

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-graduação**

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO RILUZOL
AO DANTROLENE EM RATOS SUBMETIDOS
AO TRAUMA MEDULAR AGUDO**

BERNARDO DE CARO MARTINS

BERNARDO DE CARO MARTINS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO RILUZOL AO DANTROLENE EM RATOS
SUBMETIDOS AO TRAUMA MEDULAR AGUDO**

Dissertação que foi apresentada à
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal

Área: Medicina e Cirurgia Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de
Melo

BELO HORIZONTE – MG
Escola de Veterinária - UFMG
2012

À minha família sempre presente
Aos meus amigos e todos aqueles que contribuíram com essa dissertação.....
.....dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carmen e Rogério, pela confiança e incentivo a continuar estudando não importa os obstáculos. A buscar a felicidade em tudo que formos realizar, pois só assim conseguiremos o sucesso. Ao apoio incondicional, deste a primeira opção pelo curso de Medicina Veterinária, até o início da carreira acadêmica. Obrigado, acima de tudo, por direcionar as escolhas sem controlá-las. Amo vocês!

Aos meus irmãos Carolina, Clarisse e Guilherme e Fernando, novo membro da família, pelo apoio e pela presença em todos os momentos desta jornada. Amo vocês também! À família de São Paulo (Vó Lita, Kika, Rosana, Sônia, Luiz, Mariana, Júlia, Rodrigo, Juliana, Tarcísio, Franklin e Marcelo) e de Brasília (Roberto, Maria, Magda, Juliana, Rodrigo, Ricardo) por sempre proporcionarem momentos de muita alegria quando nos encontramos. À Tia Magui e Renato por todo apoio em todos os momentos.

À professora Eliane por toda a confiança e por ter acreditado e orientado um aluno que no décimo período não sabia onde colocaria os pés.

Aos professores componentes de minha banca, Profa Milene, Profa Mônica e Prof Rubens pela disponibilidade e pela enorme contribuição à minha dissertação. Muito obrigado!

Ao pessoal do grupo da neurologia Carla, Fabíola, Isabel, Karen e Mário, por sempre estarem dispostos a ajudar nos momentos mais difíceis do meu mestrado. E ao meu grande amigo Bruno pela disposição e por ter sido um dos responsáveis pelo meu desenvolvimento e interesse na área da neurologia.

Aos meus grandes amigos da veterinária André, Balbino, Bruno (Kuririm), Carlinha, Davi (Ferrugem), Facury, Fernandinha, Gustavo (Homer), Jordana, Larissa, Luiz Paulo, Mônica, Naiara, Rafael (Quick), Renata e Stephanie pela amizade e por momentos especiais durante a graduação e pós-graduação no curso de Medicina Veterinária. E também ao Rívert por todo apoio estatístico

Aos professores da Escola de Veterinária Adriane (Tia), Alan, Fernando Bretas, Lobão, Júlio, Marília, Paulo Ricardo, Roberto Baracat, Rubens (novamente) por todo incentivo e participação em minha formação pessoal e acadêmica. À Profa Marília e Rogéria por disponibilizarem os laboratórios de toxicologia e patologia para o prosseguimento do experimento.

Ao pessoal do Hospital Veterinário Aílton, Carlos, Cleide, Cleiton, Elizeth, Erlane, Flávia, Liu, Mércio, Joaquim, Jonathan, Renan, Ronaldo que merecem todo meu respeito. Aos colegas e amigos veterinários, especialmente, Antônio, Luiz Carlos e Gleidice pelos momentos de aprendizado e companherismo no hospital veterinário.

À Empresa Cristália pelo apoio irrestrito em todos nossos projetos.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPEMIG pelos investimentos em nossos projetos de pesquisa.

LISTA DE ABREVIACÕES

AINES – Antiinflamatórios não- esteroidais

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Trifosfato de adenosina

BBB – Basso, Beatie, Bresnahan

CETEA – Comitê de Ética e Experimentação Animal

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

D – Dantrolene

DAB – Diaminobenzidina peroxidase

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico

EM – Esclerose Múltipla

EV-UFMG – Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais

FA – Fosfatase alcalina

FDA – *Food and Drug Administration*

FIA – Fator indutor de apoptose

GGT – Gama-glutamilttransferase

HE – Hematoxilina-eosina

I.P - Intraperitoneal

LMC – Lesão medular crônica

NMDA – N-Metil-D-aspartato

NMI – Neurônio Motor Inferior

NMS – Neurônio Motor Superior

PBS – *Phosphate buffer saline* (Tampão fosfato-salino)

R – Riluzol

R+D – Riluzol + Dantrolene

RYR – Receptores de rianodina

SB – Substância branca

SC - Subcutânea

SC – Substância cinzenta

SNC – Sistema Nervoso Central

TMA – Trauma medular agudo

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TUNEL – Terminal deoxybucleotidyl transferase – TdT dUTP Nick end labeling

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. FISIOPATOGENIA DO TRAUMA MEDULAR AGUDO	17
2.2. APOPTOSE X NECROSE	19
2.3. ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES MEDULARES	20
2.4. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA O TRAUMA MEDULAR AGUDO	21
2.4.1. Eritropoietina	21
2.4.2. Antiinflamatórios não-esteróides	21
2.4.3. Progesterona e Estrógeno	22
2.4.4. Magnésio	22
2.4.5. Polietilenoglicol	22
2.4.6. Fampridina	22
2.4.7. Minociclina	22
2.4.8. Dantrolene	23
2.4.9. Riluzol	24
2.5. ESTUDO EXPERIMENTAL DAS LESÕES MEDULARES	25
2.6. TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA EM RATOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. ANIMAIS	28
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
3.3. PROTOCOLOS ANESTÉSICOS E CIRÚRGICOS	29
3.4. TRATAMENTO	30
3.5. AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA	30
3.6. COLETAS DE SANGUE E ANÁLISES LABORATORIAIS	32
3.6.1. Avaliação Hematológica	32
3.6.2. Avaliação Bioquímica	32
3.7. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	32
3.8. FRAGMENTAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA TUNEL	33
3.9. MARCAÇÃO DE NEURÔNIOS ÍNTEGROS PELO ANTICORPO ANTI NEU-N	33
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1. MODELO EXPERIMENTAL DE TRAUMA MEDULAR AGUDO	34
4.2. TRATAMENTOS	34
4.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA-NEUROLÓGICA	35
4.4. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	39
4.5. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	41
4.6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	44
4.7. TUNEL	46
4.8. NEU-N	49
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO 1 – CERTIFICADO CETEA	64
ANEXO 2 – PROTOCOLO GERAL PARA IMUNOISTOQUÍMICA	65
ANEXO 3 – PROTOCOLO TUNEL	66
ANEXO 4 - ARTIGO “AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MOTORA EM CAMPO ABERTO DE RATOS SUBMETIDOS A TRAUMA MEDULAR AGUDO E TRATADOS COM ASSOCIAÇÃO DE RILUZOL E DANTROLENE”	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. A) Animal anestesiado, depilado e fixado em decúbito esternal em suporte de vidro, pronto para início dos procedimentos cirúrgicos. B) Animal anestesiado em decúbito esternal fixado em placa de vidro sobre suporte adaptado, após procedimento de antisepsia, para início da técnica cirúrgica. C) Laminectomia de T12 com drill pneumático para exposição da medula. D) Visualização da medula espinhal com aspecto normal após procedimento de laminectomia e visualização do vaso dorsal (seta). E) Trauma medular compressivo com peso de 40,5g utilizando-se aparelho estereotáxico desenvolvido na EV-UFGM. F) Visualização da medula com aspecto hemorrágico após trauma medular	31
Figura 2	Ratos Wistar em campo aberto para classificação da deambulação em escores baseado na escala BBB. Figuras 2A,B) Animais do grupo controle negativo, um dia antes da intervenção cirúrgica, classificados no escore 21. A) Animal com sustentação de peso nos quatro membros e cauda elevada. B) Animal com sustentação de peso sobre os membros pélvicos. Figuras 2C,D) Animal do grupo controle negativo após trauma medular agudo compressivo em que observa-se déficit proprioceptivo com paraparesia e cauda baixa tocando o solo, sendo, portanto classificados em escore de 0 a 7, dependendo da movimentação das articulações dos MPs.	37
Figura 3	Gráfico das medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com placebo (CP), Riluzol (R), Dantrolene (D) e Riluzol + Dantrolene (R+D)	38
Figura 4	Gráficos das médias e desvios padrão dos valores de hemácias, hemoglobina e leucócitos totais de ratos Wistar sem trauma (CN) e submetidos a trauma medular agudo e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e riluzol+dantrolene (R+D) ($P \leq 0,05$) após sete dias de tratamento	40
Figura 5	Gráficos das médias e desvios padrão dos valores plasmáticos de proteínas totais, albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2, gama e relação albumina/globulina de ratos Wistar sem trauma (CN) e submetidos a trauma medular agudo e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e riluzol+dantrolene (R+D) ($P \leq 0,05$)	42
Figura 6	Gráficos das médias e desvios padrão dos valores plasmáticos de creatinina, uréia, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e de gama glutamil-transferase de ratos Wistar sem trauma (CN)* e submetidos a trauma medular agudo e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e riluzol+dantrolene (R+D) ($P \leq 0,05$)	43
Figura 7	Fotomicroscopia de seções transversais da medula espinhal de ratos Wistar coradas em H.E em visão ampla (Fig 6A,B,C) e em detalhes mostrando detalhes das lesões (Fig 6D,E,F). A) Medula espinhal de um animal do grupo controle negativo em que observa-se morfologia normal com divisão de substância cinzenta (SC) no formato de “H” e substância branca (SB). A seta indica o canal epidurário – 25x. B) Medula espinhal de rato do grupo controle positivo da região cranial ao epicentro em que se observam áreas de malácia focal da SB (seta) e intensa degeneração axonal (asterisco) – 99,8x. C) Segmento cranial da medula espinhal de rato do grupo tratado com a associação do riluzol ao dantrolene em que se observam maior preservação da arquitetura medular e malácia da SB	45

- (asterisco) – 99,6x. D) Região de SB com degeneração walleriana em que se observam câmaras de digestão (setas) – 310x. E) Região do funículo dorsal da SB com área de malácia em que se observam aglomerados de células gitters (setas) – 308,2x. F) Região do funículo lateral da SB em que se observam formações esferóides de axônios em bainhas de mielina distendidas denominadas de balão axonais (seta) – 512,22x
- Figura 8** Fotomicroscopia de secções transversais da medula espinhal de ratos Wistar na região cranial ao epicentro da laminectomia submetidas à técnica TUNEL. Figuras 8A e C) Medulas espinhais de animais do grupo CN. A) Observar ausência de marcação de fragmentação de DNA, ou células TUNEL positivas nas substâncias branca e cinzenta – 69,4x. C) Observar corpos neuronais íntegros e ausência de marcação células TUNEL positivas (setas) – 142,9x. Figuras 8B e D) Medulas espinhais de animais do grupo controle positivo. B) Observar células TUNEL positivas em grande quantidade na região de funículo lateral da substância branca (setas) – 68,28x. D) Observar corpos neuronais marcados pela técnica TUNEL (seta) – 142,41x. E) Medula espinhal de um animal do grupo traumatizado que recebeu a associação do riluzol ao dantrolene em que são observadas poucas células TUNEL positivas (seta) – 72,79x. **47**
- Figura 9** Gráficos das médias e desvios padrão do número de células neurais TUNEL-positivas por campo, em medula Espinhal de ratos Wistar nos segmentos cranial, epicentro e caudal sem trauma (CN- controle negativo) e traumatizadas e tratadas com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e associação do riluzol ao dantrolene (R+D). Letras minúsculas distintas expressam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). **48**
- Figura 10** Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos Wistar submetidos à imunistoquímica com anti-NeuN. Figuras 10A,G) Medula espinhal de um animal do grupo controle negativo na região cranial adjacente ao epicentro da laminectomia . A) Observar a imunomarcação de corpos neuronais (NeuN- positivos) distribuídos por toda substância cinzenta – 13,99x. G) Observar corpo neuronal íntegro com o núcleo e citoplasma NeuN- positivos (seta) -1000x. Figuras 10B,D) Medulas espinhais de animais do grupo controle positivo na região cranial adjacente ao epicentro da laminectomia. B) Observar perda da arquitetura normal da medula com regiões de malácia e menor número de células NeuN-positivas – 100x. D) Observar perda da arquitetura com intensa área de malácia e escassez de imunomarcação de neurônios (círculo) – 250x. Figuras 10C,,F) Medulas espinhais de animais do grupo traumatizado tratados com a associação do riluzol ao dantrolene em região cranial adjacente ao epicentro. C) Observar células NeuN-positivas em grande quantidade – 6,21x. F) Observar grande quantidade de células NeuN-positivas – 145,7x. Figura 10E) Medula espinhal de rato na região de epicentro do grupo tratado com a associação do riluzol ao dantrolene em que se observa-se moderada quantidade de células NeuN-positivas (círculo) adjacentes à região de malácia (asterisco) – 250x **50**
- Figura 11** Gráficos das médias e desvios padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em medula Espinhal de ratos Wistar nos segmentos epicentro e adjacentes (caudal e cranial) do grupo sem trauma (CN- controle negativo) e de grupos traumatizados e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e associação do riluzol ao dantrolene (R+D). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). **51**

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 1	Escores e características locomotoras dos membros pélvicos (MPs) segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da capacidade motora de ratos após trauma medular torácico agudo.	27
Quadro 2	Distribuição dos ratos nos diferentes grupos e protocolos de tratamento após laminectomia (CN) e trauma medular compressivo (CP, R, D, R+D).	29
Tabela 1	Medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, aos sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) ou riluzol+dantrolene (R+D).	38

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da associação do riluzol ao dantrolene em ratos submetidos ao trauma medular agudo experimental. Foram utilizados 29 ratos machos adultos da variedade Wistar com peso médio de 350g divididos em cinco grupos: CN (Controle negativo), CP (Controle positivo), R (riluzol 4 mg/kg), D (dantrolene 10 mg/kg) e R+D (riluzol 4 mg/kg + dantrolene 10 mg/kg). À exceção do grupo CN, que foi submetido apenas à laminectomia de T12, todos os outros grupos foram submetidos à laminectomia de T12 e posteriormente ao trauma medular agudo compressivo, utilizando-se aparelho estereotáxico, com peso de 40,5g, durante cinco minutos. Quinze minutos após a laminectomia os grupos CN, CP e D receberam placebo,i.p, e R e R+D riluzol,i.p. Após 1 hora a laminectomia, os grupos CN, CP e R receberam placebo,i.p, e os grupos D e R+D dantrolene,i.p. Os animais foram submetidos à avaliação clínica-neurológica, diariamente durante os sete dias subseqüentes ao trauma, para observação da função motora em campo aberto e classificação conforme escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan. Após oito dias os animais foram eutanasiados e amostras de sangue, para análises hematológicas e bioquímicas, e da medula espinhal, para avaliação histológica, imunoistoquímica (anti-NeuN) e TUNEL, foram coletadas. Os animais submetidos ao trauma apresentaram paraparesia não ambulatória e apenas o grupo R+D demonstrou recuperação motora após os sete dias de avaliação pelo teste BBB ($P<0,05$). Não houve diferença estatística entre os valores dos perfis hematológico e bioquímico, com exceção dos valores de uréia que se apresentaram mais elevados nos grupos traumatizados. A contagem de células marcadas com anti-NeuN demonstrou maior número de neurônios íntegros nos animais que receberam os tratamentos, principalmente nos animais que receberam a associação de riluzol e dantrolene ($P<0,05$). Na técnica TUNEL observou-se menor número de células apoptóticas nos animais dos grupos R, D e R+D quando comparados ao grupo CP, sem que, contudo, fosse observada diferença entre a associação e a monoterapia. De acordo com esses resultados conclui-se que a associação do riluzol ao dantrolene sódico nas doses de 4mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, promoveu efeito neuroprotetor em ratos submetidos ao trauma medular agudo, associado à melhora da função motora e diminuição da apoptose neural.

Palavras-chave: trauma medular agudo, riluzol, dantrolene, NeuN, TUNEL, rato

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the association effect of riluzole and dantrolene in the spinal cord injured rats. Twenty nine male Wistar rats, 350 g, were randomly distributed into five groups: CN (Sham), CP (Placebo), R (Riluzole, 4mg/kg), D (Dantrolene, 10mg/kg) and R+D (Riluzole 4mg/kg + Dantrolene 10mg/kg). All animals underwent laminectomy of T12 and, except CN, to an acute spinal cord compressive trauma, using a stereotaxic device with a 40,5g rod for five minutes. Fifteen minutes after the laminectomy, CN, CP and D received placebo, i.p, and R, R+D, riluzole, i.p. One hour after the laminectomy, CN, CP and R received placebo, i.p, and D and R+D, dantrolene, i.p. Neurologic examination, performed daily for seven days, of the animals consisted of Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) test for the evaluation of motor function. After eight days the animals were euthanized and blood samples for hematological and biochemical analysis, and spinal cord, for histological, immunohistochemical (anti-NeuN) and TUNEL evaluation, were collected. Traumatized animals showed no ambulatory paraparesis and only the R+D group showed motor recovery after seven days of evaluation by BBB test ($P < 0,05$). There was no statistical difference between the values of hematologic and biochemical profiles, with the exception of urea values that were higher in traumatized animals. The counting of cells stained with anti-NeuN showed a higher number of intact neurons in treated animals, mainly on those that received R+D ($P < 0,05$). In the TUNEL technique a lower number of apoptotic cells were observed in R, D and R+D groups compared with CP. Meanwhile no difference in the number of apoptotic cells were observed between R+D and R, D. According to these results we concluded that the association of riluzole and dantrolene, 4mg/kg and 10mg/kg respectively, promoted synergistic neuroprotective effects in spinal cord injured rats, associated with improvement of motor function and decreased of the neural apoptosis.

Keywords: acute spinal cord injury, riluzole, dantrolene, NeuN, TUNEL, rat

1- INTRODUÇÃO

Estima-se que a cada ano ocorrem 130.000 novos casos de trauma medular na medicina humana (Thuret et al., 2006). A ocorrência desse trauma gera perda de vidas, sofrimento e repercussões econômicas e suas sequelas representam, além da incapacidade locomotora, perda do controle sensorial, urológico, fecal e sexual (Yeziarski, 2005; Hagg e Oudega, 2006, Hagen et al., 2010).

Na medicina veterinária, os traumas medulares são um dos problemas neurológicos mais comuns em animais domésticos, apesar de sua incidência real não ser bem documentada (Braund, 2003). Estão comumente associados a acidentes e quedas, além de alterações degenerativas do disco intervertebral. O trauma medular pode ocasionar disfunções e complicações em diversos órgãos e sistemas, causando impacto na vida de indivíduos por meio de déficits neurológicos graves e de longa duração (Araújo, 2005; Hagg e Oudega, 2006).

Para um melhor entendimento dos mecanismos patofisiológicos dessas lesões, diferentes modelos são utilizados para reproduzir experimentalmente a lesão medular aguda e um dos mais empregados é o trauma compressivo por peso em ratos (Basso et al., 1996; Carlson et al., 1998; Farooque, 2000; Torres et al., 2010b).

A lesão contusa traumática aplicada à medula espinhal ocasiona déficits neurológicos por mecanismos primários e secundários. Os mecanismos primários, irreversíveis, devem-se à ruptura mecânica imediata de vias neurais e vasos sanguíneos que ocorre imediatamente após o trauma. Os mecanismos secundários são uma resposta do organismo ao trauma inicial que exacerbam a injúria inicial. Ocorrem imediatamente após os mecanismos primários e podem persistir por meses ou anos. Caracterizam-se por uma cascata fisiopatológica de eventos vasculares, bioquímicos e eletrolíticos que, coletivamente, resultam em redução do fluxo sanguíneo, isquemia, necrose e ativação de mecanismos de apoptose do tecido nervoso espinhal adjacente (Lu et al.,

2000; Braund, 2003; Park et al., 2004; Hagg e Oudega, 2006; Weeb et al., 2010; Oyibo et al., 2011). A abordagem terapêutica precoce é muito importante para se obter melhor recuperação neurológica, já que os mecanismos secundários iniciam-se quase que imediatamente após o trauma inicial (Know et al., 2009).

O desequilíbrio dos níveis intracelulares de sódio e cálcio é um dos principais mecanismos da patogênese dos efeitos secundários do trauma medular agudo (Schwartz et al, 2001; Liu et al, 2011). O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), se liga em seus receptores ionotrópicos nos canais iônicos de cálcio e sódio permitindo suas aberturas. Após trauma inicial ocorre grande liberação de glutamato na fenda sináptica pelas células nervosas adjacentes. Esse acúmulo de glutamato permite grande influxo desses íons, do meio extracelular para o citoplasma, o que acarreta em morte celular. Tal mecanismo é conhecido como excitotoxicidade (Liu et al., 1999; Xu et al., 2004).

O influxo massivo de cálcio e sódio representa uma importante via para morte neuronal devido aos seus efeitos deletérios incluindo, disfunção da fosforilação oxidativa mitocondrial, ativação de óxido nítrico sintase, de fosfolipases C e A2 e de calpaínas e caspases que contribuem para a transdução do sinal apoptótico (Lu et al., 2000; Hall e Springer, 2004). Além disso, o acúmulo de sódio e, conseqüentemente, de água no citoplasma pode resultar em morte celular por lise e ruptura da membrana plasmática (Schwartz et al., 2001).

A lesão medular ocasiona déficits neurológicos devido a dois mecanismos de morte neuronal: necrose e apoptose (Beattie et al., 2000). A necrose é um processo passivo que ocorre imediatamente após o trauma em que há intensa resposta inflamatória. Já a apoptose é um processo ativo mais tardio em que ocorrem alterações morfológicas nas células que culminam em fagocitose (Raff, 1998; Lou et al., 2000).

Apesar dos efeitos devastadores e da gravidade, o trauma medular,

geralmente, não resulta em ruptura completa das fibras axonais e/ou corpos neuronais o que permite aplicação e desenvolvimento de terapias farmacológicas (Rabchvsky et al., 2011). No entanto, após décadas de pesquisas ainda não se descobriu um tratamento farmacológico efetivo para as injúrias espinhais agudas ou crônicas (Onose et al., 2009; Rabchvsky et al., 2011).

O riluzol (2-amino-6-trifluorometoxi-benzotiazole) é o fármaco aprovada pela *U.S. Food and Drug Administration* na medicina humana para pacientes que apresentam esclerose amiotrófica lateral (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996; Wokke, 1996; Meininger et al. 2000). Há relatos de que possui efeito neuroprotetor, pois atua no bloqueio de canais iônicos voltagem dependentes de sódio e cálcio e em canais iônicos glutamatérgicos do tipo NMDA, permeáveis ao íon cálcio, inibindo a neurotransmissão do glutamato e dos efeitos deletérios do influxo massivo desses íons para o citoplasma celular (Huang et al., 1997; Lang-Lazdunski et al., 1999). Possui poucos efeitos colaterais como sedação leve e mais raramente disfunção hepática. Alguns desses efeitos podem ficar mais pronunciados em uma dose acima de 8 mg/kg. (Morris et al., 1986; Castells et al., 1998).

O dantroleno sódico é um derivado da hidantoína que bloqueia a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e por isso acredita-se que proteja as células neuronais de lesões secundárias que são desencadeadas pelo acúmulo de cálcio intracitoplasmático (Krause et al., 2004; Aslan et al., 2009, Torres et al., 2010a). É um fármaco que vêm sendo estudado por Costa (2010); Torres et. al. (2010^a); Rosado (2011¹) sendo seguro com mínimos efeitos colaterais, quando utilizado em doses terapêuticas. Os efeitos indesejáveis podem ocorrer com administração de dose única excessiva ou pelo uso crônico (Krause et al., 2004).

Neste contexto, a associação do riluzol ao dantroleno poderia ter efeito sinérgico no tratamento de lesões medulares agudas e diminuir significativamente a morte neuronal, pois ambos possuem ação neuroprotetora e sítios diferentes de atuação. Tal associação poderá, portanto, ser uma opção para o tratamento do trauma medular agudo.

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da associação de riluzol e dantroleno administrados minutos após o trauma medular agudo experimental em ratos por meio da avaliação motora em campo aberto, da hematologia, da bioquímica plasmática, histopatologia, imunoistoquímica (NeuN) e TUNEL.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiopatologia do trauma medular agudo

A compreensão da complexidade dos mecanismos de lesão no trauma medular agudo (TMA) é essencial para um planejamento terapêutico adequado em que se visa estimular a regeneração axonal, controlar os mecanismos degenerativos da lesão secundária e gerar novas células neurais (Webb, 2010; Oyibo, 2011).

O TMA pode ocorrer por fatores intrínsecos e extrínsecos resultando em lesão na coluna vertebral, na medula espinhal ou em ambas. Os fatores extrínsecos incluem os atropelamentos, quedas, chutes e pisoteios, mordidas e armas de fogo (Bagley, 2000). Já as causas intrínsecas compreendem a protrusão e extrusão do disco intervertebral, malformação vertebral, fraturas patológicas devido à osteopenia, osteomielite e massas compressivas extramedulares, como abscessos e neoplasias.

Independente da causa inicial o TMA resulta em mecanismos de lesão à medula espinhal, que podem ser divididos nas fases aguda, subaguda e crônica que se sobrepõem durante o desenvolvimento da lesão (Chacón e Nieto-Sampietro, 2005; Oyibo, 2011). A fase aguda, ou lesão primária, ocorre no momento do TMA e corresponde à injúria física irreversível à

¹ Comunicação pessoal

medula espinhal resultante de lacerações, contusões, compressões e tração do tecido nervoso (Amar, 2007). No local inicial da lesão, ou epicentro, ocorre ruptura mecânica de axônios e vasos sanguíneos e morte celular imediata de neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e células endoteliais. Alguns desses eventos permanecem ativos durante as fases subaguda e crônica por semanas a meses após o trauma inicial (Donnelly e Popovich, 2008; Fehlings e Nguyen, 2010).

Durante a fase aguda ocorre ativação da cascata do complemento e massiva infiltração de neutrófilos no local da lesão (Hagg e Oudega, 2006; Donnelly e Popovich, 2008). A injúria vascular e a inflamação resultam em hemorragia, edema e isquemia locais e na presença de hipóxia e hipoglicemia, o metabolismo torna-se anaeróbico instalando-se a acidose láctica. O conjunto desses eventos resulta em necrose hemorrágica central da substância cinzenta que se inicia dentro de quinze minutos ao trauma (Bergman, et al., 2000; Yezierski, 2005; Choo et al., 2007; Fehlings e Nguyen, 2010).

O processo isquêmico e a liberação de substâncias tóxicas dos neurônios acometidos permitem uma despolarização desordenada e início de uma cascata de eventos da injúria secundária, responsável pela expansão da lesão primária (Liu, 1997; Beattie et al., 2000; Hall e Springer, 2004; Know et al., 2004; Liverman et al., 2005; Hagg e Oudega, 2006; Amar, 2007; Xiong et al., 2007; Oyinbo, 2011).

A lesão secundária inicia-se minutos após a injúria e pode permanecer por semanas ou meses. Resulta de alterações da concentração iônica local, da perda da regulação das pressões sistêmica e local, da redução do fluxo sanguíneo espinhal, da maior produção de radicais livres, do desequilíbrio de metaproteínas ativadas e da liberação de neurotransmissores excitatórios. Esses efeitos secundários determinam a perda progressiva de neurônios e oligodendrócitos próximo ao local da injúria, associada à desmielinização, reação astrocitária, proliferação da microglia e apoptose neural

(McTigue, 2008; Paterniti et al., 2009; Simon et al., 2009; Webb et al., 2010).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC que é liberado após TMA (McAdoo et al., 1999; Xu et al., 2005). Em condições normais é rapidamente removido da fenda sináptica pelos neurônios pré-sinápticos e pelos astrócitos. Entretanto, quando ocorre uma lesão medular aguda, sua concentração extracelular se torna elevada estimulando excessivamente os receptores NMDA e AMPA, permitindo o desequilíbrio iônico. Esse mecanismo, denominado de excitotoxicidade, ocasiona apoptose das células neurais (Lu et al., 2000; Xu et al., 2005; McTigue, 2008). A ativação dos receptores AMPA acarreta, primeiramente, em influxo citoplasmático de sódio, apesar de alguns subtipos serem permeáveis ao íon cálcio (Agrawal e Fehlings, 1997; Amar, 2007). Já os receptores NMDA medeiam principalmente a entrada de cálcio para o citoplasma. Associado a ativação dos canais iônicos quimicamente dependentes, ocorre ativação dos canais iônicos voltagem dependentes de cálcio e sódio que aumentam, ainda mais, a concentração intracitoplasmática desses íons e predisõem as células aos efeitos deletérios desse acúmulo. Além disso, as concentrações intracitoplasmáticas de cálcio podem aumentar com a ativação dos receptores de rianodina no retículo endoplasmático e liberação das reservas intracelulares (Ruiz et al., 2010; Torres et al., 2010a).

Provavelmente, as conseqüências mais importantes da lesão secundária são representadas pelo acúmulo intracitoplasmático de íons cálcio que inicia vários efeitos deletérios (Schwartz et al., 2001; Xiong et al., 2007). Ocorre disfunção mitocondrial que determina falhas no metabolismo aeróbico e acúmulo de lactato, ativações mitocondrial e citoplasmática do óxido nítrico sintetase e da produção de óxido nítrico, e ativação da fosfolipase A2 que libera ácido aracdônico. Este por sua vez, é convertido pelas ciclooxigenases em um grande número de prostanóides deletérios como a prostaglandina F_{2α} e o tromboxano A₂ e pelas lipoxigenases em

leucotrienos. Além disso, ocorre ativação de proteases que participam do processo de apoptose (Hall e Springer, 2004). O aumento intracelular de sódio também ocasiona efeitos deletérios às células devido ao acúmulo secundário de água e posterior ruptura e morte celular (Schwartz et al., 2001; Know et al., 2004). Os neurônios e os oligodendrocitos são particularmente mais sensíveis ao glutamato, pois possuem mais receptores expressos em suas membranas (Know et al., 2004).

As respostas inflamatória e imunológica que ocorrem após TMA envolvem componentes celulares, como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T, e não celulares como as citocinas, prostaglandinas e sistema do complemento (Fehlings e Nguyen, 2010). O epicentro da lesão espinhal é preenchido rapidamente por infiltrado neutrofílico que secreta enzimas líticas e citocinas que podem lesar o tecido e recrutar outros componentes inflamatórios (Popovich et al., 1997). A ativação da microglia e recrutamento de monócitos e macrófagos resultam em fagocitose do tecido lesado (Liverman et al., 2005). Essas células produzem citocinas como o TNF-alfa, interleucinas e interferons que medeiam a resposta inflamatória e podem contribuir para lesão do tecido neural (Bartholdi e Schwab, 1997; Klusman e Schwab, 1997). Schwartz e colaboradores (2006) observaram que o controle dessa resposta imune inata e adquirida é essencial para o reparo neural.

Outro processo patológico bem caracterizado que ocorre após o TMA é a formação de radicais livres de oxigênio e nitrogênio que ocasionam peroxidação lipídica e lesão de proteínas e ácidos nucléicos (Sakamoto et al., 1991; Xu et al., 2005; Xiong et al., 2007; Wu et al., 2009). Além de lesar a membrana neural, a formação de radicais livres também participa de mecanismos de lesão do citoesqueleto e de organelas. Na peroxidação lipídica, os radicais livres absorvem um elétron da molécula lipídica que se torna menos estável e desencadeiam reações que levam à lise da membrana e morte celular por necrose. O envolvimento dos radicais livres na lesão medular aguda é

particularmente relevante já que a inibição da peroxidação lipídica representa um dos alvos principais dos agentes neuroprotetores (Know et al., 2004; Xiong et al., 2007).

As fases aguda e subaguda se resolvem em dias, semanas ou meses após lesão inicial e a fase crônica pode se estender por anos. Durante a fase crônica, os processos degenerativos da medula espinhal continuam expandindo a lesão primária. Há início também da neuroplasticidade pela qual ocorre alteração e formação de novos circuitos neuronais (Oyinbo, 2011).

O TMA também ocasiona efeitos deletérios sistêmicos como choque neurogênico, bradicardia, e hipotensão que contribuem para a lesão da medula espinhal (Krassioukov e Claydon, 2006; Guly et al., 2008). Guizar-Sahagun e colaboradores (2004) demonstraram que a pressão arterial sanguínea diminui drasticamente após transecção do segmento T9 em ratos adultos.

Os resultados das lesões primárias e secundárias se traduzem pela perda da transmissão de impulsos neuronais resultando em alterações iônicas, desmielinização, isquemia, necrose e apoptose (Liu, 1997; Beattie et al., 2000; Hall e Springer, 2004; Know et al., 2004; Liverman et al., 2005; Hagg e Oudega, 2006; Xiong et al., 2007; Oyinbo, 2011).

2.2 Apoptose X Necrose

O TMA causa lesão medular espinhal devido a mecanismos primários, resultantes do trauma inicial, e secundários que aumentam a extensão da lesão. Acreditava-se que a injúria secundária estava relacionada apenas a morte celular por necrose, mas atualmente sabe-se que uma série de eventos celulares e moleculares induz a morte celular ativa, minutos a dias após a lesão inicial por mecanismos apoptóticos (Beattie et al., 2000).

Apoptose, morte celular programada, tem um papel muito importante na lesão secundária do trauma

medular agudo. Pode ser iniciada por vários mecanismos incluindo a excitotoxicidade glutamatérgica, radicais livres, citocinas e processos inflamatórios (Beattie et al., 2000; Lu et al., 2000).

É um processo bioquímico que envolve as vias intrínseca (mitocôndria-dependente), extrínseca (mediada por receptores transmembranais) e caspases independente (Kawaguchi et al., 2005). A via intrínseca é caracterizada pela liberação de citocromo *c* da mitocôndria, mediada pelo desbalanço de fatores pró e antiapoptóticos como Bax e Bcl-2, respectivamente. O citocromo *c* associado ao fator protease ativador da apoptose (Apaf-1) e à procaspase-9 formam um complexo chamado de apoptossoma. Esse complexo ativa a caspase-9 que resulta na posterior ativação de caspases efetoras incluindo a caspase-3 (Green, 1998; Kawaguchi et al., 2005). A via extrínseca pode ser iniciada com a ativação de receptores transmembranas, como o FasL e TNF- α , que resulta na clivagem e ativação da procaspase-8 em caspase-8. Esta, por sua vez, participa da ativação de caspases efetoras resultando na apoptose (Yu et al., 2009). Há também uma comunicação entre essas duas vias em que a caspase-8 ativa a liberação do fator pró-apoptótico Bid que sinaliza a liberação de citocromo *c* pela mitocôndria e ativa a via intrínseca (Majno e Joris, 1995). A via caspase independente é iniciada pela liberação do fator indutor da apoptose (FIA) pela mitocôndria que determina a ativação da apoptose (Zheng et al., 2003).

Morfologicamente, a apoptose, um processo ativo de destruição celular, pode ser caracterizada pela contração citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA internucleossomal e formações de corpos apoptóticos e núcleo picnóticos (Lu et al., 2000; Springer, 2001). Ocorrem também alterações na membrana celular, devido à movimentação de moléculas de fosfolípídeos para a superfície, que possibilitam o rápido reconhecimento e remoção dessas células por fagócitos sem que ocorra uma resposta inflamatória concomitante (Raff, 1998; Lou et al., 2000).

O processo de necrose é caracterizado por um processo passivo de tumefação celular, intenso dano mitocondrial com rápida perda de energia e desequilíbrio da homeostase. Nesse processo há ainda lise da membrana celular com liberação de componentes intracelulares e ativação de um significativo processo inflamatório (Lu et al., 2000; Springer, 2001).

2.3 Alterações clínicas e localização das lesões medulares

As espécies domésticas são frequentemente acometidas por várias afecções neurológicas, dentre elas o trauma medular. Muitas dessas situações quando não comprometem a qualidade de vida do animal, acabam evoluindo para a morte ou eutanásia (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005).

Em cães, o canal vertebral é relativamente estreito comparado com o diâmetro da medula, especialmente na região toracolombar e com isso os traumas toracolombares tendem a causar lesões medulares mais graves que os cervicais. A região tóraco-lombar é a mais instável da coluna vertebral do cão, sendo a região de maior ocorrência de discopatias, fraturas e luxações (Bergman et al., 2000).

Em cães e gatos a coluna vertebral é composta de sete vértebras cervicais, 13 torácicas e sete lombares seguidas pela fusão das vértebras sacrais e por um número variado de coccígeas. No entanto, o número de segmentos medulares é diferente e, em alguns pontos a medula espinhal, não corresponde à vértebra de mesma conotação. O canal cervical contém oito segmentos espinhais cervicais, mas sete vértebras cervicais. Como consequência, todos os segmentos medulares caudais à vértebra C7, deixam o canal medular por suas raízes nervosas caudal à vértebra de mesma conotação. Os segmentos medulares lombares apresentam uma maior discrepância quando comparados à posição das vértebras. Toda a região do plexo lombar, representado pelos segmentos L4-S3, está contida entre as vértebras L4-L5 no cão e L5-L6 no gato (De lahunta e Glass, 2009; Parent, 2010).

A medula espinhal pode ser subdividida de acordo com os segmentos medulares em quatro regiões principais: C1-C5, C6-T2, T3-L3 e L4-S3. Lesões nos segmentos C6-T2 e L4-S3, correspondentes aos plexos braquial e lombosacral respectivamente, vão originar sinais clínicos de neurônio motor inferior (NMI) para os membros que inervam e de neurônio motor superior (NMS) para os membros situados caudalmente à lesão. Já lesões nas regiões C1-C5 e T3-L3 vão resultar em lesões de NMS para os quatro membros e para os membros pélvicos, respectivamente (Parent, 2010).

Lesões que envolvem os NMS ocasionam vários graus de paresia/paralisia espástica, exacerbação dos reflexos miotáticos e atrofia muscular crônica por desuso. Já a paresia/paralisia ocasionada por lesões dos NMI é flácida e envolve uma atrofia aguda neurogênica associada à hipotonia e hiporreflexia (Thomas, 2000; Parent, 2010)

Clinicamente existe uma sequência em que os sinais neurológicos geralmente se manifestam baseados na anatomia e na organização das fibras da medula espinhal. Os tratos que carregam as informações sensitiva e motora da propriocepção são mais sensíveis às lesões medulares, pois são compostos por fibras axonais mais espessas que correm superficialmente na substância branca. Já as fibras que participam da transmissão da nocicepção são menores e mais internas. Com isso intensidades diferentes de lesões espinhais podem originar sinais clínicos e prognósticos diferentes. Ataxia propioceptiva e déficit propioceptivo são as primeiras características a serem observadas, seguida de perda da função motora e das sensibilidades superficial e profunda. Deste modo, a percepção da dor profunda constitui o teste prognóstico mais importante do exame neurológico e é um indicador confiável da integridade fisiológica da medula espinhal (Wheeler e Sharp, 2005).

Os resultados dos testes comportamentais em ratos, após trauma medular experimental, são relacionados

com as alterações histológicas em que a gravidade dos déficits neurológicos está diretamente relacionada à gravidade da lesão em ratos. Portanto, o conhecimento da função e localização das vias sensitivas e motoras da medula auxilia na determinação da gravidade da lesão medular (Basso et al., 1996; Cao et al., 2005).

2.4 Terapias farmacológicas para o trauma medular agudo

2.4.1 Eritropoetina

A eritropoietina (EPO) é um fator de crescimento eritropoiético produzido nos rins e no fígado de fetos que estimula a proliferação e diferenciação de precursores eritróides. Também é produzido no SNC onde exibe efeitos não hematopoiéticos com potencial ação neurotrófica e neuroprotetora (Jelkmann, 1992; Dame et al., 2001; Erbayraktar et al., 2003; Xiong et al., 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram efeito neuroprotetor e antiapoptóticos após TMA (Arishima et al., 2006; Won et al., 2007; Huang et al., 2009), embora seu exato mecanismo de ação não seja bem conhecido (Know et al., 2009; Xiong et al., 2011). Acredita-se que os efeitos neuroprotetores possam ser decorrentes da inibição de radicais livres e da liberação de aminoácidos excitatórios (Kaptanoglu et al., 2004; Yazihan et al., 2008; Rabchevsky et al., 2011). Pode ser administrada na dose de 1.000 UI/kg a 5.000 UI/kg pelas vias intraperitoneal ou endovenosa (Kontogeorgakos et al., 2009). Ensaio clínico na fase três estão sendo realizados para avaliar a eficácia e segurança da eritropoetina no TMA (Rabchevsky et al., 2011).

2.4.2 Antiinflamatórios não-estereoidais (AINES)

São utilizados desde 1980 quando observou-se a importância do processo inflamatório na cascata da lesão medular secundária ao TMA (Know et al., 2009). A indometacina é o AINES mais amplamente estudado e já foi utilizado em doses que variaram de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Outros AINES que estão sendo pesquisados para o TMA incluem BW755C, *celebocid*, SC58125, NS-398, naproxeno, aspirina e

ibuprofeno. Resultados mais promissores são relatados com a utilização do ibuprofeno, pois, além da melhora acentuada da função motora e dos aspectos histológicos, foi observada, também, regeneração axonal (Fu et al., 2007; Wang et al., 2009).

2.4.3 Progesterona e Estrógeno

A progesterona pode alterar as expressões genéticas e protéica, a morfologia celular e a expressão de receptores e de neurotransmissores na medula espinhal traumatizada, além de diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica e apresentar propriedades antioxidantes. A dose pode variar de 4 mg/kg a 16mg/kg e os estudos não encontraram resultados consistentes em animais traumatizados que receberam este tratamento (Know et al., 2009). Thomas et al. (1999) observaram recuperação da substância branca com melhora significativa da função motora. No entanto, ausência de alterações histológicas e recuperação motora também foram observadas por Fee et al. (2007).

O papel do estrógeno como agente neuroprotetor foi mais discutido por Know et al. (2009) que observaram diminuição do dano tecidual secundário, redução no acúmulo de macrófagos e células da micróglia e diminuição da apoptose neural, principalmente quando o estrógeno foi utilizado como pré-terapia ao trauma.

2.4.4 Magnésio

O magnésio, um componente funcional de enzimas envolvidas na síntese protéica, no consumo e produção de ATP e no metabolismo de lipídeos e ácidos nucleicos, foi utilizado com sucesso em lesões encefálicas isquêmicas, pois atua inibindo os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Devido a esta característica alguns estudos relatam sua utilização para o tratamento do trauma medular agudo, tanto na forma de sulfato quanto de cloridrato. Utilizado na dose de 600 mg/kg em ratos, o magnésio pode inibir a ativação de caspase-3, exercendo ação antiapoptótica, e diminuir a peroxidação lipídica,

melhorando a função neurológica (Wiseman et al., 2009; Know et al., 2010).

2.4.5 Polietilenoglicol

Possui propriedades fusogênicas bem descritas e vem sendo avaliado como agente neuroprotetor devido ao seu efeito na regeneração axonal na dose de 1g/kg. Foi utilizado em ensaios clínicos em cães paraparéticos devido à discopatia em que se observou melhor recuperação destes animais quando comparado ao grupo controle positivo (Laverty et al., 2004). No entanto, resultados que demonstrem seu efeito neuroprotetor são controversos na literatura (Baptiste et al., 2009; Know et al., 2009).

2.3.6 Fampridina

A fampridina (4-aminopiridina) é um bloqueador específico dos canais de potássio voltagem dependente em axônios desmielinizados que foi utilizada em alguns ensaios clínicos em pacientes acometidos por esclerose múltipla (EM) ou lesão medular crônica (LMC) (Hayes et al., 2003; Hayes, 2004). Resultados preliminares demonstraram resultados não muito promissores na diminuição dos sinais clínicos tanto na EM quanto na LMC (Hayes, 2004). No entanto, estudos mais recentes demonstraram melhora na deambulação de pacientes com EM (Kachuck, 2009) e redução da espasticidade em pacientes acometidos por LMC (Cardenas et al., 2007). Um ensaio clínico na fase três está sendo realizado para avaliar redução da espasticidade no TMC e modulação de funções autonômicas como controle urinário, intestinal e função sexual (Rabchevsky et al., 2011).

Altas dosagens podem ocasionar vertigem, náusea, insônia, dor de cabeça, agitação e em alguns casos crises epiléticas (Rabchevsky et al., 2011).

2.3.7 Minociclina

A minociclina, tetraciclina modificada quimicamente, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e promover neuroproteção de neurônios, oligodendrócitos e componentes da

substância branca em modelos experimentais *in vivo* de isquemia encefálica (Fox et al., 2005; Nagel et al., 2008) e de TMA (Hoang et al., 2008; Marchand et al., 2009). Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da inflamação e excitotoxicidade demonstrando efeitos antiapoptóticos (Tikka et al., 2001; Stirling et al., 2005; Yune et al., 2007).

É uma droga aprovada pela FDA que possui poucos efeitos colaterais não indicada ainda para o tratamento do TMA. No entanto, ensaios clínicos, nas fases 1 e 2, estão sendo realizados para assegurar a eficácia e segurança desse medicamento no TMA (Rabchevsky et al., 2011).

2.8 Dantrolene

O dantrolene (1-[[[5-(4-nitrofenil)-2-furanil] metil] amino]-2,4-imidazolidinedione sódio sal hidratado) é utilizado clinicamente para o tratamento de espasticidade muscular (Dykes, 1975; Krause et al., 2004), síndrome neuroléptica maligna (Hadad et al., 2005) e acidentes vasculares encefálicos (Hadad et al., 2005). É também o único agente químico disponível para o tratamento eficaz da hipertermia maligna em humanos desde 1982 em que Kolb et al. realizaram um estudo em 65 hospitais do Estados Unidos demonstrando significativa redução na mortalidade de pacientes que sofriam de hipertermia maligna e que foram tratados com o dantrolene.

O dantrolene foi originalmente sintetizado por Snyder e colaboradores em 1967 (Snyder et al., 1967). É um fármaco derivado da hidantoína que bloqueia a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, pela inibição de receptores de rianodina (RYR) expressos em sua membrana, impedindo a liberação de cálcio para o citoplasma e, conseqüentemente, a contração do músculo esquelético. Três diferentes isoformas são identificadas em diversos tecidos presentes no músculo esquelético (RYR1), no músculo cardíaco (RYR2) e no tecido nervoso (RYR3) (Krause et al., 2004; Saadet e Huafeng, 2010). O dantrolene age mais especificamente nas isoformas RYR1 e RYR3 não ocasionando, portanto,

alterações na musculatura do miocárdio (Saadet e Huafeng, 2010).

Estudos prévios demonstraram o efeito neuroprotetor em vários modelos de isquemia e injúrias encefálicas traumáticas (Frandsen e Schousboe, 1991; Zhang et al., 1993; Wei e Perry, 1996; Wei et al., 2000; Yano et al., 2001; Nakayama et al., 2002; Popescu et al., 2002; Li et al., 2005; Mori et al., 2005; Gwak et al., 2008), em trauma medular agudo *in vitro* (Thorell et al., 2002), em modelos de injúrias medulares induzidas por isquemia/reperfusão (Kocogullari et al., 2008), em modelos de trauma medular agudo contra estresse oxidativo (Aslan et al., 2009) e apoptose (Torres et al., 2010a). Também já foram demonstradas propriedades antioxidantes (Büyükkuroglu et al., 2001; Uçüncü et al., 2005), antiinflamatórias (Büyükkuroglu, 2002) e antiepilépticas (Yoshida e Sakai, 2006). Além disso, Torres et al. (2011) demonstraram que o dantrolene também protege a bexiga de injúrias resultantes do trauma medular agudo em ratos.

É uma substância altamente lipofílica que após diluição deve ser utilizada em um período máximo de 6 horas. É metabolizado pelo sistema microsomal hepático em 5-hidroxicantrolene e excretado, principalmente, pela urina e bile (Leitman et al., 1974; Dykes, 1975).

Os efeitos colaterais mais comuns do dantrolene resultam de seu uso crônico e podem ser manifestados como: euforia, tontura, sonolência, dor de cabeça, anorexia e náusea (Dykes, 1975; Flewellen et al., 1983). A utilização crônica também pode estar associada à disfunção hepática, o que raramente ocorre em baixas dosagens (Javed e Bogdanov, 2010; Kim et al., 2011). Raramente, observa-se fadiga, fraqueza e dermatoses (Dykes, 1975; Mowbray et al., 2009). Insuficiência respiratória grave também já foi relatada (Javed e Bogdanov, 2010).

2.9 Riluzol

O Riluzol (2-amino-6-trifluorometoxi-benzotiazole), um antiepiléptico benzotiazole, é a droga aprovada pela *U.S Food and Drug Administration*, na dose de 100-200mg/kg, para o tratamento da esclerose amiotrófica lateral em humanos desde 1995 (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996; Wokke, 1996; Meininger et al., 2000). É também considerada uma droga com efeitos neuroprotetores, pois inibe os canais iônicos de sódio e cálcio (Benoit et al., 1991; Huang et al., 1997), ativa uma nova classe de canais iônicos de potássio (Fink et al., 1998) e bloqueia a neurotransmissão glutamatérgica no sistema nervoso central pelo bloqueio não competitivo de receptores NMDA (Martin et al., 1993; Doble, 1996).

O riluzol é metabolizado principalmente pelo sistema microsomal hepático que resulta na formação de derivados N-hidroxiriluzol, farmacologicamente ativo que, quando administrado pela via oral, atinge a concentração plasmática máxima em 60 minutos. A excreção renal representa menos de 2% do metabolismo desse fármaco (Cheah et al., 2010).

A idéia inicial de que o mecanismo de ação do riluzol poderia envolver o bloqueio da transmissão glutamatérgica originou-se de estudos neurofarmacológicos *in vivo* que demonstraram pela primeira vez o efeito antiepiléptico desse fármaco (Mizoule et al., 1985). Essa hipótese foi corroborada por várias outras pesquisas que relataram que o riluzol, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, poderia bloquear os neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato (Benavides et al., 1985; Barbeito et al., 1990). Experimentos eletrofisiológicos realizados pelo isolamento de receptores NMDA expressos em oócitos de *Xenopus* revelaram que o riluzol interage com os receptores NMDA de glutamato de forma não competitiva inibindo a ativação do mesmo (Hebert et al., 1994). Apesar disso, estudos com radioligantes não demonstraram qualquer interação do riluzol com

receptores NMDA (Debono et al., 1993). Outros experimentos revelaram que o riluzol pode bloquear a liberação de glutamato do neurônio pré-sináptico *in vivo* e *in vitro* (Cheramy et al., 1992; Martin et al., 1993). Além disso, é capaz de prevenir a despolarização axonal pelo bloqueio de canais de sódio voltagem dependentes, demonstrado pela estabilização de canais de sódio inativados em nervo ciático de sapos (Benoit e Escande, 1991) e em canais de sódio expressos em oócitos de *Xenopus* (Hebert et al., 1994).

Vários estudos foram e estão sendo realizados com o riluzol para demonstrar seus efeitos neuroprotetores. O riluzol demonstrou várias propriedades anti-isquêmicas, em diversos modelos de isquemias cerebrais focal e difusa, (Pratt et al., 1992; Wahl et al., 1993; Doble, 1996; Siniscalchi et al., 1999) e proteção contra a apoptose induzida por morfina (Hassanzadeh et al., 2011). Há relatos também que a administração de riluzol, após TMA, melhora a função mitocondrial e acarreta aumento da recaptação de íons sódio (Mu et al., 1997) e inibe a peroxidação lipídica e a fosfolipase A2 (Koh et al., 1999). Estudos *in vitro* demonstraram características neuroprotetoras do fármaco com aumento da sobrevivência e crescimento de neurônios sensitivos (Shortland et al., 2006); bloqueio da liberação de glutamato e dos canais de sódio e cálcio em neurônios motores de ratos (Lamanasuskas e Nistri, 2008); e proteção contra excitotoxicidade em culturas organotípicas de medula espinhal de ratos (Mazzone e Nistri, 2011). Foi demonstrado *in vivo* ação neuroprotetora em diversos modelos de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e de Huntington (Benazzouz et al., 1995; Barnéoud et al., 1996), isquemia cerebral (Pratt et al., 1992; Wahl et al., 1993), lesões de nervos periféricos (Nogradi et al., 2007) e lesões medulares traumáticas e isquêmicas (Stuzmann et al., 1996; Springer et al., 1997; Lang-Lazdunski et al., 1999; Mu et al., 2000; Schwartz e Fehlings, 2001; Ates et al., 2007; Kitzmann et al., 2009).

Foram relatados poucos efeitos colaterais, devido ao uso de riluzol, como astenia, sedação leve e mais raramente disfunção hepática (Morris et al., 1986; Doble, 1996; Castells et al., 1998).

2.5 Estudo experimental das lesões medulares

A década passada representou um grande avanço em estudos que envolvem a recuperação neurológica após TMA. A necessidade de um melhor entendimento da patofisiologia do TMA e a avaliação de potenciais terapias levaram ao desenvolvimento de vários modelos para indução deste tipo de trauma em animais (Know et al., 2002).

Existem vários modelos experimentais utilizados para indução do TMA como a transecção medular (Siegenthaler et al., 2007) e os traumas contusivos (Metz et al., 2000) e compressivos (Silva et al., 2008; Lonjon et al., 2010; Torres et al., 2010b). Os modelos de compressão e contusão mimetizam de forma mais representativa as injúrias medulares que ocorrem em humanos (Ephron et al., 2004), por isso são os mais utilizados.

O modelo de contusão espinal foi, originalmente, descrito em cães por Allen em 1911 e é bastante utilizado para indução experimental do TMA. Várias técnicas podem ser empregadas em ratos, sendo que a mais precisa é a utilização do impactor *New York University* desenvolvido por Gruner (1992). Esse aparelho é conectado a um computador com *software* específico, o qual registra a velocidade que o peso atinge a medula, o momento do impacto e o grau de compressão sofrida pela medula espinal, mantendo uma padronização do trauma entre os animais (Gruner, 1992; Basso et al., 1996).

O modelo de compressão da medula espinal, utilizado para reproduzir o trauma medular agudo, foi primeiramente descrito em cães por Tarlov e colaboradores em 1953 (Lonjon et al., 2010) e desde então foi expandido para outras espécies (Martin et al., 1973; Eidelberg et al., 1976; Khan et al., 1983). Para este tipo de trauma podem

ser utilizadas técnicas com clips ou pinças (Rivlin e Tator, 1978), balão inflável (Lonjon et al., 2010) e peso compressivo (Torres et al., 2010b). O trauma por peso compressivo em ratos proposto por Torres e colaboradores (2010b), em que se utiliza um aparelho estereotáxico desenvolvido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, foi capaz de gerar lesões padronizadas entre os animais, sendo, portanto uma técnica que pode ser empregada para indução do TMA experimental (Torres et al., 2010b).

2.5 Testes comportamentais para avaliação neurológica em ratos

A observação da deambulação representa um dos mecanismos mais sensíveis no acompanhamento da evolução dos sinais clínicos neurológicos em estudos com lesões medulares (Scheff et al., 2002). A utilização do rato (*Rattus norvegicus*) como modelo experimental de transecção, hemissecção, contusão, compressão, isquemia e lesões excitotóxicas permite transpor, de forma acurada, o TMA para modelos humanos (Metz et al., 2000; Know et al., 2002; Grill, 2005).

O déficit motor que o animal apresentará após lesão da medula espinal, dependerá da extensão da lesão na substância cinzenta, da perda de axônios descendentes e ascendentes na substância branca e da reorganização das células neurais íntegras. Uma avaliação apropriada da regeneração do tecido nervoso e da extensão da lesão pode ser realizada por métodos histológicos e imunoistoquímicos. No entanto, para estudos clínicos futuros, a avaliação e a recuperação da função motora representam as características mais importantes para avaliação do TMA (Basso, 2004; Syková et al., 2006; Sedy et al., 2008). Estas avaliações permitem determinar a gravidade e localização da lesão, documentar a extensão da recuperação após TMA e identificar a integridade de tratos motores e sensitivos específicos (Sedy et al., 2008).

A observação da função motora em campo aberto de ratos com TMA é um teste bastante antigo, simples, de fácil reprodução e não precisa de aparatos

especiais. Antigamente, o teste mais utilizado era o Tarlov, que ranqueava os movimentos e o suporte dos membros pélvicos em cinco categorias (Tarlov, 1954). No entanto, esse teste mostrou-se pouco sensível para avaliação dos movimentos na ausência de suporte de peso (Metz et al., 2000). A partir daí vários outros testes foram elaborados (Behrmann et al., 1992; Marsala e Yaksh, 1994; von Euler et al., 1996; von Euler et al., 1997; Guizar-Sahagun et al., 2004), mas nenhum demonstrou alta sensibilidade. Em 1995, Basso e colaboradores aumentaram o número de pontos a serem considerados e criaram a escala BBB em referência a primeira letra dos pesquisadores Basso, Beattie e Bresnahan que a desenvolveram. Composta por 22 escores, é uma das escalas mais utilizadas para avaliação TMA em que o escore 0 representa um rato paralisado, enquanto que o 21 corresponde a um animal com marcha normal. Os escores de 1 a 8 são utilizados para descrever animais que apresentam retorno de movimentos isolados das articulações coxofemoral, femorotibiopatelar e tibiotársica. Os escores de 9 a 13 representam o retorno do apoio da pata e de movimentos coordenados com os membros anteriores. Já a faixa de 14 a 20 indica 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., 1995; Sëdy 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. O animal pode ser filmado para posterior avaliação por dois avaliadores bem treinados e independentes que definem os escores após observação da função motora dos membros pélvicos (Basso et al., 1996). O treinamento prévio dos animais é necessário, pois evita o estresse, permite avaliar se o animal apresenta-se clinicamente saudável e familiariza o animal com o teste (Muir e Webb, 2000; Sëdy et al., 2008). A observação dos animais no campo aberto durante dois minutos é suficiente para gerar resultados de alta confiabilidade (Mitsui et al., 2005). Embora existam vários testes mais sensíveis e sofisticados para avaliação da função motora de ratos e camundongos após trauma medular agudo (Soblosky et al., 1997; Mikami et al., 2002; Beare et al., 2009; Shinozaki et al., 2011) a escala proposta por Basso-Beattie-Bresnahan continua sendo amplamente utilizada nas pesquisas e permanece como padrão ouro para este fim (Basso et al., 1996, Sëdy et al., 2008).

Quadro 1 - Escores e características locomotoras dos membros pélvicos (MPs) segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da capacidade motora de ratos após trauma medular torácico agudo.

Escores	Características dos MPs	Comentários
0	Ausência de movimento	
1	Movimento discreto de uma das articulações	Discreto: $\leq 50\%$ da articulação
2	Movimento extenso de uma articulação e movimento discreto de outra articulação	Extenso $> 50\%$ da articulação
3	Movimento extenso de duas articulações	Coxofemoral e femorotibiopatelar
4	Movimento discreto das três articulações	Coxofemoral, femorotibiopatelar e tibiotársica
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira	Terceira: geralmente tibiotársica
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira	
7	Movimento extenso das três articulações	
8	Passada ou posicionamento plantar sem suporte de peso	Extensão rítmica das três articulações
9	Posicionamento plantar com suporte de peso somente em estação ou passada dorsal com suporte de peso ocasional, freqüente ou consistente e sem apoio plantar	Suporte de peso: contração dos MPs durante o posicionamento plantar da pata ou elevação do trem posterior em estação
10	Passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação com os MTs	Ocasional: $> 5\%$ e $\leq 50\%$ do tempo Passos: contato da face plantar com suporte de peso, avanço dos MPs para restabelecer contato plantar
11	Passos freqüentes a consistentes com suporte de peso sem coordenação com MT	Frequente: 51-94% do tempo
12	Passos freqüentes a consistentes com suporte de peso e coordenação com MT ocasional	Consistente: $>95\%$ do tempo
13	Passos freqüentes a consistentes com suporte de peso e coordenação com MTs frequente	
14	Passada plantar consistentemente coordenada, com a posição da pata predominantemente rotacionada durante contato inicial e retirada; passada plantar freqüente, coordenação com MTs consistente e passada dorsal ocasional.	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 freqüente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e rotacionada na retirada	
17	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos freqüente, 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 baixa: sem sustentação em contato com 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: não toca a superfície Instabilidade de tronco: mudança de apoio lateral 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 alinhadas com o corpo durante a locomoção

MT: membro torácico; MP: membro pélvico

(Adaptado de Basso et al., 1995).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo de número 186/2010 (Anexo 1), estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo referido comitê.

3.1 Animais

Foram utilizados 29 animais machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar com peso médio 350g, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia - UFMG.

Os animais foram mantidos durante todo experimento no Biotério da EV/UFMG acondicionados em caixas plásticas de dimensões de 17cm x 41cm x 33cm forradas com maravalha com três a quatro ratos por caixa. Foram desverminados com tiabendazol,² por via oral, na dose de 100 mg/kg e borrifados, sobre o pelo, com substância carrapaticida e pulgicida³. Os animais receberam ração⁴ e água *ad libidum* e foram submetidos a períodos de 12 horas com luz e 12 horas de escuro por um período total de aclimação de 14 dias.

3.2 Grupos Experimentais

Após o período de adaptação, os animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais: controle negativo (CN), controle positivo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e riluzol+dantrolene (R+D). Todos os grupos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de laminectomia e, com exceção do CN, foram também submetidos ao trauma medular e administração intraperitoneal de veículo (PBS), riluzol⁵ e

dantrolene⁶, conforme demonstrado no Quadro.2.

Todos os animais foram eutanasiados após oito dias do procedimento cirúrgico com sobredose de tiopental⁷ (100 mg/kg) pela via intraperitoneal. A seleção do tempo da eutanásia foi baseada no critério dos picos de morte celular por apoptose secundária ao trauma que ocorrem nos tempos de oito e 24 horas e sete dias após a injúria inicial (Li et al., 1996; Lu et al., 2000).

² Thiaben, Uci-Farma, São Bernardo do Campo-SP, Brasil.

³ Frontline®- Merial saúde, Campinas- SP, Brasil

⁴ Nuvilab® CR-1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo-PR, Brasil

⁵ Riluzole, R116-solid, Sigma-Aldrich Tatuapé-SP, Brasil

⁶ Dantrolene, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira-SP, Brasil

⁷ Tiopentax® 1g, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira-SP, Brasil

Quadro 2 – Distribuição dos ratos nos diferentes grupos e protocolos de tratamento após laminectomia (CN) e trauma medular compressivo (CP, R, D, R+D).

Grupo	Denominação	Número de animais	Descrição
CN	Controle negativo	Seis	Os animais foram submetidos à laminectomia no segmento T12 e receberam duas aplicações de PBS, por via intraperitoneal, após 15 e 60 minutos da laminectomia.
CP	Controle positivo	Seis	Os animais foram submetidos à laminectomia no segmento T12 seguida de trauma medular compressivo e receberam duas aplicações de PBS, por via intraperitoneal, após 15 e 60 minutos da laminectomia.
R	Riluzol 4 mg/kg	Cinco	Os animais foram submetidos à laminectomia no segmento T12 seguida de trauma medular compressivo e receberam riluzol (4mg/kg) e PBS, por via intraperitoneal, após 15 e 60 minutos da laminectomia, respectivamente
D	Dantrolene 10mg/kg	Seis	Os animais foram submetidos à laminectomia no segmento T12 seguida de trauma medular compressivo e receberam PBS e dantrolene (10 mg/kg), por via intraperitoneal, após 15 e 60 minutos da laminectomia, respectivamente.
R+D	Riluzol 4mg/kg + Dantrolene 10mg/kg	Seis	Os animais foram submetidos à laminectomia no segmento T12 seguida de trauma medular compressivo e receberam riluzol (4mg/kg) e dantrolene (10mg/kg), por via intraperitoneal, após 15 e 60 minutos da laminectomia, respectivamente.

3.3 Protocolos anestésicos e cirúrgicos

Os animais, preparados para cirurgia asséptica, receberam antibioticoprofilaxia com cefalotina sódica⁸ (30mg/kg, por via subcutânea) e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol⁹ (2mg/kg, por via subcutânea). A indução e manutenção anestésica foram realizadas com isoflurano¹⁰ fornecido por meio de máscara em sistema semi-aberto.

Após a depilação da região dorsal do tronco, os ratos foram posicionados e fixados em decúbito dorsal, com auxílio de fita adesiva, na mesa do aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFMG (Figura 1A) (Silva, 2006; Torres, 2008;

Caldeira, 2011). Essa mesa foi confeccionada com duas chapas de polietileno, paralelas entre si, e separadas por quatro hastes de alumínio permitindo a inclusão de uma bolsa térmica entre as chapas. Perfurações na superfície da chapa em contato com o rato permitem a passagem do calor da bolsa térmica e aquecimento do animal. Foi realizada antisepsia com iodopovidona degermante¹¹ e solução de álcool iodado na região previamente depilada (Figura 1B). Posteriormente, foram realizadas incisões de tecidos cutâneos e subcutâneos na linha média dorsal, estendendo-se da décima vértebra torácica à primeira vértebra lombar. As inserções dos músculos epaxiais foram incisadas e os músculos afastados lateralmente. Realizou-se ostectomia do processo espinhoso da décima segunda vértebra torácica (T12), com auxílio de uma

⁸ Cefalotina, Ariston Indústrias e Farmacêuticas Ltda, São Paulo-SP, Brasil

⁹ Tramadol[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil

¹⁰ Isoflurane, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil

¹¹ Biotrat[®] - LMFarma, São José dos Campos-SP, Brasil

pinça hemostática *Kocher*, e da lâmina dorsal com perfurador pneumático neurológico (Figura 1C)¹². Irrigação contínua com solução fisiológica¹³ para evitar o aquecimento dos tecidos foi fornecida durante todo esse processo. Após realização de uma abertura da lâmina dorsal de aproximadamente cinco milímetros de diâmetro e visualização da medula espinhal, o aparelho estereotático foi ajustado para realização do trauma espinhal compressivo (Figura 1D). Este foi realizado por uma compressão padrão da medula espinhal na linha média sobre a dura-máter, com um peso de 40,5g mantido por cinco minutos (Figura 1E). Após a retirada do peso compressivo e visualização da medula com aspecto hemorrágico (Figura 1F), o local foi irrigado com solução fisiológica. Em seguida, realizou-se a aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto, empregando-se sutura no padrão Reverdin (Figura 1G) e simples contínua com fio de polipropilene¹⁴ 3-0, respectivamente. A dermorrafia foi realizada com pontos simples separados utilizando-se também o polipropilene 3-0.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas com bolsas térmicas, à temperatura de 37°C, até completa recuperação anestésica e receberam o protocolo de tratamento conforme demonstrado no Quadro.2. Administrou-se cloridrato de tramadol (2mg/kg, SC) a cada 8 horas por cinco dias para controle da dor pós-operatória, cefalotina sódica (30mg/kg, VO) por sete dias e realizou-se massagem abdominal três vezes ao dia, até que os animais recuperassem o controle de micção e defecação voluntário.

3.4 Tratamento

O protocolo de tratamento dos animais consistiu na administração de

4mg/kg de riluzol, 10mg/kg de dantrolene e/ou volume equivalente de PBS em dose única pela via intraperitoneal conforme disposição dos grupos demonstrada no Quadro.2. O tempo para aplicação dos fármacos foi definido conforme a rapidez com que os eventos bioquímicos após TMA ocorrem (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005).

O riluzol foi dissolvido em solução de 0,1M de HCl diluído em solução PBS, até atingir-se a concentração de 10mg/ml (Lang-Lazdunski et al, 1999; Mu et al, 2000; Shortland et al, 2006; Chew, 2011¹⁵; Springer, 2011¹⁶). O dantrolene por sua vez foi diluído em água para injeção, conforme orientação do fabricante, obtendo-se uma concentração final de 0,33 mg/ml.

3.5 Avaliação Neurológica

Três dias antes do procedimento cirúrgico, todos os animais foram adaptados ao campo aberto para facilitar as avaliações após à indução do trauma.

A função neurológica dos animais foi avaliada 24 horas antes da intervenção cirúrgica e diariamente após o procedimento cirúrgico utilizando-se a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (Basso et al, 1995). Esse método consistiu na observação do padrão locomotor, em um campo aberto de 1m² sem obstáculos. Para isso, todos os animais foram observados e filmados durante dois minutos e, posteriormente os vídeos foram assistidos por dois avaliadores à cegas. Seguindo a escala estabelecida por Basso e colaboradores em 1995, foi realizada a classificação da deambulação dos animais em um escore que variou de 0 a 21 pontos (Quadro.1).

¹² ECCOS® Aesculap, Laboratório B.Braun, São Gonçalo-RJ, Brasil

¹³ Cloreto de sódio 0,9%, Laboratório Sanobiol Ltda, Pouso Alegre-MG, Brasil

¹⁴ Prolene®, Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos-SP, Brasil

¹⁵ Comunicação pessoal

¹⁶ Comunicação pessoal

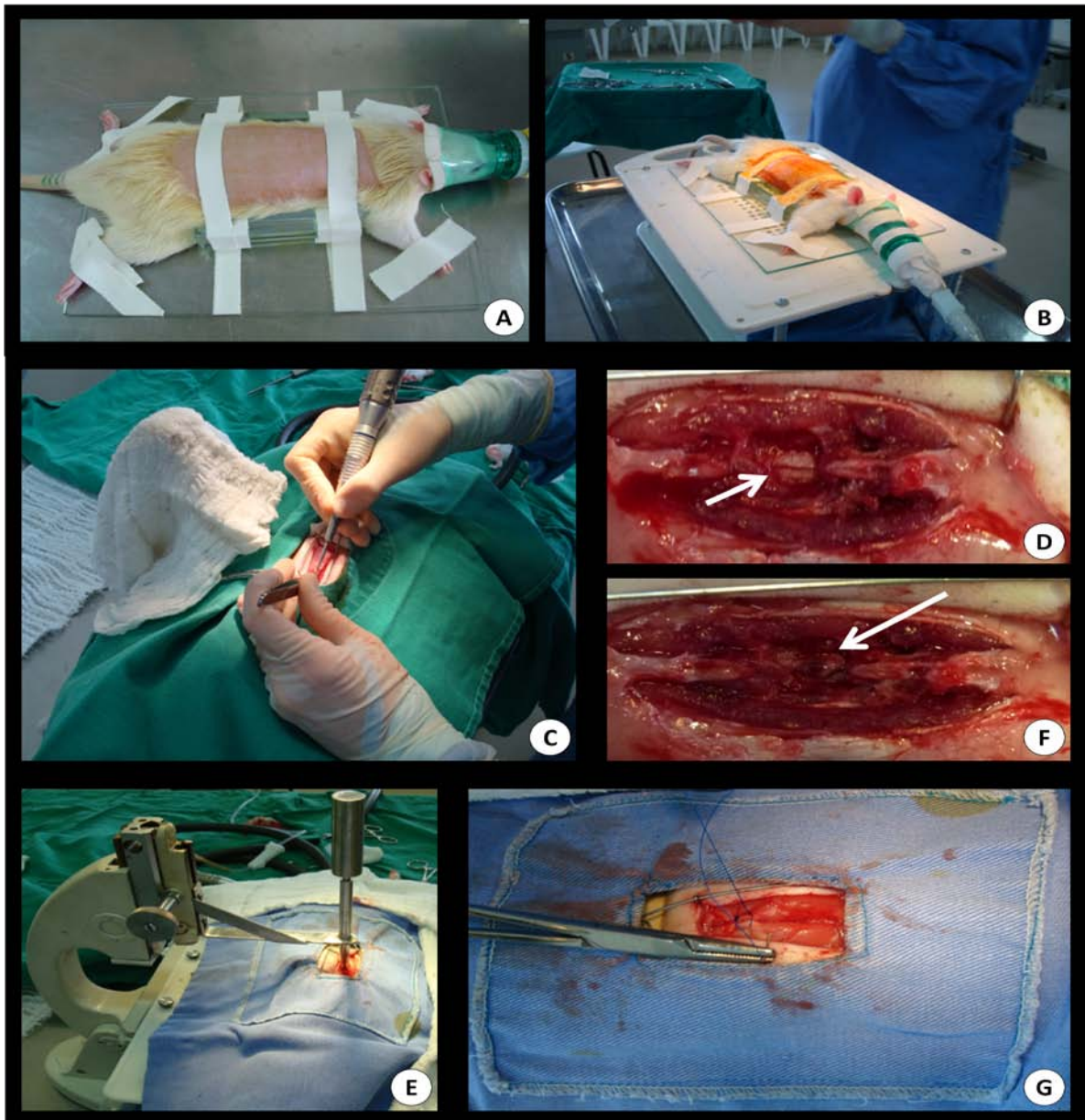


Figura 1- Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. A) Animal anestesiado, depilado e fixado em decúbito esternal em suporte de vidro, pronto para início dos procedimentos cirúrgicos. B) Animal anestesiado em decúbito esternal fixado em placa de vidro sobre suporte adaptado, após procedimento de antissepsia, para início da técnica cirúrgica. C) Laminectomia de T12 com drill pneumático para exposição da medula. D) Visualização da medula espinhal com aspecto normal após procedimento de laminectomia e visualização do vaso dorsal (seta). E) Trauma medular compressivo com peso de 40,5g utilizando-se aparelho estereotáxico desenvolvido na EV-UFGM. F) Visualização da medula com aspecto hemorrágico após trauma medular compressivo com peso de 40,5g (seta). G) Sutura padrão Reverdin com fio de polipropileno após técnica cirúrgica

3.6 Coletas de sangue e análises laboratoriais

Após oito dias da intervenção cirúrgica, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg) por via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletas por cardiopunção do ventrículo direito e armazenadas em dois frascos com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico (EDTA) a 10%. O sangue total foi submetido à análise para determinação dos parâmetros hematológicos. O plasma foi obtido após centrifugação para análise dos parâmetros bioquímicos.

As análises hematológicas e bioquímicas plasmáticas foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Veterinária da EV- UFMG.

3.6.1 Avaliação Hematológica

O hemograma foi realizado em contador eletrônico utilizando-se o sangue colhido com EDTA a 10%¹⁷ para mensuração da concentração de hemácias, hemoglobina e leucócitos totais. O volume globular (VG) foi determinado utilizando-se centrífuga para microhematócrito¹⁸ por 10 min. Os esfregaços sanguíneos foram realizados em lâminas de vidro¹⁹ (26x76mm) e corados com Panótico rápido²⁰ para contagem diferencial de leucócitos e plaquetas.

¹⁷ Diatron®, Abacus Junior Vet/CELM DA-500®-CELM, Cia.Equipadore de Laboratórios Modernos, Barueri-SP, Brasil

¹⁸ Micro Spin, Biosan, Belo Horizonte-MG, Brasil

¹⁹ Lâminas para microscopia não lapidada, Exacta, SOS lab, Belo Horizonte-MG, Brasil

²⁰ Panótico rápido LB, Laborclin produtos para laboratório Ltda, Pinhais-PR, Brasil

3.6.2 Avaliação Bioquímica

O sangue total foi submetido à centrifugação para obter-se o plasma. Foram dosadas as concentrações plasmáticas de uréia, creatinina, proteínas totais, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e de gama-glutamilttransferase (GGT) por método colorimétrico cinético,²¹ seguindo o protocolo dos kits comerciais²² de diagnósticos. O perfil protéico fracionado foi realizado em cuba de eletroforese horizontal, utilizando gel de agarose²³ em tampão Tris²⁴. A corrida eletroforética obtida foi submetida à coloração com Ponceau, e a concentração de albumina e globulinas (alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama) foi determinada pelo software CELM SE-250.

3.7 Avaliação histopatológica

Após a eutanásia os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca com 250 ml PBS (0,15M, pH 7,2), seguida de 250 ml de solução de formaldeído tamponado a 10%. Após a perfusão, retirou-se a coluna vertebral que foi fixada em solução de formaldeído tamponada a 10% durante sete dias. A coluna vertebral foi dissecada e um segmento medular de aproximadamente 2,7 cm foi coletado, contendo o epicentro da lesão e regiões adjacentes craniais e caudais. Posteriormente, realizou-se secção transversal nos fragmentados de 2,7 cm separando-os em três fragmentos menores (cranial, epicentro e caudal) que foram processados pela técnica de rotina para inclusão em parafina e submetidos a cortes

²¹ TP Analyser basic®- Thermo Plate

²² Bioclin®, Quibasa Química Básica, Belo Horizonte-MG, Brasil

²³ Filme de Agarose Geral CELMGEL®-CELM

²⁴ Tampão Tris para eletroforese em CELMGEL®-CELM

transversais seriados de 4µm no micrótomo. Estes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina²⁵ para avaliação morfológica em microscópio óptico (Luna, 1968) para avaliação da área da lesão.

3.8 Fragmentação de DNA pela técnica TUNEL

Foi realizada ainda a avaliação da fragmentação de DNA, *in situ*, pelo método TUNEL (*TdT mediated-dUTP Nick End Labeling*). Os cortes de 4µm (segmentos cranial, epicentro e caudal) foram colocados em lâminas gelatinizadas e armazenadas em estufa a 37 °C por no mínimo sete dias. Após desparafinização, as lâminas com os cortes foram processadas utilizando-se *kit* comercial²⁶, de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram submetidos a desparafinização em xilol e hidratação em uma sequência gradual de álcoois. Em seguida, foi realizada a permeabilização das amostras com 0,5% de triton X-100 em água destilada, recuperação antigênica com proteinase K, 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 streptavidina-biotina-peroxidase, revelação com diaminobenzidina peroxidase (DAB) em peróxido de hidrogênio e contra-coloração com *Methyl Green* (Anexo 3). 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 contadas células com DNA fragmentado marcadas em 30 campos, abrangendo as substâncias cinzenta e branca, e o resultado

²⁵ H&E, Sigma-Aldrich, MO/USA

²⁶ FragEL® DNA Fragmentation Detection Kit TdT Enzyme, Merck, Darmstadt, Germany

obtido correspondeu à média de células marcadas por campo

3.9 Marcação de neurônios íntegros pelo anticorpo antiNeu-N

Foi realizada imunoistoquímica para avaliação da expressão gênica do anticorpo primário anti-NeuN²⁷, diluição 1:1000 para contagem neuronal. A técnica de imunoistoquímica seguiu os padrões determinados pelo fabricante e as lâminas foram visualizadas à microscopia óptica. Os cortes de 4µm foram posicionados em lâminas gelatinizadas e armazenadas em estufa a 37 °C por no mínimo sete dias. Após esse período, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em uma sequência gradual de álcoois. Realizou-se a recuperação antigênica em tampão citrato (0,01M, pH 6,0), bloqueio das peroxidases em peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico, seguido pela incubação em soro bloqueio²⁸ e pernoite em anticorpo primário a 4°C. No dia seguinte, foi realizada incubação em anticorpo secundário universal²⁹, seguida pelo complexo estreptavidina-biotina-peroxidase³⁰, revelação em DAB³¹ e contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Anexo 2). Para controle negativo foi utilizado solução PBS como anticorpo primário. A contagem das células marcadas foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de 40x, com auxílio de uma grátula reticulada em 121 pontos³². Foram

²⁷ NeuN- Chemicon Internacional Inc, Temecula, CA/USA

²⁸ Protein Block, Serum Free (X0909-1), Dako North America Inc, Carpinteria-CA, EUA

²⁹ Anticorpo secundário, Dako do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil

³⁰ Streptavidin, Dako do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil.

³¹ Diaminobenzidine, Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil

³² Olympus®, Eyepiece Micrometer 20.4MM OCM 10/10/SQ

contados os corpos neuronais de três cortes de cada segmento de cada animal marcados pelo anticorpo Neu-N em 10 campos, abrangendo toda a substância cinzenta. O resultado obtido correspondeu à média de células marcadas por campo e entre os cortes de cada segmento.

3.10 Análise Estatística

Neste estudo foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. As variáveis paramétricas (contagem de células marcadas para anticorpo Neu-N e pelo TUNEL; e variáveis das dosagens bioquímicas e hematológicas) foram submetidas à análise de variância, com comparação de médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK). Os escores das avaliações neurológicas entre os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e entre os dias pelo teste de Friedman. Para todas as análises estatísticas adotou-se 95% como nível de confiança ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelo experimental de trauma medular agudo

A utilização do aparelho estereotático desenvolvido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para realização de trauma medular compressivo em ratos, foi capaz de induzir, de forma eficiente, lesão aguda ao tecido medular, de intensidade discreta a moderada, como demonstrada pelas alterações deambulatórias observadas no período pós-cirúrgico com já mencionado por Torres e colaboradores (2010a).

Estudos recentes indicam que a indução de trauma medular discreto a moderado, permite um menor entrada de cálcio nas células e manutenção da função mitocondrial, possibilitando uma ocorrência maior de apoptose (Lou et al., 2000). Portanto, foi utilizado peso compressivo de

40,5 g, que ocasiona trauma medular de discreto a moderado, para obtenção de maiores índices de morte celular decorrentes de apoptose ao invés de necrose, que ocorre em maiores extensões no trauma medular grave.

Não foram observados distúrbios comportamentais como alteração do apetite e infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica e os animais apresentaram tolerância satisfatória aos procedimentos, constituindo, portanto, um modelo experimental viável e adequado para o estudo de traumas medulares compressivos em ratos.

4.2 Tratamentos

No presente estudo, foi utilizada a via intraperitoneal como de escolha para aplicação do riluzol e dantrolene, devido ao baixo pH pela dissolução em ácido clorídrico (HCl) e ao alto volume aplicado, respectivamente (Aslan et al., 2009; Torres et al., 2010a; Chew e Springer, 2011³³). Além disso, Springer et al. (1997), Lang-Lazdunski et al. (1999), Mu et al. (2000), Schwartz e Fehlings (2001), Shortland et al. (2006), Ates et al. (2007), Kitzmann (2009) também optaram por esta via para administração do riluzol em ratos sem a ocorrência de qualquer efeito colateral.

As metodologias utilizadas por diversos estudos com a utilização de riluzol e dantrolene são muito variadas, incluindo as vias de administração, o tipo e a intensidade do trauma, os parâmetros avaliados e o tempo de observação após lesão. O riluzol foi, com mais frequência, administrado pela via intraperitoneal em doses que variaram de 4-8 mg/kg, aplicado antes, durante e após a lesão isquêmica ou traumática (Springer et al., 1997; Lang-Lazdunski et al., 1999; Mu et al., 2000; Schwartz and Fehlings, 2001; Ates et al.,

³³ Comunicação pessoal

2007; Kitzmann et al., 2009). Entretanto observou-se efeito neuroprotetor com dose de 2 mg/kg administrado pela via endovenosa (Stutzmann et al., 1996). Há poucos dados na literatura sobre os efeitos neuroprotetores do dantrolene na injúria espinhal aguda. Nos estudos que demonstraram esse efeito foram utilizadas doses de 10 mg/kg pela via intraperitoneal, imediatamente após injúria, e 1 hora após procedimento cirúrgico (Aslan et al., 2009; Torres et al., 2010a). Com isso, neste estudo, optou-se pela utilização de 4 mg/kg de riluzol e de 10 mg/kg de dantrolene.

Optou-se por um período de avaliação de oito dias para se acompanhar a evolução clínica, as alterações histológicas e imunoistoquímicas visto que os picos de apoptose secundária ao trauma inicial ocorrem nos tempos de oito e 24 horas e aos sete dias após o trauma medular. Deste modo, aos oito dias foi possível avaliar os três picos da apoptose neural e os principais eventos responsáveis pela progressão da lesão medular.

Apesar de diversos estudos já terem avaliado os efeitos neuroprotetores do riluzol e do dantrolene, não há dados na literatura sobre o possível efeito neuroprotetor sinérgico que poderia ocorrer com a utilização simultânea de ambas as drogas.

4.3 Avaliação clínica-neurológica

A avaliação da função motora em campo aberto foi de fácil execução, aplicabilidade e não representou condição de estresse aos animais devido ao condicionamento prévio realizado nos três dias que antecederam o procedimento cirúrgico (Caldeira, 2011; Fukushima, 2011³⁴). Foram necessários equipamentos mínimos para a realização do teste tornando o procedimento de baixo custo. A avaliação

clínica de ratos após trauma medular agudo pode ser realizada de forma acurada utilizando-se, como teste único, a deambulação em campo aberto e classificação segundo a escala BBB (Sedý et al., 2008; Fukushima, 2011³⁵).

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade que, na escala BBB, corresponderam ao escore máximo de 21, caracterizado por marcha normal, suporte de peso nos quatro membros, cauda elevada e estabilidade do tronco (Basso et al. 1996), parâmetro, este, essencial para continuidade dos animais no experimento.

Os animais do grupo CN mantiveram o escore máximo no teste após procedimento cirúrgico, indicando que a laminectomia não causou qualquer lesão ao tecido medular (Figuras 2A, 2B). Em outros estudos com trauma medular também não foram relatados déficits neurológicos nos animais submetidos apenas à laminectomia (Torres, 2008; Caldeira, 2011). Já os animais submetidos à lesão medular (CP, R, D, R+D) apresentaram déficits neurológicos, resultante apenas do trauma medular compressivo desencadeado pelo peso de 40,5 g (Figuras 2C, 2D) e foram classificados em escores que variaram de 1 a 10 pontos.

Os grupos que receberam placebo, riluzol e dantrolene demonstraram, ao quinto dia de observação, um escore máximo de 3 pontos representado por movimento extenso de duas articulações dos membros pélvicos. Já os animais tratados com a associação de riluzol e dantrolene, no quinto dia, atingiram o escore 7, movimento extenso das três articulações dos membros pélvicos, demonstrando um retorno mais rápido da função motora (Figura 3). Ao final dos sete

³⁴ Comunicação pessoal

³⁵ Comunicação pessoal

dias de observação o grupo tratado com essa associação de fármacos atingiu um escore 10, passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação dos membros pélvicos com os membros torácicos, enquanto os outros grupos atingiram um escore máximo de 8, passada sem suporte de peso ou posicionamento plantar sem suporte de peso (Figura 3). Esse fato demonstra uma recuperação motora mais rápida de ratos tratados com a associação de riluzol e dantrolene quando comparada aos outros grupos. Tal fato foi confirmado quando se comparou os tratamentos, após os sete dias subseqüentes à cirurgia, submetidos ao teste estatístico de Kruskal Wallis ($p < 0.05$) (Tabela.1).

Houve diferença estatística significativa entre o grupo CN e os grupos CP, R e D. No entanto, essa diferença não foi observada quando se comparou CN com R+D. Isso indica que houve uma maior recuperação da função motora do grupo R+D após os sete dias de tratamento sugerindo um potencial efeito neuroprotetor da associação dos fármacos. Sendo assim, apenas a associação do riluzol ao dantrolene foi capaz de promover recuperação motora em ratos avaliados em campo aberto após os sete dias de observação.

Apesar de outros autores sinalizarem que, individualmente o riluzol (Stutzmann et al., 1996) e o dantrolene (Costa, 2010) possuem efeito neuroprotetor em ratos submetidos ao trauma medular agudo, não foi possível observar esse efeito na avaliação clínica-neurológica realizada no período de sete dias de observação. Stutzmann et al. (1996) observaram recuperação da função motora desses animais, mas o trauma aplicado à medula espinhal foi de menor intensidade e, além disso, os animais receberam tratamento diariamente após o trauma durante 10 dias, diferentemente deste trabalho em que foi realizada apenas uma aplicação. Costa em (2010) observou que a utilização do dantrolene possibilitou uma recuperação motora mais rápida quando se realizou observação clínica prolongada por 31 dias. Diante desses resultados, que indicam efeito neuroprotetor dos fármacos, mesmo quando utilizados como monoterapias, e pelo fato dos escores desses animais terem sido maiores quando comparados ao controle, acredita-se que, se fosse realizada uma avaliação clínica mais tardia, possivelmente, seria observada uma recuperação motora nos grupos que receberam tratamento monoterápico com riluzol e dantrolene.

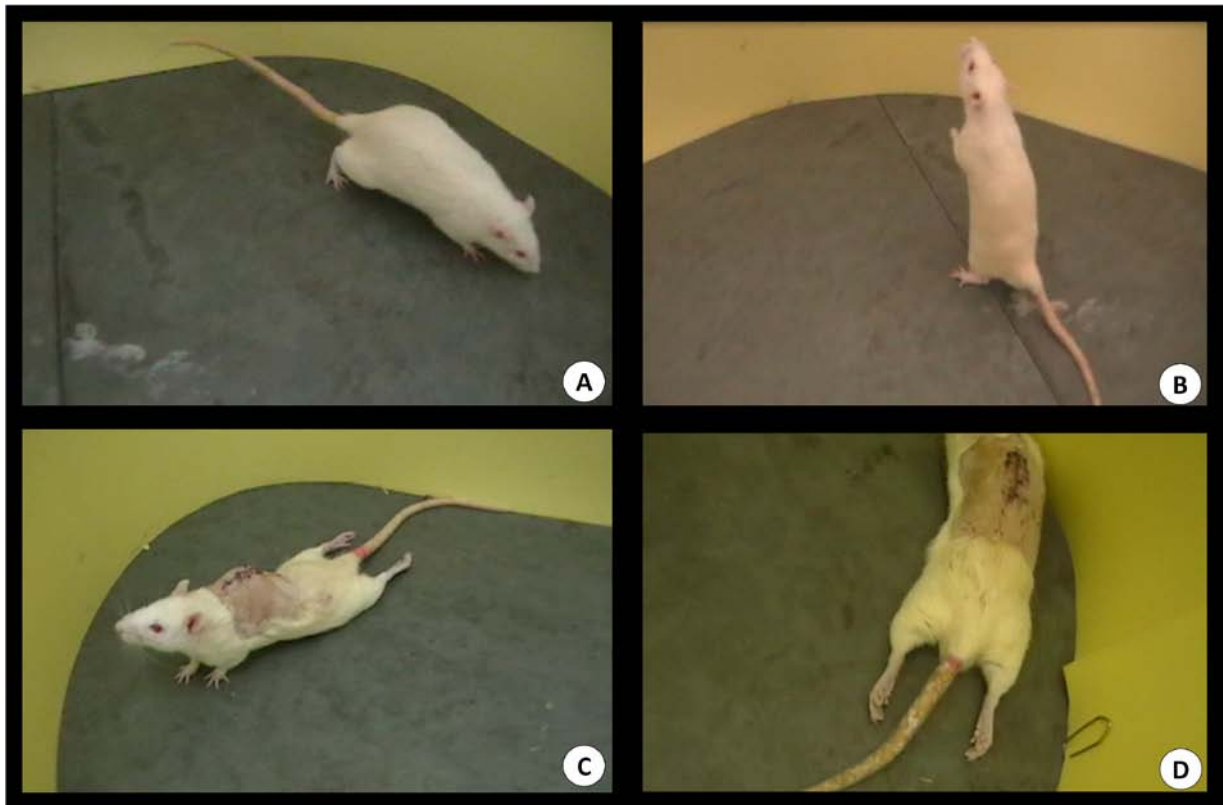


Figura 2 – Ratos Wistar em campo aberto para classificação da deambulação em escores baseado na escala BBB. Figuras 2A-B) Animais do grupo controle negativo, um dia antes da intervenção cirúrgica, classificados no escore 21. A) Animal com sustentação de peso nos quatros membros e cauda elevada. B) Aniamal com sustentação de peso sobre os membros pélvicos. Figuras 2C-D) Animal do grupo controle negativo após trauma medular agudo compressivo em que observa-se déficit proprioceptivo com paraparesia e cauda baixa tocando o solo, sendo, portanto classificados em escore de 0 a 7, dependendo da movimentação das articulações dos MPs.

Tabela 1 - Medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, aos sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) ou riluzol+dantrolene (R+D).

Medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($P < 0,05$)

	CN	CP	R	D	R+D
Escore	21 ^a	2 ^b	3 ^b	3 ^b	7 ^{ab}

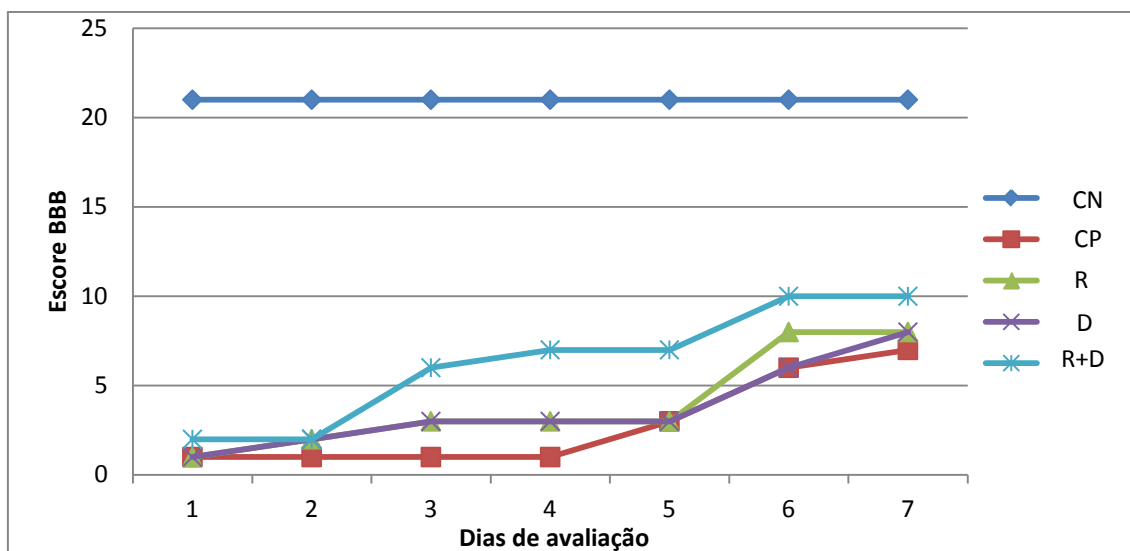


Figura 3. Gráfico das medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com placebo (CP), Riluzol (R), Dantrolene (D) e Riluzol + Dantrolene (R+D)

4.4 Avaliação hematológica

Os valores plasmáticos das provas hematológicas (quantidade de hemácias, concentração de hemoglobina, quantidade de leucócitos totais) não apresentaram diferença em relação aos padrões fisiológicos para espécie (Thrall, 2004; Kaneco et al., 2008) e nem entre os grupos (Figura 4). A permanência dos valores nos padrões fisiológicos para a espécie, em testes hematológicos realizados oito dias após a cirurgia, sugere que os tratamentos não ocasionaram qualquer distúrbio na produção ou consumo das células sanguíneas, quando utilizou-se a dose de 4

mg/kg e 10 mg/kg para o riluzol e dantrolene, respectivamente.

O riluzol e o dantrolene são fármacos que produzem mínimos efeitos colaterais ao organismo e não há relatos de disfunções hematológicas com a utilização dessas medicações (Lang-Lazdunskia et al., 1999; Krause et al., 2004; Torres, 2008). Em estudos clínicos humanos leucocitose com neutropenia e anemia aplástica foram observados em menos de 0,5% de pacientes que utilizaram o riluzol de forma crônica em doses acima de 8 mg/kg (Kaufman et al., 1996).

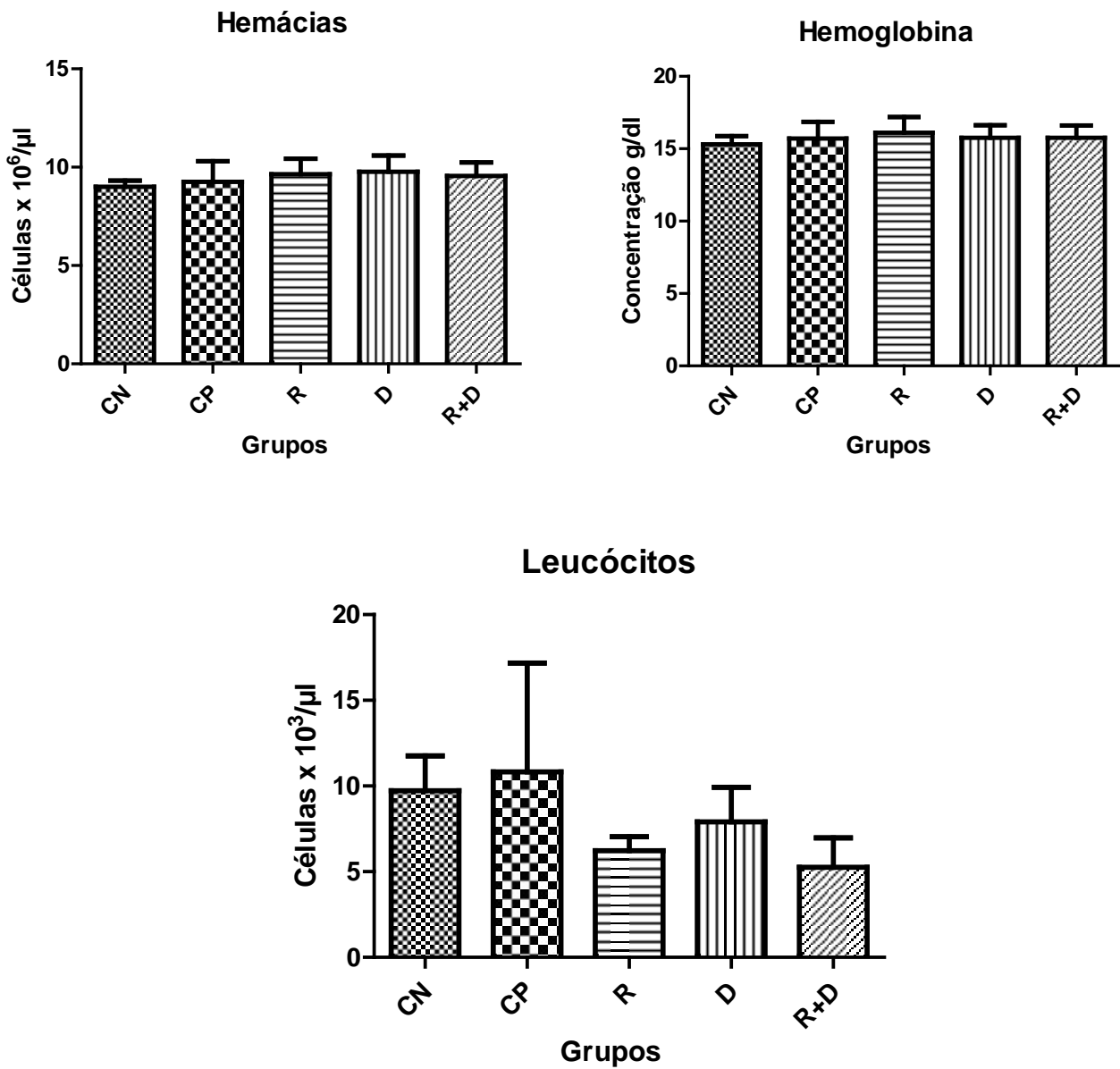


Figura 4 - Gráficos das médias e desvios padrão dos valores de hemácias, hemoglobina e leucócitos totais de ratos Wistar sem trauma (CN) e submetidos a trauma medular agudo e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e riluzol+dantrolene (R+D) ($P \leq 0,05$) após sete dias de tratamento.

4.5 Avaliação bioquímica

Os valores plasmáticos das provas hepáticas (albumina, proteínas totais, FA, ALT, AST, GGT), renais (uréia e creatinina) e os valores plasmáticos das globulinas (alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2, gama) não apresentaram diferença em relação aos padrões fisiológicos para espécie (Thrall, 2004; Dantas et al., 2006; Kaneco et al., 2008) e nem entre os grupos (Figura 5) e (Figura 6). A permanência dos valores nos padrões fisiológicos para a espécie sugere que os tratamentos também não ocasionaram lesão hepática ou renal.

A exceção foram os valores de uréia que foram maiores nos grupos traumatizados, independente do tratamento utilizado, em relação ao grupo que não sofreu trauma (Figura 6). A uréia, diferentemente da creatinina, pode ter sua concentração plasmática alterada devido a fatores extrarenais (Kaneco et al., 2008). Sugere-se que o procedimento cirúrgico e a hipotrofia crônica da musculatura pélvica dos ratos, resultante de lesões de neurônios motores superiores, possam ter alterado o metabolismo da uréia, aumentando-a nos grupos submetidos ao trauma medular agudo.

Informações diagnósticas podem ser obtidas detectando-se alterações nas diferentes frações protéicas (albumina ou globulinas) que, no caso das globulinas, podem ser obtidas com utilização da eletroforese, com isso é importante realizar o fracionamento protéico para obtenção desses valores. Foi sugerido que a maioria das afecções sistêmicas altera o perfil sérico ou plasmático protéico (Anderson e Anderson, 2002). As alfa-globulinas e beta-globulinas podem aumentar suas concentrações em afecções como hepatopatias e nefropatias já a fração gama geralmente estará aumentada em caso de infecções (Kaneco et al.; 2008).

O riluzol possui poucos efeitos colaterais como astenia, sedação leve e

raramente disfunção hepática (Morris et al., 1986; Doble, 1996; Castells et al., 1998). Foi, também, observado que os efeitos hepatotóxicos foram mais frequentes quando o fármaco foi utilizado em doses acima de 8mg/kg em coelhos (Lang-Lazdunska et al., 1999).

O dantrolene quando utilizado em altas doses e/ou por longo período pode resultar em hepatopatias que pode variar desde elevações plasmáticas assintomáticas, até hepatite fatal (Ward et al., 1986). Pinder e colaboradores (1977) observaram disfunção hepática em 0,7 a 1 % de pacientes humanos que utilizaram o fármaco de forma prolongada, porém estudos *in vivo* com ratos não demonstraram qualquer efeito hepatotóxico do dantrolene (Durham et al., 1984; Sorensen et al., 1985, Torres, 2008).

A realização da massagem abdominal, três vezes ao dia, permitiu efetivo esvaziamento da bexiga, o que provavelmente preveniu o desenvolvimento de um quadro urêmico e de infecções do trato urinário. O trauma medular agudo produz interrupção de tratos motores descendentes que normalmente coordenam a função motora da bexiga e de tratos sensitivos resultando em deficiência do controle da micção (Herrera, et al., 2010). A incapacidade de esvaziamento vesical e a conseqüente retenção urinária, originada pelo trauma medular agudo podem predispor a um quadro de uremia pós-renal, com aumento de compostos nitrogenados reabsorvidos da urina para a circulação sanguínea (Torres et al., 2011).

A ausência de alterações nos parâmetros bioquímicos corrobora os dados da literatura que afirmam que o riluzol e o dantrolene são fármacos seguros e com poucos efeitos colaterais quando utilizados em doses terapêuticas não ocasionando efeitos nefrotóxicos ou hepatotóxicos tanto em associação ou como em monoterapias (Lang-Lazdunska et al., 1999; Krause et al., 2004; Torres, 2008).

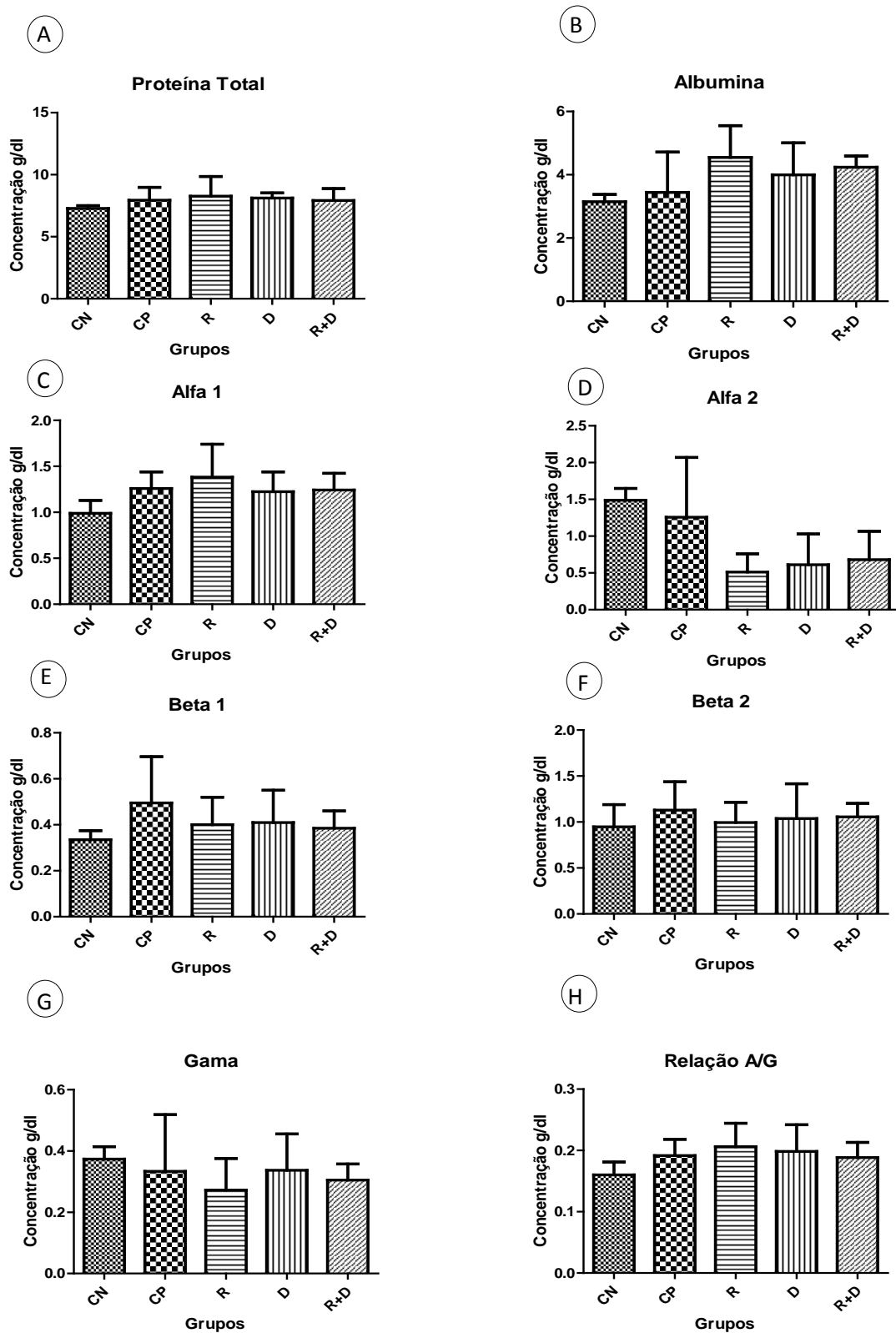


Figura 5 – Gráficos das médias e desvios padrão dos valores plasmáticos de proteínas totais (A), albumina (B), alfa-1 (C), alfa-2 (D), beta-1 (E), beta-2 (F), gama (G) e relação albumina/globulina (H) de ratos Wistar sem trauma (CN) e submetidos a trauma medular agudo e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e riluzol+dantrolene (R+D) ($P \leq 0,05$).

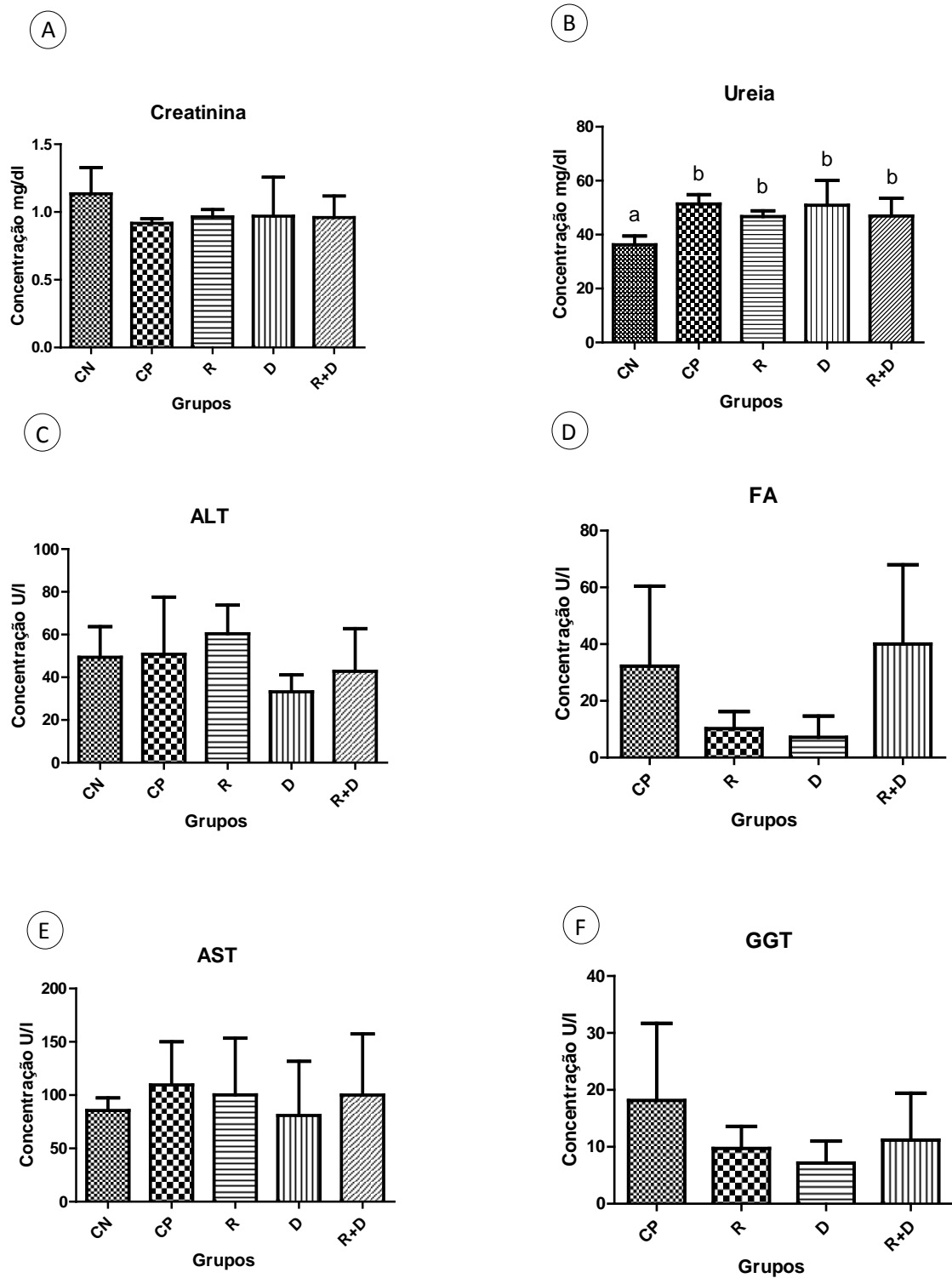


Figura 6 - Gráficos das médias e desvios padrão dos valores plasmáticos de creatinina (A), uréia (B), alanina aminotransferase (ALT) (C), fosfatase alcalina (FA) (D), aspartato aminotransferase (AST) (E) e de gama glutamil-transferase (GGT) (F) de ratos Wistar sem trauma (CN)* e submetidos a trauma medular agudo e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e riluzol+dantrolene (R+D) ($P \leq 0,05$).

* Para os valores de FA e de GGT não foi possível mensurar os valores de ratos do grupo CN, pois os valores se encontraram fora do espectro de leitura do aparelho.

4.6 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica das medulas espinhais dos animais do grupo CN, não revelou qualquer tipo de lesão (Figura 7A). Observou-se medula espinhal com preservação da arquitetura normal, circundada pela paquimeninge (dura-máter) e leptomeninges (aracnoíde e pia-máter), dividida em substância cinzenta e branca. Substância cinzenta disposta em um arranjo descrito com “H” medular, composta por cornos dorsais e ventrais, e constituída de corpos neuronais, fibras axonais amielínicas e mielínicas, astrócitos, oligodendrócitos, células da microglia e canal ependimário contido no interior da comissura cinzenta revestido por células ependimárias. E substância branca composta por fibras axonais mielínicas, oligodendrócitos, astrócitos e células da microglia dividida em funículos dorsal, lateral e ventral (Junqueira e Carneiro, 2004). Essas observações foram importantes, pois evidenciaram que o procedimento de laminectomia não ocasionou lesões ao tecido nervoso, fato também comprovado pela observação de escores máximos apresentados ao exame neurológico.

Nos animais submetidos ao trauma medular agudo, independente do tratamento instituído, foram observados: cavitação central com perda de substância branca e cinzenta e intenso infiltrado de células Gitter, principalmente na região do epicentro; formações esferóides de axônios em bainhas de mielina distendidas denominadas de tumefação axonal, em toda região da substância branca; e degeneração walleriana com a observação de câmaras de digestão. Apesar de terem sido encontradas essas características em todos os animais traumatizados, independente do tratamento instituído, a gravidade das lesões foi diferente entre os grupos e entre as regiões estudadas. No epicentro as características histológicas não variaram entre os grupos

traumatizados em que foram observadas áreas de malácia moderada e multifocais com moderada degeneração e tumefação axonal e mielínica (Figura 7). Nas regiões cranial e caudal ao epicentro do CP observaram-se áreas focais de malácia e degeneração e tumefação axonal e mielínica moderadas. Nessas mesmas regiões dos grupos R, D e R+D notou-se área de malácia focal e degeneração e tumefação axonal e mielínica discretas, demonstrando redução da lesão secundária determinando recuperação morfológica das estruturas neurais de animais que receberam tratamento com riluzol e dantrolene.

Uma das características histopatológicas mais importantes das injúrias medulares agudas é a presença de tumefação axonal. O mecanismo para esta formação pode ser explicada pela cicatrização axonal do terço proximal da lesão e fluxo axoplasmático contínuo (Norenberg et al., 2004). A ruptura da bainha de mielina é outra característica muito comum decorrente de trauma medular agudo e geralmente está associada a injúrias axonais ou de células glia responsáveis pela manutenção da mielina, como o oligodendrócito e o astrócito. Essa é caracterizada inicialmente pelo engurgitamento das bainhas de mielina com posterior fragmentação e fagocitose por macrófagos (Van Dijk et al., 2008).

A formação de balões axonais, câmaras de digestão e malácia são características comumente descritas durante a evolução das lesões em modelos de trauma medular agudo (Norenberg et al., 2004). Essas características podem mais ser evidentes dependendo da gravidade do trauma assim como do segmento medular espinhal avaliado (Cao et al., 2005). Todas essas características que foram observadas nas medulas dos animais traumatizados, também foram observadas em estudos anteriores (Torres et al., 2008, Costa, 2010).

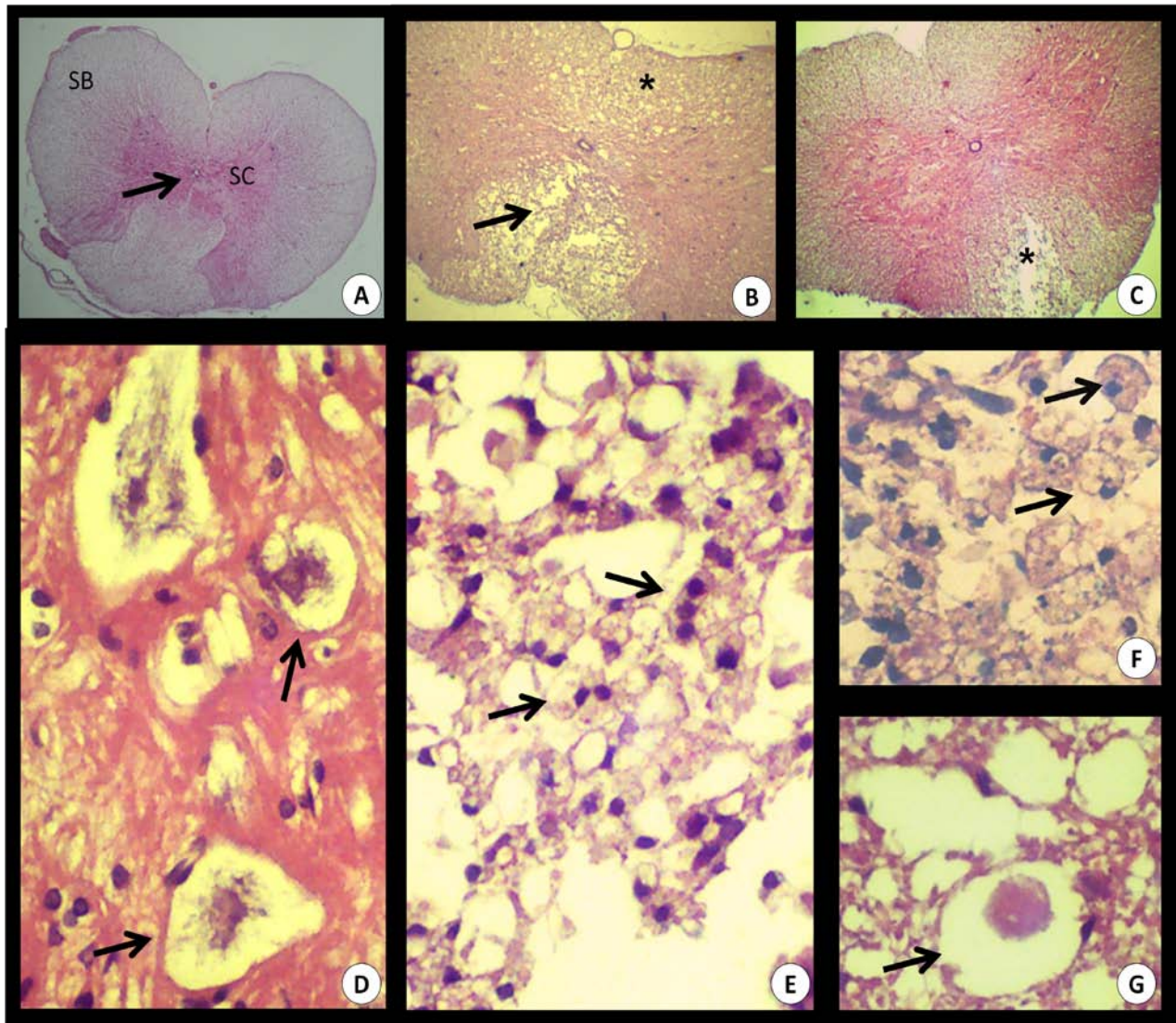


Figura 7 – Fotomicroscopia de secções transversais da medula espinhal de ratos Wistar coradas em H.E em visão ampla (Fig 6A,B,C) e em detalhes mostrando detalhes das lesões (Fig 6D,E,F). A) Medula espinhal de um animal do grupo controle negativo em que observa-se morfologia normal com divisão de substância cinzenta (SC) no formato de “H” e substância branca (SB). A seta indica o canal ependimário – 25x. B) Medula espinhal de rato do grupo controle positivo da região cranial ao epicentro em que se observam áreas de malácia focal da SB (seta) e intensa degeneração axonal (asterisco) – 99,8x. C) Segmento cranial da medula espinhal de rato do grupo tratado com a associação do riluzol ao dantrolene em que se observam maior preservação da arquitetura medular e malácia da SB (asterisco) – 99,6x. D) Região de SB com degeneração walleriana em que se observam câmaras de digestão (setas) – 310x. E) Região do funículo dorsal da SB com área de malácia em que se observam aglomerados de células gitters (setas) – 308,2x. F) Região do funículo lateral da SB em que se observam formações esferóides de axônios em bainhas de mielina distendidas denominadas de balão axonais (seta) – 512,22x.

4.7 TUNEL

Observou-se diferença significativa entre os grupos CN e CP nos segmentos caudal e cranial ao epicentro do trauma medular. Houve menos marcação de células TUNEL positivas no grupo CN comparado ao CP. Esses resultados confirmam que o procedimento de laminectomia e exposição da medula espinhal mantêm a integridade da medula espinhal (Figura 9).

Não se observou diferença estatística significativa quando se comparou o grupo CN e o grupo CP aos grupos traumatizados que receberam riluzol e dantrolene. Isso indica que, apesar de não ter ocorrido diferença dos grupos R, D e R+D em relação ao grupo CP, há uma tendência de inibição da apoptose neural nesses animais já que a contagem de células em morte celular também não diferiu do grupo que não recebeu trauma (Figura 9). Esses resultados sugerem que uma única aplicação dos fármacos, após trauma medular agudo foi capaz de diminuir a morte neural nos segmentos caudal e cranial conforme demonstrado por Torres et al. (2010a), tanto quando utilizados como monoterapia quando utilizados em associação, possuindo efeito antiapoptótico.

Não foi realizada a técnica de TUNEL no epicentro da lesão, pois há ocorrência de necrose em maior escala, o que poderia ocasionar muita marcação inespecífica (células em processo de apoptose e necrose) levando a resultados pouco confiáveis (Beattie et al., 2000).

A técnica imunoistoquímica de TUNEL permitiu avaliar fragmentação de DNA, consequentemente, morte celular, de células neurais (neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e microgliócitos). A técnica consiste na ligação específica da enzima TdT (enzima transferase deoxinucleotídicil terminal) à extremidade 3'-OH do DNA fragmentado, e na subsequente amplificação pela ligação avidina-peroxidase. Consegue-se, portanto avaliar células que sofreram clivagem do DNA, que ocorre tanto no processo de necrose como no processo de apoptose (Lu et al., 2000). Isoladamente, a técnica não é muito específica para marcação de células

apoptóticas, mas sugere-se que a utilização de um peso compressivo de 40,5g, que proporciona um trauma discreto a moderado, permitiu uma maior formação de células apoptóticas comparadas à ocorrência de necrose no epicentro e nos segmentos adjacentes ao trauma (Fukushima, 2011³⁶).

O riluzol e o dantrolene atuam em várias etapas da injúria secundária após trauma medular agudo, principalmente no desequilíbrio hidroeletrólítico, que resultam em acúmulo de cálcio intracitoplasmático e na ativação de morte celular por apoptose. Com isso menos células TUNEL positivas foram observadas em animais que, após trauma medular agudo, receberam esses fármacos demonstrando seus efeitos na neuroproteção (Figura 8).

³⁶ Comunicação pessoal

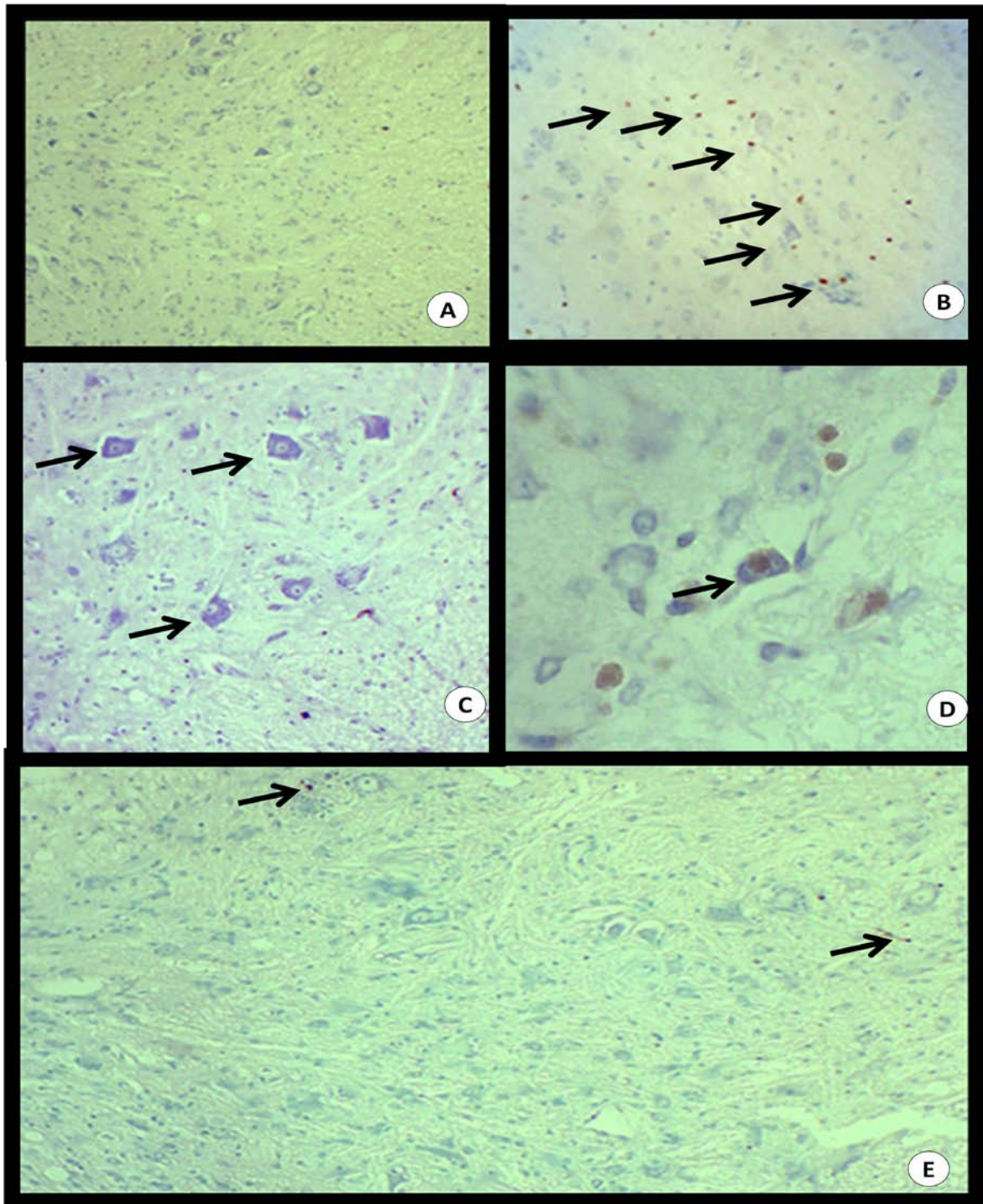


Figura 8 - Fotomicroscopia de secções transversais da medula espinhal de ratos Wistar na região cranial ao epicentro da laminectomia submetidas à técnica TUNEL. Figuras 8A e C) Medulas espinhais de animais do grupo CN. A) Observar ausência de marcação de fragmentação de DNA, ou células TUNEL positivas nas substâncias branca e cinzenta – 69,4x. C) Observar corpos neuronais íntegros e ausência de marcação células TUNEL positivas (setas) – 142,9x. Figuras 8B e D) Medulas espinhais de animais do grupo controle positivo. B) Observar células TUNEL positivas em grande quantidade na região de funículo lateral da substância branca (setas) – 68,28x. D) Observar corpos neuronais marcados pela técnica TUNEL (seta) – 142,41x. E) Medula espinhal de um animal do grupo traumatizado que recebeu a associação do riluzol ao dantrolene em que são observadas poucas células TUNEL positivas (seta) – 72,79x.

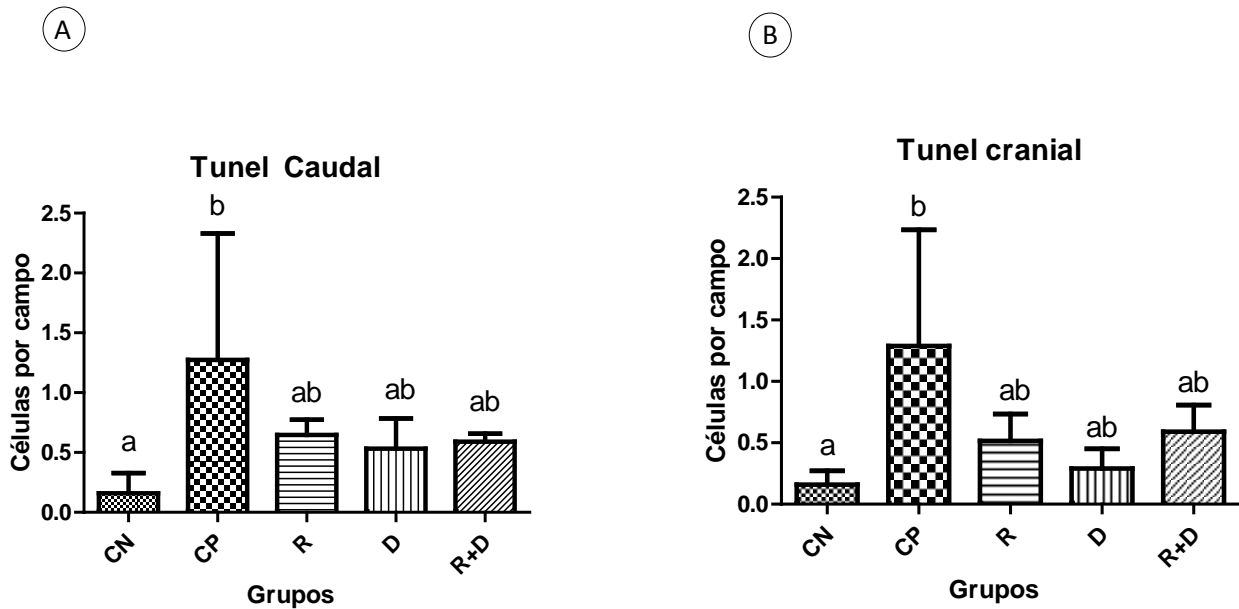


Figura 9 – Gráficos das médias e desvios padrão do número de células neurais TUNEL-positivas por campo, em medula espinhal de ratos Wistar nos segmentos caudal (A) e cranial (B) sem trauma (CN- controle negativo) e submetidas ao trauma e tratadas com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e associação do riluzol ao dantrolene (R+D). Letras minúsculas distintas expressam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

4.8 Neu-N

Não foi observada marcação de células da glia ou de células com características apoptóticas ou necróticas. Com isso, foi considerado células NeuN positivas aquelas que apresentaram o núcleo ou o citoplasma marcados (Figura 10).

Em todos os segmentos medulares (cranial, epicentro e caudal) observou-se maior número de células marcadas nos grupos em que os animais não foram submetidos ao trauma medular quando comparadas ao grupo CP. Isso indica que o peso compressivo de 40,5 g foi capaz de ocasionar trauma medular discreto a moderado com diminuição significativa da quantidade de neurônios íntegros marcados pela técnica NeuN (Figura 10).

No segmento cranial observou-se ainda, que apenas o grupo tratado com a associação de riluzol ao dantrolene apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo CP, demonstrando que apenas a associação dos fármacos foi capaz de manter a integridade de células neuronais após trauma medular agudo (Figura 11). Apesar dos grupos tratados com riluzol e dantrolene, em monoterapia, não apresentarem diferença estatística do grupo CP, também não foi observada diferença estatística quando se comparou com a associação dos fármacos demonstrando uma tendência de recuperação neurológica dos animais que foram tratados com os fármacos isoladamente como foi também observado por Stutzman e colaboradores (1996) e Torres e colaboradores. (2010a).

No epicentro da lesão os grupos tratados com riluzol e dantrolene não diferiram dos grupos CN e CP. Isso indica que os animais que receberam riluzol e

dantrolene, associados ou não, apresentam uma tendência de recuperação neurológica quando comparado ao grupo que recebeu apenas placebo, fato que poderia ser mais evidente se o número de animais utilizados em cada grupo fosse maior.

A avaliação do segmento caudal também demonstrou que a associação dos fármacos foi capaz de manter mais neurônios íntegros, após trauma medular agudo, quando comparado ao grupo controle positivo reafirmando o potencial efeito neuroprotetor que a associação dos fármacos possui. Nesse segmento também foi observado que, dos tratamentos utilizados em monoterapia, apenas o riluzol foi capaz de promover efeito neuroprotetor.

O anticorpo monoclonal anti-NeuN, amplamente empregado como marcador neuronal em culturas celulares ou diagnósticos histopatológicos, foi utilizado para determinar a viabilidade neuronal e o efeito neuroprotetor do riluzol e do dantrolene (Sun et al., 2009). Isto se deve ao fato de a proteína NeuN ser expressa apenas em corpos neuronais viáveis, tanto no núcleo como no citoplasma, não sendo expressa em células da glia, com isso a ligação do anticorpo à proteína NeuN permitiu avaliar a quantidade de corpos neuronais íntegros presentes na substância cinzenta de forma acurada.

Uma vez que houve maior expressão protéica de NeuN e menor marcação de TUNEL nos animais que receberam riluzol e dantrolene, principalmente com a associação destes, pode-se confirmar o efeito neuroprotetor desses fármacos. Os resultados obtidos no presente trabalho são inéditos e sugerem que a associação de riluzol ao dantrolene possui efeito neuroprotetor sinérgico na inibição da apoptose neural.

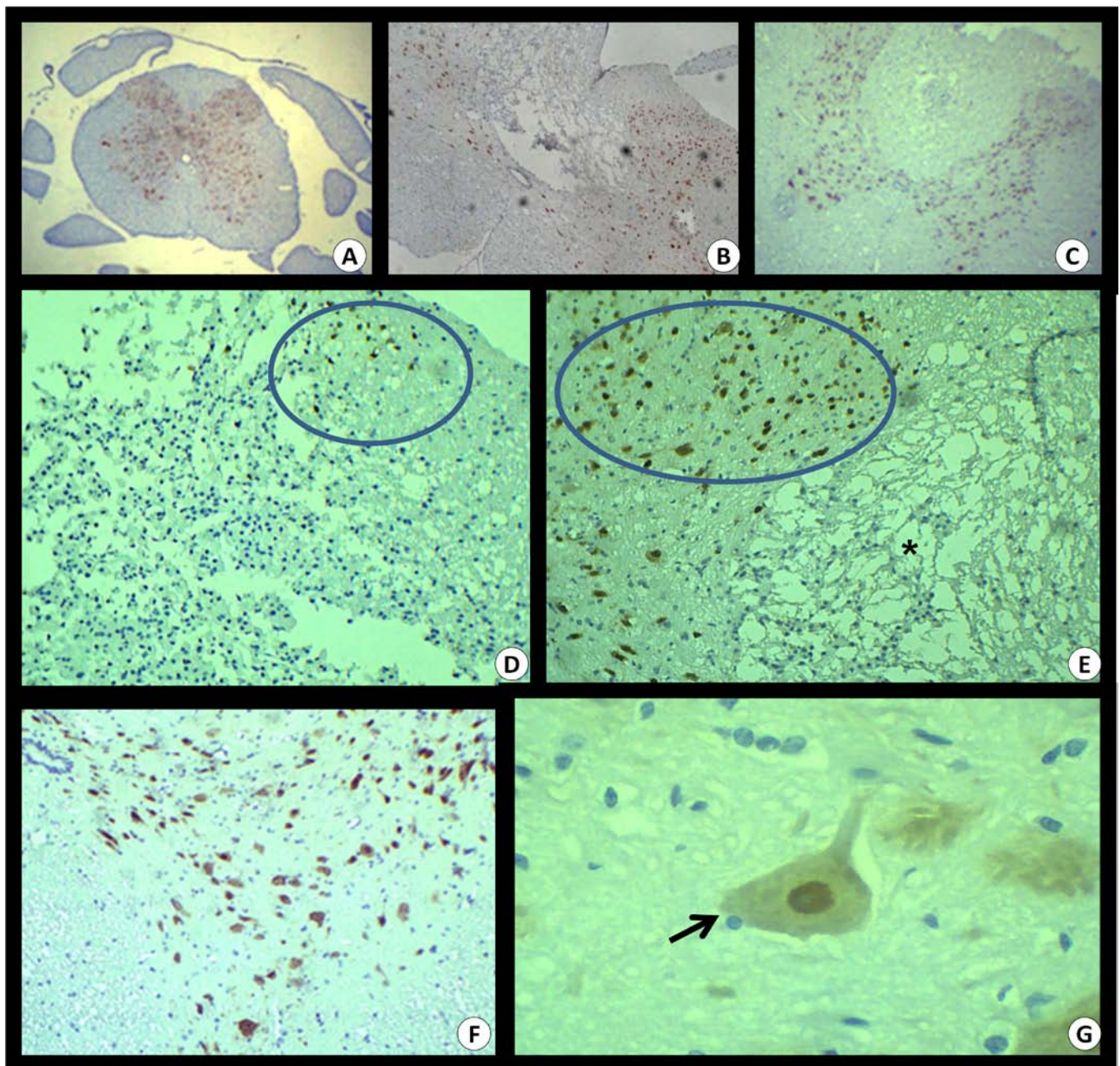


Figura 10 – Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos Wistar submetidos à imunistoquímica com anti-NeuN. Figuras 10A,G) Medula espinhal de um animal do grupo controle negativo na região cranial adjacente ao epicentro da laminectomia . A) Observar a imunomarcção de corpos neuronais (NeuN- positivos) distribuidos por toda substância cinzenta – 13,99x. G) Observar corpo neuronal íntegro com o núcleo e citoplasma NeuN- positivos (seta) -1000x. Figuras 10B,D) Medulas espinhais de animais do grupo controle positivo na região cranial adjacente ao epicentro da laminectomia. B) Observar perda da arquitetura normal da medula com regiões de malácia e menor número de células NeuN-positivas – 100x. D) Observar perda da arquitetura com intensa área de malácia e escassez de imunomarcção de neurônios (círculo) – 250x. Figuras 10C,,F) Medulas espinhais de animais do grupo traumatizado tratados com a associação do riluzol ao dantrolene em região cranial adjacente ao epicentro. C) Observar células NeuN-positivas em grande quantidade – 6,21x. F) Observar grande quantidade de células NeuN-positivas – 145,7x. Figura 10E) Medula espinhal de rato na região de epicentro do grupo tratado com a associação do riluzol ao dantrolene em que se observa-se moderada quantidade de células NeuN-positivas (círculo) adjacentes à região de malácia (asterisco) – 250x.

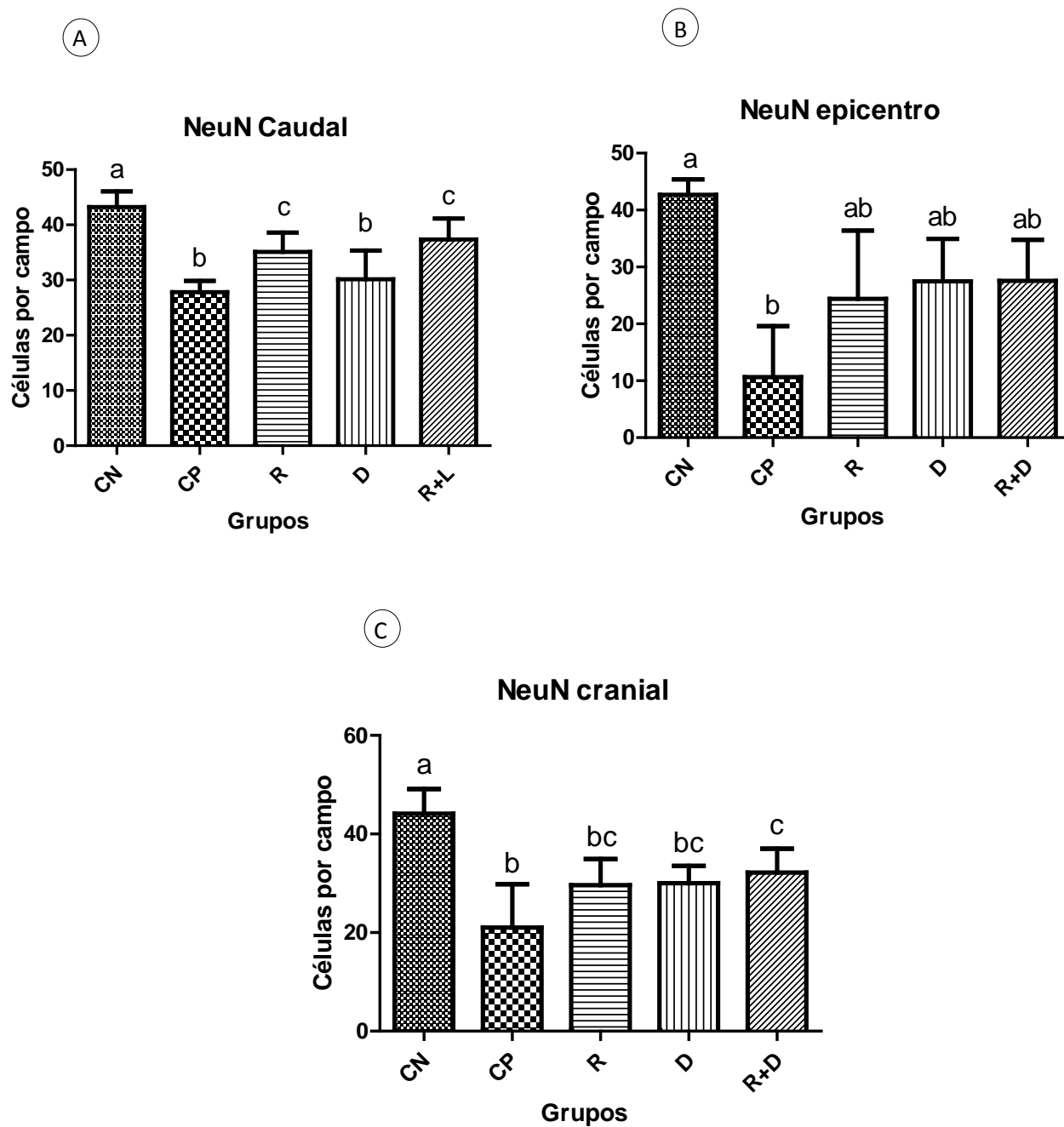


Figura 11 – Gráficos das médias e desvios padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em medula espinhal de ratos Wistar nos segmentos caudal (A), epicentro (B) e cranial (C) do grupo sem trauma (CN- controle negativo) e de grupos traumatizados e tratados com placebo (CP), riluzol (R), dantrolene (D) e associação do riluzol ao dantrolene (R+D). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

5. CONCLUSÕES

O trauma medular agudo compressivo com a utilização de um peso de 40,5g foi capaz de produzir lesão medular aguda em ratos Wistar de intensidade leve a moderada.

Os fármacos riluzol (4mg/kg) e dantrolene (10mg/kg) aplicados pela via intraperitoneal em dose única, associados em monoterapia, não produziram efeitos colaterais sistêmicos e podem ser utilizados de forma segura como protocolo para tratamento de injúrias medulares aguda.

A associação de riluzol e dantrolene, aplicados em dose única, foi capaz de promover recuperação motora em ratos, após oito dias de avaliação.

O riluzol e o dantrolene são fármacos que possuem efeito antiapoptótico em ratos submetidos a trauma medular agudo, principalmente quando utilizados em associação, indicando, portanto que a associação dos fármacos possui efeito neuroprotetor sinérgico para o tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERY, A.; TATOR, C.; KRASSIOUKOV, A. A global perspective on spinal cord injury epidemiology. *J Neurotrauma*, v. 21, p. 1355-1370, 2004.

AGRAWAL, S.K.; GEHLINGS, M.G. Role of NMDA and Non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci*, v.17, n.3, p.1055-1063, 1997.

AMAR, A. P. Pathogenesis of Acute Spinal Cord Injury and Theoretical Bases of Neurological Recovery. In AMAR, A.P. *Surgical Management of spinal Cord Injury: Controversies and Consensus*. 1ª ed. Blackwell Publishing, 2007, p.1-17.

ANDERSON, N.L.; ANDERSON, N.G. The human plasma proteome. *Molec.Cell.Proteom.*, v.1, p.845-867, 2002.

ARAÚJO, I.S. Presence of free radical in spinal Cord injury. Experimental evidence

in rats. *Rev. Bras. Neurol.*, v.41, n.1, p. 23-29. 2005.

ARISHIMA, Y.; SETOGUCHI, T.; YAMAURA, I. et al. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. *Spine*, v. 31, n.21, p. 2432-2438, 2006.

ASLAN, A., CEMEK, M., BUYUKOKUROGLU, M.E et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury, *Eur Spine J*, **18**: 10, 1442-1451, 2009.

BAGLEY, R.S. Spinal fracture or luxation. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.30, n.1, p.133-153, 2000.

BAPTISTE, D.C.; AUSTIN, J.W.; ZHAO, W. et al. Systemic polyethylene glycol promotes neurological recovery and tissue sparing in rats after cervical spinal cord injury. *J.Neuropathol Exp Neurol*, v.68, p.661-676, 2009.

BARBEITO, L.; CHERAMY, A.; GODEHEU, G.; et al. Glutamate receptors of a quisqualate-kainate subtype are involved in the presynaptic regulation of dopamine release in the cat caudate nucleus *in vivo*. *Eur. J.Neurosci*. v.2, p.304-311, 1990.

BARNÉOUD, P.; MAZADIER, M.; MIQUET, J.M. et al. Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*, v.74, p.971-983, 1996.

BARTHOLDI, D.; SCHWAB, M.E. expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci*, v.9, n.7, p.1422-1438, 1997.

BASSO, D.M. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies, *J Neurotrauma*, v. 21, n. 4, p.395-404, 2004

BASSO, D.M.; BEATIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. et al. MASCIS Evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on

- reliability. *J Neurotrauma*, v. 13, n. 7, p.343-359, 1996.
- BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, v.12, p. 1-21, 1995.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.*, v.139, n.2, p.244-256, 1996.
- BEARE, J.E.; MOREHOUSE, J.R.; DEVRIES, W.H. et al. Gait analysis in normal and spinal contused mice using the treadscan system, *J Neurotrauma*, v. 26, n. 11, p. 2045-2056, 2009.
- BEATTIE, M.S.; FAROOQUI, A.A.; BRESNAHAN, J.C. Review of Current Evidence for Apoptosis After Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*, v.17, n.10, p. 915-925, 2000.
- BEHRMANN, D.L.; BRESNAHAN, J.C.; BEATTIE, M.S. et al. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*, v.9, p. 197-217, 1992.
- BENAVIDES, J.; CAMELIN, J.C.; MITRANI, N.; et al. 2-amino-6trifluoromethoxybenzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission.II. *Neuropharmacology*. v.24, p.1085-1092, 1985
- BENAZZOZ, A.; BORAUD, A.; DUBEDAT, P.; et al. Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study. *Eur. J. Pharmacol.* v. 284, o.299-307, 1995.
- BENOIT, E.; ESCANDE, D. Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibers. *Pflugers Arch.* v. 419, p.603-609, 1991.
- BENSIMON, G.; LACOMBLEZ, L.; MEININGER, V. A controlled trial of riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New Engl J Medicine*, v.330, p.585-591, 1994.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. *Vet. Med.*, v.95, n.11, p.855-866, 2000.
- BRAUND, K.G. Traumatic disorders. In: IVIS. *Clinical Neurology in Small Animals - Localization, Diagnosis and Treatment*. 2003.
- BRECHTEL, K.; TURA, A.; ABDIBZADEH, M. et al. Intrinsic locomotor outcome in dorsal transection of rat spinal cord: predictive value of minimal incision depth. *Spinal Cord*, v.44, n.10, p. 605-613, 2006.
- BÜYÜKOKUROGLU, M.E. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of dantrolene sodium in rats and mice. *Pharmacol. Res.*, v.45, p.455-460, 2002.
- BÜYÜKOKUROGLU, M.E.; GULÇIN, I.; OKTAY, M. et al. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol. Res.*, v.44, p.491-494, 2001.
- CADOTTE, D.W.; FEHLINGS, M.G. Spinal cord injury - A systematic review of current treatment options. *Clin Orthop Relat Res.*, v. 469, p. 732-741, 2011.
- CALDEIRA, F.M.C. *Células tronco mesenquimais indiferenciadas no tratamento do trauma medular espinhal de ratos Lewis*. 2011.100f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- CAO, Q.; ZHANG, Y.P.; IANNOTTI, C. et al. Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat. *Exp. Neurol.*, v.191, suppl.1, p.S3-S16, 2005.
- CARDENAS, D. D., DITUNNO, J., GRAZIANI, V.; et al. Phase 2 trial of sustained-release fampridine in chronic spinal cord injury. *Spinal Cord*, v.45, n.2, p.158-168, 2007.

- CARLSON, S.; PARRISH, M.E.; SPRINGER, J.E. et al. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.*, v.151, n.1, p. 77-88, 1998
- CASTELLS, L.I.; GÁMEZ, J.; CERVERA, C. et al. Icteric toxic hepatitis associated with riluzole. *Lancet*, v.351, p.648, 1998.
- CHACÓN, S.C.; NIETO-SAMPEDRO, M. Pathophysiology of spinal Cord injury. A review. *Vet. Mex.*, v.36, n.1, p. 75-86, 2005.
- CHEAH, B.C.; VUCIC, S.; KRISHNAN, A.V. et al. Riluzole, Neuroprotection and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cur. Medic. Chemistry.*, v.17, p.1942-1959, 2010.
- CHERAMY, A.; BARBEITO, L.; GODEHEU, G. et al. Riluzole inhibits the release of glutamate in the caudate nucleus of cat *in vivo*. *Neurosci Lett.* v. 147, p. 209-212, 1992.
- CHOO, A.M.; LIU, J.; LAM, C.K. et al. Contusion, dislocation, and distraction: primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanism of spinal cord injury. *J. Neurosurg Spine*, v.6, p.255-266, 2007.
- 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.
- CROWE, M.J.; BRESNAHAN, J.C.; SHUMAN, S.L. et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature*, v.3, p. 73-76, 1997.
- DAME, C.; JUUL, S. E.; CHRISTENSEN, R. D. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate*, v. 79, n. 3-4, p. 228-235, 2001.
- DANTAS, J.A., AMBIEL, C.R., CUMAN, R.K.N. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta. Sci. Health*, v.28, n.2, p.165-170, 2006.
- DEBONO, M.W.; LE GUERN, J.; CANTON, T.; et al. Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* v.235, p. 283-289, 1993.
- DELAHUNTA, A.; GLASS, E. *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*. 3^a ed. St Louiz: Saunders, 2009, 540p.
- DOBLE, A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, n. 47, p. 233-41, 1996.
- DONNELLY, D.J.; POPOVICH, P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, v.209, n.2, p. 378-338, 2008.
- DURHAM, J.A.; GANDOLFI, A.J., BENTLEY, J.B. Hepatotoxicological evaluation of dantrolene sodium. *Drug. Chem. Toxicol.*, v.7, p.23-40, 1984.
- DYKES, M.H. Evaluation of a muscle relaxant: dantrolene sodium (Dantrium). *JAVMA*, v.231, p. 862-864, 1975.
- EIDELBERG, E.; STATEN, E.; WATKINS, J.C. et al. A model of spinal cord injury. *Surg Neurol*, v.6, p.35-38, 1976.
- ERBAYRAKTAR, S.; YILMAZ, O.; GOKMEN, N. et al. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep*, v. 2, n. 6, p. 465-470, 2003.
- FAROOQUE, M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathol.*, v.100, n.1, p.13-22, 2000.
- FEE, D.M.; SWARTZ, D.R.; JOY, K.M. et al. Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Res*, v.1137, p.146-152, 2007.

- FEHLINGS, M.G.; NGUYEN, D.H. Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *J Clin Immunol*, v.1, p. S109–S112, 2010.
- FINK, M.; LESAGE, F.; DUPRAT, F. et al. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *Embo J*, v.17, p.3297-3308, 1998.
- FLEWELLEN, E.H.; NELSON, T.E.; JONES, W.P. et al. Dantrolene dose response in awake man: implications for management of malignant hyperthermia. *Anesthesia*, v. 59, p.275-280, 1983.
- FOX, C.; DINGMAN, A.; DERUGIN, N., et al. Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia–reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 25, n. 9, p. 1138–1149, 2005.
- FRANSEN, A.; SCHOUSBOE, A. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca²⁺ release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J.Neurochem*, v.56, p.1075-1078, 1991.
- FU, Q.; HUE, J.; LI, S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via RhoA inhibition. *J.Neurosci*, v.27, p.4154-4164, 2007.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, v.199, p.493-501, 1992.
- GRACIES, J.M.; NANCE, P.; ELOVIC, E. et al. Tradicional pharmacological treatments for spasticity part II: general and regional treatments. *Muscle and Nerve*, v.20, p.92-120, 1997.
- GREEN, D. Apoptotic pathway: the roads to ruin. *Cell*, v.94, p.695-698, 1998.
- GRUNER J.A. A monitored contusion modelo of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma*, v.25, p.123-126, 1992.
- GUIZAR-SAHAGUN, G.; GRIJALVA, I.; SALGADO-CEBALLOS, H. et al. Spontaneous and induced aberrant sprouting at the site of injury is irrelevant to motor function outcome in rats with spinal cord injury. *Brain Research*, v.1013, p. 143-151, 2004.
- GULY, H.R.; BOUAMRA, O.; LECKY, F.E. The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department. *Resuscitation*, v.76, p. 57-62, 2008.
- GWAK, M.; PARK, P.; KIM, K. et al. The effects of dantrolene on hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain. *Anesth. Analg*, v.106, p.227-233, 2008.
- HADAD, E.; COHEN-SIVAN, Y.; HELED, Y. et al. Clinical review: treatment of heat stroke – should dantrolene be considered? *Crit Care*, v.9, p.86-91, 2005.
- HAGEN, E.M., LIE, S.A., REKAND, T. et al. Mortality after spinal cord injury: 50 years of follow-up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 81: p368-373, 2010.
- HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J.Neurotrauma*, v.23, p.263-280, 2006.
- HALL, E.D.; SPRINGER, J.E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*, v.1, p.80-100, 2004.
- HARRISON, G.G.; Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br.J.Anaesth.*, v.47, p.62-65, 1975.
- HASSANZADEH, K.; ROSHANGAR, L.; HABIBI-ASL, B. et al. Riluzole prevents morphine-induced apoptosis in rat cerebral cortex. *Pharmacological reports*, v.63, n.3, p. 697-707, 2011.
- HAUSMANN, O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, v.41, p. 369-378, 2003.
- HAYES, K. C. The use of 4-aminopyridine (fampridine) in demyelinating disorders. *CNS Drug Rev*, v. 10, n. 4, p. 295–316, 2004.

- HAYES, K. C.; POTTER, P. J.; HANSEBOUT, R. R. et al. Pharmacokinetic studies of single and multiple oral doses of fampridine-SR (sustained-release 4-aminopyridine) in patients with chronic spinal cord injury. *Clin Neuropharmacol*, v. 26, n. 4, p. 185–192, 2003.
- HEBERT, T.; DRAPEAU, P.; PRADIER, L. et al. Block of the rat brain IIA sodium channel α subunit by the neuroprotective drug riluzole. *Mol Pharmacol*. v. 45, p.1055-1060, 1994.
- HERRERA, J.J.; HAYWOOD-WATSON II, R.J.L.; GRILL, R. Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. *J.Neurotrauma*, v.27, p.423-431, 2010.
- HOANG, T. X.; AKHAVAN, M.; WU, J. et al. Minocycline protects motor but not autonomic neurons after cauda equina injury. *Exp Brain Res*, v.189, n. 1, p. 71–77, 2008.
- HUANG, C.S.; SONG, J.H.; NAGATA, K. et al. Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 282, n° 3. 1997.
- JAVED, M.; BOGDANOV, A. Oral dantrolene and severe respiratory failure in a patient with chronic spinal cord injury. *Anaesthesia*, v.65, p.855-856, 2010.
- JEFFERY, N.D.; BLAKEMORE, W.F. Spinal cord injury in small animals. Mechanisms of spontaneous recovery. *Vet.Rec.*, v.144, n.15, p.407-413, 1999.
- JELKMANN, W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*, v.72, n.2, p.449–489, 1992.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.448p.
- KACHUCK, N. J. Sustained release oral fampridine in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother*, v. 10, n. 12, p. 2025–2035, 2009.
- KANEKO, J.; HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals, 6ed. San Diego: Academic Press, 2008, 896p.
- KAPTANOGLU, E.; SOLAROGLU, I.; OKUTAN, O. et al. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev*, v. 27, n. 2, p. 113–120, 2004.
- KAUFMAN, D.W.; KELLY, J.P.; JURGELON, J.M., et al. Drugs in the aetiology of agranulocytosis and aplastic anaemia. *Eur J Haematol*, v.57, n.S60, p.23-30, 1996.
- KEANE, R.W.; DAVIS, A.R.; DIETRICH, W.D. Inflammatory and Apoptotic Signaling after Spinal Cord Injury. *J.Neurotrauma*, v.23, p.335-344, 2006
- KHAN, M.; GRIEBEL, R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can J Neurol Sci*, v.10, p. 161-165, 1983.
- KIM, J.Y.; CHUN, S.; BANG, M.S. et al. Safety of low-dose oral dantrolene sodium on hepatic function. *Arch Phys Med Rehabil*, v.92, p.1359-1363, 2011.
- KLUSMAN, I.; SCHWAB, M.E. effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res*, v.762, n. 1-2, p.173-184, 1997.
- KWON, B.K.; OXLAND, T.R.; TETZLAFF, W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, v.27, n.14, p.1504-1510, 2002.
- KNOW, B.K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J.N. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The spine Journal*, v.4, p.451-464, 2004.
- KWON, B.K.; OKON, E.; HILLYER, J.; et al. A systematic Review of Non-Invasive Pharmacologic Neuroprotective Treatments for Acute Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*, v.27, p. 1-44, 2009.
- KNOW, B.K.; ROY, J.; LEE, J.H. et al. Magnesium chloride in a polyethylene

- glycol formulation as a neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: preclinical refinement and optimization. *J.Neurotrauma*, DOI:10.1089/neu.2009-0884, 2010.
- KOCOULLARI, C.U.; EMMILER, M.; CEMEK, M. et al. Can dantrolene protect spinal cord against ischemia / reperfusion injury? An experimental study. *Thorac. Cardiovasc. Surg*, v. 56, p. 406–411, 2008.
- KOH, J.Y.; KIM, D.K.; HWANG, J.Y. et al. Antioxidative and proapoptotic effects of riluzole on cultured cortical neurons. *J Neurochem*, v.72, n.2, p.716-723, 1999.
- KOLB, M.E.; HORNE, M.L.; MARTZ, R. Dantrolene in human malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, v.56, p.254-262, 1982.
- KONTOGEOGAKOS, V.A.; VOULGARIS, S.; KOROMPILIAS, A.V. et al. The efficacy of erythropoietin on acute spinal cord injury. An experimental study on a rat model. *Arch. Orthop. Trauma Surg*, v.129, p.189-194, 2009.
- KRASSIOUKOV, A.; CLAYDON, V.E. The clinical problems in cardiovascular control following spinal cord injury: An overview. *Prog Brain Res*, v. 152, p. 223–229, 2006.
- KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M.U.; FIEGE, M.; et al. Dantrolene- A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesth.*, v.59, n.4, p.364-373, 2004.
- KRETSCHMER, B.D., KRATZER, U., SCHMIDT, W.J. Riluzole, a glutamate release inhibitor, and motor behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 358: 181-190, 1998.
- LACOMBLEZ, L.; BENSIMON, G.; LEIGH, P.N. et al. For the ALS/Riluzole study group II. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, v.348, p.795-809, 1996.
- LAMANAUSKAS, N.; NISTRIS, A. Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *Eur Journal of Neuroscience*, v.27, p.2501-2514, 2008.
- LANG-LAZDUNSKIA, L.; HEURTEAUX, C.; MIGNONC, A.; et al. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Euro. J. Cardiothorac. Surg.*, v.18, n.2, p. 174-181, 1999.
- LAVERTY, P.H.; LESKOVAR, A.; BREUR, G.J. et al. A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs: polymer therapy in canine clinical SCI. *J.Neurotrauma*, v.21, p. 1767-1777, 2004.
- LEITMAN, P.S.; HASLAM, R.H.; WALCHER, J.R. Pharmacokinetics of intravenous dantrolene sodium in children. *Arch Phys Med Rehabil*, v.55, p. 388-392, 1974.
- LI, F.; HAYASHI, T., JIN, G. et al. The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers. *Brain Res.*, v.1048, n. 1-2, p.59-68, 2005.
- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng J Med*, v.330, p. 613-622, 1994.
- LIU, D.; XU, G.Y.; PAN, E. et al. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience*, v.93, p.1383-1389, 1999.
- LIU, W.M.; WU, J.Y.; LI, F.C. et al. Ion channel blockers and spinal cord injury. *J Neuroscience research*, v.89, p.791-801, 2011.
- LIU, X.Z.; XU, X.M.; HU, R. et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neuroscience*, v. 17, p.6395-6408, 1997.
- LONJON, N.; KOUYOUMDJIAN, P.; PRIETO, M. et al. Early functional outcomes and histological analysis after spinal cord compression injury in rats. *J Neurosurg Spine*, v.12, p. 106-113, 2010.

- LU, J.; ASHWELL, K.W.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury. *Spine*, v.25, p.1859-1866, 2000.
- LUNA, L.G. *Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3. ed. New York:McGraw Hill, 1968. 258p.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis – An overview of cell death. *Am J Pathol*, v.169, n.1, p.3-15, 1995.
- MARCHAND, F.; TSANTOULAS, C.; SINGH, D. et al. Effects of etanercept and minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain*, v. 13, n. 7, p. 673–681, 2009.
- MARSALA, M.; YAKSH, T.Y. Transient spinal ischemia in the rat: characterization of behavioral and histopathological consequences as a function of the duration of aortic occlusion, *J Cereb Blood Flow Metab*, v.14, p. 526-535, 1994.
- MARTIN, D.; THOMPSON, M.A.; NADLER, J.V. The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *Eur. J. Pharmacol.* v. 250, p.473-476, 1993.
- MARTIN, S.H.; BLOEDEL, J.R. Evaluation of experimental spinal cord injury using cortical evoked potentials. *J Neurosurg*, v.39, p. 75-81, 1973.
- MAZZONE, G.L.; NISTRÌ, A. Delayed neuroprotection by riluzole against excitotoxic damage evoked by kainate on rat organotypic spinal cord cultures. *J Neuroscience*, v.190, p.318-327, 2011.
- MCADOO, D.J.; XU, G.Y.; ROBAK, G. et al. Changes in amino acid concentrations over time and space around and impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol*, v.159, p. 538-544, 1999.
- MCTIGUE, D.M. Potential therapeutic targets for ppar after spinal cord injury. *PPAR Res*, v.2008, p.1-7, 2008.
- MEININGER, V.; LACOMBLEZ, L.; SALACHAS, F. What has changed with riluzole? *J.Neurol*, v.247, p.19-22, 2000.
- 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.
- MIKAMI, Y.; TODA, M.; WATANABE, M. et al. A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice: technical note. *J Neurosurgery*, v.97, n.1, p. 142-147, 2002.
- MITSUI, A.J.; VELEZ, P.; SCHENDEL, S.L. et al. Transplants of fibroblasts expressing BDNF and NT-3 promote recovery of bladder and hindlimb function following spinal cord contusion injury in rats. *Exp. Neurol.*, v.194, p.410-431, 2005.
- MIZOULE, J.; MELDRUM, B.S.; MAZADIER, M.; et al. 2-amino-6-trifluoromethoxybenzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission.I. Anticonvulsant properties. *Neuropharmacology*. v.24, p.767-773, 1985.
- MORI, F.; OKADA, M.; TOMIYAMA, M. et al. Effects of ryanodine receptor activation on neurotransmitter release and neuronal cell death following kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*, v. 65, p. 59–70, 2005.
- MORRIS, R.G.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S. et al. Selective impairment of learning and blockade of long term potentiation by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, Ap5. *Nature*, v.319, p.774-776, 1986.
- MOWBRAY, M.; SINCLAIR, S.A.; ALLAN, S.J. Severe acneiform eruption exacerbated by dantrolene sodium. *Clin exp Dermatol*, v.34, p.248-249, 2009.
- MU, X.; AZBILL, R.D.; SPRINGER, J.E. Riluzole and Methyprednisolone Combined Treatment Improves Functional Recovery in Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*, 17:773-781, 2000.
- MU, X.; AZBILL, R.D.; SPRINGER, J.E. Riluzole treatment following spinal cord

- injury improves mitochondrial function and increases glutamate and glucose uptake. *Soc Neurosci*, v.23, p.1384, 1997.
- MUIR, G.D.; WEBB, A.A. Assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *Eur J Neuroscience*, v.12, p. 3079-3086, 2000.
- NAGEL, S., SU, Y., HORSTMANN, S. et al. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res*, v. 1188, p. 198–206, 2008.
- NAKAYAMA, R.; YANO, T.; USHIJIMA, K. et al. Effects of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia. *Anesthesiol*, v. 96, p. 705–710, 2002.
- NOGRADI, A.; SZABO, A.; PINTER, S. et al. Delayed riluzole treatment is able to rescue injured rat spinal motoneurons. *J Neuroscience*, v.144, p. 431-438, 2007.
- NORENBERG, M.D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma*, v.21, n.4, p. 429-440, 2004.
- ONOSE, G.; ANGHELESCU, A.; MURESANU, D.F.; et al. A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury. *Spinal Cord*, v.47, n.10, p. 716-726, 2009.
- OUARDOUZ, M.; MALEK, S.; CODERRE, E.; et al. Complex interplay between glutamate receptors and intracellular Ca²⁺ stores during ischaemia in rat spinal cord white matter. *J Physiol*. P.191-204, 2006.
- OYINBO, C.A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp*, v.71, p.281-299, 2011.
- OZAWA, H.; KEANE, R.W.; MARCILLO, A.E.; et al. Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurology*, v.177, p. 306-313, 2002.
- PARENT, J. Clinical approach and lesion localization in patients with spinal disease. *Vet Clin. Small Anim*, v.40, p. 733-753, 2010.
- PARK, E.; VELUMIAN, A.A.; FEHLINGS, M.G. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma*, v.21, p. 754-774, 2004.
- PATERNITI, I.; GENOVESE, T.; CRISAFULLI, C. et al. Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, v.380, p.179-192, 2009.
- PINDER, R.M.; BROGDEN, R.N.; SPEIGHT, T.M. et al. Dantrolene sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in spasticity. *Drugs*. v. 13, p.2-23, 1977.
- POPESCU, B.O.; OPRICA, M.; SAJIN, M. et al. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Med.*, v.6, n.4, p.555-569, 2002.
- POPOVICH, P.G.; WEI, P.; STOKES, B.T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp Neurol*, v.337, n.3, p.443-464, 1997.
- PRATT, J.; RATAUD, J. BARDOT, F.; et al. Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal ischaemia. *Neurosci Lett*. v. 140, p. 225-230, 1992.
- RABCHEVSKY, A.G.; PATEL, S.P.; SPRINGER, J.E. Pharmacological interventions for spinal cord injury: Where do we stand? How might be step forward? *Pharmacology and Therapeutics*, v.132, p.15-29, 2011
- REGAN, R.F.; CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *J Neuroscience*, v.43, p.585-591, 1991

- REITHMEIER, R.A.; Mammalian exchangers and co-transporters. *Curr Opin Cell Biol*, v.6, p.583-594, 1994.
- RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol*, v. 10, p. 38-43, 1978.
- RUIZ, A.; MATUTE, C.; ALBERDI, E. Intracellular Ca²⁺ release through ryanodine receptors contributes to AMPA receptor-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress in oligodendrocytes. *Cell Death Dis*, v.1, n.54, p.1-9, 2010.
- SAADAT, I.; HUAFENG, W. The cytoprotective effects of dantrolene: a ryanodine receptor antagonist. *Analgesia*, v.111, p.1400-1410, 2010.
- SAKAMOTO, A.; OHNISHI, S.T.; OHNISHI, T. et al. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res*, v.554, n.1-2, p. 186-192, 1991.
- SCHEFF, S.W.; SAUCIER, D.A.; CAIN, M.E. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J.Neurotrauma*, v.19, p.1251, 2002.
- SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M.G. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurgery*, v.94, p.245-256, 2001.
- SCHWARTZ, M.; YOLES, E. Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. *J Neurotrauma*, v.23, p. 360-370, 2006.
- SEDÝ, J.; URDZÍKOVA, L.; JENDELOVÁ, P.; et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*. v. 32, p.550-580, 2008.
- SHINOZAKI, M.; TAKAHASHI, Y.; MUKAINO, M. et al. Novel concept of motor functional analysis for spinal cord injury in adult mice. *J Biomed Biotechnol*, v.11, p. 1-7, 2011.
- SHORTLAND, P.D.; LEINSTAR, V.H.; WHITE, W. et al. Riluzole promotes cell survival and neurite outgrowth in rat sensory neurones in vitro. *Eur J Neuroscience*, v. 24, p.3343-3353, 2006.
- SIEGENTHALER, M.M.; TU, M.K.; KEIRSTEAD, H.S. The extent of myelin pathology differs following contusion and transection spinal cord injury. *J Neurotrauma*, v.24, p.1631-1646, 2007.
- SILVA, C.M.O. *Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos (Rattus norvegicus)*. 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Effect of prednisone on acute experimental spinal cord injury in rats. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.60, n.3, p.461-650, 2008.
- SIMON, M.C.; SHARIF, S.; TAN, P.R. et al. Spinal Cord Contusion Causes Acute Plasma Membrane Damage. *J Neurotrauma*, v. 26, p. 563–574, 2009.
- SINISCALCHI, A.; ZONA, C.; SANCESARIO, G. et al. Neuroprotective effects of riluzole: an electrophysiological and histological analysis in an *in vitro* model of ischemia. *Synapse*, v.32, p.147-152, 1999.
- SNYDER H.R.J.; DAVIS, C.S.; BICKERTON, R.K. et al. 1-[(5-arylfurfurylidene) amino]-hydantoins. A new class of muscle relaxants. *J Med Chemistry*, v.10, p.807-810, 1967.
- SOBLOSKY, J.S. COLGIN, L.L.; CHORNEY-LANE, D. et al. Ladder beam and camera video recording system for evaluation forelimb and hindlimb deficits after sensorimotor cortex injury in rats. *J Neur Methods*, v.78, n. 1-2, p. 75-83, 1997.
- SORENSEN, E.M.; ACOSTA, D. Comparison of dantrolene sodium with erythromycin estolate using primary cultures or rat hepatocytes. *Drug Chem Toxicol*, v.8, p.219-237, 1985.

- SPRINGER, J.E.; AZBILL, R.D.; KENNEDY, S.E. et al. Rapid calpain I activation and cytoskeletal protein degradation following traumatic spinal cord injury: attenuation with riluzole pretreatment. *J Neurochemistry*, v.69, p. 1592-1600, 1997.
- STUTZMANN, J.M.; PRATT, J.; BORAUT, T. et al. The effect of riluzole on post-traumatic spinal cord injury in the rat. *Neuroreport*, v.7, p. 387-392, 1996.
- STYS, P.K.; WAXMAN, S.G.; RANSOM, B.R. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁺ / Ca²⁺ exchanger. *J Neuroscience*, v.12, p.430-439, 1992.
- STYS, P.K.; WAXMAN, S.G.; RANSOM, B.R. Na⁺ / Ca²⁺ exchanger mediates Ca²⁺ influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter. *Ann Neurol*, v.30, p. 375-380, 1991.
- 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.
- TARLOV, I.M. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. *Am Mel Ass Arch Neu Psych*, v.71, p. 588-597, 1954.
- TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute Spinal Cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J.Neurosurg*, v.75, p.15-26, 1991.
- TAYLOR, C.P.; GEER, J.J.; BURKE, S.P. Endogenous extracellular glutamate accumulation in rat neocortical cultures by reversal of transmembrane sodium gradient. *Neuroscience Letter*, v.145, p.197-200, 1992.
- THOMAS, A.J.; NOCKELS, R.P.; PAN, H.Q. et al. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine*, v.24, p.2134-2138, 1999.
- THOMAS, W.B.; Initial assessment of patients with neurologic dysfunction. *Vet. Clin. Small. Anim*, v. 30, n.1, p. 1-23, 2000.
- THORELL, W.E.; LEIBROCK, L.G.; AGRAWAL, S.K. Role of RYRs and IP3 receptors after traumatic injury to spinal cord white matter. *J. Neurotrauma*, v.19, p. 335-342, 2002.
- THURET, S.; MOON, L.D.; GAGE, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, v.7, p. 628-643, 2006.
- TIKKA, T.; FIEBICH, B. L.; GOLDSTEINS, G. et al. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci*, v. 21, n. 8, p. 2580-2588, 2001.
- TORRES, B.; SERAKIDES, R.; CALDEIRA, F. et al. The ameliorating effect of dantrolene on the morphology of urinary bladder in spinal cord injured rats. *Article in press*, 2011.
- TORRES, B.B.J. *Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular agudo experimental*. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- TORRES, B.B.J.; CALDEIRA, F.M.C.C.; SERAKIDES, R. et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal Cord after traumatic injury in rats. *Int J Exp Pathol*, v.91, p.530-536, 2010a.
- TORRES, B.B.J.; SILVA, C.M.O.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Modelo de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,v.62, p.92-99, 2010b.
- 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.38, p.1176-1195, 1996.
- UÇÜNCÜ, H.; TAYSI, S.; AKTAN, B. et al. Effect of dantrolene on lipid peroxidation, glutathione and glutathione-dependent enzyme activities in

- experimental otitis media with effusion in guinea pigs. *Hum. Exp. Toxicol*, v. 24, p. 567–571, 2005.
- VAN DIJK, D.J.E.; GRUYS, E.; MOUWEN, J.M.V.M. *Atlas colorido de patologia veterinária: reações morfológicas gerais de órgãos e tecidos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 200p.
- VON EULER, M.; AKESSON, E.; SAMUELSSON, E.B. et al. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp Neurology*, v.137, p. 242-254, 1996.
- VON EULER, M.; SEIGER, A.; SUNDSTRÖM, E. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp Neurology*, v.145, p.502-510, 1997.
- WAHL, F.; ALLIX, M.; PLOTKINE, M. et al. Effect of riluzole on focal cerebral ischaemia in rats. *Eur J Pharmacol*. v. 230, p. 209-214, 1993.
- WANG, X.; BUDEL, S.; BAUGHMAN, K. et al. Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth. *J.Neurotrauma*, v.26, p.81-95, 2009.
- WARD, A.; CHAFFMAN, M.O.; SORKIN, M.E. Dantrolene: a review of its pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs*. v. 32, p.130-168, 1986
- WEBB, A.A.; NGAN, S.; FOWLER, J.D. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic science. *Can Vet J*. v.51, p.485-492, 2010.
- WEI, H.; LEEDS, P.; CHEN, R.W. et al. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *J. Neurochem*, v. 75, p. 81–90, 2000.
- WEI, H.; PERRY, D.C. Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J. Neurochem*, v.67, p. 2390–2398, 1996.
- WHEELER, S.J.; SHARP, N.J.H. *Small animal spinal disorders: Diagnosis and surgery*. 2. ed. London: Mosby, 2005. 379p.
- WISEMAN, D.B.; DAILEY, A.T.; LUNDIN, D. et al. Magnesium efficacy in rat spinal cord injury model. *J Neurosurg spine*, v.10, n.4, p.308-314, 2009.
- WOKKE, J. Riluzole. *Lancenet*, v.348, p.795-809, 1996.
- WON, Y. J.; YOO, J. Y.; LEE, J. H. et al. Erythropoietin neuroprotective on GABAergic neurons against kainic acid-excitotoxicity in the rat spinal cell cultures. *Brain Res*, v. 1154, p. 31–39, 2007.
- WU, B.; REN, X. Promoting axonal myelination for improving neurological recovery in spinal cord injury. *J Neurotrauma*, v. 26, p. 1847–1856, 2009.
- XIONG, M.; CHEN, S.; YU, H. et al. Neuroprotection of erythropoietin and methylprednisolone against spinal cord ischemia-reperfusion injury. *J Huazhong Univ Sci Technol*, v.31, n.5, p. 652-656, 2011
- XU, G.Y.; HUGHES, M.G.; YE, Z. et al. Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord. *Exp Neurol*, v.187, p. 329-336, 2004.
- XU, G.Y.; HUGHES, M.G.; ZHANG, L. et al. Administration of glutamate into the spinal cord at extracellular concentrations reached post-injury causes functional impairments. *Neurosci Lett*, v.382, p. 271-276, 2005.
- YANO, T.; NAKAYAMA, R.; IMAIZUMI, T. et al. Dantrolene ameliorates delayed cell death and concomitant DNA fragmentation in the rat hippocampal Ca1 neurons subjected to mild ischemia. *Resuscitation*. V. 50, p. 117–125, 2001.
- YAZIHAN, N.; UZUNER, K.; SALMAN, B. et al. Erythropoietin improves oxidative

stress following spinal cord trauma in rats. *Injury*, v. 39, n. 12, p. 1408–1413, 2008.

YEZIERSKI, R.P. Spinal cord injury: a model of central neuropathic pain. *Neurosignals*, v.14, p.182-193, 2005.

YOSHIDA, M.; SAKAI, T. Dantrolene, a calcium-induced calcium release inhibitor, prevents the acquisition of amygdaloid kindling in rats, a model of experimental epilepsy. *Tohoku J. exp. Med*, v.209, n.4, p.303-310, 2006.

YU, W.R.; LIU, T.; FEHLINGS, T.K. et al. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury. *Eur J Neuroscience*, v.29, p. 114-131, 2009.

YUNE, T. Y.; LEE, J. Y.; JUNG, G. Y. et al. Minocycline alleviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. *J Neurosci*, v. 27, n. 29, p. 7751–7761, 2007.

ZHANG, L.; ANDOU, Y.; MASUDA, S. et al. Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci. Lett.* v. 58, p. 105–108, 1993.

ZHENG, Z.; ZHAO, H.; STEINBERG, G.K et al. Cellular and molecular events underlying ischemia-induced neuronal apoptosis. *Drug News Perspect*, v.16, p.497-503, 2003.

ANEXO 1

Certificado do Protocolo CETEA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 186/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos da associação do riluzol ao dantrolene em ratos submetidos a trauma medular agudo**", 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 **27/ 10/2010**.


Este certificado expira-se em **27/ 10/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 186/2010**, related to the project entitled "**The association effect of riluzole and dantrole in acute spinal cord trauma in 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 **October 27, 2010**.

This certificate expires in **October 27, 2015**.

Belo Horizonte, 29 de Outubro de 2010.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora 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
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2

Protocolo geral para imunistoquímica

- Estufa 65 °C (15 min)
- Xilol 1 (30 min)
- Xilol 2 (30 min)
- Álcool absoluto 1 (5 min)
- Álcool absoluto 2 (5 min)
- Álcool absoluto 3 (5 min)
- 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 - 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 3 (10 min)
- Álcool absoluto 2 (10 min)
- Álcool absoluto 1 (10 min)
- Xilol 2 (15 min)
- Xilol 1 (15 min)
- Montagem das lâminas com bálsamo do Canadá

ANEXO 3 – Protocolo TUNEL

- Estufa 67°C (5 min)
- Xilol (10 min) – Preparar TBS
- Xilol (10 min)
- Álcool absoluto (5 min)
- Álcool absoluto (5 min)
- 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 peroxidase (30 min) – temperatura ambiente no escuro.
- TBS (5 min) – Preparar o TdT Equilibration Buffer
- TBS (5 min)
- TdT Equilibration Buffer (20 min) – temp. ambiente Fazer spin da enzima e da solução na centrífuga.
- TdT Labeling Reaction Mixture (1.5 hs)
- TBS (5 min)
- Stop Solution a 37°C (5 min) – temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Blocking Buffer (10 min) – temp. 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 (20 min)
- Mergulhe 2 a 4 X em álcool absoluto
- Mergulhe 2 a 4 X em álcool absoluto novo
- Mergulhe 2 a 4 X em xilol e manter ate terminar de montar as lâminas
- Monte a lâmina.

ANEXO 4 – Artigo “avaliação da capacidade motora em campo aberto de ratos submetidos a trauma medular agudo e tratados com associação de riluzol e dantrolene

abalho de Pesquisa

Trabalho científico apresentado no Congresso Medvep de Especialidades Veterinárias 2011, realizado de 27 a 30 de Julho de 2011, no ExpoUnimed, Curitiba - PR.

Avaliação da capacidade motora em campo aberto de ratos submetidos a trauma medular agudo e tratados com a associação de riluzol e dantrolene

Evaluation of the motor capacity of rats, in an open field, submitted to acute spinal cord trauma and treated with the association of riluzole and dantrolene

Bernardo De Caro Martins – Aluno de pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária da UFMG – E-mail: bernardodcmartins@hotmail.com.
Bruno Benetti Junta Torres – Aluno de pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária da UFMG.
Guilherme De Caro Martins – Aluno residente II da Escola de Veterinária da UFMG.
Ellane Gonçalves de Melo – Professor, Dra. Escola de Veterinária da UFMG.

Martins BC, Torres BBJ, Martins GC, Melo EG. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; 2011; 9(30); 496-499.

Resumo

O riluzol e o dantrolene são fármacos que apresentam potencial efeito neuroprotetor. Não há relatos da associação destes fármacos para tratamento de trauma medular, porém acredita-se que esta possa oferecer efeito neuroprotetor sinérgico. Assim, objetivou-se avaliar a função motora em campo aberto de ratos submetidos ao trauma medular agudo e tratados com riluzol (4mg/kg), dantrolene (10 mg/kg) e placebo (volume equivalente). Foram utilizados 25 ratos Wistar (± 220 g), divididos em 5 grupos: GI (controle negativo), GII (placebo), GIII (riluzol), GIV (dantrolene) e GV (riluzol+dantrolene). Realizou-se laminectomia de T12. Os grupos GII, GIII, GIV e GV também foram submetidos a trauma medular compressivo (40,5g) por 5 minutos. Quinze minutos após o trauma GI, GII e GIV receberam placebo, e GIII e GV riluzol. Após 1 hora ao trauma, os grupos GI, GII e GIII receberam placebo, e os grupos GIV e GV dantrolene. Realizou-se observação da função motora 1 dia antes e nos 7 dias subsequentes ao procedimento cirúrgico. Não houve diferença significativa entre GI e GV. Conclui-se que a associação do riluzol ao dantrolene é capaz de promover recuperação motora em ratos submetidos ao trauma medular agudo, sugerindo efeito neuroprotetor.

Palavras-chave: trauma medular, riluzol, dantrolene, função motora, ratos

Abstract

Riluzole and Dantrolene are drugs which have potential neuroprotective effect. There are no reports of the association of these drugs for the spinal cord trauma treatment, but it is believed that can provide synergistic neuroprotective effect. Therefore, the aimed of this study was to evaluate rats motor function, in an open field, submitted to acute spinal cord trauma and treated with riluzole (4mg/kg), dantrolene (10mg/kg) and placebo (equivalent volume). 25 Wistar rats (± 220 g) were divided into five groups: GI (negative control), GII (placebo), GIII (riluzole), GIV (dantrolene) and GV (riluzole+dantrolene). Laminectomy was performed from T12. GII, GIII, GIV and GV groups were also submitted to compressive spinal cord trauma (40,5g) for 5 minutes. Fifteen minutes after the trauma GI, GII and GIV received placebo, and GIII and GV riluzole. One hour after the trauma, GI, GII and GIII received placebo and GIV and GV dantrolene. Observation of the motor function one day before

and seven days after the surgical procedure was performed. There was no significant difference between GI and GV after seven days observation. So, the combination of riluzole and dantrolene is able to promote motor recovery in rats subjected to acute spinal cord trauma, suggesting a neuroprotective effect.

Keywords: spinal cord injury, riluzole, dantrolene, motor function, rats

Introdução e Revisão de Literatura

O trauma medular ocasiona déficits neurológicos graves e de longa duração, afetando a sobrevivência dos pacientes acometidos (1). O déficit neurológico é causado por mecanismos primários, em que há ruptura mecânica de vias neurais e vasos sanguíneos; e secundários em que ocorre uma cascata de eventos bioquímicos, vasculares e eletrolíticos que evoluem para apoptose do tecido nervoso espinhal adjacente (2).

A apoptose é um processo ativo de destruição celular caracterizada pela contração citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA internucleossomal e formações de corpos apoptóticos e núcleos picnóticos (3). Ocorrem também alterações na membrana celular, devido à movimentação de moléculas de fosfolípidos para a superfície, que possibilitam o rápido reconhecimento e remoção dessas células por fagócitos sem que ocorra uma resposta inflamatória concomitante (4,5).

O riluzol (2-amino-6-trifluorometoxi-benzotiazole) é uma droga muito utilizada na medicina humana em pacientes que apresentam esclerose amiotrófica lateral (6). Há relatos de que possui efeito neuroprotetor, pois atua no bloqueio de canais iônicos de sódio e cálcio tanto do tipo quimicamente quanto voltagem dependentes, inibindo os efeitos deletérios do influxo massivo desses íons para o citoplasma celular e a neurotransmissão do glutamato (7;8). Possui poucos efeitos colaterais como sedação leve e mais raramente disfunção hepática (9).

O dantroleno sódico é um derivado da hidantoína que bloqueia a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e por isso acredita-se que proteja as células neuronais de lesões secundárias que são desencadeadas pelo acúmulo de cálcio intracitoplasmático (10,11). Apresenta-se como um fármaco seguro e com mínimos efeitos colaterais quando utilizado em doses terapêuticas. Os efeitos indesejáveis podem ocorrer com administração de dose única excessiva ou pelo uso crônico (11).

Foi demonstrado que o riluzol e o dantroleno quando utilizados como monoterapia possuem ação neuroprotetora em ratos submetidos a trauma medular agudo (12,13). Neste contexto a associação do riluzol ao dantroleno pode ter efeito sinérgico no tratamento de lesões medulares agudas e diminuir significativamente a morte neuronal por apoptose, pois ambos possuem ação neuroprotetora e sítios diferentes de atuação. Tal associação poderá, portanto, ser uma opção para

o tratamento do trauma medular agudo.

A avaliação comportamental em experimentos de lesão à medula espinhal tem como objetivos principais documentar a recuperação neurológica e identificar a integridade dos sistemas motor e sensorial (14). Com isso o efeito neuroprotetor dos fármacos pode ser avaliado pela observação da recuperação motora de ratos após lesão medular espinhal torácica (15). Apesar de existirem várias opções para essa avaliação a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em 1995, composta por 22 escores, é uma das mais utilizadas e permanece como padrão ouro para avaliação clínica de ratos submetidos ao trauma medular espinhal torácico (16). Não há relatos clínicos do efeito neuroprotetor da associação de riluzol ao dantroleno. Diante disso objetivou-se avaliar a capacidade motora em campo aberto de ratos submetidos ao trauma medular agudo e tratados com a associação de riluzol e dantroleno

Material e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) com o protocolo de número 186/10 e está de acordo com os Princípios Éticos para Uso de Animais de Laboratório do SBCAL/COBEA.

Foram utilizados 25 ratos Wistar machos (± 420 g), distribuídos em cinco grupos: GI (controle negativo) (n=5) GII (placebo) (n=5); GIII (riluzol) (n=5); GIV (dantroleno) (n=5) e GV (riluzol + dantroleno) (n=5). Todos os animais foram submetidos à laminectomia do processo espinhoso de T12. Os grupos GII, GIII, GIV e GV sofreram trauma medular compressivo, por meio de aparelho estereotáxico, com peso de 40,5g, durante cinco minutos (17). Os animais foram tratados pela via intraperitoneal com riluzol (4mg/kg), dantroleno (10mg/kg) e placebo (volume equivalente) em dois momentos (Tabela 1). A avaliação clínica consistiu na observação da capacidade motora em campo aberto de um metro de diâmetro, sem obstáculos. Os animais foram observados e filmados, um dia antes e nos setes dias subsequentes ao procedimento cirúrgico, durante dois minutos, para análise por dois avaliadores. Os animais foram então classificados em escores (0 a 21) conforme escala estabelecida por Basso, Beattie e Bresnahan em 1995 (Tabela 2). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparação entre os tratamentos ($p < 0,05$).

	Riluzol 16 min	Placebo 16 min	Dantrolene 1 hora	Placebo 1 hora
GI		X		X
GII		X		X
GIII	X			X
GIV		X	X	
GV	X		X	

Tabela 1 - Tratamentos instituídos aos grupos experimentais GI (controle negativo), GII (placebo), GIII (riluzol), GIV (dantrolene), GV (riluzol+dantrolene) em dois tempos após procedimento cirúrgico. A letra "X" indica o tratamento a que cada grupo foi submetido

Escores	Características dos MPs	Comentários
0	Ausência de movimento	
1	Movimento discreto de uma das articulações	Discreto < 50% da articulação
2	Movimento extenso de uma articulação e movimento discreto de outra articulação	Extenso > 50% da articulação
3	Movimento extenso de duas articulações	Coxofemoral e femorotibiopatelar
4	Movimento discreto das três articulações	Coxofemoral, femorotibiopatelar e tibiotársica
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira	Terceira geralmente libiotársica
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira	
7	Movimento extenso das três articulações	
8	Passada ou posicionamento plantar sem suporte de peso	Extensão rítmica das três articulações
9	Posicionamento plantar com suporte de peso somente em estação ou passada dorsal com suporte de peso ocasional, frequente ou consistente e sem apoio plantar	Suporte de peso; contração dos MPs durante o posicionamento plantar da pata ou elevação do trem posterior em estação
10	Passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação com os MTs	Ocasional: > 5% e < 50% do tempo Passos: contato da face plantar com suporte de peso, avanço dos MPs para restabelecer contato plantar
11	Passos frequentes e consistentes com suporte de peso sem coordenação com MT	Frequente: 51-94% do tempo
12	Passos frequentes e consistentes com suporte de peso e coordenação com MT ocasional	Consistente: > 95% do tempo
13	Passos frequentes e consistentes com suporte de peso e coordenação com MTs frequente	
14	Passada plantar consistentemente coordenada, com a posição da pata predominantemente rotacionada durante contato inicial e retirada; passada plantar frequente, coordenação com MTs consistente e passadas dorsais ocasionais	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 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 apoiada por parte ou todo o tempo de avaliação	Cauda baixa: sem sustentação em contato com 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 do tronco	Cauda elevada: não toca a superfície instabilidade de tronco; 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; peixe e cauda alinhadas com o corpo durante a locomoção

Tabela 2 - Escores e características locomotoras segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da capacidade motora de ratos após trauma medular agudo. Adaptado de (17)

Resultados e Discussão

O teste do BBB foi de fácil execução e não representou condição de estresse aos animais, já que condicionamento prévio ao procedimento cirúrgico foi realizado. Na avaliação pré-trauma todos os animais apresentaram escore 21, caracterizado por marcha normal, suporte de peso nos quatro membros, cauda elevada e estabilidade de tronco, demonstrando que os animais submetidos ao procedimento cirúrgico não tinham qualquer déficit da função motora.

Os animais do grupo GI mantiveram o escore máximo no teste após procedimento cirúrgico, indicando que a laminectomia não causou qualquer lesão ao tecido medular. Já os animais submetidos à lesão medular apresentaram déficits neurológicos, resultante apenas do trauma medular compressivo

desencadeado pelo peso de 40,5 g.

Os grupos que foram tratados com placebo, riluzol e dantrolene demonstraram, ao quinto dia de observação, um escore máximo de 3 pontos representado por movimento extenso de duas articulações dos membros pélvicos. Já os animais tratados com a associação do riluzol ao dantrolene, no quinto dia, atingiram o escore 7, movimento extenso das três articulações dos membros pélvicos, demonstrando um retorno mais rápido da função motora. Ao final dos sete dias de observação o grupo tratado com a associação dos fármacos atingiu o escore 10, passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação dos membros pélvicos com os membros torácicos, enquanto os outros grupos atingiram um escore máximo de 8, passada sem suporte de peso ou posicionamento plantar sem suporte de peso (Gráfico 1). Esse fato demonstra uma maior recuperação motora de ratos tratados com a associação de riluzol e dantrolene quando comparada aos outros grupos. Tal fato foi confirmado pelas comparações das medianas submetidas ao teste estatístico (Tabela 3).

Houve diferença estatística significativa entre o grupo GI e os grupos GII, GIII e GIV. No entanto, essa diferença não foi observada quando se comparou GI com GV (Tabela 3). Isso indica que houve uma maior recuperação da função motora do GV após os sete dias de tratamento que é sugestivo de um possível efeito neuroprotetor da associação dos fármacos. Sendo assim, apenas a associação do riluzol ao dantrolene foi capaz de promover recuperação motora, sendo um resultado inédito para literatura.

Medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (P<0,05)

Escore	C-	C+	R	D	R+D
	21 ^a	2 ^b	3 ^b	3 ^b	7 ^{ab}

Tabela 3 - Medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (C-) e trauma medular associado aos tratamentos com placebo (C+), riluzol (R), dantrolene (D) ou riluzol+dantrolene (R+D).

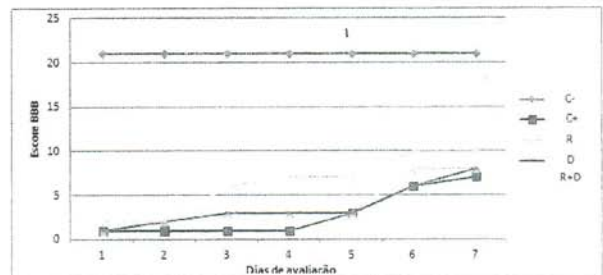


Gráfico 1 - Medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (C-) e trauma medular associado aos tratamentos com placebo (C+), Riluzol (R), Dantrolene (D) e Riluzol + Dantrolene (R+D).

Conclusão

Conclui-se que a associação do riluzol ao dantrolene foi

capaz de promover recuperação motora em ratos submetidos ao trauma medular agudo com uma única dose e após sete dias de observação.

Referências

- Hagen EM, Lie SA, RekanDT. et al. Mortality after spinal cord injury: 50 years of follow-up. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2010, 81:368-373.
- Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2003, 41: 369-378.
- Springer JE. Apoptotic Cell Death Following Traumatic Injury to the Central Nervous System, *Journal of Biochemistry Biology* 2002, 35: 94-105.
- Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998, 396:119-122.
- Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ et al. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 1998, 36: 683-690.
- Bensiom G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of Riluzole In Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 1994, 330:585-591.
- Huang CS, Song JH, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T. Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal ganglion neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997, 282(3):1280-1290.
- Lang-lazdunskia L, HeurteauxBC.; MignoncA et al. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 2000, 18(2):174-181.
- Castells LI, Gámez J, Cervera C, Guardia J. Icteric toxic hepatitis associated with riluzole. *Lancet*, 1998
- Aslan A, Cemek M., Buyukokuroglu ME et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury, *European Spine Journal* 2009, 18(10):1442-1451.
- Krause T.; Gerbershagen MU, FiegeM et al. Dantrolene - A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia Journal* 2004, 59(4): 364-373.
- Stutzmann JM, Pratt J, Boraut T, Gross C. The effect of riluzole on post-traumatic spinal cord injury in the rat. *Neuroreport* 1996, 7: 387-392.
- Torres BBJ, Caldeira FM.; Serakides R et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal Cord after traumatic injury in rats. *International Journal of Experimental Pathology* 2010, 91:530-536.
- Basso DM. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies, *Journal of Neurotrauma* 2004, 21(4):395-404.
- 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* 1996, 13(7):343-359.
- Sedý J, Urdzikova L, Jendelová P. et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2008, 32:550-580.
- Torres BBJ, Silva CMO, Almeida AERF; Caldeira FMC, Gomes MG, Alves EGL, Silva SJ, Melo EG. Modelo de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2010, 62:92-99.

Recebido para publicação em: 15/06/2011.

Enviado para análise em: 15/06/2011.

Aceito para publicação em: 11/07/2011.

Caçando Mitos do Paciente Felino

Aperfeiçoamento do clínico veterinário na área de felinos, buscando a abordagem das principais patologias e seus diagnósticos diferenciais.

19 de novembro Dra. Fernanda Amorim

8 às 10h	Manejo hospitalar do paciente felino
10:30 às 12h	Complexo respiratório viral felino
12 às 14h	Almoço
14 às 16h	Retrovírus
16:30 às 18h	Peritonite infecciosa felina

20 de novembro Dra. Monica Daiha

8 às 12h	Doenças respiratórias em felinos
12 às 14h	Almoço
14 às 18h	O gato como paciente crítico: gatos não são cães na emergência

Coordenação:



Centro de Estudos Ypiranga

Patrocínio:

PROPLAN

ourofino
saúde animal

MERIAL

ino vet

Realização:

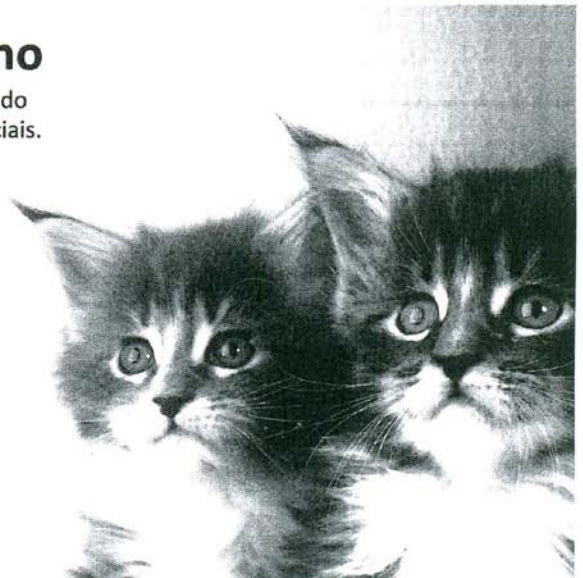


Apoio:

CRMV/RJ

Gestão:

C
Vet Consulting



Para mais informações entrar em contato tel. 21 9909.0002 ou pelo site www.ceypiranga.com.br
Valor: Até 31/10/2011 - R\$ 180,00 Estudante e R\$ 220,00 Profissional | Após 01/11/2011 - R\$ 250,00 Estudante e R\$ 290,00 Profissional