

Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE LESÃO
MEDULAR EM RATOS PRODUZIDA PELO MODELO
EXPERIMENTAL DE TRANSECÇÃO**

RAFAELA PONTES DE ALBUQUERQUE

São Luís

2019

RAFAELA PONTES DE ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE LESÃO
MEDULAR EM RATOS PRODUZIDA PELO MODELO
EXPERIMENTAL DE TRANSECÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

São Luís

2019

ALBUQUERQUE, RAFAELA PONTES DE.

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE LESÃO MEDULAR EM RATOS PRODUZIDA PELO MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSECÇÃO / RAFAELA PONTES DE ALBUQUERQUE. - 2019.

86 p.

Orientador(a): RAFAEL CARDOSO CARVALHO.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

1. Degeneração neuronal. 2. Estresse oxidativo. 3. Inflamação. 4. Lesão medular. I. CARVALHO, RAFAEL CARDOSO. II. Título.

RAFAELA PONTES DE ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE LESÃO MEDULAR EM
RATOS PRODUZIDA PELO MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSECÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Maranhão,
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em 10/ 05/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho (Orientador)
Doutor em Ciências
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Orlando Jorge Martins Torres (Examinador)
Doutor em Clínica Cirúrgica
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^a Alana Lislea de Sousa (Examinadora)
Doutora em Ciências
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^ª. Dr^a Ana Lúcia Abreu Silva (Examinadora)
Doutora em Patologia
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico

A Deus, por ter me dado sabedoria e paciência
para não desistir da concretização de um
sonho.

A minha família, essa conquista também é de
vocês. E, em especial, ao meu orientador,
Rafael Cardoso Carvalho que foi o propulsor
desta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se mostrar onipresente nos meus momentos de solidão, onipotente nos meus momentos de fraqueza e, acima de tudo, onisciente na minha busca pelo saber. Obrigado por me aceitar incondicionalmente, como sua filha e protegida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho, pela credibilidade e confiança em mim depositadas e, posteriormente, pela paciência, dedicação, ensinamentos, conselhos e orientações me encorajando a trilhar novos caminhos e perseverar sempre. Antes de orientador, um grande amigo que me ensinou a cada dia ser um ser humano melhor, aprimorando as minhas qualidades e, principalmente, me ajudando no meu processo de amadurecimento pessoal. Se tem uma pessoa que tenho imenso respeito e carinho é ele. E serei eternamente grata por tudo que fez por mim. Obrigada por participar de todos os momentos de minha vida. Esse é só um ciclo que está se encerrando, que venham outros com você. Rumo ao doutorado!!!!

Ao Prof. Dr. Eduardo Martins Sousa, pelos conhecimentos partilhados e pela amizade, que certamente expandiu-se juntamente com os conhecimentos adquiridos.

A Prof^a. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva, pela contribuição científica para a realização deste trabalho e, principalmente, pelo enriquecimento espiritual. Obrigada por me ajudar em um dos momentos que mais precisei através de uma simples conversa. E desde esse dia, tenho um carinho e respeito imenso pela pessoa tão humanizada e pela profissional de excelência que és.

A Prof^a Dra. Flávia Nascimento, pela contribuição em minha pesquisa e pelo acolhimento a mim fornecido. Obrigada!!!

A Prof^a Dra. Rosane Guerra, pelas contribuições científicas para o engrandecimento da pesquisa.

A Prof^a. Dra. Maria Angélica Miglino da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), por ter aberto as portas do Programa de pós-graduação para realização de algumas técnicas requeridas no desenvolvimento desta pesquisa, como também pelo apoio tecnológico.

Ao Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e, especialmente, aos amigos André Franciulli, Jéssica Borghesi, Diogo Palermo, Rose Eli Ricci, Marcos Paulo Assunção, Carlos Eduardo pela colaboração na execução desta pesquisa. Obrigada por me receberem tão bem e por serem tão generosos em me ensinar. Precisamos de pessoas assim como vocês no mundo da pós-

graduação. Foi uma experiência incrível que me fez perceber o quanto tenho potencial para melhorar e me tornar uma pesquisadora de excelência. Além disso, quero agradecer pelas amizades adquiridas na USP, em especial, Maria Clara, Natal, Fausto, Carol e Rafael.

A minha querida família, em especial a minha mãe sempre presente com palavras de incentivo e coragem. Ao meu querido irmão Leonardo pela contribuição na execução das etapas experimentais deste trabalho, e pelas palavras de incentivo e apoio em qualquer desafio. A minha irmã Daniela e meu cunhado Éder pelo apoio ofertado.

Aos amigos Nayara e Jorge Henrique por me acolherem nos momentos bons e ruins durante este ciclo.

A minha amiga Kelly Assunção, que costumo dizer que é uma irmã que Deus me deu. Uma pessoa que soube respeitar todas as minhas fases difíceis durante esse mestrado.

A Perla Lopes, Luciana Bastos e José Antônio Leite, amigos que a pós-graduação me deu. Obrigada pelos bons e difíceis momentos vividos e pelas palavras confortantes nas horas difíceis sabendo alegrar minha alma.

Aos meus grandes amigos Élder Mariano e Paulo Martins que mesmo distantes estiveram comigo dando apoio emocional.

Ao meu amigo Paulo Vítor por me ajudar com um dos principais materiais para execução da minha pesquisa. Obrigada você não sabe o quanto sou grata.

Aos meus amigos, Virginia Travassos, Marco Antônio, Naine Linhares, Maria Ramos, Gabriel Alves, Bruno Ricardo, Socorro Reis, Moisés Serra, Dr. Nonato Baldez que colaboraram com a pesquisa através da doação de materiais a apoio durante a execução.

A Lucianne Thays e, principalmente, Akemy Carvalho por honrar com o seu compromisso durante essa fase.

Ao Dr. Marcelo Maia, pelos conselhos e suporte para continuar nessa empreitada.

Ao Dr. Alexandre Carvalho e Dra. Ana Cláudia Carvalho por sempre se mostrarem interessados na execução da minha pesquisa e me apoiarem a seguir em frente.

Aos funcionários do Biotério Central e no Biotério Setorial da Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFMA, em especial, Alexandre Magno, por viabilizar a execução das cirurgias e pelos cuidados prestados aos animais.

A todos os professores do programa da Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFMA, pela enorme contribuição para o aprimoramento do meu conhecimento científico.

Aos profissionais da UFMA que, através das suas diversas funções, contribuíram de forma indireta para a concretização deste trabalho (Dona Dica, Tânia), em especial, Fátima Portela,

um ser humano incrível, sempre disponível a ajudar no que for necessário. Obrigada minha querida Fatinha.

Às fontes de fomento CNPq, Fapema e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela contribuição financeira para execução desta pesquisa.

“A principal meta da educação é criar pessoas
capazes de fazer coisas novas e não
simplesmente repetir o que as outras gerações
fizeram. Homens que sejam criadores,
inventores, descobridores”

Jean Piaget

RESUMO

A lesão traumática da medula espinhal acomete mundialmente milhares de pessoas, ocasionando déficits neurológicos com perda parcial ou total de capacidade sensorial/motora. Ainda não existem terapias que restaurem completamente a função após uma lesão medular, podendo estar relacionado a cascata de eventos que aumentam a reação inflamatória local, levando à destruição progressiva do tecido neuronal, o que acaba prejudicando a sua regeneração espontânea e recuperação funcional. Dessa forma, esta pesquisa avaliou a resposta inflamatória tecidual da medula espinhal em ratos submetidos à lesão de medula por transecção medular completa por caracterização morfológica. Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* (variedade *albinus*) da linhagem Wistar, adultos com 60 dias de idade, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: o controle (ratos sem procedimento cirúrgico); e os lesionados (ratos submetidos ao procedimento cirúrgico de laminectomia com transecção completa da medula espinhal). Após 48 horas do procedimento cirúrgico foram realizadas avaliações motoras através da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), sendo utilizado apenas os animais que obtiveram escore zero. Após o período de 3, 7, 14, 21 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados e a medula espinhal lesionada removida para a realização histotécnica (histologia, microscopia de varredura e imunohistoquímica utilizando os anticorpos NOX2, anti-CD43, anti-GFAP) para melhor avaliação da resposta inflamatória tecidual. Podemos concluir que a lesão de medula espinhal produzida pelo modelo cirúrgico experimental utilizado nesta pesquisa reproduz, de maneira homogênea, a incapacidade funcional, sensorial e motora graves, tendo grande relevância clínica à medida que induziu a alterações histopatológicas progressivas, inflamatórias e desmielinização que foram intensificadas com a duração de tempo após a lesão da medula espinhal.

Palavras-chave: Lesão medular; Inflamação; Degeneração neuronal; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The traumatic injury of the spinal cord affects thousands of people worldwide, causing neurological deficits with partial or total loss of sensory/motor ability. There are still no therapies that completely restore function after a spinal cord injury, and may be related to the cascade of events that increase the local inflammatory reaction, leading to the progressive destruction of the neuronal tissue, which end up affecting its spontaneous regeneration and functional recovery. Thus, this research evaluated the tissue inflammatory response of the spinal cord in rats submitted to spinal cord injury by complete spinal cord transection through morphological characterization. We used rats of the species *Rattus norvegicus* (albinus variety) of the Wistar lineage, 60-day-old male adults, from the Central Bioterium of the Federal University of Maranhão (Universidade Federal do Maranhão – UFMA). The animals were divided into two experimental groups: control (rats without surgical procedure); and injured (rats submitted to the surgical procedure of laminectomy with complete spinal cord transection). After 48 hours of the surgical procedure, motor assessment was performed through the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale, and only animals that scored 0-2 were used. After the period of 3, 7, 14 and 21 days after surgical procedure, the animals were euthanized and their injured spinal cords were removed for histotechnical processing (histology, scanning microscopy and immunohistochemistry using the antibodies NOX2, anti-CD43, anti-GFAP) for better evaluation of the tissue inflammatory response. It can be concluded that the spinal cord injury produced by the experimental model used in this research reproduces, homogeneously, the severe functional, sensory and motor disability, with a great clinical relevance, as it induced inflammatory, demyelinating and progressive histopathological changes, which were intensified with time after spinal cord injury.

Key words: Spinal cord injury; Inflammation; Neuronal degeneration; Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASIA	<i>American Spinal Injury Association</i>
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DPC	Dia após procedimento cirúrgico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAPEMA	Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HE	Hematoxilina e Eosina
Il-1 β	Interleucina-1 beta
IFN γ	Interferon γ
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
LPS	Lipopolissacarídeos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP	Mieloperoxidase
MMP-9	Matriz metaloproteinase 9
NASCIS	<i>National Acute Spinal Cord Injury Studies</i>
NCSID	<i>National Spinal Cord Injury Database</i>
ON	Óxido Nítrico
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
SSMP	Succinato sódico de metilprednisolona
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TGF β	Fator de crescimento transformador β
TNF- α	Necrose tumoral-alfa
TRM	Traumatismo raquimedular

UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Desenho esquemático da medula espinhal destacando a composição das substâncias cinzenta e branca	18
Figura 2 -	Desenho esquemático dos eventos ocorridos na fisiopatologia da lesão medular.....	25
Quadro 1 -	Esquema da distribuição dos grupos dos animais	36
Figura 3 -	Linha do tempo demonstrando os diferentes procedimentos realizados ao longo experimento	37
Figura 4 -	Procedimento cirúrgico experimental	39
Figura 5 -	Visualização do animal na caixa padronizada para avaliação da motricidade	40
Quadro 2 -	Anticorpos, marcação, fabricantes e diluição utilizados nesta pesquisa	42
Figura 6 -	Características físicas do animal após lesão medular completa	44
Figura 7 -	Fotomicrografias em coloração de HE de secções transversais da medula espinhal de rato submetido a transecção completa, conforme o tempo de sobrevida (3, 7, 14 e 21 dias)	46
Figura 8 -	Fotomicrografias da microscopia eletrônica de varredura de lesão medular completa	47
Figura 9 -	Fotomicrografias de cortes da área lesionada por transecção medular completa analisados por Imunohistoquímica para NOX2, conforme o tempo de sobrevida 7 dias	48
Figura 10 -	Fotomicrografias de cortes da área lesionada por transecção medular completa analisados por Imunohistoquímica para CD43, conforme o tempo de sobrevida (3, 7, 14 e 21 dias)	51
Figura 11 -	Fotomicrografias de cortes da área lesionada por transecção medular completa analisados por Imunohistoquímica para GFAP, conforme o tempo de sobrevida (3, 7, 14 e 21 dias)	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Hipótese	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Medula espinhal	17
2.2	Linhagens celulares do sistema nervoso central	18
2.3	Definição de lesão medular traumática	22
2.4	Epidemiologia da lesão medular	22
2.5	Fisiopatologia da lesão medular	22
2.6	Manifestações clínicas e classificação da lesão medular	27
2.7	Complicações da lesão medular	27
2.8	Perspectivas de tratamento	28
2.9	Modelos experimentais e o uso de biomarcadores na lesão medular	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Geral	34
3.2	Específicos	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Aspectos éticos	35
4.2	Local da pesquisa	35
4.3	Solventes, reagentes e drogas	35
4.4	Aparelhos e instrumentos laboratoriais	35
4.5	Animais	36
4.5.1	Formação dos grupos experimentais	36
4.5.2	Linha do tempo do experimento	36
4.6	Técnica cirúrgica experimental	37
4.7	Avaliação de motricidade dos animais após lesão medular	40
4.8	Eutanásia e coleta do material biológico	41
4.8.1	Análise por microscopia óptica de luz comum	41
4.8.2	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura	42
4.8.3	Análise por imunohistoquímica	42
4.9	Financiamento	43
5	RESULTADOS	44

5.1	Eficácia do modelo cirúrgico experimental de transecção e avaliação da motricidade dos animais que sofreram lesão medular completa	44
5.2	Análise morfológica da medula espinhal lesionada: histopatologia e MEV...	45
5.3	Expressão de NOX 2 após lesão medular completa	50
5.4	Expressão de CD43 após lesão medular completa	50
5.5	Expressão de GFAP após lesão medular completa	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	77
	APÊNDICE	83

1 INTRODUÇÃO

A lesão traumática da medula espinhal é considerada uma desordem neurológica catastrófica que afeta cerca de 180.000 novos indivíduos a cada ano e um total de 1,3 milhões de pessoas em todo o mundo (SINGH et al., 2014). Geralmente, causada por acidentes automobilísticos, quedas acidentais, atos de violência (armas de fogo) e atividades esportivas/recreativas (NSCISC, 2017). É consequência de uma força mecânica que ocasiona uma compressão e/ou laceração da medula espinhal, gerando uma lesão de comprometimento neurológico permanente (NUNES et al., 2017).

A lesão medular provoca devastadores déficits neurológicos o que resulta na perda parcial ou total de capacidade sensorial/motora, caracterizado por paraplegia ou tetraplegia, podendo ser agravada por algumas disfunções, como infecções, problemas cardiorrespiratórios e mau funcionamento dos sistemas vesico-intestinais, bem como por dores (nociceptivas e/ou neuropáticas) (SINGH et al., 2014).

Atualmente, não há tratamento resolutivo que proporcione completa recuperação neurológica ou funcional do paciente com lesão medular (VARMA et al., 2013), ocasionando um impacto enorme nas vidas desses pacientes, assim como, para sociedade à medida que gera altos custos em termos de saúde (SINGH et al., 2014).

O momento da ruptura da medula espinhal por trauma mecânico, definido como lesão primária, resulta na desconexão sináptica, desmielinização, dano axonal e morte neuronal induzida (ORR; GENSEL, 2018). Entretanto, a lesão primária acaba por resultar uma lesão secundária, caracterizada por eventos vasculares, bioquímicos e inflamatórios (HAUSMANN, 2003; ARIAS et al., 2007). Apesar dessas reações serem fisiológicas, demonstrou-se que esses acontecimentos exacerbam a lesão tecidual, dificultando a recuperação medular (CADOTTE; FEHLINGS, 2010).

Dessa forma, acredita-se que a resposta inflamatória pode ser altamente prejudicial ao indivíduo, à medida que pode tornar-se excessiva e ou desregulada induzindo danos irreversíveis aos neurônios e aos oligodendrócitos (CAPPELLANO et al., 2013), a partir da liberação de mediadores inflamatórios, responsáveis pelos efeitos prejudiciais no mecanismo de transmissão sináptica (ARIAS et al., 2007).

Contudo, em decorrência da reação inflamatória acentuada neste tipo de lesão, acredita-se que a atenuação desta resposta imune de forma precoce pode, portanto, limitar a extensão do dano tecidual e, conseqüentemente, a incapacidade gerada (BETHEA, 1999; GRIS et al., 2004).

Diante da necessidade de identificar alvos potenciais para novos tratamentos que reduzam os danos secundários, os biomarcadores representam uma ferramenta muito atraente e imparcial para avaliar a gravidade da lesão medular como potenciais marcadores de danos na medula espinhal (TSAI et al., 2008). Em nossa pesquisa utilizamos alguns marcadores como o NOX|2, anti-GFAP e anti-CD43, com intuito de obter um conhecimento preciso, acerca da fisiopatologia da lesão medular, destacando o curso do tempo de migração das várias células inflamatórias para o local da lesão, assim como, a ativação de células residentes da medula espinhal que devido as suas funções afetam o tecido neural.

Neste contexto, considerando que a compreensão do mecanismo inflamatório da injúria medular, por transecção pode ser a “questão chave” para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas efetivas para posterior intervenção no processo nosológico, no intuito de embasar futuras pesquisas com células-tronco, objetiva-se com essa pesquisa avaliar a resposta inflamatória tecidual da medula espinhal de ratos submetidos a lesão medular a partir da técnica cirúrgica experimental de transecção medular.

1.1 Hipótese

A lesão causada pela técnica cirúrgica experimental de transecção medular produz uma intensa resposta inflamatória tecidual, o que pode ser o fator inibitório para o êxito na implementação de estratégias resolutivas de tratamento terapêutico, incluindo intervenções baseadas em terapias celulares e farmacológicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Medula espinhal

O sistema nervoso é o responsável pela execução de funções básicas, tais como: sensorial, integrativa e motora, além de ser considerado o mais complexo dos sistemas do corpo de um ser vivo, que em atuação conjunta com o sistema endócrino, controla e coordena as atividades gerais do organismo, em sua adaptação necessária a cada momento. Este sistema possibilita a rápida comunicação e integração entre o cérebro e os diferentes tecidos e órgãos do corpo (ROBERGS; ROBERTS, 2002; GRABOWSKI, 2008).

Do ponto de vista anatômico, o sistema nervoso divide-se em sistema nervoso central (SNC), composto pelo encéfalo e medula espinhal; e, em sistema nervoso periférico (SNP) que é constituído por uma rede ramificada de nervos e gânglios que cobre os demais tecidos do corpo (PRADA, 2014).

Com relação a medula espinhal, esta localiza-se dentro do canal vertebral constituindo-se na porção alongada que se inicia logo abaixo do bulbo, no forame magno, atravessando o canal das vértebras, se estendendo até a primeira ou segunda vértebra lombar (SPENCE, 1991). Da medula partem os pares de nervos raquidianos que se ramificam. Por meio dessa rede de nervos, a medula se conecta com as várias partes do corpo, recebendo mensagens de vários pontos e enviando-as para o cérebro e recebendo mensagens do cérebro e transmitindo-as para as várias partes do corpo. A medula possui dois sistemas de neurônios: o sistema descendente controla funções motoras dos músculos, regula funções como pressão e temperatura e transporta sinais originados no cérebro até seu destino; o sistema ascendente transporta sinais sensoriais das extremidades do corpo até a medula e de lá para o cérebro (PRADA, 2014).

A medula espinhal é responsável por várias funções no organismo, tais como a transmissão dos impulsos nervosos das regiões do corpo até o encéfalo, assim como, a coordenação das atividades musculares e de reflexo (SPENCE, 1991). Dessa forma, uma falha na condução dos estímulos nervosos afeta de maneira grave o indivíduo, podendo causar uma perda parcial ou total da percepção, bem como perda à resposta aos estímulos físicos, psicológicos e ambientais (SALVADOR; TARNHOVI, 2004).

Assim como no encéfalo, a medula espinhal apresenta duas porções distintas, denominadas substância branca e substância cinzenta (Figura 1).

A substância branca é constituída por prolongamentos de neurônios e por células da glia e é assim chamada devido à grande quantidade de um material esbranquiçado

denominado mielina, que envolve determinados prolongamentos dos neurônios (axônios). A substância cinzenta da medula espinhal consiste em uma estrutura em forma de H, constituída, principalmente, por corpos celulares dos neurônios, células da glia e prolongamentos de neurônios. Conecta-se a substância branca por um canal central que é preenchido pelo líquido cefalorraquidiano (BICAN et al., 2013)

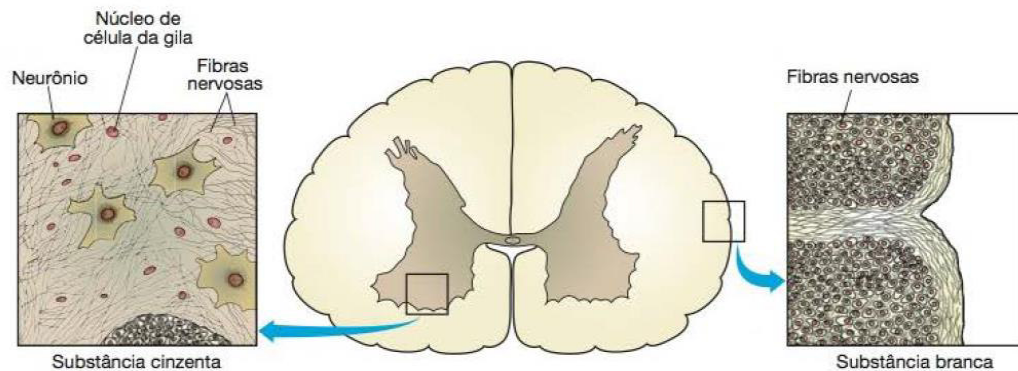


Figura 1 - Desenho esquemático da medula espinhal destacando a composição das substâncias cinzenta e branca. No centro, apresentação da medula espinhal observada em corte transversal. À esquerda, demonstração da estrutura da substância cinzenta, e, à direita, a da substância branca. Fonte: adaptado de Junqueira e Carneiro (2013).

Quanto ao revestimento, a medula espinhal é envolvida por membranas fibrosas denominadas meninges, que são: dura-máter, aracnóide e pia-máter. A dura-máter é a meninge mais externa, sendo formada por abundantes fibras colágenas, que a tornam espessa e resistente. A aracnóide se dispõe entre a dura-máter e a pia-máter. Compreende um folheto justaposto à dura-máter e um emaranhado de trabéculas, as trabéculas aracnóideas, que unem este folheto à pia-máter. A pia-máter é a meninge mais delicada e mais interna, encontra-se aderida intimamente ao tecido nervoso da superfície da medula, penetrando na fissura mediana anterior (MACHADO; HAERTEL, 2012).

2.2 Linhagens celulares do sistema nervoso central

No sistema nervoso central diferenciam-se duas linhagens celulares: os neurônios e as células da glia (ou da neurógli). Os neurônios são células nervosas constituídas de corpo celular ou pericário (centro trófico da célula com capacidade de recepção de estímulos), dendritos (prolongamentos ramificados que atuam como receptores de estímulos) e axônios (prolongamentos longos que atuam como transmissores dos impulsos nervosos)

(MONTANARI, 2016). A princípio, os neurônios por serem células responsáveis na condução de estímulos nervosos, são considerados células eletricamente excitáveis, onde a sua propagação é feita em milésimos de segundos, levando a um processamento rápido da informação (JESSEN, 2004).

Já as células da glia (ou da neurógli) são responsáveis por várias funções, tais como: sustentação, proteção, isolamento e nutrição dos neurônios. E conforme à morfologia, a origem embrionária e as funções que exercem, são classificadas em: astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células endoteliais (MACHADO, 2010).

Nave & Scheller (2000) relataram que as células da glia apresentam-se envolvidas por membranas gliais, que desempenham papel crítico na determinação das propriedades de sinalização das células.

Segundo Moura-Neto & Lent (2008), o significado do termo glia é cola, remetendo a palavra neurógli) como “cola de nervos”. Inicialmente, o papel dessas células consistia em permitir a união do sistema nervoso (PURVES et al., 2005), além da função de sustentação e suporte ao neurônio (HOF et al., 2003).

Atualmente, outras funções foram descobertas, relacionadas à nutrição, reserva, defesa e isolamento (PURVES et al., 2005; MACHADO, 2010).

A neuroglia é classificada nos vertebrados em macroglia e microglia (KANDEL, 2003; MACHADO, 2010). A macroglia é constituída por astrócitos e oligodendrócitos oriundos de células progenitoras neuroepiteliais no tubo neural embrionário e prosencéfalo (ROWITCH; KRIEGSTEIN, 2010); as células de Schwann, derivadas da crista neural e células endoteliais, derivadas do neuroepitélio embrionário (KANDEL, 2003; MACHADO, 2010). Já a microglia é de origem mesodérmica e são geradas no saco vitelino durante a embriogênese (AGUZZI et al., 2013; GINHOUX; PRINZ, 2015; CASANO; PERI, 2015) com funções fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória (LENT, 2001; JESSEN, 2004).

Com relação aos astrócitos, estes localizam-se entre os neurônios, sendo considerados as maiores células da glia, caracterizados por numerosos prolongamentos, com núcleo esférico e vesiculoso, circunscrito pela diminuta massa citoplasmática (MACHADO, 2010). Essas células compreendem aproximadamente 50% de toda massa cerebral, e dentre as células gliais são consideradas as mais abundantes no SNC de mamíferos, onde desempenham um papel chave para o microambiente neuronal realizar suas funções (PRIVAT et al., 1995; RAMOS et al., 2011).

A sua função se baseia na sustentação, nutrição dos neurônios, incluindo regulação do fluxo sanguíneo, metabolismo energético, homeostase de íons e água, defesa

imunológica, neurotransmissão e neurogênese adulta (MACHADO, 2010; OBERHEIM et al., 2011).

Morfologicamente, as células da linhagem astrocitária são muito variadas e versáteis, funcionalmente. Essa variação está relacionada as interações morfológicas e funcionais que cada célula desempenha com o seu microambiente (RAMOS et al., 2011). Podem ser classificados, conforme a sua morfologia e distribuição no SNC, em protoplasmáticos e fibrosos. O primeiro são pouco corados, apresentam um forma grande, núcleo ovóide e pequenos prolongamentos ramificados, sendo encontrados na substância cinzenta. Já o segundo apresenta prolongamentos longos, finos e pouco ramificados com citoplasma escasso, localizando-se mais na substância branca ((SUMMERS; LOWE et al., 1993; REICHENBACH; WOLBURG, 2005; OBERHEIM et al., 2011).

No que diz respeito à função astrocitária, Montgomery (1994), justificou que devido as múltiplas interações com outras células e estruturas do SNC, contribuem para o desenvolvimento e funcionamento do SNC maduro. Ramos et al. (2011) relatam que o modo eficaz com que essas células participam e controlam o processo de homeostase do tecido nervoso encontra-se na existência das junções comunicantes (gap) que permitem a constituição de um elaborado sincício celular.

Já os oligodentrócitos são as células mielinizantes que constituem cerca de 5 a 10% da população glial total (BARATEIRO et al., 2016), encontrados apenas no SNC tanto na substância branca quanto na cinzenta, sendo menores que os astrócitos e com poucos prolongamentos (MACHADO, 2010). Exercem papéis importantes na manutenção dos neurônios, assim como, na mielinização axonal que é fundamental não só para o desenvolvimento e manutenção dos oligodendrócitos, mas também para apoiar os axônios e manter a sua integridade estrutural e sobrevivência (BARATEIRO, 2016).

A mielina é uma proteína altamente especializada e membrana biológica rica em lipídios que envolve os axônios neuronais, permitindo a rápida condução nervosa saltadora e a proteção da integridade axonal (NAVE; WERNER, 2014). Atualmente, há vários estudos sistemáticos que vêm elucidando sua origem, bem como as moléculas que influenciam sua diferenciação, comportamento na homeostasia, nas doenças e sua capacidade de regeneração (SALLIS et al., 2011).

A fim de mielinizar adequadamente, os oligodendrócitos possuem uma alta taxa metabólica sendo bastante suscetíveis a danos resultantes da ativação de vários mecanismos intracelulares, como degradação oxidativa, excitotóxica e dano inflamatório (BARATEIRO, 2016).

Com relação a micróglia, esta é considerada a menor célula da glia com função fagocitária, análoga aos macrófagos atuando na defesa do sistema nervoso, sendo encontrada tanto na substância branca quanto na cinzenta (MONTANARI, 2016).

Em 1932, foi descrita primeiramente por Del Rio-Hortega, o qual utilizou um método de impregnação pela prata no cérebro em desenvolvimento, onde foi identificada uma classe de células com aspecto morfológico que variava de redondo a estrelado, cuja a denominação foi dada de micróglia, o que possibilitou a diferenciação dos outros componentes da glia. Propôs ainda que sua origem era mesodérmica, e tinha como precursor um derivado da medula óssea (BONDAN; SANCHEZ, 2011). Grande parte dos pesquisadores, atualmente concordam que a micróglia tem origem a partir da medula óssea, derivando de células mononucleares que entram no parênquima cerebral durante o processo da embriogênese (AUSTYN; GORDON, 1891; FABER; KETTENMANM, 2005).

No que diz respeito as ações da micróglia nos processos lesivos ao SNC, o processo de injúria sobre a micróglia faz com que ocorra a ativação microglial, levando a um quadro de alterações patológicas ou até mesmo a ausência de alterações neuropáticas evidentes, pois estas células respondem rapidamente a leve alterações em seu microambiente (GEHRMANN; KREUTZBERG, 2005; BONDAN; SANCHEZ, 2011)

Em lesões traumáticas do SNC em que há dano vascular, devido a ruptura da barreira hematoencefálica, ocorre um recrutamento de células polimorfonucleares e monócitos. Na região da lesão ocorre uma regulação positiva dos antígenos macrofágicos na micróglia ativada, o que leva a uma intensa resposta inflamatória. Quando ocorre a ativação da micróglia e de células inflamatórias, as mesmas vão até o local da lesão para estabelecer o processo da homeostase através da restauração da barreira hematoencefálica (GRAÇA et al., 2011).

Segundo Yang Fan et al. (2017), estudos recentes demonstraram que a microglia exibe dois estados de ativação funcionalmente diferentes que são referidos como ativação clássica (pró-inflamatória M1) e alternativa (antiinflamatória M2). O fenótipo M1 é induzido por citocinas, como Interferon γ (IFN γ), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 12 (IL-12) e interleucina 6 (IL-6), bem como lipopolissacarídeos (LPS), resultando na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e IL-6, matriz metaloproteinase 9 (MMP-9), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARCIA et al., 2012; DELGADO, 2003; SUZUMURA, 2013). Já o fenótipo M2, induzido pelas citocinas interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13), interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformador β (TGF β), está relacionado à reparação tecidual e

composição da matriz extracelular (COLTON; WILCOCK, 2010; GORDON, 2003; TOWN et al., 2005).

Já as célulasependimárias são células remanescentes do neuroepitélio embrionário, de formato cuboidais ou prismáticas que revestem as cavidades do encéfalo e da medula espinhal, sendo responsáveis pela produção do líquido cerebrospinal (MACHADO, 2010; MONTANARI, 2016).

2.3 Definição de lesão medular traumática

A lesão medular traumática ou traumatismo raquimedular (TRM) é considerado um evento catastrófico súbito e inesperado, a medida que traz consequências drásticas a vida das pessoas, abrangendo tanto contexto de saúde como o social. É caracterizado por comprometimentos da motricidade, sensibilidade e distúrbios neurodegenerativos dos segmentos do corpo localizados abaixo da lesão (BINDER, 2013; NEW; CRIPPS; BONNE, 2013).

Segundo o *National Spinal Cord Injury Database* (NSCID), a definição da lesão da medula espinhal é caracterizada como a ocorrência de uma lesão traumática aguda dos elementos do canal medular (medula espinhal ou cauda equina), resultando na perda temporária ou permanente, sensitiva e/ou motora (MIKIO SUMIDA et al., 2001).

Esse tipo de lesão está cada vez mais presente na vida da população, devido ao aumento dos números de casos de violência urbana, tais como, acidentes de trânsito e com armas de fogo, consideradas as causas mais comuns (BAMPI et al. 2008). Essa lesão, geralmente, é gerada por um trauma mecânico que rapidamente leva à ruptura da medula espinhal, morte das células neurais com dano axonal e desmielinização, seguido por uma cascata de lesões secundárias que exacerbam a reação inflamatória no local da lesão, induzindo a apoptose, assim como, prejudicando a regeneração espontânea e a recuperação funcional (OKADA, 2016).

2.4 Epidemiologia da lesão medular

O conhecimento epidemiológico das lesões traumáticas da medula espinhal é de grande importância, pois é responsável por gerar altos impactos pessoais, biológicos e psicológicos, assim como, as altas consequências a curto e longo prazo (RIEDER, 2014).

Segundo Friedli et al. (2015), estas lesões medulares acometem inúmeras pessoas em todo o mundo, gerando consequências no decorrer da vida. Segundo as estimativas disponíveis, a taxa de incidência global de lesão medular afeta cerca de 180.000 novos indivíduos a cada ano e um total de 1,3 milhões de pessoas em todo o mundo (SINGH et al., 2014). Alguns dados regionais estão disponíveis na América do Norte (40 casos por milhão de habitantes), na Europa Ocidental (16 casos por milhão de habitantes) e na Austrália (15 casos por milhão de habitantes). Os dados regionais extrapolados estão disponíveis para Ásia-Central (25 casos por milhão de habitantes), Sul da Ásia (21 casos por milhão de habitantes), Caribe (19 casos por milhão de habitantes), África (29 casos por milhão de habitantes), sendo que na América Latina é estimado 25 casos por milhão de habitantes (LEE et al., 2014). Sua ocorrência é frequente no sexo masculino com faixa etária entre 30 e 40 anos de idade (FURLAN et al., 2013).

Pelo fato de não ser uma doença de notificação obrigatória, no Brasil, os dados epidemiológicos de pacientes com lesão medular são escassos. Em uma revisão sistemática realizado por Botelho et al. (2014) para revelar a estimativa dos dados epidemiológicos do TRM no Brasil, a incidência de lesões medulares resultou em uma média de 21 casos por milhão por ano com idade média dos pacientes aproximadamente de 34,75 anos, sendo que 84% dos pacientes eram do sexo masculino (BOTELHO et al., 2014). Considerando geograficamente as regiões do Brasil, Masini (2001) observou que a região nordeste apresentou a maior incidência com 91 novos casos, seguida pelo Centro-oeste com 79 casos e região Sudeste com 71 casos registrados. As regiões Norte e Sul apresentaram as mais baixas incidências, com 49 e 38 casos respectivamente (MASINI, 2001).

As lesões medulares traumáticas são resultantes, em sua maioria, de acidentes automobilísticos (38,4%), quedas de alturas (30,5%), seguido de eventos violentos (13,5%) e traumatismos esportivos (8,9%) e outras causas (8,7%) (NSCISC, 2017).

Com relação a região de acometimento da lesão, a região cervical é a mais atingida com 55-65% dos casos das lesões medulares, resultando em uma mortalidade de 10-15% após o primeiro ano da lesão. Por outro lado, a região torácica, torácica-lombar e lombosacral são responsáveis por 15% das lesões medulares (SEKHON; FEHLINGS, 2001; NSCISC, 2013).

Diante da complexidade fisiopatológica, tal lesão medular repercute na qualidade de vida e no potencial funcional do indivíduo, implicando em mudanças radicais no estilo de vida, além de provocar um importante ônus social (KAWANISHI; GREGUOL, 2014). O tratamento é caro, contínuo e não apresenta resolução adequada (MEYER et al., 2003).

Considerando ser bastante oneroso para a sociedade, estima-se que o custo financeiro até o fim de vida de um doente de lesão vertebro-medular pode variar entre 1.092.521 dólares e 4.633.137 dólares, dependendo do local e gravidade da lesão, assim como a idade do doente no momento da lesão (NSCISC, 2013).

Portanto, o tratamento da lesão medular possui custos elevados em decorrência ao alto grau de sequelas neurológicas e psicológicas em pacientes que encontram-se na fase profissional ativa (RIEDER, 2014).

2. 5 Fisiopatologia da lesão medular

Com relação a fisiopatologia, uma vez que o trauma medular acontece, uma sequência de eventos fisiopatológicos ocorrem gerando danos neurológicos, como resultado de pelo menos dois mecanismos distintos: a lesão mecânica primária e a lesão endógena secundária (FORNER, 2015).

Segundo Forner (2015), a lesão mecânica primária é causa do impacto que somado à compressão da medula espinhal, resulta em dano axonal, devido a fraturas por deslocamento que resultam em fragmentos ósseos ou por transecção ou laceração da medula espinhal por deslocamento severo ou feridas penetrantes, levando à secção parcial ou total da medula.

Já a lesão endógena secundária inicia-se após o trauma inicial resultante da ruptura tecidual, com hemorragia na substância cinzenta e, por conseguinte, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, apoptose glial e neuronal, além de uma complexa resposta neuroinflamatória que persiste por meses ou anos, após o trauma inicial (DUMONT et al., 2001; SCHWARTZ; FEHLINGS, 2002; PROFYRIS et al., 2004; FLEMING et al., 2006; DONNELLY; POPOVICH, 2008). Os eventos envolvidos durante essa fase fazem com que a sobrevivência neuronal seja escassa e a recuperação funcional prejudicada. Ademais, é durante esse momento da lesão que o ambiente celular se torna impróprio para a regeneração e remielinização (MCDONALD; SADOWSKY, 2002; VAWDA; FEHLINGS, 2013; DASARI et al., 2014). Tal evento é dividido em subfases: imediata, aguda, intermediária e crônica (FORNER, 2015).

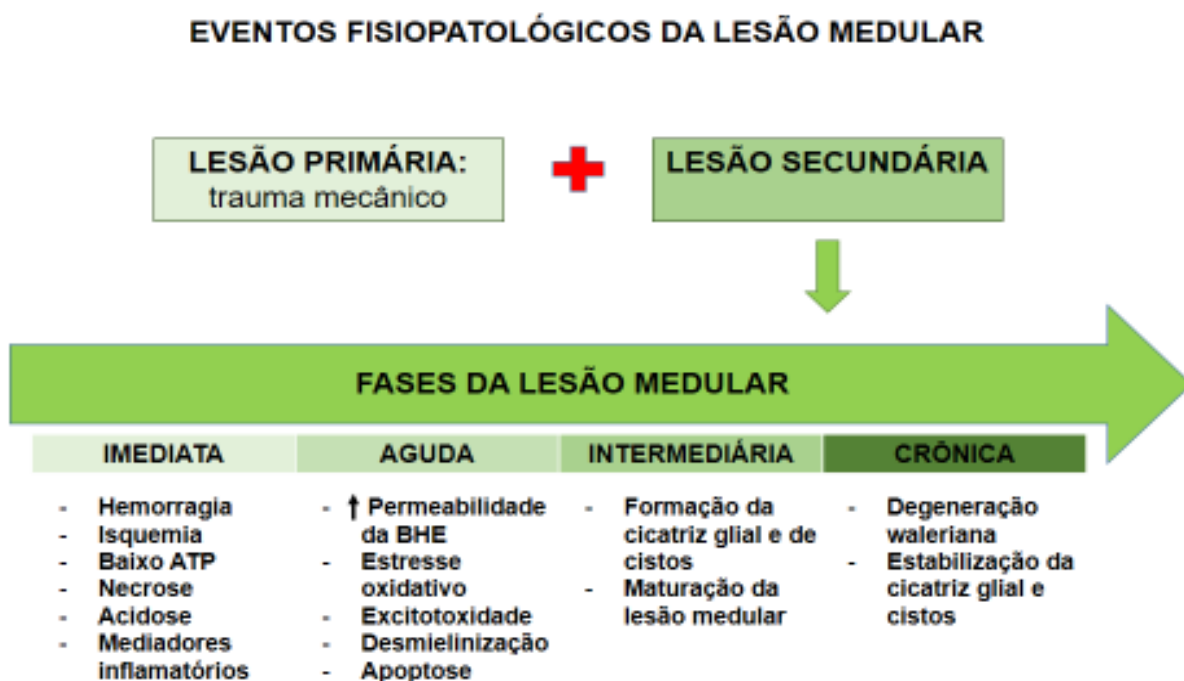


Figura 2 - Desenho esquemático dos eventos ocorridos na fisiopatologia da lesão medular. Fonte: Adaptado Forner (2015).

A subfase imediata se refere, aproximadamente, as primeiras duas horas após o trauma e resulta em uma morte neuronal e glial acompanhada de choque medular e consequente perda funcional motora no nível da lesão e abaixo (DITUNNO et al., 2004; NORENBORG et al., 2004; BOLAND et al., 2011). Ocorre, ainda, o aparecimento de pontos hemorrágicos distantes do sítio da lesão original como resultado da perda de integridade estrutural dos capilares sanguíneos e há o aumento da expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) (DONNELLY; POPOVICH, 2008; DAVID; KRONER, 2011).

Com relação a subfase aguda, o primeiro momento ocorre entre 2 e 48 horas após o trauma medular inicial, com um aumento acentuado de área hemorrágica, resultando em uma isquemia (TATOR; FEHLINGS, 1991). Este fenômeno é particularmente importante uma vez que a hemoglobina liberada é tóxica às células do SNC, expandindo o volume de tecido neural destruído (REGAN; GUO, 1998; GERZANICH et al., 2009).

Além disso, a interrupção das barreiras hematoencefálica e hematoespinhal permite a infiltração de células do sistema imune para o SNC, tais como células T, neutrófilos e monócitos. As micróglia residentes continuam a proliferar e se ativam durante a fase aguda, resultando na liberação acentuada de quimiocinas e citocinas (DONNELLY;

POPOVICH, 2008; TZEKOU; FEHLINGS, 2014). Dessa forma, durante as primeiras 24 horas após o trauma medular, os neutrófilos chegam ao sítio da lesão e há liberação de citocinas, MMP (mieloperoxidase) e espécies reativas de oxigênio (FLEMING et al., 2006; DONNELLY; POPOVICH, 2008). Assim, em 48 horas ocorre uma migração de monócitos e os neutrófilos já não são mais recrutados. Já em 72 horas, ocorre uma expansão da lesão secundária, uma vez que os monócitos iniciam sua diferenciação para macrófagos e há liberação de glutamato, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e prostanóides (LESKOVAR et al., 2000; SCHWAB et al., 2000).

Já a subfase intermediária inicia entre a segunda e terceira semana após o trauma e tem duração aproximada de 6 meses. Durante esse momento a reação de gliose continua até a cicatriz glial se formar por completo. A cicatrização glial é um fator crucial na recuperação de lesões no SNC, pois a eliminação do contingente de astrócitos reativos leva ao aumento do tamanho da lesão e a perda exagerada de macromoléculas através da barreira hematoencefálica que se encontra comprometida (FAULKNER et al., 2004; MYER et al., 2006). Por conta disso, as falhas na regeneração axonal devem-se a produção de moléculas inibitórias pelos astrócitos a partir da cicatriz glial (FITCH; SILVER, 2008).

Por fim, a fase crônica que inicia-se a partir do sexto mês do trauma inicial, caracterizada pelo estabelecimento da cicatriz glial e dos cistos/cavidades na medula espinhal. Nesse momento, a degeneração walleriana (retração axonal) continua e pode durar anos até que os corpos celulares e os restos de axônios sejam totalmente removidos do sítio da lesão (FLEMING et al., 2006; KRAMER et al., 2013).

Arias et al. (2007) relatam em seu trabalho que o trauma na medula é considerado uma das afecções neurológicas mais frequentes e graves na prática clínica, à medida que no momento da lesão medular aguda ocorre uma cascata de eventos vasculares, bioquímicos e inflamatórios que irão resultar no surgimento de lesões teciduais secundárias, levando em seguida à destruição progressiva do tecido neuronal, que trará consequências desastrosas e, geralmente, irreversíveis às funções motora e sensorial do ser vivo. Portanto, esta afecção deve ser considerada emergencial, necessitando de uma intervenção rápida e eficiente, num intervalo de tempo apropriado para ajudar na redução dos danos ao tecido neuronal, favorecendo a recuperação neurológica do paciente.

2.6 Manifestações clínicas e classificação da lesão medular

As manifestações clínicas da lesão medular traumática dependerão do nível e grau da lesão. Com relação ao nível de lesão, é determinado pelo segmento mais caudal da medula com preservação das funções motora e sensitiva bilateralmente nos lados do corpo (CEREZETT et al., 2012), sendo definida como tetraplegia (diminuição ou perda da função motora e/ou sensitiva de tronco, membros superiores e inferiores) e paraplegia (diminuição ou perda da função motora e/ou sensitiva de tronco e membros inferiores) (GOMEZ-SORIANO et al., 2012).

Em relação ao grau, as lesões medulares podem ser caracterizadas em completas e incompletas. Nas lesões completas existem perda sensitiva e paralisia motora total abaixo do nível da lesão devido à interrupção completa dos tratos nervosos. Já nas lesões incompletas estão preservados grupos musculares e áreas sensitivas que não foram afetados (ADLER, 2005).

Atualmente, a classificação de lesão medular mais utilizada é a padronização internacional determinada pela *American Spinal Injury Association* – (ASIA) que consiste na avaliação da motricidade e sensibilidade que compreende entre os limiares de A a E, sendo: ASIA A (lesão medular completa); ASIA B (lesão motora completa e sensitiva incompleta); ASIA C (lesão sensitiva e motora incompletas); ASIA D (lesão incompleta com função motora preservada abaixo do nível da lesão); e ASIA E (sem déficits) (AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION, 2017).

Vale ressaltar que o prognóstico funcional do paciente com lesão medular traumática será determinado somente após a fase aguda, incluindo as determinações do nível e grau da lesão, assim como, avaliação dos comprometimentos das funções motora e sensitiva (CASALIS, 2003).

2.7 Complicações da lesão medular

A lesão da medula espinhal traumática é uma das mais graves doenças que acarretam incapacidade no ser humano, em decorrência da falência de uma série de funções vitais como: locomoção, sensibilidade, sexualidade, sistemas urinário e intestinal e do sistema nervoso autônomo (CARCINONI et al., 2005) e que o grau de comprometimento neurológico determinará as possíveis complicações que este paciente poderá apresentar (STÁVALE, 2011).

Dentre as complicações que podem ser acarretadas por tal patologia, temos: choque medular, choque neurogênico, trombose venosa profunda, disreflexia autonômica, bexiga neurogênica, intestino neurogênico, espasticidade, úlceras por pressão, pneumonias, alterações psicossociais e infecções (OSBORN et al., 1992; SARAIVA et al., 1995).

No estudo realizado por Sousa et al. (2013) que teve como objetivo levantar as principais complicações do traumatismo raquimedular nos pacientes internados na unidade de neurocirurgia do Hospital de Base do Distrito Federal no ano de 2012, a bexiga neurogênica foi evidenciada como a principal complicação nos pacientes vítimas de TRM (87%), seguida de úlcera por pressão (38%), infecção urinária (19%), intestino neurogênico (15%) e pneumonia (15%).

Portanto, é indispensável que o paciente seja assistido por uma equipe multidisciplinar, em decorrência das limitações físicas e psicológicas que o mesmo irá enfrentar, sendo necessário a elaboração de um plano terapêutico individualizado priorizando as capacidades individuais (MEDEIROS et al., 2013).

2.8 Perspectivas de tratamento

Os tratamentos atuais para lesão medular traumática consistem em condutas que buscam conter a deterioração neurológica, assim como, estimular a recuperação funcional das áreas neurológicas lesadas (DVORAK et al., 2015). Segundo Souza (2017), esses tratamentos consistem na utilização de medicamentos que agirão na redução do processo inflamatório e no controle da dor, assim como, intervenções cirúrgicas que visam desde a estabilização e, principalmente, descompressão da medula espinhal e estabilização hemodinâmica. Entretanto, estas terapias resultam apenas benefícios modestos aos pacientes com esta doença (BAPTISTE; FEHLINGS, 2007).

As dificuldades encontradas no tratamento das vítimas de lesão medular são de grande importância e muitos trabalhos visam promover melhor conhecimento científico das limitações impostas por esta lesão (DINIZ et al., 2012). Durante muito tempo, atenção foi dispensada aos aspectos físico-motores, com ênfase em técnicas de tratamento, visando melhor recuperação funcional (ROMERO, 2008). Tais perspectivas fortalecem o conhecimento sobre neuroplasticidade que incita o fato que o SNC pode sofrer alterações estruturais a partir do aprendizado e de novas conexões neurais por regeneração axonal (WESSELS et al., 2010).

Além dos avanços nas perspectivas de sensório-motora, nas últimas décadas, algumas estratégias de recuperação ou redução de danos têm sido bastante investigadas como potenciais tratamentos para pacientes com lesão medular, embora sem evidências que suportem a recomendação do uso (RIEDER, 2014). Dentre as estratégias em investigação, encontram-se:

Hipotermia terapêutica da medula espinhal: temperaturas baixas (32° – 34°C) reduz a taxa metabólica basal do SNC com redução da ativação de células inflamatórias (KWON et al, 2008). Em um estudo que avaliou o uso de corticoesteróides por via parenteral e resfriamento local 8 horas após a lesão medular completa de dez pacientes foi demonstrado uma taxa melhor do que a esperada de recuperação da função motora e sensitiva, além da redução na taxa de mortalidade em comparação às condutas terapêuticas convencionais (KWON et al., 2011). Porém, mais evidências são necessárias antes que a hipotermia seja adotada amplamente, para avaliar criticamente esta intervenção terapêutica potencialmente promissora (DIETRICH et al., 2011).

Corticóide: há décadas os corticoides têm sido testados como protetores neuronais no trauma da medula espinhal. Estudos multicêntricos coordenados pela *American Spinal Injury Association* (ASIA) e *National Acute Spinal Cord Injury Studies* (NASCIS) revelaram resultados promissores com o uso do succinato sódico de metilprednisolona. Porém, várias críticas às metodologias foram publicadas (BOTELHO et al., 2009; FITZMAURICE, 2011). A metilprednisolona é um potente glicocorticóide sintético que aumenta a liberação de citocinas anti-inflamatórias e reduz o estresse oxidativo para aumentar a sobrevivência das células neurais em modelos pré-clínicos de lesão medular traumática, porém os benefícios neurológicos tornam-se limitados quando utilizado o protocolo de altas doses nas 48 horas em decorrência das complicações relacionadas a infecção. Atualmente, o guideline AOSpine 2016 sugere o uso da metilprednisolona IV (30 mg / kg em bolus + 5,4 mg / kg / h × 23 h) por 24 horas em pacientes dentro de 8 horas de lesão medular com potenciais benefícios neurológicos (AHUJA et al., 2017).

Macrófagos autólogos: avaliou a segurança e a tolerabilidade de macrófagos autólogos incubados administrados a pacientes com lesão medular completa, demonstrando recuperação da função motora, porém com eventos adversos graves como embolia pulmonar e osteomielite (LAMMERTSE et al., 2012).

Uso de minociclina: é uma tetraciclina bacteriostática de segunda geração com propriedades neuroprotetoras em modelos pré-clínicos de patologias do SNC (AHUJA et al., 2017). O uso deste antibiótico como agente neuroprotetor em modelos animais com lesão

medular demonstrou melhora dos resultados neurológicos e histológicos, promovendo redução neuronal e apoptose oligodendroglial, diminuição da ativação da microglia e da inflamação (KWON et al., 2011). Segundo Santos (2017), tais resultados podem estar relacionados com ação desta medicação sobre os neutrófilos e macrófagos, acabando por influenciar na liberação de citocinas. Contudo, tal medicação vem sendo testada em estudo fase III que avaliará a administração intravenosa minociclina durante 7 dias *versus* placebo (CLINICAL TRIALS, 2016).

Tratamento com células-tronco: tem sido considerado uma estratégia terapêutica como forma de reparação da lesão da medula espinhal (HORNER; GAGE, 2000; OSAKA et al., 2010). As células-tronco possuem capacidade de autorenovação e podem se diferenciar em múltiplas linhagens celulares (KORBLING; ESTROV, 2003; PITTENGER; MARTIN, 2004). Vários estudos têm referido positivamente a utilização de células-tronco na recuperação funcional de animais com lesões medulares (ANTONIC et al., 2013). Por outro lado, o sucesso da terapia celular está ligado a fatores como localização, tipo e gravidade da lesão, métodos de cultivo celular e preparo da suspensão de células para o transplante, tempo de administração após a lesão da medula espinhal, local de administração da suspensão celular, presença ou ausência de imunopressores e outros fatores (MUKHAMADSHINA; RIZVANOVA, 2016). Com isso, a estratégia ideal para terapia celular aplicada a regeneração axonal após neurotrauma é construir um microambiente propício à sobrevivência e diferenciação das células-tronco e regular a expressão dos fatores neurotróficos (CUI et al., 2013.).

Atualmente, há inúmeros trabalhos avaliando os processos regenerativos dos neurônios do SNC após lesões medulares. O uso de transplantes de nervos periféricos, de suspensão de células de Schwann, de populações de origem fetal e de células gliais centrais cultivadas associadas ou não à infusão de fatores neurotróficos, são as abordagens mais utilizadas nestes estudos (LEME, 2004). Porém, ainda não existem terapias que restaurem completamente a função após uma lesão medular.

O melhor entendimento do processo patológico secundário a lesão primária está evoluindo rapidamente e vários tratamentos estão sendo estudados para atuar na prevenção da cascata inflamatória e dos processos moleculares (SOUZA, 2017).

2.9 Modelos experimentais e o uso de biomarcadores na lesão medular

A lesão medular traumática é uma doença que ainda não possui tratamento resolutivo, porém vários estudos, incluindo modelos experimentais, estão sendo realizados na tentativa de solucionar esta problemática (SHARIF-ALHOSEINI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2010).

Allen, em 1911, apresentou o primeiro modelo de experimentação animal reproduzível e quantificável de lesão medular traumática, utilizando o modelo de peso em queda livre sobre a dura-máter de cães (DOHRMANN E PANJABI, 1976). Posteriormente, Wrathall e colaboradores (1985) adaptou essa mesma técnica utilizando ratos.

Segundo Mautes et al. (2010), independente do tipo de modelo experimental utilizado, o objetivo é induzir uma lesão que reproduza alguns aspectos do dano mecânico primário e dos eventos secundários que mais se assemelhem a lesão medular em humanos.

Sendo assim, diante dos avanços científicos na área da neurociência, os modelos experimentais continuam sendo muito usados para se obter conhecimento sobre o tratamento resolutivo das lesões medulares (DABNEY et al., 2004). Atualmente, os modelos experimentais mais utilizados na reprodução da lesão medular em animais são os de contusão, compressão, excitotóxico e transecção.

Contusão: seja por queda de pêndulos ou compressões prolongadas, sendo mais usados em estudos de mecanismo de neuroproteção, os quais os tratos axonais podem ser preservados após a lesão (KWON et al., 2002);

Compressão: seja por clipe, balão, espaçador ou fórceps, sendo utilizado para oclusão persistente do canal vertebral com intuito de investigar os efeitos da compressão ou do tempo ideal de descompressão (SHARIF-ALHOSEINI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2014);

Excitotóxico: administração na medula espinhal de algumas excitotoxinas (glutamato, N-metilaspartato e ácido caínico) que vão induzir uma cascata de eventos da fisiopatologia medular, tendo como vantagem a capacidade de correlacionar áreas específicas de danos nos tecidos com alterações comportamentais (NAKAE et al., 2011);

Transecção: podendo ser parciais ou completas, sendo considerada a melhor alternativa para se fazer a análise da regeneração de tratos axoniais específicos (KWON et al., 2002). Neste modelo, a transecção da medula espinhal é realizada após a laminectomia com tesoura cirúrgica que permite a interrupção direcionada das fibras nervosas da medula espinhal (SHARIF-ALHOSEINI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2014).

Esses modelos permitem obter um maior conhecimento sobre o mecanismo da resposta inflamatória em lesões medulares. Segundo Olby e Jeffery (2003), após a lesão da medula espinhal, uma intensa resposta inflamatória começa a se formar, surgindo a proliferação de leucócitos polimorfonucleares fagocíticos e adjacentes às paredes vasculares e áreas de intensa hemorragia. Nesse momento, a função neural é alterada pela liberação dos mediadores inflamatórios, causando dessa forma, efeitos prejudiciais na condução iônica e transmissão sináptica (SMITH; MACDONALD, 1999). Portanto, o controle da resposta inflamatória da lesão secundária é considerada uma linha experimental bastante promissora para redução dos danos teciduais gerado pela lesão medular traumática (SANTOS, 2017).

Neste contexto, a utilização de biomarcadores pode ser útil na determinação da evolução das lesões primárias, assim como, no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes (RIEDER, 2014).

Dentre os biomarcadores, o anticorpo anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial) é uma proteína intermediária de classe III encontrada na rede estrutural de células gliais (BIGNAMI et al., 1972; BIGNAMI; DAHL, 1974), sendo usada como um marcador para distinguir astrócitos de outras células da glia durante o desenvolvimento. Segundo Nylen et al. (2006), os níveis séricos elevados de GFAP foram relatados como um biomarcador para a detecção de lesão medular traumática, traumatismo cranioencefálico e hemorragia cerebral em pacientes na fase do acidente vascular encefálico.

Ostberg et al. (1996) retratam em sua pesquisa, a importância de um outro marcador molecular, o anticorpo anti-CD43 de rato, o clone W3 / 13, reconhece o antígeno de superfície celular CD43 do rato, também conhecido como leucosialina, sialoforina ou antígeno W3/13 (KILLEEN et al. 1987) muito importante na indução da resposta inflamatória (ALKIM et al., 2007). O CD43 é uma proteína transmembrana tipo I fortemente glicosilada e sialilada expressa em linfócitos, macrófagos e monócitos (HOWELL et al. 1994) caracterizado por apresentar duas isoformas (115 kDa e 130 kDa) que expressam hexassacáridos ricos em ácido siálico ramificados (FUKUDA; CARLSSON, 1986; PILLER et al., 1988). Em decorrência do seu domínio intracelular altamente conservado, esta proteína exerce várias funções como diferenciação, proliferação, locomoção e adesão, ativando múltiplas vias de sinalização celular (BRAVO-ADAME et al., 2012; PEDRAZA-ALVA; ROSENSTEIN, 2007; OSTBERG; BARTH; FRELINGER, 1998). CD43, em ratos, atua como um contra-receptor de células T para CD169 (Siglec-1) sugerindo um papel nas interações célula-célula (VAN DEN BERG et al., 2001).

Quando ocorre a lesão de medula espinhal, a enzima NOX-2 é ativada, desempenhando, dessa forma, um papel fundamental na inflamação pós lesão. A sua inibição melhora significativamente a inflamação aguda e os estresses causados por esse tipo de lesão. Portanto, a inibição da NOX-2 é um verdadeiro potencial alvo para a terapia após lesão da medula espinhal (KHAYRULLINA et al., 2015).

Um outro marcador importante é o anticorpo anti-CD68, caracterizado por ser uma glicoproteína transmembranar, fortemente glicosilada no seu domínio extracelular, com um peso molecular de 110 kD. Sua seqüência primária consiste de 354 aminoácidos com peso molecular previsto de 37,4 kD se não fosse glicosilado (HOLNESS; SIMMONS, 1993). Suas funções peculiares incluem a remoção de detritos celulares, promoção de fagocitose e a mediação, recrutamento e ativação de macrófagos e localiza-se predominantemente aos lisossomas e endossomos com uma fração menor circulando na superfície da célula (HOLNESS; SIMMONS, 1993).

Embora se reconheça os inegáveis avanços nos estudos das repostas teciduais das lesões, ainda se faz necessário mais pesquisas que avaliem melhor a atuação desses marcadores moleculares, frente à resposta inflamatória medular de uma determinada lesão, quer seja ela de origem neurológica ou não (LIBBY et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a resposta inflamatória tecidual da medula espinhal em ratos submetidos à transecção de medula espinhal.

3.2 Específicos

- Avaliar a motricidade dos ratos submetidos à lesão de medula espinhal;
- Caracterizar morfollogicamente a evolução das lesões em ratos submetidos à lesão de medula espinhal em diferentes tempos de sobrevida;
- Analisar a resposta inflamatória tecidual da medula espinhal lesionada em diferentes tempos de sobrevida utilizando os anticorpos NOX-2, anti-CD43, anti-GFAP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Os protocolos experimentais utilizados nesta pesquisa obedeceram aos princípios técnicos e éticos de experimentação com animais de laboratório preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL), sendo a pesquisa iniciada após a aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA - UFMA) sob processo número 23115.013651/2016-43 (ANEXO B).

4.2 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório experimental do Biotério Setorial da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e no Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). No primeiro foram realizados os procedimentos cirúrgicos, avaliação comportamental, eutanásia e coleta dos fragmentos medulares. Já no segundo foram realizados o processamento das análises histológicas e imunohistoquímicas.

4.3 Solventes, reagentes e drogas

Os produtos utilizados foram acepran® 1%, cloridrato de cetamina a 2%, cloridrato de xilazina 2%, cloridrato de tramadol, soro fisiológico 0,9%, soro glicosado 50%, enrofloxacino 2,5%, solução de clorexidina a 2%, álcool iodado, água destilada, paraformaldeído 4%, tampão fosfato de sódio (0,15M e pH 7,4), etanóis (70 a 100%), diafanizado em xilol, similar de parafina, hematoxilina-eosina, Kit DAKO, anticorpos e reagentes (GFAP, CD43, NOX-2).

4.4 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

Os aparelhos utilizados foram banho-maria e estufas de temperaturas constantes, balança eletrônica, centrífuga, paquímetro digital, micrótomo (LEICA, RM 2165), microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800), microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP).

4.5 Animais

Para execução deste estudo foram utilizados 22 ratos da espécie *Rattus norvegicus* (variedade *albinus*) da linhagem Wistar, machos, adultos com 60 dias de idade e peso variando de 250-350g, fornecidos pelo Biotério Central da UFMA e mantidos durante os experimentos no Biotério Setorial da Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFMA.

4.5.1 Formação dos grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais compostos por ratos submetidos a técnica cirúrgica experimental de laminectomia com transecção completa da medula espinhal, sendo eutanasiados no tempo de sobrevida proposto. O **GRUPO I (GI)** – controle, ratos hígido, ou seja, sem intervenção cirúrgica a fim de estudar a estrutura normal da medula espinhal. **GRUPO II (GII)** - animais submetidos a lesão medular e eutanasiados com três dias após o procedimento cirúrgico experimental; **GRUPO III (GIII)** - animais submetidos a lesão medular e eutanasiados com sete dias após o procedimento cirúrgico experimental; **GRUPO IV (GIV)** - animais submetidos a lesão medular e eutanasiados com 14 dias após o procedimento cirúrgico experimental e **GRUPO V (GV)** - animais submetidos a lesão medular e eutanasiados com 21 dias após o procedimento cirúrgico experimental (Quadro 1).

Quadro 1 - Esquema da distribuição dos grupos dos animais.

CONTROLE	LESIONADOS: submetidos a transecção completa da medula espinhal e eutanasiados no tempo de sobrevida proposto			
GI (hígido) N = 1 rato	GII (3° DPC) N = 6 ratos	GIII (7° DPC) N = 6 ratos	GIV (14° DPC) N = 5 ratos	GV (21° DPC) N = 4 ratos

Legenda: DPC (dia após o procedimento cirúrgico).

4.5.2 Linha do tempo do experimento

Uma linha do tempo (Figura 3) foi desenhada com o objetivo de demonstrar em que ordem os eventos experimentais ocorreram. Todos os eventos foram descritos em detalhes ao longo dos métodos.

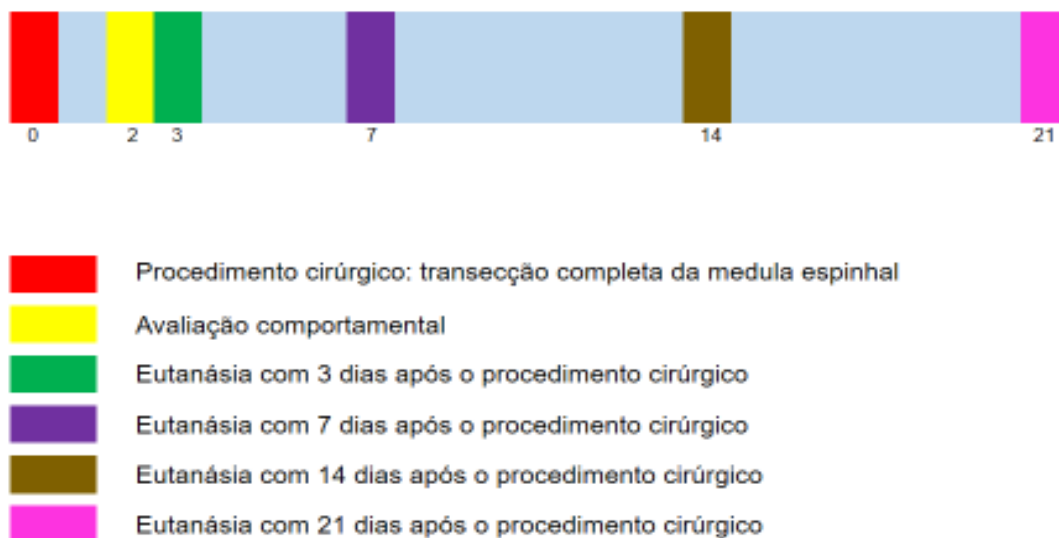


Figura 3 - Linha do tempo demonstrando os diferentes procedimentos realizados ao longo experimento.

4.6 Técnica cirúrgica experimental

Para a indução da lesão medular traumática foi utilizado o modelo experimental previamente descrito por Braga-Silva et al. (2007) com modificações.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério Setorial da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFMA sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) em gaiolas coletivas, com 2 ou 3 animais, com acesso *ad libitum* a água e ração comercial para roedores.

No período pré-operatório, os animais foram submetidos ao jejum hídrico e alimentar, por uma hora, antes da cirurgia. Os animais foram pesados e, posteriormente, foi administrado antibiótico/profilático de amplo espectro (enrofloxacino 2,5% 2,5mg/kg), via subcutânea, uma hora antes da cirurgia e mantido a cada 24 horas, por 7 dias, no período pós-operatório. Além disso, foi realizado analgesia com cloridrato de tramadol (5mg/kg), via subcutânea, 30 minutos antes do início do protocolo anestésico, e a cada 8 horas, por mais 3 dias, no período pós-operatório. Como pré-anestésico foi utilizado o acepran® 1% (2mg/kg), via intramuscular, 30 minutos antes da indução anestésica.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina 2% (90mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10mg/kg), via intraperitoneal (Figura 4A). O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência dos reflexos da córnea, motores e o de retirada da pata. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral, com os

membros torácicos e pélvicos estendidos. Foram submetidos à tricotomia dorsal e antisepsia com solução de clorexidina a 2% e álcool iodado (Figura 4B).

Para demarcar o local de incisão foi considerado como referência duas linhas horizontais desenhadas perpendicularmente ao eixo vertebral, uma passando pelos membros torácicos e a outra pelos membros pélvicos (Figura 4B). O espaço entre essas duas linhas foi dividido em três porções, sendo o local da incisão realizado entre o terço cranial e médio. Com o uso dessa técnica, a laminectomia foi realizada entre T-10 e T12.

Após a delimitação do local, uma incisão longitudinal de aproximadamente 4,5 cm na região da linha média dorsal foi realizada. Após incisão da pele, a dissecação por planos foi realizada sobre o processo espinhoso, com o afastamento do músculo espinotrapézio dos processos espinhosos e transversos das vértebras torácicas. Após a dissecação da musculatura epaxial, com um Afastador Alm de ponta romba, foi divulsionada, para melhor visualização do campo cirúrgico e estruturas envolvidas. Em seguida, foi realizada a laminectomia que consistiu na ressecção da lâmina vertebral, com a desarticulação do arco e corpo vertebral, expondo as meninges da medula espinhal (Figura 4C). Sequencialmente, foi realizado a transecção completa da medula espinhal com tesoura de dissecação (Figura 4D). Frequentemente, este procedimento causa sangramento das meninges, sendo manejado pela compressão da zona afetada com gaze cirúrgica umedecida. Posteriormente, a incisão foi fechada por planos com pontos da camada muscular e da pele, por sutura simples, com o fio mononylon 3-0, sendo finalizado com uma nova assepsia no local da incisão (Figura 4E).

Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, aquecidos, até a recuperação anestésica (Figura 4F) e observados três vezes ao dia para evitar desconforto ou infecção. Como este procedimento cirúrgico acarreta em alterações na contratilidade/relaxamento da bexiga urinária e do esfíncter uretral externo, a bexiga dos animais submetidos à lesão medular foi esvaziada, três vezes ao dia, pela compressão manual da região abdominal do animal (método de Crede) (SANTOS-BENITO et al., 2006). Cuidados diários foram tomados com os animais para evitar infecções, úlceras e outras complicações devido à paraplegia e procedimentos cirúrgicos.

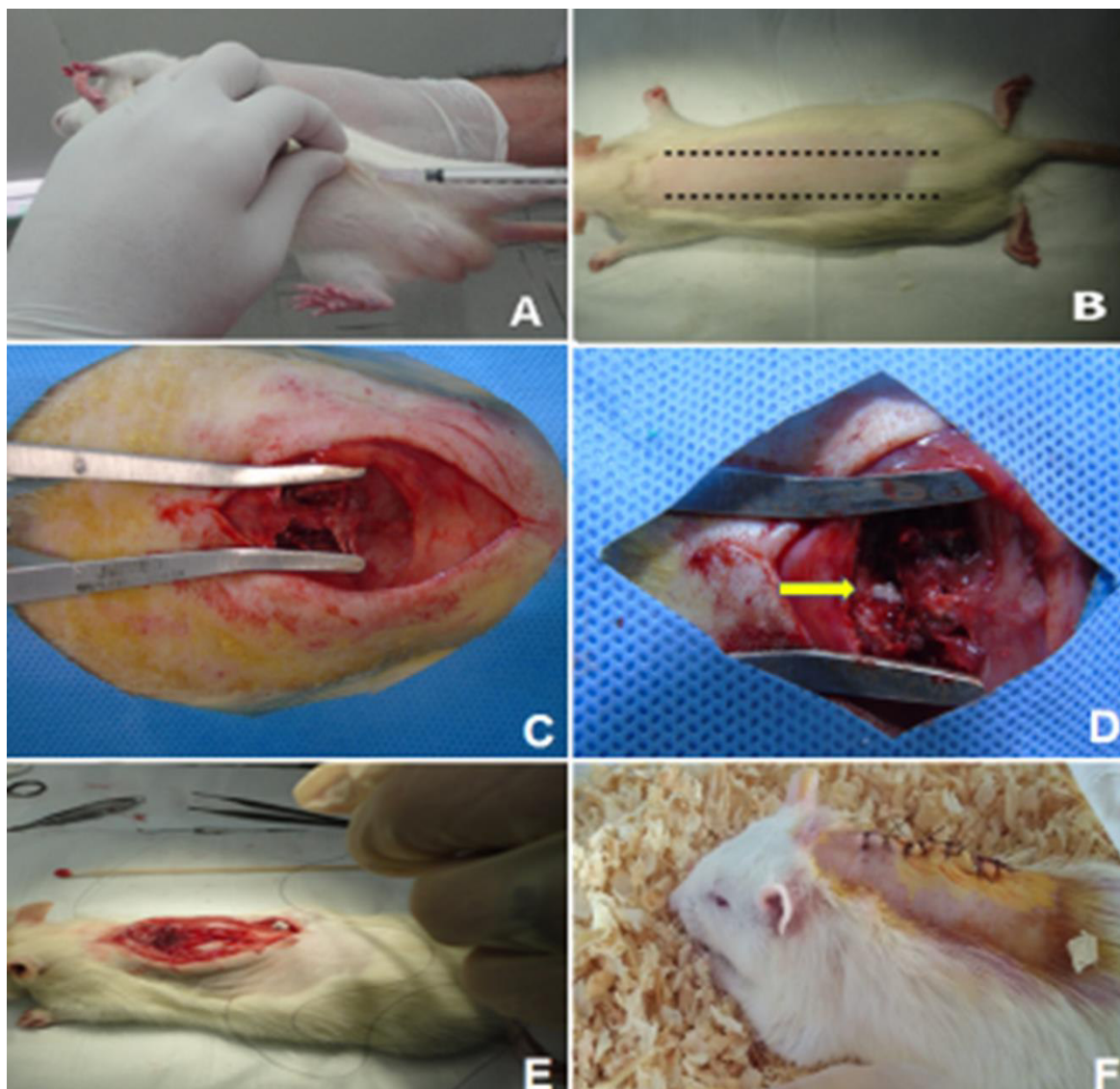


Figura 4 - Procedimento cirúrgico experimental. Procedimento pré-anestésico com indução anestésica (A). Tricotomia e manutenção da anestesia com anestesia geral. Notar entre as linhas tracejadas o local de incisão cirúrgica (B). Dissecção da musculatura epaxial e divulsão da musculatura com a utilização de afastador oftálmico do tipo Alm (C). Exposição da medula espinhal transectada (D). Fechamento por planos com pontos na camada muscular e da pele (E). Comportamento do animal na recuperação anestésica (F).

4.7 Avaliação de motricidade dos animais após lesão medular

Após 48 horas do procedimento cirúrgico, foram realizadas avaliações motoras seguindo o protocolo proposto por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) que tem como objetivo graduar os movimentos das articulações do animal refletindo suas condições locomotoras. Esta escala varia de zero a 21 pontos, em que escore zero corresponde a ausência total de movimento dos membros pélvicos e 21 apresenta atividade locomotora normal (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995) (ANEXO A).

Durante a avaliação, os animais ficaram em uma caixa plástica padronizada, de fundo escuro, com dimensões de 90 cm de diâmetro e 7 cm de altura sem presença de ruídos (Figura 5).



Figura 5 - Visualização do animal na caixa padronizada para avaliação da motricidade.

Dois observadores treinados participaram de cada sessão de teste, sendo posicionados de forma a permitir a observação de cada lado do animal por meio da caixa de observação. Cada animal foi avaliado durante 5 minutos, para minimizar o risco de não observar movimentos importantes. Os animais que permaneceram imóveis por mais de 15 a 20 segundos foram estimulados por leves batidas na parte externa do campo aberto. Em casos de não resposta ao estímulo, o animal foi posicionado pelos avaliadores no centro da caixa de observação, cuidadosamente, para que não ocorresse toque na cauda ou nos membros pélvicos

do animal, já que isto poderia influenciar o desempenho locomotor (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995). Cada teste realizado foi filmado por um período de 5 minutos e foto/documentado para posterior comprovação dos achados.

A sensibilidade motora, foi testada a partir do pinçamento do espaço interdigital dos pés dos animais para avaliação da perda da resposta nervosa a dor.

Vale ressaltar que para as análises subsequentes foram utilizados, entre os lesionados, somente aqueles que obtiveram escore zero na escala de BBB.

4.8 Eutanásia e coleta do material biológico

As análises subsequentes foram realizadas em amostras do grupo de animais lesionados, conforme a divisão dos grupos nos períodos de 3, 7, 14, 21 dias após o procedimento cirúrgico.

Para a eutanásia, os animais foram submetidos a overdose anestésica de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 240mg/kg e 30mg/kg, via intraperitoneal. Após a eutanásia, conforme o grupo experimental, foram coletados fragmentos da medula espinhal (T10-T12), os quais foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, para análises subsequentes.

4.8.1 Análise por microscopia óptica de luz comum

A técnica de microscopia óptica de luz comum foi empregada a fim de caracterizar histologicamente a evolução das lesões causadas na medula espinhal dos ratos.

As secções de medula espinhal após fixação, foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e desidratadas em uma série de etanol em concentrações crescentes (de 70-100%), diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina. Os blocos contendo as secções de medula foram seccionados em micrótomo automático (Leica, RM2165) obtendo-se cortes de 5µm, que foram desparafinizados e corados com Hematoxilina e Eosina – HE (TOLOSA et al., 2005). O material processado e corado foi analisado e as características morfológicas encontradas foram foto/documentadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

4.8.2 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura

Para o estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados secções de medula espinhal de 3, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. Após fixação em solução de paraformaldeído 4%, as amostras foram lavadas em solução tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). Em seguida, o material foi lavado em dois banhos sucessivos de água destilada por 10 minutos cada. O material, então, foi imerso em solução de ácido tânico por 1h, em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado com água destilada por três vezes seguidas de 5 minutos cada. As amostras foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (70% - 100%) durante 10 minutos, quatro vezes com álcool 100%, por 10 minutos. Então foram submetidas no ponto crítico, modelo Leica EM CPD300, montadas em bases metálicas e, recobertas com camada de ouro em aparelho metalizador, Emitech K550. As peças foram examinadas sob microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

4.8.3 Análise por imunohistoquímica

Com a finalidade de avaliar os padrões de resposta inflamatória tecidual, realizou-se reações imunohistoquímicas com anticorpos conforme mostra o quadro 2.

Quadro 2 – Anticorpos, marcação, fabricantes e diluição utilizados nesta pesquisa.

ANTICORPO	MARCAÇÃO	FABRICANTE	DILUIÇÃO
NOX2 (pAb anti-CYBB)	Estresse oxidativo	NBP2-41291; Novus Biologicals, USA	2:5
ANTI-CD43 (W3/13)	Linfócitos T, exceto linfócitos B	NB100-64992; Novus Biologicals, USA	1:250
ANTI-GFAP (5C10)	Astrócitos	NBP1-05197; Novus Biologicals, USA	1:500

É importante ressaltar que o controle negativo das reações imunohistoquímicas foi realizado utilizando o IgG (Goat anti-Mouse IgG – AP 308F, Chemical International, Temecula, California, USA).

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, e na segunda passagem de etanol 100% os cortes tiveram a peroxidase endógena bloqueada pela adição de H₂O₂ (3%) em etanol (100%), por 20 minutos. Os cortes foram então hidratados usando concentrações

decrecentes de etanol. Em seguida, foram tratados com tampão citrato (0,1M pH 6,0) e irradiados em microondas, na potência máxima (700MHz), três vezes, durante cinco minutos. Depois os cortes foram equilibrados e bloqueados pela adição de proteínas com o kit Dako Protein Block (X 0909, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), por 20 minutos. As inclusões com anticorpos primários foram realizadas em câmara úmida, overnight, à 4°C. Após esse período, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, Kit Dako LSAB (K 0690, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), por 45 minutos, seguido de streptoavidina do mesmo Kit também por 45 minutos. A reação foi visualizada pela adição do substrato DAB (Revelador Líquido DAB + Substrate Chromogen System, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) por 5 minutos, seguido de contra-coloração com hematoxilina e montagem em Permount (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA).

4.9 Financiamento

Os equipamentos e materiais permanentes foram adquiridos previamente pela instituição participante (UFMA – executora; USP – co-executora), sendo assim, o valor total gasto na pesquisa foi de R\$ 19.800,00. Ressalta-se que o recurso para aquisição do material de consumo utilizado na execução da pesquisa foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) – EDITAL Nº 31/2016 – UNIVERSAL – Processo UNIVERSAL-01251/17 - TERMO: 015832/2017) do Dr. Rafael Cardoso Carvalho (orientador do projeto).

5 RESULTADOS

5.1 Eficácia do modelo cirúrgico experimental de transecção e avaliação da motricidade dos animais que sofreram lesão medular completa

Todos os animais submetidos ao modelo cirúrgico experimental proposto perderam a motricidade abaixo do nível da lesão, permanecendo paraplégicos desde então foi verificado a perda completa de mobilidade espontânea, tanto nos membros pélvicos e cauda, bem como, a perda da resposta nervosa à dor. Estes resultados foram confirmados também pela análise do BBB, onde todos os animais submetidos a técnica cirúrgica experimental obtiveram score de 0 (zero). Ressalta-se que não houve perda motora ou de sensibilidade nos membros torácicos e cabeça, o que permitiu ao animal movimentar-se e alimentar-se. Pôde-se constatar a ausência de dor durante a avaliação clínica diária destes animais. Não foram detectadas disfunções respiratória, digestiva ou urinária graves, durante o período experimental.



Figura 6 – Características físicas do animal após lesão medular completa. Em A e B: Animal no 2º dia após o procedimento cirúrgico: em A - abdômen arrastado e ausência de reflexos motores na cauda (A); em B - membros pélvicos com a face dorsal dos pés em contato com a superfície de apoio (B).

5.2 Análise morfológica da medula espinhal lesionada: histopatologia e MEV

Quanto a avaliação microscópica da medula espinhal de animais submetidos ao modelo experimental de transecção, a avaliação após 3 e 7 dias da indução da lesão mostrou áreas de cavitação no epicentro da lesão, infiltrado celular, presença de necrose de liquefação e vacuolização, presença de células Gitter (macrófagos espumosos), além de várias áreas hemorrágicas (figuras 8B – E). Após 14 e 21 dias (figuras 8F - I) observou-se a manutenção de amplas áreas cavitadas na substância cinzenta, assim como, melhor visualização de células neuronais degeneradas e redução do infiltrado inflamatório e de áreas hemorrágicas comparados com 3 e 7 dias.

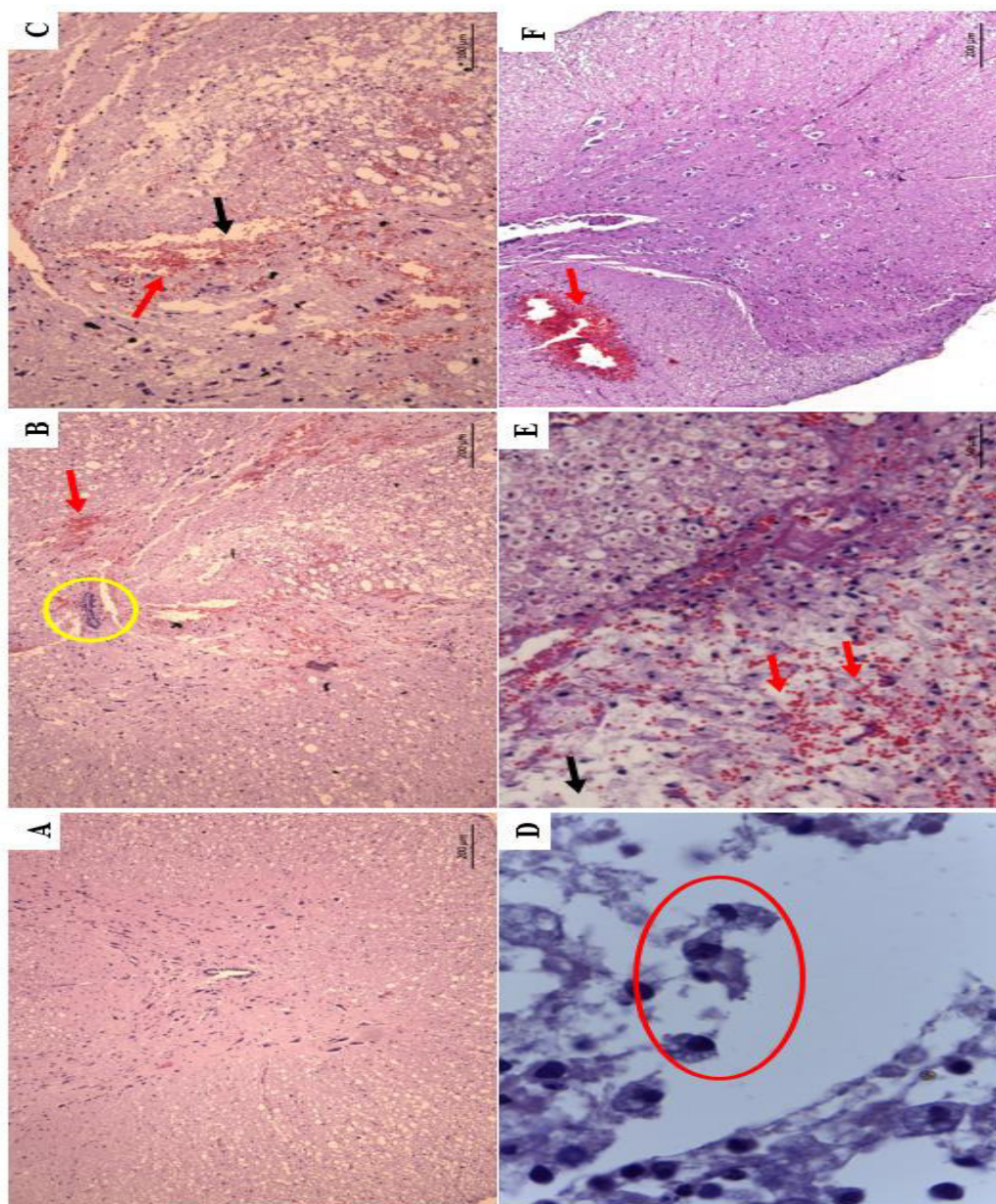


Figura 7 – Fotomicrografias em coloração de HE de secções transversais da medula espinhal de rato submetido a transecção completa, conforme o tempo de sobrevivência (3, 7, 14 e 21 dias). Em A – controle negativo, animal sem lesão medular. Barra: 200 μm. B e C- animais eutanasiados com 3 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 200 μm e 100 μm. Em D e E – animais eutanasiados com 7 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 μm. Em F e G – animal animais eutanasiados com 14 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 200 e 100 μm. Em H e I – animais eutanasiados com 21 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 100 μm. Coloração HE. Em B, C, D e E – Notar área de malácia intensa com presença de células gitter (círculo vermelho), migração de células inflamatórias (círculo amarelo) e áreas de cavitação (seta preta) e hemorragia (seta vermelha). Em F, G, H e I – Notar moderada degeneração de axônios e bainha de mielina (seta amarela) e manutenção de áreas de hemorragia (seta vermelha).

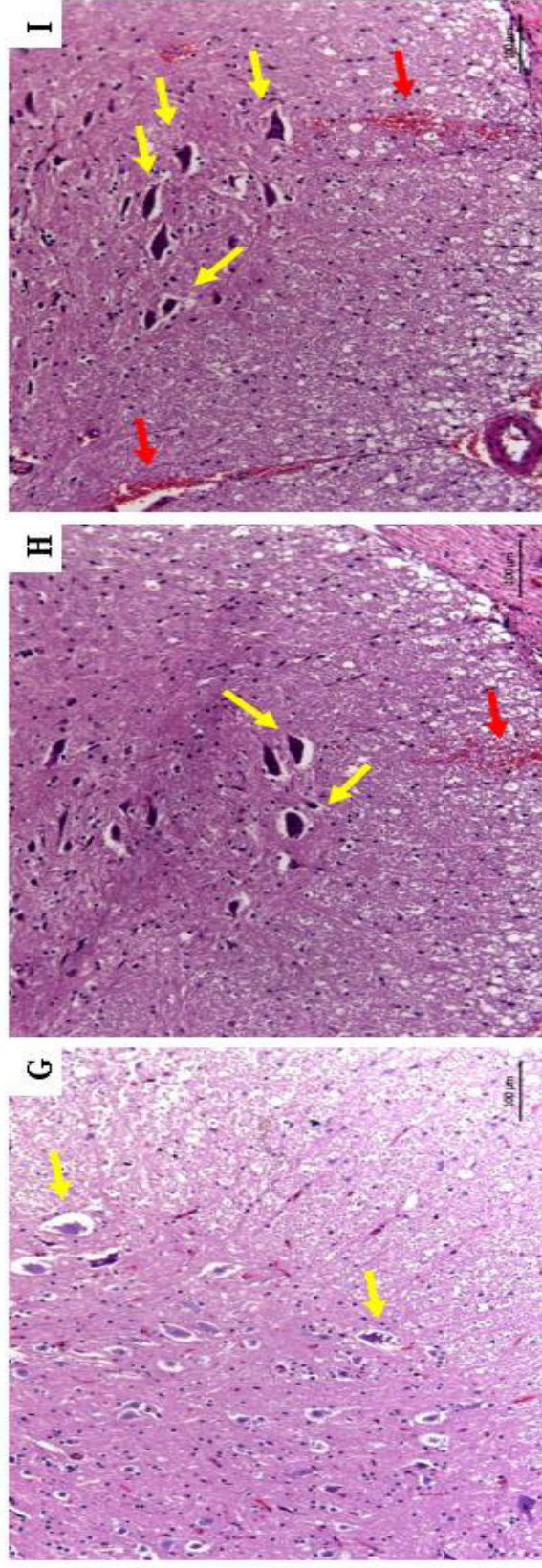


Figura 7 – Fotomicrografias em coloração de HE de seções transversais da medula espinal de rato submetido a transecção completa, conforme o tempo de sobrevida (3, 7, 14 e 21 dias). Em A – controle negativo, animal sem lesão medular. Barra: 200 μm. B e C – animais eutanasiados com 3 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 200 μm e 100 μm. Em D e E – animais eutanasiados com 7 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 μm. Em F e G – animal animais eutanasiados com 14 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 200 e 100 μm. Em H e I – animais eutanasiados com 21 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 100 μm. Coloração HE. Em B, C, D e E – Notar área de malácia intensa com presença de células gitter (círculo vermelho), migração de células inflamatórias (círculo amarelo) e áreas de cavitação (seta preta) e hemorragia (seta vermelha). Em F, G, H e I – Notar moderada degeneração de axônios e bainha de mielina (seta amarela) e manutenção de áreas de hemorragia (seta vermelha).

No que concerne a avaliação da medula espinhal por microscopia de eletrônica de varredura, pode-se observar a modificação tecidual com evolução dos períodos experimentais. Após 3 dias, pode-se notar o início do processo de desorganização tecidual (Figura 8A), o qual torna-se mais acentuado aos 7 dias, com a observância de moderada degeneração da substância cinzenta, com expansão para a substância branca (Figuras 8B – C). Após 14 dias de lesão, é notória a presença de linfócitos na substância cinzenta e perda de delimitação do espaço anatômico entre a substância cinzenta e branca (Figura 8D). Após 21 dias, é observado o início do remodelamento tecidual, uma vez que torna-se cada vez mais difícil a delimitação dos espaços entre a substância branca e cinzenta da medula espinhal (Figuras 8E – F).

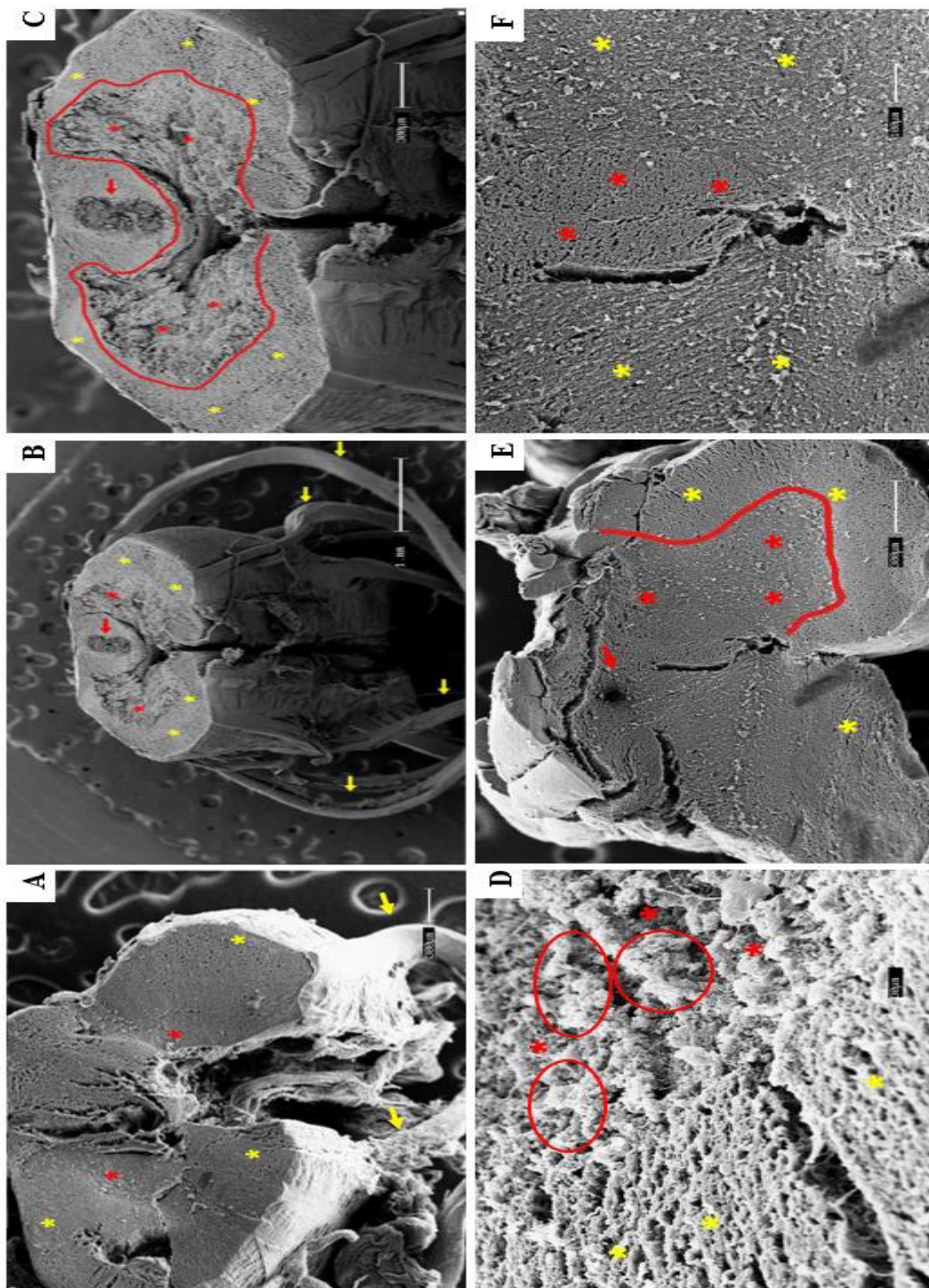


Figura 8 – Fotomicrografias da microscopia eletrônica de varredura de lesão medular completa. Em A - secção transversal da medula espinhal lesionada com 3 dias após procedimento cirúrgico. Barra: 300 μ m. Em B e C - secções transversais da medula espinhal lesionada com 7 dias após procedimento cirúrgico. Barra: 1 mm e 300 μ m. Em D - secção transversal da medula espinhal lesionada com 14 dias após procedimento cirúrgico. Barra: 30 μ m. Em E e F - secções transversais da medula espinhal lesionada com 21 dias após procedimento

cirúrgico. Barra: 300 μm e 100 μm . Em B e C notar moderada degeneração da substância cinzenta (asteriscos e contorno em vermelhos) com expansão para a substância branca (asterisco amarelo), presença de área de hemorragia (seta vermelha) e das radículas nervosas (seta amarela). Em D notar a presença de linfócitos na substância cinzenta (círculo vermelho) e perda de delimitação do espaço anatômico (contorno em vermelho) entre a substância cinzenta (asterisco vermelho) e branca (asterisco amarelo). Em E e F observar o início do remodelamento tecidual, uma vez que torna-se cada vez mais difícil a delimitação dos espaços entre a substância branca (asterisco amarelo) e cinzenta (asterisco vermelho) da medula espinhal.

5.3 Expressão de NOX 2 após lesão medular completa

Na análise por imunohistoquímica da expressão de NOX2, observou-se aumento deste marcador 7 dias pós-lesão (Figuras 9A – B), e sua expressão manteve-se constante até aos 21 dias após a lesão medular.

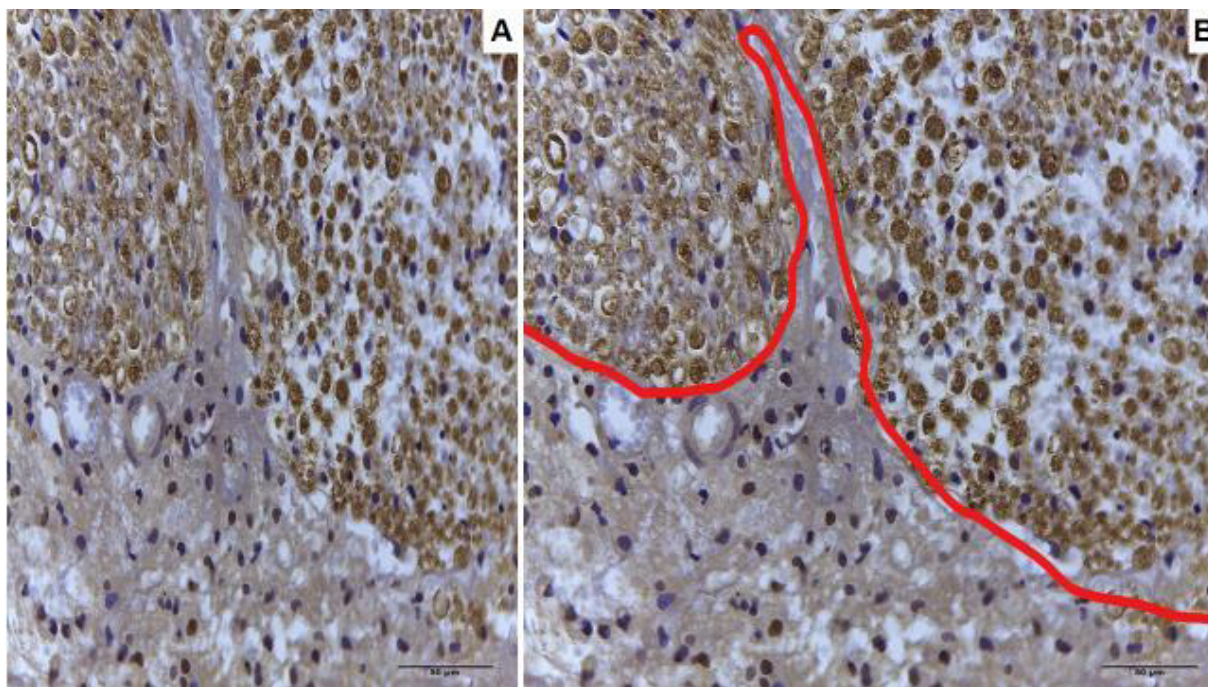


Figura 9 – Fotomicrografias de cortes da área lesionada por transecção medular completa analisados por Imunohistoquímica para NOX2, conforme o tempo de sobrevivência 7 dias. Em A - animais eutanasiados com 7 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em B – ampliação da imagem A com delimitação da área imunomarcada. Barra: 50 µm. Notar expressão positiva citoplasmática para NOX2 (coloração em marrom e delimitada em vermelho).

5.4 Expressão de CD43 após lesão medular completa

Após a lesão da medula espinhal observamos a migração leucocitária pela alta expressão de CD43⁺, aumentada aos 3, 7, 14 e 21 dias em relação ao grupo controle. Células CD43⁺ concentravam-se principalmente na substância branca e ao redor da área lesionada apresentando um pico máximo de infiltração 3 dias após a lesão (Figura 10B), evoluindo com redução acentuada em 14 e 21 dias após a lesão medular (Figuras 10C – E).

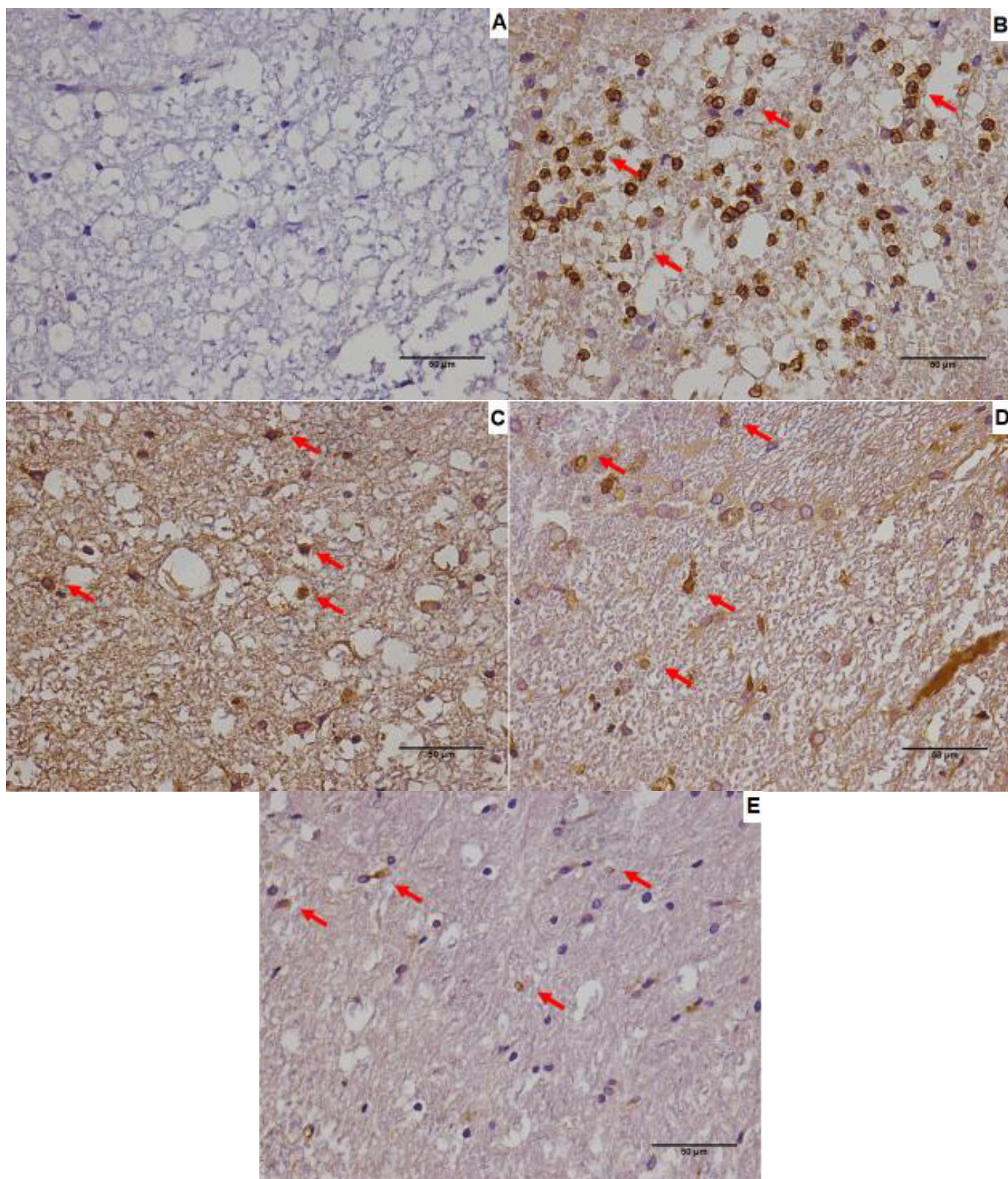


Figura 10 – Fotomicrografias de cortes da área lesionada por transecção medular completa analisados por Imunohistoquímica para CD43, conforme o tempo de sobrevivência (3, 7, 14 e 21 dias). Em A – controle negativo, animal sem lesão medular. Barra: 50 µm. B - animais eutanasiados com 3 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em C – animais eutanasiados com 7 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em D – animais eutanasiados com 14 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em E – animais eutanasiados com 21 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Notar expressão CD43⁺ (seta vermelha), indicando a presença de linfócito T.

5.5 Expressão de GFAP após lesão medular completa

No nosso experimento, observou-se mudança na expressão de GFAP, conforme os tempos experimentais analisados neste estudo. A expressão deste marcador, é caracterizada como astrocitose, a qual é definida pela hipertrofia do corpo dos astrócitos, e redução no comprimento de suas ramificações.

Na figura 10 pode-se observar o aumento na expressão do GFAP nos grupos de 3, 7, 14 e 21 dias em relação ao grupo controle. Pode-se destacar uma intensa ativação astrocitária no período de 3 a 14 dias pós-lesão (Figuras 11B – D), e regressão significativa desta expressão após os 21 dias pós-lesão (Figura 11E).

Neste estudo, os astrócitos foram encontrados principalmente na periferia da medula e na substância branca ao redor da lesão na porção dorsal e dorsolateral da medula espinhal.

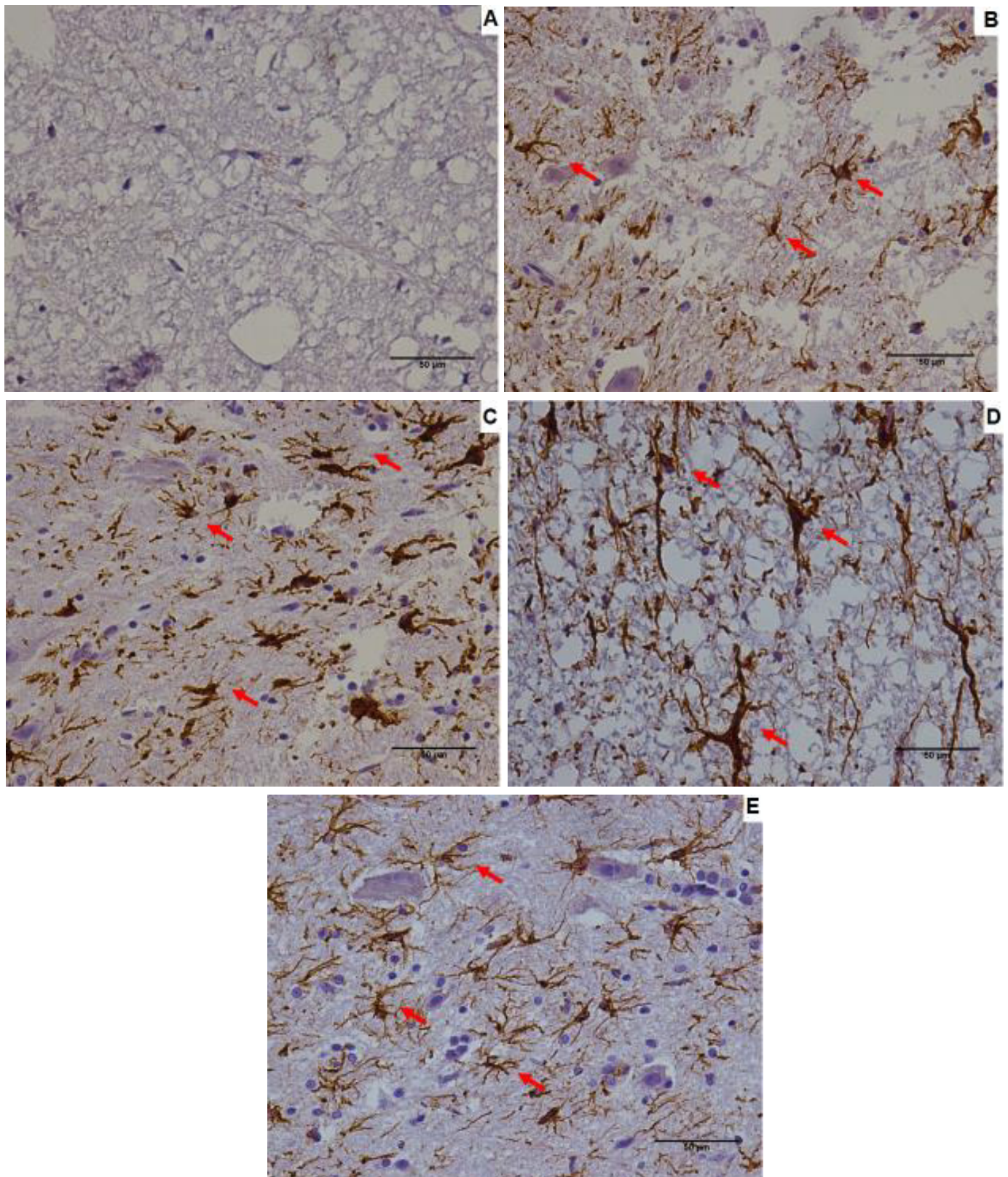


Figura 11 – Fotomicrografias de cortes da área lesionada por transecção medular completa analisados por Imunohistoquímica para GFAP, conforme o tempo de sobrevivência (3, 7, 14 e 21 dias). Em A - controle negativo, animal sem lesão. Barra: 50 µm. Em B – animais eutanasiados com 3 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em C – animais eutanasiados com 7 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em D – animais eutanasiados com 14 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em E – animais eutanasiados com 21 dias após a indução da lesão medular traumática. Barra: 50 µm. Em B, C, D e E – Notar expressão positiva para GFAP (seta vermelha), indicando a presença de astrócitos.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o modelo experimental de transecção completa da medula espinhal em ratos adultos, com a finalidade de induzir lesão medular traumática para investigar os padrões temporais de resposta inflamatória. Nossos resultados confirmam que este modelo é reproduzível e de fácil padronização resultando em danos similares aos casos mais graves de lesão medular em humanos, caracterizado pela incapacidade funcional, sensorial e motora graves.

A maior vantagem deste modelo de lesão medular é a natureza focal da lesão produzida. A transecção da medula espinhal permite a interrupção direcionada de fibras nervosas dos tratos motores e sensoriais, reproduzindo um cenário ideal para se estudar abordagens de regeneração, degeneração e plasticidade a nível axonal, assim como, eventos patológicos secundários que incluem inflamação aguda e desmielinização (SHARIF-ALHOSEIMI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2014). Esta investigação confirmou estudos anteriores, que a transecção completa da medula espinhal constitui um excelente método para indução da lesão medular traumática (WATERS et al., 1991; ERCEG et al., 2010; SHARIF-ALHOSEIMI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2014; LUKOVIC et al., 2015).

A confirmação da eficácia na reprodução deste modelo experimental em nosso estudo se deu pela avaliação da motricidade, usando a escala de BBB, sendo que os animais avaliados obtiveram pontuação zero, caracterizando a paralisia completa dos membros pélvicos. Vários estudos corroboram com nossos resultados, confirmando que o modelo animal de transecção completa da medula espinhal promoveu de forma imediata a perda da função motora e sensitiva dos membros pélvicos e cauda (SAKAI et al., 2012; LUKOVIC et al., 2015). Além disso, pelos nossos achados histológicos também foi possível afirmar a perda funcionalidade da medula espinhal.

Sendo assim, fica claro que esse modelo é bastante eficaz para induzir a lesão medular completa em ratos, e foi uma excelente alternativa para investigar os mecanismos fisiopatológicos em lesões medulares.

A lesão medular traumática consiste em duas fases determinantes: lesão primária e lesão secundária. A primeira consiste no impacto inicial, limitando-se à área da fratura vertebral sendo caracterizada por hemorragia aguda seguido de isquemia (ANWAR et al. 2016). Enquanto que a lesão secundária ocorre imediatamente a lesão primária envolvendo mecanismos vasculares, iônicos, bioquímicos, inflamatórios e celulares que resulta em mais danos teciduais (FLEMING et al, 2006; DONNELLY; POPOVICH, 2008; FORNER, 2015).

Através de análises histológicas, demonstramos acentuadas alterações teciduais na medula espinhal lesionada. Na análise histológica da medula espinhal dos animais lesionados que foram eutanasiados com 3 e 7 dias após o procedimento cirúrgico observou-se a substituição parcial da substância cinzenta por regiões de cavitação, áreas hemorrágicas, necrose de liquefação infiltrado de células inflamatórias e várias células de gitter (macrófagos espumosos). Semelhantemente ao encontrado em nossa pesquisa, Dumont et al. (2001) e Anwar et al. (2016), afirmaram que após o impacto mecânico primário, a lesão medular traumática sofrerá alterações imediatas na permeabilidade vascular evoluindo rapidamente para hemorragia e isquemia na região lesionada. Além disso, algumas características encontradas em nosso trabalho, que incluem edema, hemorragia, permeabilidade endotelial prejudicada, assim como, perda de autorregulação resultando em lesão celular local também são relatadas nos estudos de (TATOR; KOYANAGI, 1997; MAUTES et al., 2000; FASSBENDER et al., 2011; LOSEY et al., 2014).

Na análise histológica da medula espinhal dos animais lesionados que foram eutanasiados com 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico, observou-se a manutenção de áreas cavitadas, assim como, visualização de células balonizadas que reflete a degeneração neuronal. Segundo Profyris et al. (2004), é nesta fase da lesão secundária que a necrose é seguida por apoptose resultando em degeneração de diferentes tipos celulares.

Semelhante aos nossos resultados, Zhang et al. (2011) descreveram o aparecimento de lesões cavitadas com células balonizadas na medula espinhal de animais eutanasiados com 7, 14, 21 e 28 dias após a indução da lesão medular traumática. No estudo de Ramadan et al. (2017) também foi demonstrado que a medula espinhal dos animais submetidos à lesão medular traumática apresentou um aumento importante de áreas de cavitação, necrose fibrinóide e intensa hemorragia. Isso nos leva a pressuposição que entre os eventos que ocorrem na fase de lesão secundária, a resposta inflamatória seja de grande importância para elucidação da fisiopatologia da lesão medular, à medida que sua atenuação pode contribuir para o controle da resposta regenerativa.

Para avaliação da resposta inflamatória na medula espinhal lesionada, realizamos ensaios imunohistoquímicas pela expressão dos anticorpos NOX2, anti-CD43 e anti-GFAP.

Inicialmente, para avaliação do processo inflamatório da técnica experimental de lesão medular pelo modelo de transecção foi realizada a análise da expressão de NOX 2. De acordo com Savchenko (2013), funcionalmente, o NOX2 desempenha um papel na potencialização da inflamação e no aumento da liberação de metaloproteínases assim como, contribui para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Desse modo, avaliamos a expressão temporal de um dos isotipos da família NOX, o NOX 2. Os nossos resultados demonstraram o aumento na expressão de NOX 2 a partir de 7 dias pós-lesão, mantendo-se constante até aos 21 dias. Semelhantemente aos nossos resultados, Cooney et al. (2014), observaram aumento na expressão de NOX 2 aos 7 dias pós-lesão, sendo mantida até 28 dias. Contudo, um ponto que deve ser destacado neste aspecto, é que o modelo utilizado por estes autores foi o modelo de compressão medular, o que nos permite afirmar a validade e eficiência do modelo utilizado para objetivo proposto nesta pesquisa.

Neste mesmo aspecto e quanto da análise do mesmo modelo, Vaziri et al. (2004), diferentemente do nosso estudo, relataram que as subunidades de NADPH oxidase (gp91Phox e p67 Phox) estavam expressas desde o dia primeiro dia após lesão. Em adição a estas informações, Byrnes et al. (2011) demonstraram a expressão de NOX por pelo menos 6 meses pós-lesão. Com estas informações e de acordo os resultados observados em nossa pesquisa, que embora tenham tido um tempo de análise de 21 dias, pode-se inferir que o processo inflamatório na lesão medular está presente, sendo importante no processo de recrutamento celular para o processo de remodelação/regeneração.

Em continuação na avaliação do processo inflamatório foi realizada a imunomarcacão de CD43⁺. Nossos resultados demonstraram que as células CD43⁺ concentravam-se principalmente na substância branca e ao redor da área lesionada, apresentando um pico máximo de marcação após 3 dias de lesão, evoluindo com redução acentuada após 14 e 21 dias. Estes achados nos levam a ter duas hipóteses, a saber: a primeira: - a reparação e remodelação da lesão medular é mediada especialmente por leucócitos (granulócitos, monócitos/macrófagos); a segunda: a remodelação da lesão medular ocorre mediante o recrutamento de linfócitos Th17 que estão envolvidos na migração transendotelial como um mecanismo responsável pela migração e recrutamento de células para o sítio da inflamação.

Em observância aos nossos achados é fundamental ressaltar os trabalhos de Fleming et al., (2006); Zhang & Gensel, (2014) e Velázquez et al. (2019) os quais demonstraram que para o local da lesão são recrutados leucócitos que além de participar eventos inflamatórios, também estão envolvidos na limitação e reparação do dano patológico.

Outro aspecto importante a ser destacado, é a presença de linfócitos observados durante a análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura. Esse resultado pode ser corroborado por Velázquez et al. (2019), os quais relataram que a infiltração de linfócitos

Th17 no sistema nervoso central são importantes para o processo inflamatório e de desmielinização (o que também foi observado em nossos resultados).

De acordo com Nakagawa & Kaneko, (2010), os astrócitos fazem parte dos tipos celulares mais abundantes no SNC, sendo moduladores da transdução sináptica através da interação com os neurônios. Quando ativadas apresentam uma morfologia diferenciada com caráter hipertrófico e ramificações mais curtas e espessas com capacidade de expressar intensamente anti-GFAP.

No que tange a análise imunohistoquímica por GFAP, observou-se que no dia 3 pós-lesão, inicia-se a modificação estrutural astrocitária, hipertrofia no citoesqueléticos desta célula a nível da lesão. Com 7 e 14 dias pós-lesão, observou-se um aumento importante na quantidade de astrócitos reativos, assim como, espessamento dos processos citoesqueléticos. Interessantemente, após 21 dias, os animais têm uma queda significativa na resposta astrocitária, quando comparada aos intervalos anteriores.

Nossos resultados assemelham-se aos descritos na literatura por Bignami e Dahl (1994), os quais afirmaram que as lesões no SNC ocasionam aumento na intensidade de marcação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nos prolongamentos astrocitários, conhecido como astrocitose fibrilar reacional, e está associado a hiperplasia e hipertrofia dos astrócitos. Corroborando com estes achados Couttsekeirstead (2008) relatou que, quando reativos, os astrócitos formam a cicatriz glial, que se acumula ao redor da lesão constituindo uma barreira física e um ambiente inibitório para a regeneração axonal e a remielinização, o que foi confirmado também em nosso trabalho pelas análises morfológicas realizadas nesta pesquisa.

Diferente dos nossos resultados, no estudo realizado por Popovich et al. (1997), os astrócitos reativos foram mais acentuados nos tempos de 7 a 28 dias pós-lesão ficando interpostas entre micróglia e macrófagos fagocitários. Estes autores afirmaram que a inflamação por trauma do SNC, ocorre rapidamente no local da lesão, envolvendo a participação de células imunes residentes e recrutadas caracterizado, principalmente, por micróglia e astrócitos ativados. Na mesma perspectiva, no estudo realizado por Dusart e Schwab (1994) foi observado na primeira semana pós-lesão que vários astrócitos reativos encontravam-se dando início ao delineamento da área circundante do local da lesão.

Quanto ao tocante da lesão medular traumática, os astrócitos reativos parecem desempenhar um duplo papel na lesão. A literatura especializada na área relata que, se por um lado, podem desempenhar a função de suporte no crescimento axonal, por outro lado, contribuem para a formação da cicatriz glial, formando uma barreira física e química que inibe o crescimento axonal para sua reparação (FITCH; SILVER, 2008; WHITE et al., 2008).

Em nossa pesquisa, embora o tempo experimental não nos permitisse avaliar a evolução da cicatrização glial como processo impeditivo na migração celular para regeneração/remodelação tecidual, nossos achados que demonstraram a involução da resposta astrocitária nos levam a hipotetizar que a resposta destas células, ou seja, a formação da cicatriz glial não seria um fator limitante a remodelação/regeneração tecidual no modelo experimental estudado.

7 CONCLUSÃO

O modelo cirúrgico experimental utilizado nesta pesquisa reproduz, de maneira homogênea, a incapacidade funcional, sensorial e motora graves, tendo grande relevância clínica à medida que induziu a alterações histopatológicas progressivas e desmielinização que foram intensificadas com a duração de tempo após a lesão da medula espinhal. Este estudo permitiu a avaliação da resposta inflamatória tecidual da medula espinhal caracterizada pelo recrutamento de células, acentuada reatividade de astrócitos, ativação linfocitária, degeneração neuronal e estresse oxidativo.

Portanto, tais resultados podem contribuir com a melhor compreensão sobre o mecanismo do processo inflamatório da injúria medular com perspectivas futuras de intervenções terapêuticas com células-tronco.

REFERÊNCIAS

- ADLER C. Lesões na medula espinhal. In: PREDETTI LW, EARLY MB. **Terapia ocupacional: capacidades práticas para as disfunções físicas**. 5.ed. São Paulo: Roca, 805-31; 2005.
- AGUZZI A, BARRES BA, BENNETT ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? **Science**, 339: 156-161; 2013.
- AHUJA CS, NORI S, TETREAULT L, WILSON J, KWON B, HARROP J, CHOI D, FEHLINGS MG. Traumatic spinal cord injury—repair and regeneration. **Neurosurgery**, 80: S9–S22; 2017.
- AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION (ASIA). **International standarts for neurological classification of spinal cord injury** [online]. Atlanta (US): American Spinal Injury Association; 2017.
- ANTONIC A, SENA ES, LEES JS, WILLS TE, SKEERS P, BATCHELOR PE, Macleod MR, Howells DW. Stem cell transplantation in traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis of animal studies. **PLoS biology**, 11:12; 2013.
- ANWAR MA, SHEHABI TSA, EID AH. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. **Front. Cell. Neurosci**, 10:98; 2016.
- ARIAS MV, SEVERO MS, TUDURY EA. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Seminário: Ciências Agrárias**. Londrina: 28: 115-134; 2007.
- AUSTYN JM, GORDON S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **European Journal of Immunology**, 11: 805-815; 1981.
- BAMPI LNS, GUILHEM D, LIMA DD. Qualidade de vida em pessoas com lesão medular traumática: um estudo com o WHOQOL-bref. **Rev Bras Epidemiol**, 11(1): 67-77; 2008.
- BAPTISTE DC, FEHLINGS MG. Update on the treatment of spinal cord injury. **Prog Brain Res**, 161: 217-33; 2007.

BARATEIRO A, BRITES D, FERNANDES A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. **Current Pharmaceutical Design**, 22, 000-000; 2016.

BARCIA C, ROS CM, ANNESE V, GOMEZ A, ROS-BERNAL F, AGUADOLLERA D, MARTINEZ-PAGAN ME, DE PABLOS V, FERNANDEZ-VILLALBA E, HERRERO MT. IFN-gamma signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. **Cell. Death Dis**, 3, e379; 2012.

BASSO DM, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, 12(1):1-21, 1995.

BETHEA JR, NAGASHIMA H, ACOSTA MC, BRICENO C, GOMEZ F, MARCILLO AE, LOOR K, VERDE J, DIETRICH WD. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. **J Neurotrauma**, 16: 851-63; 1999.

BICAN O, MINAGAR A, PRUITT AA. The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. **Neurol Clin**, 31(1):1-18; 2013.

BIGNAMI A, ENG LF, DAHL D, UYEDA CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. **Brain Res**, 25;43(2):429-35; 1972.

BIGNAMI A, DAHL D. Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. **J Comp Neurol**, 153: 27 - 37; 1974.

BIGNAMI A, DAHL D. Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury. Austin: **Landes**, 1994.

BINDER H. Traumatic spinal cord injury. **Handb Clin Neurol**, 110: 411-26; 2013.

BOLAND RA, LIN CSY, ENGEL S, KIERNAN MC. Adaptation of motor function after spinal cord injury: novel insights into spinal shock. **Brain**, 134: 495-505; 2011.

BONDAN EF, SANCHEZ M. Microglia. In: GRAÇA DL, BONDAN EF, PEREIRA LAV, MAIORCA PC. Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla. Santa Maria: **Editora da UFSM**, 61-79; 2011.

BOTELHO RV, DANIEL JW, BOULOSA JLR, COLLI BO, FARIAS RL, MORAES O JS, PIMENTA JR, WE, RIBEIRO CH, RIBEIRO FRB, TARICCO M.A, CARVALHO MV, BERNARDO WM. Efetividade da metilprednisolona na fase aguda do trauma raquimedular - revisão sistemática dos ensaios clínicos randomizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 55(6): 729-737; 2009.

BOTELHO RV, ALBUQUERQUE LDG, BASTIANELLO JÚNIOR R, ARANTES JÚNIOR AA. Epidemiology of traumatic spinal injuries in Brazil: systematic review. **Arq Bras Neurocir**, 33(2): 100-6; 2014.

BRAGA-SILVA J, GEHLEN D, ROMAN JA, MACHADO DC, COSTA JCD, FAÚNDEZ M, ORSI VV, BRAGA R. Modelo experimental de lesão raquimedular em ratos com dispositivo para acesso de agentes terapêuticos locais. **Acta Ortop Bras**, 15(3): 155-157; 2007.

BRAVO-ADAME M, SANDOVAL-HERNANDEZ M, MIGUELES-LOZANO O, ROSENSTEIN Y. 670 2012. CD43, p 320-328. In Choi S, Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer New York; 2012.

BYRNES KR, WASHINGTON PM, KNOBLACH SM, HOFFMAN E, FADEN AI. Delayed inflammatory mRNA and protein expression after spinal cord injury. **J Neuroinflammation**. 8: 130; 2011.

CADOTTE DW, FEHLINGS MG. Spinal Cord Injury: a systematic review of current treatment options. **Clinical orthopaedics and related research**. 2010.

CAPPELLANO G, CARECCHIO M, MAGISTRELLI L, CANTELLO R, DIANZANI U, COMI C. Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. **Am J Neurodegener Dis**, 21;2(2):89-107; 2013.

CARCINONI M, CALIRI MHL, NASCIMENTO MS. Ocorrência de úlcera de pressão em indivíduos com lesão traumática da medula espinhal. **REME**, 9(1):29-34; 2005.

CASALIS MEP. Lesão Medular. In: TEIXEIRA E, et al. Terapia Ocupacional na reabilitação física. São Paulo: **Roca**, 4: 41-61; 2003.

CASANO AM, PERI F. Microglia: multitasking specialists of the brain. **Dev. Cell**, 32: 469-477; 2015.

CEREZETTI CRN, NUNES GR, CORDEIRO DRCL, TEDESCO S. Lesão Medular Traumática e estratégias de enfrentamento: revisão crítica. **O Mundo da Saúde**, 36(2):318-326; 2012.

Clinical Trials.gov. 2016. <https://clinicaltrials.gov/>. Accessed August 4, 2016.

COLTON C, WILCOCK, D.M. Assessing activation states in microglia. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, 9, 174-191; 2010.

COONEY SJ, ZHAO Y, BYRNES KR. Characterization of the expression and inflammatory activity of NADPH oxidase after spinal cord injury. **Journal Free Radical Research**, 48; 2014.

COUTTS M, KEIRSTEAD HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. **Exp Neurol**, 209: 368–377; 2008.

CUI X, CHEN L, REN Y, JI Y, LIU W, LIU J, YAN Q, CHENG L, SUN YE. Genetic modification of mesenchymal stem cells in spinal cord injury repair strategies. **Biosci Trends**, 7(5):202-8; 2013.

DABNEY KW, EHRENSHTEYN M, AGRESTA CA, TWISS JL, STERN G, TICE L, SALZMAN SK. A Model of Experimental Spinal Cord Trauma Based on Computer-Controlled Intervertebral Distraction: Characterization of Graded Injury. **Spine**, 29(21): 2357–2364; 2004.

DASARI VR, VEERAVALLI KK, DINH DH. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. **World J Stem Cells**, 6(2): 120-33; 2014.

DAVID S, KRONER A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci**, 12(7): 388-99; 2011.

DELGADO M. Inhibition of interferon (IFN) gamma-induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression. **J. Biol. Chem**, 278, 27620-27629; 2003.

DIETRICH WD, LEVI AD, WANG M, GREEN BA. Hypothermic Treatment for Acute Spinal Cord Injury. **Neurotherapeutics**, 8(2): 229–239; 2011.

DINIZ IV, SOARES RAS, NASCIMENTO JA, SOARES MJGO. Caracterização das vítimas de acidente de trânsito que apresentaram traumatismo raquimedular. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. 16(3); 2012.

DITUNNO JF, LITTLE JW, TESSLER A, BURNS AS. Spinal shock revisited: a four-phase model. **Spinal Cord**, 42(7): 383-95; 2004.

DONNELLY DJ, POPOVICH PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Exp Neurol**, 209(2): 378-88; 2008.

DOHRMANN GJ, PANJABI MM. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. **Surg Neurol**, 6: 263-7; 1976.

DUMONT RJ, OKONKWO DO, VERMA S, HURLBERT RJ, BOULOS PT, ELLEGALA DB, DUMONT AS. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. **Clin Neuropharmacol**, 24(5): 254-64; 2001.

DUSART I, SCHWAB, ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinalcord. **Eur. J.Neurosci**, 6: 712–724; 1994.

DVORAK MF, NOONAN VK, FALLAH N, FISHER CG, FINKELSTEIN J, KWON B K, RIVERS CS, AHN H, PAQUET J, TSAI EC, TOWNSON A, ATTABIB N, BAILEY CS, CHRISTIE SD, DREW B, FOURNEY DR, FOX R, HURLBERT RJ, JOHNSON MG, LINASSI AG, PARENT P, FEHLINGS MG. The Influence of Time from Injury to Surgery on Motor Recovery and Length of Hospital Stay in Acute Traumatic Spinal Cord Injury: An Observational Canadian Cohort Study. **J Neurotrauma**, 32(9): 645–654; 2015.

ERCEG, S, RONAGHI H, ORIA H, ROSELLÓ MG, ARAGÓ MA, LOPEZ MG, RADOJEVIC I, MORENO-MANZANO V, RODRIGUEZ-JIMÉNEZ FJ, BHATTACHARYA SS, CÓRDOVA J, STOJKOVIC M. Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. **Stem Cells**, 28: 1541–1549; 2010.

FASSBENDER JM, WHITTEMORE SR, HAGG T. Targeting microvasculature for neuroprotection after SCI. **Neurotherapeutics**, 8: 240–251; 2011.

FAULKNER JR, HERRMANN JE, WOO MJ, TANSEY KE, DOAN NB, SOFRONIEW MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, 24(9): 2143-55; 2004.

FABER K, KETTENMANN H. Physiology of microglial cells. **Brain Research Reviews**, 48(2):133-143; 2005.

FITCH MT, SILVER J. Glial cells, inflammation, and CNS trauma. Modulation of the inflammatory environment after injury can lead to long-distance regeneration beyond the glial scar. In: KORDOWER, J. H. e TUSZYNSKI, M. H. (Ed.). **CNS Regeneration**. London: Academic Press, 2008.

FITZMAURICE SN. **Neurologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 181-183; 2011.

FLEMING JC, NORENBURG MD, RAMSAY DA, DEKABAN GA, MARCILLO AE, SAENZ AD, PASQUALE-STYLES M, DIETRICH WD, WEAVER LC. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. **Brain**, 129 (12): 3249-69; 2006.

FORNER S. **Dor neuropática após lesão medular traumática: o papel dos receptores endotelinérgicos eta e etb**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina; 2015.

FRIEDLI L, ROSENZWEIG ES, BARRAUD Q, SCHUBERT M, DOMINICI N, AWAI L, NIELSON JL, MUSIENKO P, NOUT-LOMAS Y, ZHONG H, ZDUNOWSKI S, ROY RR, VERTENTE SC, VAN DEN MARCA R, HAVTON LA, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC, BÉZARD E, BLOCH J, EDGERTON VR, FERGUSON AR, CURT A, TUSZYNSKI MH, COURTINE G. Pronounced species divergence in corticospinal tract reorganization and functional recovery after lateralized spinal cord injury favors primates. **Sci. Transl. Med**, 7: 302ra134; 2015.

FUKUDA M, CARLSSON SR. Leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes as differentiation antigens. **Medical Biology**, 64:335-343; 1986.

FURLAN JC, SAKAKIBARA BM, MILLER WC, KRASSIOUKOV AV. Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. **Can J Neurol Sci**, 40(4): 456-64; 2013.

GEHRMANN J, KREUTZBERG GW. Microglia in experimental neuropathology. In: KETTENMANN H, RANSOM BR. **Neuroglia**. Oxford: University Press, 2: 883-903; 2005.

GERZANICH V, WOO SK, VENNEHENS R, TSYMBALYUK O, IVANOVA S, IVANOV A, GENG Z, CHEN Z, NILIUS B, FLOCKERZI V, FREICHEL M, SIMARD JM. De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. **Nat Med**, 15(2): 185-91; 2009.

GINHOUX F, PRINZ M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. Cold Spring Harb. Perspect. **Biol**, 7, a020537; 2015.

GOMEZ-SORIANO J, CANO-DE-LA-CUERDA R, MUNOZ-HELLIN E, ORTIZ-GUTIERREZ R, TAYLOR JS. Evaluation and quantification of spasticity: a review of the clinical, biomechanical and neurophysiological methods. **Rev Neurol**, 55(4):217-26; 2012.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol**, 3, 23-35; 2003.

GRABOWSKI RS. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GRAÇA DL, BONDAN EF, PEREIRA LAV, MAIORKA PC. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla**. Santa Maria: Editora da UFSM, 240 p; 2011.

GRIS D, MARSH DR, OATWAY MA, CHEN Y, HAMILTON EF, DEKABAN GA, WEAVER LC. Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. **J. Neurosci**, 24: 4043–4051; 2004.

HAUSMANN ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. **Spinal Cord**, 41: 369–378; 2003.

HOLNESS CL, SIMMONS DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. **Blood**, 81:1607-1613; 1993.

HORNER PJ, GAGE FH. Regenerating the damaged central nervous system. **Nature**, 407 (6807): 963-70; 2000.

HOWELL DN, AHUJA V, JONES L, BLOW O, SANFILIPPO FP. Differential expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) by mononuclear phagocyte populations. **J Leukoc Biol**, 55: 536-544; 1994.

JESSEN KR. Glial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36: 1861-1867; 2004.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2013.

KANDEL ER. As células nervosas e o comportamento. In: KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. **Princípios da neurociência**. Barueri, São Paulo: Manole, 4: 19-35; 2003.

KAWANISHI C, GREGUOL M. Avaliação da autonomia funcional de adultos. **Rev Ter Ocup Univ São Paulo**, 25(2):159-66; 2014.

KHAYRULLINA G, BERMUDEZ S, BYRNES KR. Inhibition of NOX2 reduces locomotor impairment, inflammation, and oxidative stress after spinal cord injury. **Journal of Neuroinflammation**, 12:172; 2015.

KILLEEN N, BARCLAY AN, WILLIS AC, WILLIAMS AF. The sequence of rat leukosialin (W3/13 antigen) reveals a molecule with O-linked glycosylation of one third of its extracellular amino acids. **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.)J**, 6:4029-4034; 1987.

KORBLING M, ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **The New England Journal of Medicine**, 349(6): 570-582; 2003.

KWON BK, OXLAND TR, TETZLAFF W. Animal models used in spinal cord regeneration research. **Spine**, 27: 1904-10; 2002.

KWON BK, MANN C, SOHN HM, HILIBRAND AS, PHILLIPS FM, WANG JC, FEHLINGS MG. Review Article. Hypothermia for spinal cord injury. **Spine J**, 8(6): 859-874; 2008.

KWON BK, CASHA S, HURLBERT RJ, YONG VW. Inflammatory and structural biomarkers in acute traumatic spinal cord injury. **Clin Chem Lab Med**, 49(3): 425-33; 2011.

KWON BK, OKON EB, PLUNET W, BAPTISTE D, FOUAD K, HILLYER J. et al. A systematic review of directly applied biologic therapies for acute spinal cord injury. **J Neurotrauma**, 28(8):1589-610; 2011.

KRAMER AS, HARVEY AR, PLANT GW, HODGETTS SI. Systematic review of induced pluripotent stem cell technology as a potential clinical therapy for spinal cord injury. **Cell Transplant**, 22(4): 571-617; 2013.

LAMMERTSE DP, JONES LA, CHARLIFUE SB, KIRSHBLUM SC, APPLE DF, RAGNARSSON KT, FALCI SP, HEARY RF, CHOUDHRI TF, JENKINS AL, BETZ RR, POONIAN D, CUTHBERT JP, JAI UM, SNYDER DA, KNOLLER N. Autologous incubated macrophage therapy in acute, complete spinal cord injury: results of the phase 2 randomized controlled multicenter trial. **Spinal Cord**, 50(9):661-71; 2012.

LEE BB, CRIPPS RA, FITZHARRIS M, WING PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. **Spinal Cord**; 2014.

LEME RJA. **Regeneração da medula espinhal de ratos adultos após a inoculação de células de schwann em presença do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), análise comportamental e celular.** Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

LENT R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências.** São Paulo: Atheneu, 2001.

LESKOVAR A, MORIARTY LJ, TUREK J, SCHOENLEIN IA, BORGES RB. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. **J Exp Biol**, 203(12): 1783-95; 2000.

LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, 105:1135-143; 2002.

LOSEY P, YOUNG C, KRIMHOLTZ E, BORDET R, ANTHONY DC. The role of hemorrhage following spinal-cord injury. **Brain Res**, 1569: 9–18; 2014.

LUKOVIC D, MORENO-MANZANO V, LOPEZ-MOCHOLI E, RODRIGUEZ-JIMÉNEZ FJ, JENDELOVA P, SYKOVA E, ORIA M, STOJKOVIC M, ERCEG S. Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation. **Scientific Reports**, 5: 9640; 2015.

MACHADO A, HAERTEL LM. **Neuroanatomia funcional.** 3.ed. Atheneu, 2010.

MASINI M. Estimativa da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. **J. Bras Neurocirurg**, 12(2): 97-100; 2001.

MAUTES AE, WEINZIERL MR, DONOVAN F, NOBLE LJ. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. **Phys. Ther**, 80: 673–687; 2000.

MEDEIROS CGM, RAMALHO LN, HARDI RNC, SILVA PTC. Os benefícios da inclusão da realidade virtual no tratamento fisioterapêutico de um paciente com traumatismo raquimedular (trm): um estudo de caso. **Caderno de Ciências Biológicas e da Saúde**; 2013.

MCDONALD JW, SADOWSKY C. Spinal-cord injury. **Lancet**, 359(9304): 417-25; 2002.

MEYER F, VIALLE LR, VIALLE EM, BLEGGI-TORRES LF, RASERA E, LEONEL I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, 18(3); 2003.

MIKIO SUMIDA MD, MIKIO FUJIMOTO MD, AKIHIRO TOKUHIRO MD, TOSHIKATSU TOMINAGA MD, AKIRA MAGARA MD, RYUSEI UCHIDA MD. Early rehabilitation effect for traumatic spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, 82(3): 391-5; 2001.

MONTANARI T. **HISTOLOGIA**: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3.ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 2016.

MONTGOMERY DL. Astrocytes: form, function, and roles in disease. **Veterinary Pathology**, 31(2): 145-167; 1994.

MOURA-NETO V, LENT R. Como funciona o sistema nervoso. IN: LENT R. (Coordenador). **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 61-88; 2008.

MUKHAMEDSHINA YO, RIZVANOV AA. Genetically modified human umbilical cord blood cells as a promising strategy for treatment of spinal cord injury. **Neural Regen Res**, 11(9): 1420-1421; 2016.

MYER DJ, GURKOFF GG, LEE SM, HOVDA DA, SOFRONIEW MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**, 129(10): 2761-72; 2006.

NAKAE A, NAKAI K, YANO K, HOSOKAWA K, SHIBATA S, MASHIMO T. The Animal Model of Spinal Cord Injury as an Experimental Pain Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**; 2011.

NAKAGAWA T, KANEKO S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. **Journal of Pharmacological Sciences**, 347-353; 2010.

NAVE, K. A; SCHELLER, R. H. Neuronal and glial cell biology. **Current Opinion in Neurobiology**, 10: 541-542; 2000.

NAVE KA, WERNER HB. Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 30:503-533; 2014.

NEW PW, CRIPPS RA, BONNE LEE B. Global maps of non-traumatic spinal cord injury epidemiology. **Spinal Cord**; 2013.

NUNES DM, MORAIS CR, FERREIRA CG. Fisiopatologia da lesão medular: uma revisão sobre os aspectos evolutivos da doença. *Getec*, 6(13): 87-103; 2017.

NORENBERG MD, SMITH J, MARCILLO A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J Neurotrauma**, 21(4): 429-40; 2004.

NSCISC. **Annual report for the spinal cord injury model system**. 2013.

NSCISC. **Annual report for the spinal cord injury model system**. 2017.

NYLÉN K, OST M, CSAJBOK LZ, NILSSON I, BLENNOW K, NELLGÅRD B, ROSENGREN L. Increased serum-GFAP in patients with severe traumatic brain injury is related to outcome . **J Neurol Sci**, 240: 85 – 91; 2006.

OBERHEIM, NA, GOLDMAN, SA E NEDERGAARD, M. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. **Astrocytes**, 23-45; 2011.

OKADA S. The pathophysiological role of acute inflammation after spinal cord injury. **Inflammation and Regeneration**, 36: 20; 2016.

OLBY N, JEFFERRY N. Pathogenesis of diseases of the central nervous system. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. Philadelphia: Saunders, 2(77): 1132-1147; 2003.

ORR MB, GENSEL JC. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. Review. **Neurotherapeutics**; 2018.

OSAKA M, HONMOU O, MURAKAMI T, NONAKA T, HOUKIN K, HAMADA H. et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. **Brain Res**, 1343:226-35; 2010.

OSBORN JR, ROGERS HH, POUSADA L. **Enfermagem de emergência: um manual prático**. Tradução de Ana Maria Müller Magalhães. Porto Alegre: Artes Médicas; 1992.

OSTBERG JR, DRAGONE LL, DRISKELL T, MOYNIHAN JA, PHIPPS R, BARTH RK, FRELINGER JG. Disregulated expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency. **J Immunol**, 157(11): 4876-84; 1996.

OSTBERG JR, BARTH RK, FRELINGER JG. The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. **Immunol Today**, 19:546-550; 1998.

PEDRAZA-ALVA G, ROSENSTEIN Y. CD43 – One molecule, many tales to recount. **Signal Transduction**, 7:372-385; 2007.

PILLER F, PILLER V, FOX RI, FUKUDA M. Human lymphocyte-T activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, 263:15146-15150; 1988.

PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, 95(1): 9-20; 2004.

POPOVICH PG, WEI P, STOKES BT. Cellular Inflammatory Response After Spinal Cord Injury in Sprague-Dawley and Lewis Rats. **The Journal of Comparative Neurology**, 377: 443–464; 1997.

PRADA I. **Neuroanatomia funcional em medicina veterinária com correlações clínicas**. Editora Terra Molhada, 2014.

PRIVAT A, GIMENEZ-RIBOTTA M, RIDET JL. Morphology of astrocytes. In: Neuroglia, KETTERMANN H, RANSON BR. (Eds). New York: **Oxford University Press**, 58-84; 1995.

PROFYRIS C, CHEEMA SS, ZANG DW, AZARI MF, BOYLE K, PETRATOS S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol Dis**, 15(3): 415-36; 2004.

PURVES D, AUGUSTINE GJ, FITZPATRICK D, KATZ LC, LaMANTIA A-S, McNAMARA JO, WILLIAMS SM. **Neurociências**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAMADAN WS, ABDEL-HAMID GA, AL-KARIM S, ABBAS AT. Histological, immunohistochemical and ultrastructural study of secondary compressed spinal cord injury in a rat model. **Folia Histochem Cytobiol**, 55(1): 11-20; 2017.

RAMOS AT, VIOTT AM, MACHADO GF. Astrócitos. In: GRAÇA DL, BONDAN EF, PEREIRA LAV, MAIORKA PC. Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla. Santa Maria: **Editora da UFSM**, 35-59; 2011.

REGAN RF, GUO Y. Toxic effect of hemoglobin on spinal cord neurons in culture. **J Neurotrauma**, 15(8): 645-53, 1998.

REICHENBACH A, WOLBURG H. Astrocytes and ependymal glia. Neuroglia. Oxford: **University Press**, 2: 13-35; 2005.

RIEDER MM. **Trauma raquimedular**: aspectos epidemiológicos, de recuperação funcional e de biologia molecular. Tese de doutorado em Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

ROBERGS RA, ROBERTS SO. **Princípios fundamentais de fisiologia do exercício para aptidão, desempenho e saúde**. São Paulo: Phorte Editora, 2002.

ROMERO CH. **Análise ultra-sonográfica das vias urinárias pré e pós auto-cateterismo em pacientes com lesão medular**. Dissertação de Mestrado. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica: 2008.

ROWITCH DH, KRIEGSTEIN AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. **Nature**, 468: 214-222; 2010.

SAKAI K et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. **The Journal of clinical investigation**, 122: 80-90; 2012.

SALLIS ES, PEREIRA LAV, GRAÇA DL. Oligodendrócitos. In: GRAÇA DL, BONDAN EF, PEREIRA LAV, MAIORKA PC. Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla. Santa Maria: Editora **da UFSM**, 23-33; 2011.

SALVADOR LA, TARNHOVI EG. **Estudo comparativo da qualidade de vida em indivíduos com trauma raquimedular praticantes e não-praticantes de atividades físicas, utilizando o questionário genérico SF-36**, 2004.

SANTOS TFD. Neuroproteção, diminuição do infiltrado de neutrófilos e microgliose após tratamento com óleo-resina de copaífera reticulata ducke em um modelo experimental de lesão aguda da medula espinhal. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Pará. Belém (PA), 2017.

SANTOS-BENITO FF1, MUÑOZ-QUILES C, RAMÓN-CUETO A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. **J Neurotrauma**, 23(3-4): 521-36; 2006.

SARAIVA RA, PIVA JUNIOR L, PAZ JUNIOR A.C, PACHECO MAR. As bases fisiopatológicas para a anestesia no paciente com lesão medular. **Rev Bras Anesthesiol**, 45:387-398; 1995.

SAVCHENKO VL. Regulation of NADPH oxidase gene expression with PKA and cytokine IL-4 in neurons and microglia. **Neurotox Res**, 23(3): 201-13; 2013.

SCHWAB JM, BRECHTEL K, NGUYEN TD, SCHLUESENER HJ. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. **J Neuroimmunol**, 111, 1-2: 122-30; 2000.

SCHWARTZ G, FEHLINGS MG. Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole. **Prog Brain Res**, 137: 177-90, 2002.

SEKHON LH, FEHLINGS MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)**, 26(24): S2-12; 2001.

SHARIF-ALHOSEINI M, RAHIMI-MOVAGHAR V. Animal Models in Traumatic Spinal Cord Injury. **Intech open science open minds**; 2014.

SINGH A, TETREAULT L, KALSI-RYAN S, NOURI A, FEHLINGS MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. **Clin. Epidemiol**, 6: 309–331; 2014.

SMITH KJ, McDONALD WI. The pathophysiology of multiple sclerosis: The mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences**, 354(1649-1658); 1999.

SOUSA EPD, ARAUJO OFD, SOUSA CLM, MUNIZ MV, OLIVEIRA IR, FREIRE NETO NG. Principais complicações do Traumatismo Raquimedular nos pacientes internados na unidade de neurocirurgia do Hospital de Base do Distrito Federal. **Com. Ciências Saúde**, 24(4): 321-330; 2013.

SOUZA JAT DE. **O Futuro da Recuperação na Lesão Medular**, por Jacks Alan Tenório de Souza – Neurocirurgião. Portal Brasileiro da Neurocirurgia; 2017.

SPENCE AP. **Anatomia Humana básica**. São Paulo: Manole, 1991.

STÁVALE M. Bases da terapia intensiva neurológica: fisiopatologia e princípios terapêuticos. 2. ed.ampl. e revisada. São Paulo: Santos, 2011.

SUMMERS, A.; LOWE, J. S. **Histology**. London: Mosby, 206-225; 1993.

SUZUMURA A. Microglia in pathophysiology of neuroimmunological disorders. **Nihon. Rinsho**, 71, 801-806; 2013.

TATOR CH, FEHLINGS MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **J Neurosurg**, 75(1): 15-26; 1991.

TATOR CH, KOYANAGI I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. **J. Neurosurg**, 86: 483–492; 1997.

TOLOSA EMC, RODRIGUES CJ, BEHMER AO, FREITAS-NETO AG. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2005.

TOWN T, NIKOLIC, V, TAN J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J. Neuroinflammation*, 2, 24; 2005

TSAI MC, WEI CP, LEE DY, TSENG YT, TSAI MD, SHIH YL, YH LEE, CHANG SF, LEU SJ. Inflammatory mediators of cerebrospinal fluid from patients with spinal cord injury. **Surgical Neurology**, 70: 19–24; 2008.

TZEKOU A, FEHLINGS MG. Treatment of spinal cord injury with intravenous immunoglobulin G: preliminary evidence and future perspectives. *J Clin Immunol*, 34(1): 132-8; 2014.

VAN DEN BERG TK, NATH D, ZILTENER HJ, et al. "Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1)". **J. Immunol**, 166 (6): 3637–40; 2001.

VARMA AK, DAS A, WALLACE G TH, BARRY J, VERTEGEL AA, RAY SK, BANIK NL. Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers. **Neurochem Res**, .38(5): 895-905; 2013.

VAWDA R, FEHLINGS MG. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives. **Curr Stem Cell Res Ther**, 8, n(1): 25-38; 2013.

VAZIRI ND, LEE YS, LIN CY, LIN VW, SINDHU RK. NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury. **Brain Res**, 995(1):76-83; 2004.

VELÁZQUEZ FE, ANASTASIOU M, CARRILLO-SALINAS FJ, NGWENYAMA N, SALVADOR AM, NEVERS T, ALCAIDE P. Sialomucin CD43 regulates T helper type 17 cell intercellular adhesion molecule 1 dependent adhesion, apical migration and transendothelial migration. **Immunology**, 157(1):52-69; 2019.

WATERS RL, ADKINS RH, YAKURA JS. Definition of complete spinal cord injury. **Paraplegia**, 29, 573–581; 1991.

WRATHALL JR, PETTEGREW RK, HARVEY F. Spinal Cord Contusion in the rat: Production of graded, reproducible, injury groups. **Exp Neurol**, 88 (1): 108-22; 1985.

WESSELS, M.; LUCAS, C.; ERIKS, I.; DE GROOT, S. Body weight-supported gait training for restoration of walking in people with an incomplete spinal cord injury: a systematic review. **J Rehabil Med**, 42(6):5130-9; 2010.

WHITE RE, YIN FQ, JAKEMAN LB. TGF- α increases astrocyte invasion and promotes axonal growth into the lesion following spinal cord injury in mice. **Exp Neurol**, 214:10-24; 2008.

YANG FAN, LIRUI XIECH, ANG Y. CHUNG. Signaling Pathways Controlling Microglia Chemotaxis. **Mol. Cells**, 40(3): 163-168; 2017.

ZHANG S, HUANG F, GATES M, WHITE J, HOLMBERG EG. Histological repair of damaged spinal cord tissue from chronic contusion injury of rat: A LM observation. **Histol Histopathol**, 26: 45-58; 2011.

ZHANG B, GENSEL JC. Is neuroinflammation in the injured spinal cord different than in the brain? Examining intrinsic differences between the brain and spinal cord. **Exp. Neurol**, 258: 112–120; 2014.

ANEXOS

ANEXO A – ESCALA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE BASSO, BEATTIE E BRESNAHAN (BBB)

ESCORE	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS
0	Nenhum movimento observável dos membros posteriores.
1	Ligeiro (limitado) movimento de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho.
2	Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e ligeiro movimento de outra articulação.
3	Extenso movimento de duas articulações dos membros posteriores.
4	Ligeiro movimento de mais de três articulações dos membros posteriores.
5	Ligeiro movimento de duas articulações e extenso movimento da terceira articulação.
6	Extenso movimento de duas articulações e ligeiro movimento da terceira articulação.
7	Extenso movimento das três articulações dos membros posteriores.
8	Arrastamento sem suporte de carga ou colocação plantar da pata sem suporte de carga.
9	Apoio plantar da pata com suporte de carga apenas na fase de apoio (ou seja, quando estática) ou pisada plantar ocasional, frequente ou inconsistente com suporte de carga e sem pisada plantar.
10	Apoio plantar com suporte de carga ocasional e nenhuma coordenação membro posterior-anterior.
11	Apoio plantar com suporte de carga frequente-consistente e coordenação ocasional dos membros posterior-anterior.
12	Apoio plantar com suporte de carga frequente-consistente e coordenação ocasional dos membros posterior-anterior.
13	Apoio plantar com peso frequente-consistente e coordenação frequente dos membros posterior-anterior.
14	Apoio plantar com peso constante, coordenação consistente de membro posterior-anterior e posição da pata predominantemente em rotação (interna ou externa) durante locomoção, tanto quando começa o contato inicial com a superfície, como antes de mover os dedos ao final da fase de suporte ou apoio plantar frequente, coordenação consistente membros posterior-anterior e passada dorsal ocasional.
15	Apoio plantar consistente, coordenação consistente de membros posterior-anterior sem movimento nos dedos ou movimento ocasional dos dedos dos pés durante o avanço do membro seguinte; posição da pata predominantemente paralela ao corpo no contato inicial.
16	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento.
17	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e no instante do movimento dos dedos dos pés.
18	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento dos dedos dos pés.
19	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento dos dedos dos pés, e o animal apresenta o rabo para baixo durante parte ou todo o tempo.
20	Apoio plantar consistente, coordenação de membro posterior-anterior durante caminhada e movimento dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante movimento de avançar dos membros; a posição da pata predominantemente paralela ao corpo no momento do contato inicial e curvado no instante do movimento dos dedos dos pés, e o animal apresenta consistente elevação do rabo e instabilidade do tronco.
21	Apoio plantar consistente e caminhada coordenada, movimento consistente dos dedos dos pés, posição da pata predominantemente paralela ao corpo durante todo o estágio de suporte; estabilidade consistente do tronco e elevação consistente do rabo.

Fonte: (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995)

	DEFINIÇÕES
MODERADO	Movimento parcial da articulação, abaixo da metade da amplitude de movimento da articulação.
EXTENSO	Movimento parcial da articulação, acima da metade da amplitude de movimento da articulação.
MOVIMENTO DE PEDAL	Movimento rítmico do membro posterior no qual as três articulações são estendidas, então totalmente flexionadas e estendidas mais uma vez. O animal geralmente se inclina para os lados, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, não há suporte de carga evidente em toda a superfície da pata traseira.
SEM SUPORTE DE CARGA	Na contração do músculo extensor dos membros posteriores durante apoio plantar da pata ou elevação da coxa.
COM SUPORTE DE CARGA	Contração do músculo extensor dos membros posteriores durante apoio plantar da pata ou sem elevação da coxa.
APOIO PLANTAR	A pata está em contato planar com suporte de carga, seguido de movimento de avanço do membro até que o contato plantar é restabelecido com suporte de carga.
PASSO DORSAL	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo de passo.
COORDENAÇÃO DOS MEMBROS POSTERIOR-ANTERIOR	Para cada passo do membro anterior um passo é dado com o membro posterior e o membro posterior oposto.
OCASIONAL	Menor ou igual a metade das vezes, < 50%
FREQUENTE	Mais do que a metade, mas nem sempre, 51- 94%
CONSISTENTE	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%
INSTABILIDADE DE TRONCO	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado ao outro ou colapso parcial do tronco.

Fonte: (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995)

ANEXO B – PROCESSO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UFMA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da resposta inflamatória de lesão medular em ratos produzida pelo modelo experimental de transecção” registrada com o nº 23115.013651/2016-43, sob a responsabilidade de Rafael Cardoso Carvalho, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/03/2018 a 01/03/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> , Wistar
Nº de animais	32
Peso/Idade	250-350g/ 60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFMA

Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
Vice-presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA

ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA USP



Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia



São Paulo, 27 de agosto de 2018.

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro para os fins que se fizerem necessários que estou de acordo em supervisionar a etapa experimental do protocolo de Imunohistoquímica do projeto de mestrado intitulado: **"AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE LESÃO MEDULAR EM RATOS PRODUZIDA PELO MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSECÇÃO"**, orientado pelo Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho, da discente Rafaela Pontes de Albuquerque, mestranda do Programa em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para o período de 10 a 24 de setembro de 2018. Ressalto ainda que a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo dispõe de toda infraestrutura necessária para a realização desta etapa experimental do projeto acima mencionado.


Profa. Dra. Maria Angélica Miglino
Profa. Titular – FMVZ/USP

Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 – Cidade Universitária Armando de Sales Oliveira

São Paulo/SP – Brasil | CEP 05508-270 | Tel. +55 11 3091-1232

vcifmvz@usp.br <http://www.fmvz.usp.br/>

ANEXO D – CARTA DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Dear Miss Pontes Albuquerque,

Submission no: RVSC_2019_317

Submission title: Development of an experimental model for anosmia for cell therapy purposes

Corresponding author: Professor M. Angelica Miglino

Listed co-author(s): Dr Marcio Nogueira Rodrigues, Dr. ANA ABREU-SILVA, Mr Gustavo de Sá Schiavo Matias, Dr Erika Toledo da Fonseca, Dr Rodrigo Barreto, Miss Rafaela Pontes Albuquerque, Dr Andre Luiz Rezendo Francioli, Professor RAFAEL CARDOSO CARVALHO

Professor Miglino has submitted a manuscript to Research in Veterinary Science and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/RVSC?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach00345288%23%2FRVSC%2Fsubmission%2FRVSC_2019_317&email=rafaela.pontes@hotmail.com&firstName=Rafaela&surname=Pontes+Albuquerque&country=Brazil&institution=Federal+University+of+Maranh%C3%A3o&title=Miss

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Research in Veterinary Science

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

http://www.evise.com/co-author/#/RVSC/unsubscribe/rafaela.pontes@hotmail.com/b1cbLOAXaMidcnb_qoTL6BMRHSVCZTdX0-akcSciRPFzhfpqI3T8Zw6ZOvqc0nhzfcyv2R7wf_W23MWaGHxUew

APÊNDICE

APÊNDICE – Esquema ilustrativo do protocolo experimental

