

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

EFEITO DO 17 β -ESTRADIOL NA PERFORMANCE LOCOMOTORA DE RATAS SUBMETIDAS À LESÃO MEDULAR POR COMPRESSÃO

FERNANDA KOHN BASTOS DA SILVA

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EFEITO DO 17 β -ESTRADIOL NA PERFORMANCE
LOCOMOTORA DE RATAS SUBMETIDAS À LESÃO
MEDULAR POR COMPRESSÃO**

FERNANDA KOHN BASTOS DA SILVA

Sob a Orientação da Professora

Magda Alves de Medeiros

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ
Agosto de 2014

617.482

S586e

T

Silva, Fernanda Kohn Bastos da, 1987-
Efeito do 17 β -estradiol na performance locomotora de ratas submetidas à lesão medular por compressão / Fernanda Kohn Bastos da Silva. - 2014.

79 f.: il.

Orientador: Magda Alves de Medeiros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2014.

Bibliografia: f. 63-79.

1. Medula espinhal - Ferimentos e lesões - Teses. 2. Medula espinhal - Ferimentos e lesões - Tratamento - Teses. 3. Estradiol - Uso terapêutico - Teses. 4. Agentes neuroprotetores - Teses. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Medeiros, Magda Alves de, 1973- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

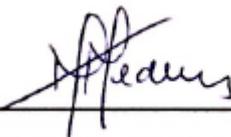
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

FERNANDA KOHN BASTOS DA SILVA

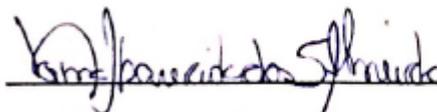
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/08/2014

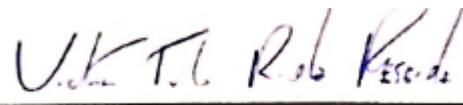


Magda Alves de Medeiros. Ph.D. UFRRJ

(Orientadora)



Norma Aparecida dos Santos Almeida. Ph.D. UFRRJ



Victor Túlio Ribeiro de Resende. Ph.D. UFRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Cynthia,
meu alicerce, minha inspiração e por quem tenho
grande admiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Cynthia por todo carinho, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos e decisões. Inclusive pelas lições de vida, pelos valores ensinados e por sempre me proporcionar o melhor e não medir esforços na minha formação acadêmica e como ser humano. Sou muito grata por sua dedicação e amor incondicional, você é uma mãe incrível! Tenho imenso orgulho e sou muito feliz por ser sua filha. Essa conquista também é sua!

À minha avó Maria Lúcia pelos cuidados, amor, apoio e sabedoria. Inclusive pela ajuda nas correções gramaticais e estruturais desse trabalho. Sempre muito dedicada à mim e à toda a família. Sou privilegiada por ter você como avó, muito obrigada por tudo!

Ao meu pai Gilberto pelo amor, cuidado e apoio na minha formação pessoal, acadêmica e profissional.

À minha família, tia Lúcia Cristhina, minha madrinha Paola, tio Paulinho, tio Edson, tia Glória, meus primos André e Felipe que sempre foram muito carinhosos comigo. Obrigada pelo apoio, amor e zelo.

Às minhas grandes amigas Joana Leite, Raquel Leal, Maria Lopes, Natália Lima, Cássia Couto, Larissa Moraes e Juliana Macedo que sempre me apoiaram, incentivaram e que contribuíram para o meu crescimento em todos os aspectos da minha vida.

À minha orientadora Magda Medeiros pela confiança depositada. Muito obrigada por me apoiar em toda a minha jornada científica, desde a iniciação científica, e acreditar no meu trabalho, inclusive me permitindo desviar um pouco da sua linha de pesquisa para desenvolver esse trabalho.

À minha amiga e parceira científica Raquel Nascimento por toda paciência e dedicação, desde a iniciação científica, em me ensinar, me ajudar e cooperar em absolutamente todo os passos desse trabalho. Sou muito grata à você e a tudo o que fez por mim, você foi fundamental nesse processo.

Às minhas grandes amigas Fabrícia Fonseca e Iracema Araújo que sempre me incentivaram muito, obrigada por todo apoio científico e pessoal e por todo o carinho. Aos meus amigos Cláudio Almeida e Rafael Côrtes que sempre estiveram dispostos a ajudar, seja no laboratório ou aconselhando e aguentando as minhas crises científicas e pessoais. Aos meus amigos Marissa Carvalho e Rodrigo Rodrigues por tornarem meus dias no laboratório sempre mais engraçados e agradáveis e também pelos incentivos.

À todos os mestres do DCF que me proporcionaram uma excelente formação acadêmica.

Aos alunos do DCF Roberto Laureano, Cristine de Paula, Natália Cruz, Carla Caroline, Raquel Teixeira, Verônica Menezes, Raoni, Fernanda Seará, Bruno Leme, Lívia Monteiro, Anderson Silveira e Renata. Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar, pelos incentivos e por tornarem meus dias no laboratório muito mais agradáveis.

À Graziane Sabrina e David Malvar que mesmo mal me conhecendo me acolheram na sua casa durante quatro meses em Ribeirão Preto, quando fui fazer as disciplinas do Cursão da USP, e me trataram como uma filha. Muito obrigada, vocês foram incríveis comigo e são pessoas maravilhosas.

Aos amigos de turma do Cursão/USP em especial à Graziane Sabrina, Ana Carolina Sanches, Leda Coimbra, Natalia Cunha e Fernanda Possamai que tornaram os meus dias em Ribeirão Preto muito mais agradáveis, engraçados e felizes!

À Ailin que me ajudou com a técnica do PCR e à Andrea Machado pela ajuda com as fotos da histopatologia, obrigada pela colaboração.

Aos alunos de iniciação científica Tamires, Thiago e Mariana pela ajuda na execução de experimentos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que me proporcionou a melhor experiência acadêmica, onde tive a oportunidade de me graduar em Medicina Veterinária, além de ser um lugar incrível que me fez crescer e amadurecer pessoalmente e onde também conheci pessoas e fiz amigos que levarei para o resto da vida.

Ao Curso Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por me permitir experienciar uma formação acadêmica de alto nível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma maneira contribuíram na minha jornada acadêmica, científica e pessoal. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

SILVA, Fernanda. **Efeito do 17 β -estradiol na performance locomotora de ratas submetidas à lesão medular por compressão**. 2014. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Uma lesão traumática na medula espinal promove rápida morte celular no epicentro da lesão e desencadeia uma série de eventos vasculares, celulares e bioquímicos, denominados danos secundários, que culminam em morte de células que estavam intactas após o trauma inicial e, desta forma, amplifica a lesão e a disfunção tecidual. O 17 β -estradiol (E₂) é um hormônio esteroide endógeno produzido principalmente pelas gônadas e que tem demonstrado efeito neuroprotetor *in vitro* e *in vivo*, em diversas doenças e traumas no sistema nervoso central (SNC). Na lesão medular espinal o E₂ tem evidenciado múltiplas ações neuroprotetoras por modular diversos danos secundários à lesão, tais como: inflamação, apoptose, estresse oxidativo e alterações vasculares. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar se, de forma aguda, o E₂ promove recuperação locomotora em ratas ovariectomizadas submetidas à lesão medular por compressão. Neste estudo foram utilizadas ratas Wistar que foram submetidas a ovariectomia bilateral (OVX) e após uma semana foi induzida a lesão medular através da inflação do balão de um cateter Fogarty 2F de embolectomia, inflado com 15 μ l de solução salina no espaço epidural entre as vértebras T8 e T9 durante 5 minutos. Quinze minutos após a cirurgia de lesão medular foi administrado por via subcutânea uma dose única de 100 μ g/Kg de E₂ diluído em óleo (grupo OVX+E₂) ou somente o veículo óleo (grupo OVX+óleo). Uma parte dos animais foi submetida a OVX e após uma semana foi realizada apenas a laminectomia vertebral (grupo OVX+sham). A performance locomotora dos animais foi avaliada através do teste BBB durante 14 dias e foi detectado uma significativa melhora na recuperação locomotora do grupo OVX+E₂ comparado ao grupo OVX+óleo no 10^o e 14^o dia após a lesão medular. Para verificar se essa melhor capacidade locomotora dos animais tratados com E₂ esta relacionada com a menor quantidade de lesão no tecido medular, foi realizada a análise histopatológica de cortes longitudinais de tecido medular desses animais. Na avaliação histopatológica da medula foi detectado que o grupo OVX+E₂ apresentou lesões significativamente menores sob os aspectos de comprimento, largura e área da lesão comparado ao grupo OVX+óleo. Nesse sentido, os resultados sugerem que o E₂ é capaz de promover recuperação locomotora após uma lesão moderada na medula espinal, sendo esse efeito associado ao menor tamanho de lesão no tecido, corroborando com a hipótese de que o E₂ é um hormônio neuroprotetor.

Palavras-chave: Lesão medular espinal, 17 β -estradiol, neuroproteção.

ABSTRACT

SILVA, Fernanda. **Effect of 17 β -estradiol on locomotor performance in rats subjected to spinal cord compression injury**. 2014. 79 p. Dissertation (Master in Physiological Sciences). Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Traumatic spinal cord injury promotes rapid cell death at the lesion epicenter and triggers a series of vascular, cellular and biochemical events, known as secondary damage, which culminate in more cell death, amplifying the injury and tissue dysfunction. The 17 β -estradiol (E₂) is an endogenous steroid hormone produced primarily by the gonads that has demonstrated neuroprotective effect *in vitro* and *in vivo* in several diseases and trauma to the central nervous system (CNS). E₂ has shown multiple neuroprotective effects after spinal cord injury by modulating many secondary damage, such as: inflammation, apoptosis, oxidative stress and vascular changes. Accordingly, the aim of this study was to assess whether, acutely, the E₂ promotes locomotor recovery in ovariectomized rats subjected to spinal cord compression injury. In the present study, female Wistar rats were subjected to bilateral ovariectomy (OVX) and after one week spinal cord injury was induced by inflation of a embolectomy catheter balloon (Fogarty 2F) with 15 μ l of saline into the epidural space between T8 and T9 vertebrae for 5 minutes. Fifteen minutes after spinal cord injury surgery a single dose of 100 μ g/Kg of E₂ diluted in oil (OVX+E₂ group) or oil vehicle alone (OVX+oil group) was administered subcutaneously. Some of the animals were subjected to OVX and after a week was performed only spinal laminectomy (OVX+sham group). The locomotor performance of the animals was assessed using the BBB test for 14 days and it was detected significant improvement in locomotor recovery in OVX+E₂ group compared to OVX+oil group at 10 and 14 days after spinal cord injury. To verify that better locomotor ability of animals treated with E₂ is related with the least amount of damage to the spinal cord tissue, the cross-sections of the histopathological analysis of spinal cord tissue of these animals was performed. The histopathological evaluation detected that the OVX+E₂ group showed significantly less tissue damage under the aspects of length, width and area of the lesion compared to OVX+oil group. Accordingly, the results suggest that E₂ is able to promote locomotor recovery after a mild compression injury to the spinal cord, and this effect is associated with a reduction of the damage to the spinal cord tissue, supporting the hypothesis that E₂ is a neuroprotective hormone.

Keywords: Spinal cord injury, 17 β -estradiol, neuroprotection.

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Principais características das três fases da lesão medular espinal. Retângulos sombreados indicam eventos em comum entre as fases.	13
Tabela 2: Lista de mecanismos secundários à lesão medular.	14
Tabela 3: Escala BBB de 21 pontos e definições operacionais de categorias e atributos para avaliação da capacidade locomotora dos membros posteriores de ratos após a lesão medular.	33
Tabela 4 : Resultados estatísticos - Anova de duas vias para medidas repetidas na avaliação da capacidade locomotora (teste BBB) doas animais do grupo OVX+E ₂ , OVX+óleo e OVX+sham.	38
Tabela 5: Resultado estatístico do pós teste Bonferroni na capacidade locomotora (teste BBB) do grupo OVX+E ₂ (n=22) e do grupo OVX+óleo (n=25). O grupo OVX+sham apresentou escores significativamente maiores (p<0,001) em comparação ao grupo OVX+E ₂ e ao grupo OVX+óleo e não são apresentados na tabela. São apresentados valores da média ± erro padrão e valores de P na comparação do grupo OVX+E ₂ com o OVX+óleo.	39
Tabela 6: Similaridades e diferenças na resposta da medula espinal à lesão entre humanos e roedores.	47
Tabela 7: Modelos utilizados e protocolos de administração do E ₂ de estudos que evidenciaram uma melhora na capacidade locomotora através da escala BBB após tratamento da lesão medular espinal com E ₂ .	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Esquema da posição anatômica das vértebra espinhais, seguimentos medulares e seus respectivos nervos espinhais.	4
Figura 2: (A) Comparação entre as medulas espinhais do homem e do rato em tamanho natural. Visão dorsal: a medula completa do rato possui aproximadamente 9 cm de comprimento, o que se compara com uma porção da medula humana entre os segmentos C6 a T4. Modificado de WATSON et al., 2009. (B) Esquema do esqueleto do rato, vista lateral. Modificado de ANDERSEN & TUFIK, 2010.	5
Figura 3: Representação esquemática das meninges (dura-máter, aracnóide e pia-mater) e do espaço entre elas (epidural, subdural e subaracnóide) que envolvem a medula espinal. Vista posterior.	6
Figura 4: Esquema da substância cinzenta em formato de "H" por dentro da substância branca na medula espinal de humanos. À esquerda representação dos núcleos de neurônios nos cornos dorsal (sensoriais) e ventral (motores) da substância cinzenta. À direita representação da distribuição das lâminas de Rexed na substância cinzenta.	7
Figura 5: Esquema do padrão de distribuição da substância branca e cinzenta ao longo dos segmentos da medula espinal humana (A) e do rato (B) em cortes transversais. (A) Modificado de KANDEL, 2000; (B) Modificado de WATSON et al, 2009 e ANDERSEN & TUFIK, 2000.	8
Figura 6: Ilustração da lesão traumática na medula espinal. (A) Ilustração da lesão compressiva na medula espinal. (B) Ilustração de uma fratura vertebral com deslocando estruturas ósseas e ligamentares que comprimem a medula.	11
Figura 7: Esquema da lesão traumática primária e danos secundários subsequentes ao impacto na medula. O impacto mecânico na medula causa interrupção do tecido no local da lesão primária e o tecido sadio adjacente fica vulnerável aos eventos secundários subsequentes à lesão inicial. As intervenções neuroprotetoras visam minimizar esse processo destrutivo. Modificado de KWON et al., 2004.	12
Figura 8: Esquema dos danos secundários à lesão na medula espinal. Os eventos bioquímicos e celulares que sucedem ao trauma inicial induzem outros eventos secundários formando um ciclo destrutivo e aumento progressivo da lesão pela medula espinal. Perpetuando a neurodegeneração pelo aumento de estímulos à morte celular necrótica e apoptótica, culminando em maior disfunção tecidual. Modificado de KWON et al., 2004.	19
Figura 9: Representação esquemática da lesão na medula espinal e formação de cavidade cística e da cicatriz glial. Modificado de SILVA et al., 2014.	20
Figura 10: Representação esquemática do centro da lesão traumática na medula	21

e a região de penumbra com as interações celulares que formam a escara glial. Modificado de CREGG et al., 2014.

Figura 11: Estrutura química do estradiol, estrona e estriol. São compostos monofenólicos. Modificado de BEHL, 2002a. 21

Figura 12: (A) Mecanismo de ação do E₂ na célula através da via genômica e ativação do ERE no DNA. (B) Mecanismo de ação do E₂ na célula através da via não-genômica e ativação de cascatas de sinalização intracelular e por fim estímulo à transcrição gênica no DNA. Modificado de BEHL, 2002a. 22

Figura 13: Hipóteses de ações protetoras do E₂ em doenças neurodegenerativas e síndromes psiquiátricas não relacionadas entre si. Modificado de MANTHEY & BEHL, 2006. 24

Figura 14: Ações neuroprotetoras do E₂ através da via não clássica/não genômica, independente de receptores nucleares. (1) E₂ age em ERm e ativa cascata de sinais intracelulares associados resultando em neuroproteção. (2) Ação antioxidante do E₂ diminuindo ROS e o estresse oxidativo. (3) E₂ pode interagir com receptor de neurotransmissor, como receptores de glutamato, e regular a atividade ionotrópica e metabotrópica. Modificado de GARCIA-SEGURA et al., 2001. 25

Figura 15: Ações neuroprotetoras da E₂ através da ativação da via genômica/clássica, dependente da ativação de ER nuclear, regulando a transcrição de fatores de crescimento, proteínas do citoesqueleto e moléculas anti apoptóticas, todos esses fatores resultam em neuroproteção. E₂ também pode se ligar a ERm e ativas cascata de sinais intracelulares associados à membrana. Modificado de GARCIA-SEGURA et al., 2001. 25

Figura 16: Esquema ilustrativo do desenho experimental. Procedimentos metodológicos realizados em relação ao tempo experimental. 29

Figura 17: Cirurgia de lesão medular por compressão. (A e B) Fotografia da rata anestesiada sendo submetida à compressão da medula espinal através da inflação do balão do cateter forgaty do tipo 2 de embolectomia. (C) Posição do balão do cateter em relação as vértebras durante a compressão medular. (A e B) Fotografia tirada pela autora. (C) Modificado de Vanický et al., 2001. 31

Figura 18: Animais sendo submetidos ao teste BBB no campo aberto. Fotografia tirada pela autora no Departamento de Ciências Fisiológicas na UFRRJ. 32

Figura 19: Corte longitudinal da medula (5 µm de espessura e 1,5 cm de comprimento) contendo a lesão e coradas com HE. As mensurações quantitativas do comprimento (em azul), da altura (do corte, em amarelo; da lesão, em verde) e da área total da lesão (em preto) de cada corte foram realizadas no programa Image J e a média dos quatro cortes por animal para cada mensuração foi utilizada na análise estatística. Barra de calibração = 1 mm. 35

Figura 20: Efeito de uma dose única de E₂ (100 µg/Kg) na capacidade 39

locomotora (teste BBB) de ratas ovx submetidas à lesão medular por compressão moderada. Ratas Winstar OVX foram submetidas à uma única administração de 100 µg/Kg de E₂ (OVX+E₂, n=22) ou óleo (OVX+óleo, n=25) 15 minutos após a lesão medular por compressão moderada. Os animais do grupo OVX+sham (n=5) foram submetidos apenas a laminectomia. Valores são apresentados como média ± erro padrão. Pós teste Bonferroni, P<0,05. *** indica que o grupo OVX+ E₂ apresentou escore BBB significativamente maior que o grupo OVX+óleo no 10º (P<0,001) e no 14º (P<0,001) dia após a lesão medular por compressão. O OVX+sham obteve média de escore BBB significativamente maior em comparação ao OVX+E₂ e ao OVX+óleo em todos os tempos (P<0,001) e não está representado no gráfico.

Figura 21: Cortes histológicos transversais de medula corados com hematoxilina e eosina (HE). Os animais OVX submetidos à falsa lesão (OVX+sham) ou lesão medular por compressão moderada foram tratados com uma única dose de 100 µg/Kg de E₂ (OVX+E₂) ou óleo (OVX+óleo), 1,5 cm das suas medulas contendo a lesão foram coletadas após perfusão tecidual no 14º dia pós lesão para realização de cortes histológicos logitudinais (5 µm de espessura) e coloração com HE. Corte de medula representativo do grupo OVX+sham, OVX+óleo e OVX+E₂. Barra = 1 mm. 40

Figura 22: Efeito de uma única dose de E₂ (100 µg/Kg) na extensão da lesão no sentido craniocaudal da medula (comprimento da lesão). As ratas OVX submetidas a lesão medular por compressão e tratadas com uma única dose de E₂ (100 µg/Kg s.c.) ou óleo 15 minutos pós-lesão, foram perfundidas e suas medulas coletadas 14 dias após a lesão. Foi determinado o comprimento dos 4 cortes da medula de cada animal e a média por animais utilizada para análise estatística. Valores são apresentados como média ± erro padrão. Teste t-Student, P<0,05. * indica que o grupo OVX+E₂ (n=6) apresentou um comprimento de lesão significativamente menor (P<0,05) comparado ao grupo OVX+óleo (n=5). O grupo OVX+sham (n=1) não apresentou lesão no tecido medular. 41

Figura 23: Efeito de uma única dose de E₂ (100 µg/Kg) na extensão da lesão no sentido laterolateral da medula (largura da lesão). As ratas OVX submetidas a lesão medular por compressão e tratadas com uma única dose de E₂ (100 µg/Kg s.c.) ou óleo 15 minutos pós-lesão, foram perfundidas e suas medulas coletadas 14 dias após a lesão. Foi determinado o percentual da largura da lesão dos 4 cortes da medula de cada animal e a média por animais utilizada para análise estatística. Valores são apresentados como média ± erro padrão. Teste t-Student, P<0,05. * indica que o grupo OVX+E₂ (n=6) apresentou uma porcentagem de largura da lesão significativamente menor (P<0,05) comparado ao grupo OVX+óleo (n=5). O grupo OVX+sham (n=1) não apresentou lesão no tecido medular. 42

Figura 24: Efeito de uma única dose de E₂ (100 µg/Kg) no tamanho geral da lesão na medula (área total da lesão). As ratas OVX submetidas a lesão medular por compressão e tratadas com uma única dose de E₂ (100µg/Kg s.c.) ou óleo 15 minutos pós-lesão, foram perfundidas e suas medulas coletadas 14 dias após a lesão. Foi determinada a área total da lesão nos 4 cortes da medula de cada animal e a média por animais utilizada para análise estatística. Valores são 43

apresentados como média \pm erro padrão. Teste t-Student, $P < 0,05$. * indica que o grupo OVX+E₂ (n=6) apresentou uma área de lesão significativamente menor ($P < 0,05$) comparado ao grupo OVX+óleo (n=5). O grupo OVX+sham (n=1) não apresentou lesão no tecido medular.

Figura 25: Correlação entre a severidade da lesão medular e a capacidade locomotora dos animais. Gráfico de regressão linear simples para correlação das médias da área total da lesão de cada medula de ambos os grupos (OVX+E₂, n=6; OVX+óleo, n=5) com os respectivos escores BBB obtidos no 14º dia pós lesão medular por compressão moderada. O teste de regressão linear evidenciou uma correlação positiva ($r^2=0,3749$ e $P < 0,05$, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%) entre a severidade da lesão medular e a capacidade locomotora dos animais. A reta indica que quanto maior o escore BBB menor a área total de lesão medular, ou seja, quanto maior a capacidade locomotora menor a severidade da lesão medular. 44

Figura 26: Efeito de uma única dose de E₂ na modulação da inflamação na lesão medular espinal compressiva. As medulas dos animais do grupo OVX+óleo (n=2) e do grupo OVX+E₂ (n=3) foram coletadas 14 dias após a lesão medular através da eutanásia por decapitação e aproximadamente 1 cm da medula contendo o epicentro da lesão foi processado através da técnica de RT-PCR que quantificou a expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10. O teste t-Student não detectou diferença entre os grupos na expressão de nenhuma das citocinas analisadas ($P > 0,05$). 45

Figura 27: Esquema ilustrativo representando um dos possíveis efeitos anti-inflamatórios do E₂. O E₂ ativa ER- α no citoplasma induzindo a ativação de PI3K que inibe o transporte intracelular do NF κ B ao núcleo e diminui a expressão gênica de mediadores inflamatório induzidos por NF κ B, sendo que este que pode ser ativado por TNF- α . Esse mecanismos possivelmente ocorre nas micróglias. Modificado de VEGETO et al., 2008. 55

Figura 28: Mecanismos neuroprotetores e neurotróficos do E₂ em células que estão ativas na inflamação do SNC. Esses mecanismos do E₂ são por atuação direta em neurônios ou indireta através de astrócitos, aumentando nestes a síntese e liberação de fatores de crescimento, e micróglias, por diminuir sua síntese e liberação de citocinas inflamatórias. Modificado de BRANN et al., 2007. 56

Figura 29: Ações neuroprotetoras do E₂ na lesão medular espinal: anti-inflamatório, antioxidante, angiogênico, inibidor da excitotoxicidade e da morte celular. O E₂ reduz o processo inflamatório diminuindo seus efeitos neurotóxicos, reduz os radicais livres atenuando o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, reduz a excitotoxicidade induzida por glutamato e outros aminoácidos excitatórios do SNC e diminui a isquemia tecidual por aumentar o fluxo sanguíneo local. A diminuição desses danos secundários após a lesão induzido por E₂, por fim, diminui a morte celular necrótica e apoptótica, no entanto, o E₂ também exerce ação direta nas células prevenindo a apoptose celular. Modificado de KWON et al., 2004. 61

LISTA DE ABREVIÇÕES

SNC	Sistema Nervoso Central
E₂	17 β -estradiol
LCR	Líquido Cefaloraquidiano
ATP	Adenosina Trifosfato
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
PPR	Receptores de Reconhecimento Padrão
TLR	Receptor Toll-like
COX-2	Ciclooxigenase-2
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
INF-γ	Interferon- γ
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
NFκB	Fator Nuclear κ B
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral
OMgp	Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
HSPG	Proteoglicano de Sulfato de Heparano
DSPG	Proteoglicano de Sulfato de Dermatano
KSPG	Proteoglicano de Sulfato de Keratano
CSPG	Proteoglicano Sulfato de Condroitina
ER-α	Receptor de Estrogênio (isômero α)
ER-β	Receptor de Estrogênio (isômero β)
ER	Receptor de Estrogênio
ERE	Elemento Responsivo ao Estrogênio
mER	Receptor de Membrana do Estrogênio
IGF-1	Fator de crescimento associado à insulina-1
EGF	Fator de crescimento Epidérmico
PI3K	Fosfatidil Inositol 3-Kinase
GP_{ER}	Receptor de Estrogênio acoplado à proteína G
MAPK	Proteína Kinase Ativadora de Mitógeno
AMP_c	Adenosina Monofosfato
PKA	Proteína Kinase A
CREB	Proteína de Ligação de Elemento
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento- β
bFGF	Fator de Crescimento do Fibroblasto Básico
RT-PCR/qPCR	PCR quantitativo em tempo real
BBB	Escala de avaliação locomotora (Basso, Beattie e Bresnahan)
OVX	Ovariectomia bilateral

HE	Hematoxilina e Eosina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ANOVA	Análise de variância
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GLAST	Transportador para glutamato (karki, 2014)
GLT-1	Transportador para glutamato (karki, 2014)
Iκ-Bα	Inibidor do NF κ B
RhoA	Família de genes homólogos à Ras, membro A
ERK	Kinase Regulada por Sinais Extracelulares
SERM	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno
JNK3	c-Jun N-terminal Kinase 3

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1. Anatomia, histologia e fisiologia da medula espinal	3
2.2. Epidemiologia da lesão medular espinal	10
2.3. Patogênese da lesão medular espinal	11
2.4. Elementos inibitórios da regeneração no SNC	19
2.5. Estrogênio: mecanismos de ação celular e função protetora tecidual.....	21
2.6. Estrogênio e lesão medular: evidências de neuroproteção espinal	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Animais	29
4.2. Desenho experimental	29
4.3. Procedimentos cirúrgicos	30
4.4. Tratamento com E ₂	31
4.5. Teste BBB: Avaliação funcional da capacidade locomotora.....	32
4.6. Perfusão transcardíaca	34
4.7. Histopatologia	34
4.8. RT-PCR.....	35
4.9. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	38
6. DISCUSSÃO	46
6.1. Modelos experimentais: lesão medular espinal e capacidade locomotora.....	46
6.2. Eficácia do E ₂ na recuperação funcional da capacidade locomotora.....	49
6.3. E ₂ reduz o tamanho da lesão tecidual provocada na medula espinal	52
6.4. Efeito anti-inflamatório do E ₂	53
6.5. E ₂ como um agente neuroprotetor multifatorial: possíveis mecanismos de ação	56
7. CONCLUSÃO	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

A medula espinal é um tecido composto por dois tipos principais de células, os neurônios e glias, e tem um papel muito importante por ser a via de transmissão de informações sensoriais, motoras e autonômicas entre o encéfalo e o restante do corpo, mantendo a correta função do organismo. Além disso, também possui circuitos neuronais locais que possibilitam respostas reflexas estereotipadas sem que haja prévio comando encefálico.

Nesse sentido, uma lesão na medula espinal é uma das patologias mais debilitantes ao ser humano e gera enormes mudanças físicas e emocionais na vida do indivíduo acometido. Ocorre principalmente por traumas, mas também por doenças na coluna vertebral ou na medula espinal em si. Pode afetar em diferentes graus a capacidade da medula de mandar e receber informações, levando a deficiências sensoriais, motoras e autonômicas. No entanto, geralmente uma lesão medular provoca quadros de deficiências profundas e irreversíveis.

No caso da lesão medular espinal por trauma, a taxa de incidência global (2007) é estimada em 179.312 novos casos por ano. Cada acometido custa para a sociedade aproximadamente 10 milhões de dólares com tratamentos, cuidados na hospitalização, reabilitação e custos médicos durante a vida, além da perda dos seus ganhos e das perdas pessoais.

Uma lesão na medula provoca uma profunda alteração na homeostase do sistema nervoso central (SNC), pois subsequente ao primeiro trauma mecânico há o surgimento de uma complexa cascata de eventos moleculares que amplificam ainda mais a lesão de forma progressiva e, por consequência, aumenta a disfunção do tecido medular. Essa cascata de eventos moleculares é denominada danos (ou mecanismos/eventos) secundários e dificultam o tratamento e a recuperação. Como o trauma inicial não pode ser evitado, apesar da existência de programas de prevenção, os estudos focam em descobrir novos tratamentos para atenuar os danos secundários e, desta forma, tentar frear a progressão da lesão no tecido medular.

O tratamento corrente para lesão medular espinal inclui o uso de altas doses de metilprednisolona, intervenções cirúrgicas para estabilização e descompressão da medula espinal e cuidados com a reabilitação. Entretanto, essas intervenções são ineficazes e a lesão medular espinal ainda é uma condição prejudicial a qual ainda não existe cura.

O 17β -estradiol (E_2) é um hormônio esteroide endógeno que tem sido estudado como um possível tratamento para essa patologia. É produzido pelas gônadas e em pequena quantidade pela adrenal e seus mecanismos moleculares são mediados pela via clássica (genômica) e não clássica (não genômica) de sinalização celular. As ações do E_2 por ambas as vias são amplamente distribuídas no organismos, atuando não só no sistema reprodutivo mas também em diversos tecidos incluindo o SNC em regiões não relacionadas com a reprodução.

Tem sido demonstrada ações neuroprotetoras do E_2 em estudos experimentais e epidemiológicos de muitas doenças neurológicas e traumáticas do SNC, inclusive influenciando de forma benéfica na recuperação locomotora e promovendo diminuição do dano tecidual de lesões traumáticas na medula espinal. Evidências sugerem que a ação neuroprotetora do E_2 é devido às suas múltiplas ações positivas que atenuam os danos secundários após um trauma medular, por seus efeitos anti-inflamatórios, anti apoptóticos, antioxidantes e angiogênicos. Apesar de ser um agente adjuvante em potencial, a dose, a via e a janela terapêutica de administração ainda precisam ser extensivamente investigadas. Em adição há uma escassez de estudos experimentais acerca deste efeito medular do E_2 em fêmeas.

Sendo assim, a proposta desse estudo é avaliar se, de forma aguda, uma única dose suprafisiológica do E_2 administrada por via subcutânea logo após a lesão medular espinal em

fêmeas é capaz de promover neuroproteção atenuando o dano no tecido medular e se este efeito acarreta em recuperação da capacidade locomotora.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Anatomia, histologia e fisiologia da medula espinal

A etimologia da palavra "medula" significa "miolo", ou seja, o que está dentro. A medula espinal é uma estrutura do sistema nervoso central (SNC) localizada dentro do canal medular na coluna vertebral. É dividida em quatro regiões principais (cervical, torácica, lombar e sacral) e cada região é subdividida em 31 segmentos, sendo 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 coccígeo que correspondem aos 31 pares de nervos espinhais. Portanto, a conexão dos nervos espinhais marca a segmentação da medula. A porção cranial da medula limita-se com o bulbo, ao nível do forame magno do osso occipital, e se estende até a 2ª vértebra lombar (L2) onde situa-se seu limite caudal, terminando com uma estrutura afilada denominada cone medular. A medula apresenta forma cilindróide e é ligeiramente achatada no sentido ântero-posterior (MACHADO, 2007; KANDEL, 2000).

A coluna vertebral cresce no sentido longitudinal em ritmo mais acelerado que a medula espinal. Portanto, as vértebras que correspondentes aos seus segmentos medulares não estão dispostos na mesma linha horizontal no adulto. A 11ª e 12ª vértebras torácicas (T11 e T12, respectivamente) correspondem aos 5 segmentos lombares e a 1ª vértebra lombar (L1) corresponde aos 5 segmentos sacrais. Além disso, abaixo da vértebra L2 só há raízes nervosas dos últimos nervos espinhais e as meninges ao redor, constituindo a cauda equina (MACHADO, 2007).

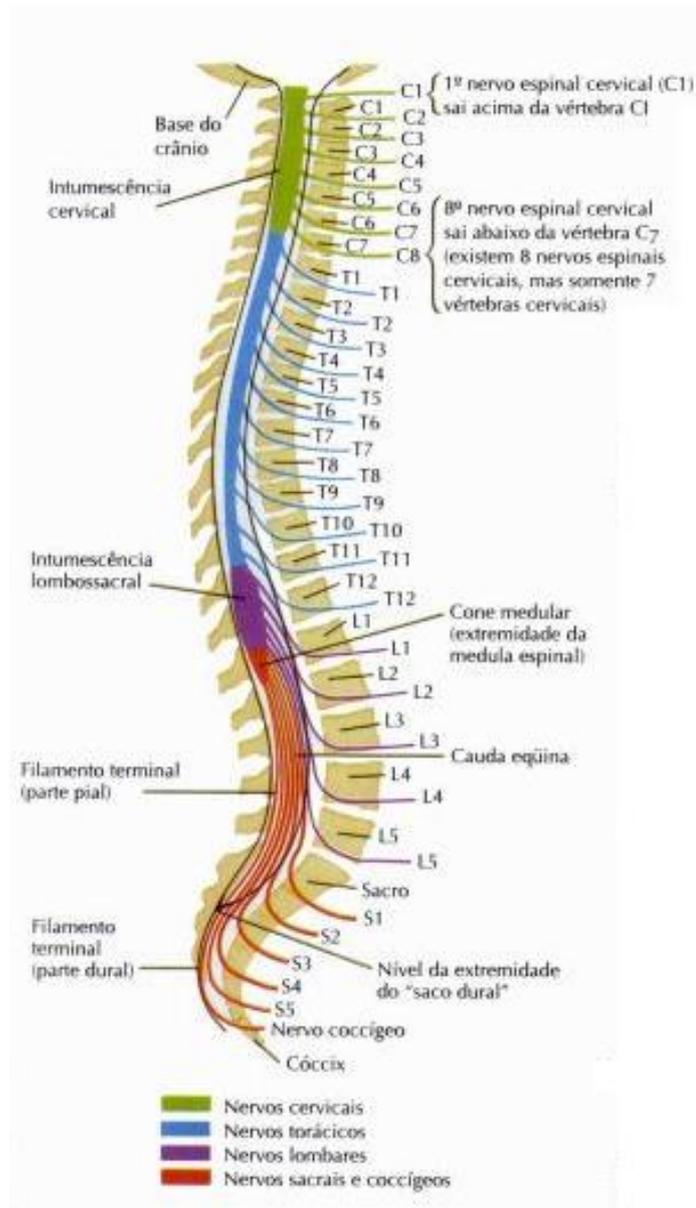


Figura 1: Esquema da posição anatômica das vértebra espinhais, seguimentos medulares e seus respectivos nervos espinhais. Retirado em 04/02/2014, de world wide web: <http://ebah.com.br/content/ABAAAAs7sAL/medula-espinhal>

O SNC dos seres humanos têm ampla semelhança morfológica e fisiológica com o dos roedores (Figura 2A). Essa similaridade permite a utilização desses animais em pesquisas científicas no âmbito da neurociência. No entanto, embora os ratos sejam utilizados de forma constante nessa vertente da experimentação animal, eles apresentam um perfil de segmentação medular que difere um pouco do homem. O rato apresenta 8 segmentos cervicais, 13 torácicos, 6 lombares, 4 sacrais e 3 coccígeos (Figura 2B) (GRANT, 2004).

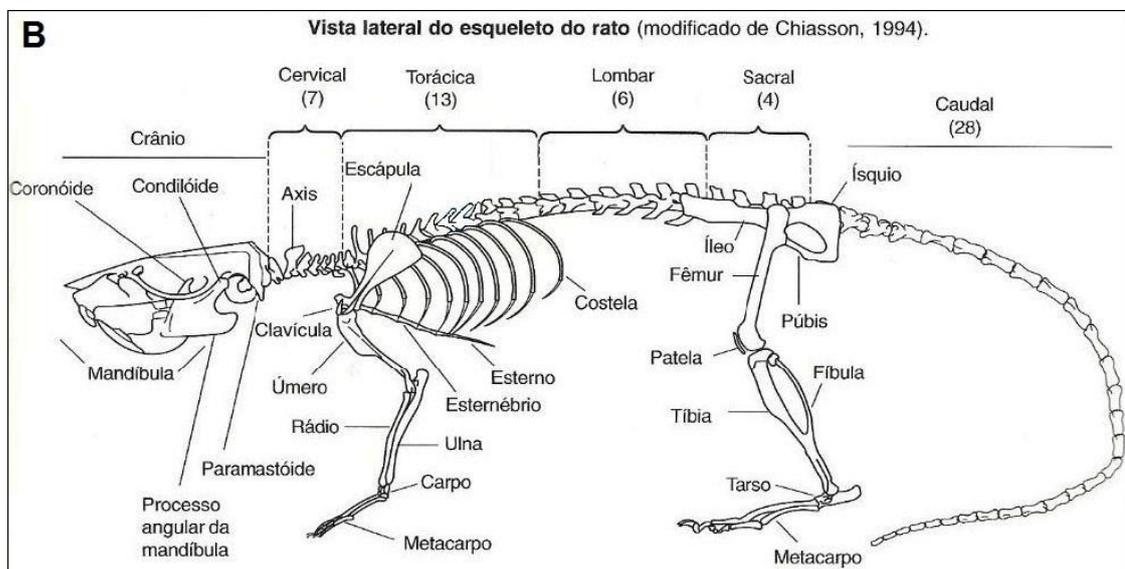


Figura 2: (A) Comparação entre as medulas espinhais do homem e do rato em tamanho natural. Visão dorsal: a medula completa do rato possui aproximadamente 9 cm de comprimento, o que se compara com uma porção da medula humana entre os segmentos C6 a T4. Modificado de WATSON et al., 2009. (B) Esquema do esqueleto do rato, vista lateral. Modificado de ANDERSEN & TUFIK, 2010.

A medula espinhal, como todo o SNC, é recoberta por três membranas fibrosas denominadas meninges (dura-máter, aracnóide e pia-máter), envolvendo-a por completo. A mais externa é a dura-máter, uma membrana espessa e resistente. A meninge intermediária é a aracnóide, menos rígida que a dura-máter, constituída de um folheto justaposto à dura-máter e um emaranhado de trabéculas aracnóideas que unem este folheto à pia-máter, que é a membrana mais interna e que fica intimamente aderida à superfície do tecido nervoso medular (MACHADO, 2007; LENT, 2010).

Entre as meninges existem três espaços: epidural, subdural e subaracnóideo. O epidural (ou extradural) localiza-se entre o perióstio do canal vertebral e a dura-máter, é preenchido por tecido adiposo e por vasos sanguíneos. O subdural situa-se entre a dura-máter e a aracnóide, é estreito e contém uma fina camada de líquido para lubrificar o contato entre as duas meninges, evitando aderência. Por fim, o subaracnóideo encontra-se entre as meninges pia-máter e aracnóide, é amplo, aloja vasos sanguíneos para irrigar e drenar o tecido nervoso e é preenchido com líquido cefalorraquidiano (LCR), também denominado de líquido. Esse espaço comunica-se com a cavidade interna da medula espinhal, o canal central (ou canal do

epêndima), permitindo a passagem de líquido de dentro para fora da medula (MACHADO, 2007; LENT, 2010).

O líquido é produzido de modo contínuo pelo plexo coróide nos ventrículos encefálicos com a função de proteger e manter a homeostasia do tecido nervoso. Reduz o peso do cérebro e da medula sobre as estruturas ósseas mantendo a forma do SNC e atenua impactos externos e internos. Ademais, promove a excreção de produtos do metabolismo neural e é veículo de comunicação química com o compartimento intersticial do tecido nervoso (LENT, 2010).

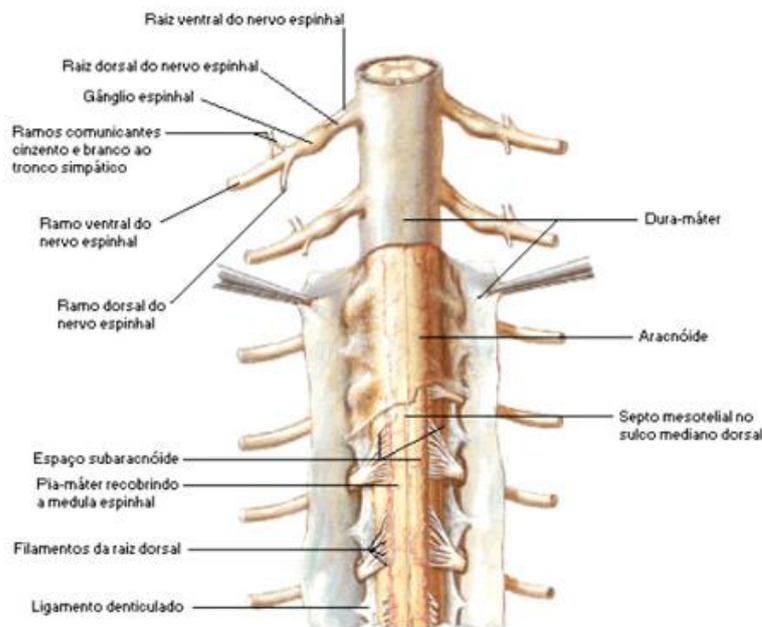


Figura 3: Representação esquemática das meninges (dura-máter, aracnóide e pia-mater) e do espaço entre elas (epidural, subdural e subaracnóideo) que envolvem a medula espinhal. Vista posterior. Retirado em 04/02/2014, de world wide web: <http://fundacionannavazquez.wordpress.com/category/documentos-en-portugues/>

O tecido nervoso medular em si compõe-se de duas classes principais de células: as células nervosas (neurônios) e células gliais (glia). As células gliais são mais numerosas e circundam os corpos celulares, axônios e os dendritos dos neurônios (KANDEL, 2000).

A glia é dividida em duas classes: microglia e macroglia. As microglias são originadas de macrófagos de fora do SNC e são mobilizadas e ativadas após uma lesão, infecção ou doença para atuar como um fagócito. Já as macroglias são subdividida em dois tipos celulares no SNC: oligodendrócitos e astrócitos. Os oligodendrócitos têm o papel de isolar os axônios envolvendo-os com uma camada de mielina em espiral. Os astrócitos têm a função de suprir os neurônios com nutrientes, propiciam a formação da barreira hematoencefálica que protege o SNC contra agentes nocivos do sangue, ajudam a manter a concentração iônica de potássio extracelular em níveis satisfatórios e regulam a atividade sináptica por captação de neurotransmissores. Portanto, as glias são células de suporte que sustentam os neurônios, ajudam a nutrir as células nervosas, reparam danos, separam grupos neuronais e conexões sinápticas, proporcionando uma eficiente sinalização neuronal (KANDEL, 2000).

Por sua vez, os neurônios são as unidades de sinalização do sistema nervoso. Promovem conexões (sinapses) através da liberação de neurotransmissores, entre as próprias células nervosas e entre estas e outras células do organismo, que geram sinais eletroquímicos pelos quais o sistema nervoso recebe, analisa e transmite informações (KANDEL, 2000).

Em uma visão estrutural histológica, a medula apresenta duas porções distintas denominadas de substância branca e substância cinzenta. A substância cinzenta é constituída por corpos celulares dos neurônios, células gliais e prolongamento de neurônios. Localiza-se por dentro da substância branca e apresenta a forma de um "H" (em secções transversas) que é dividida em três cornos: ventral, dorsal e intermediário. O corno dorsal contém um arranjo ordenado de relés de neurônios sensoriais que recebem aferências da periferia por fibras que chegam à medula pela raíz dorsal, enquanto o corno ventral contém grupos de neurônios motores, cujos axônios emergem da medula através das raízes ventrais e inervam músculos esqueléticos. Os diversos interneurônios da substância cinzenta modulam as informações que fluem dos neurônios sensoriais para o encéfalo e os comandos do córtex para os neurônios motores, assim como as informações que passam entre os grupos de neurônios motores. Ademais, na substância cinzenta, os neurônios agrupam-se em núcleos que formam colunas longitudinais dentro dos três cornos medulares, sendo denominados de Lâminas de Rexed (REXED, 1954). Essas microrregiões laminares são numeradas de I a X no sentido dorso-ventral. As lâminas de I a IV constituem a área receptora onde terminam os neurônios das fibras exteroceptivas (estímulos de dor, mecânicos e táteis) que penetram pelas raízes dorsais, as lâminas de V a VI recebem informações proprioceptivas, a lâmina VII recebe informações associadas ao sistema nervoso autônomo, as lâminas VIII e IX contêm os neurônios motores descendentes e a lâmina X possui os neurônios associados aos estímulos nociceptivos (MACHADO, 2007; KANDEL, 2000).

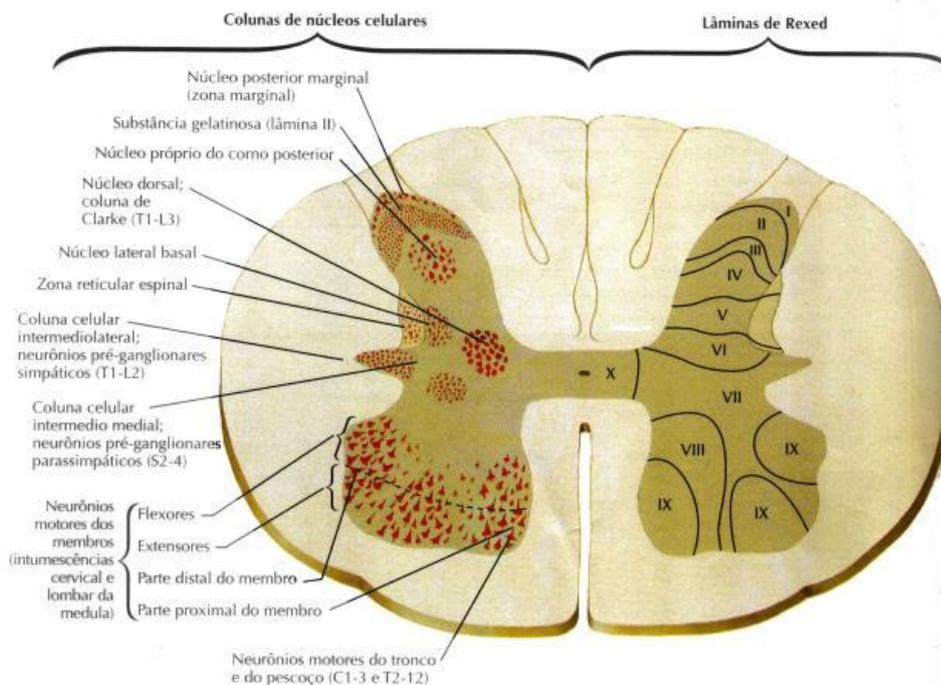


Figura 4: Esquema da substância cinzenta em formato de "H" por dentro da substância branca na medula espinal de humanos. À esquerda representação dos núcleos de neurônios nos cornos dorsal e ventral da substância cinzenta. À direita representação da distribuição das lâminas de Rexed na substância cinzenta. Retirado em 04/02/2014, de world wide web: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAs7sAL/medula-espinal>

A substância branca, em volta da substância cinzenta, é constituída de células gliais e fibras de axônio, sendo a maioria mielínicas. Essas fibras são agrupadas em feixes de axônios e organizadas em cada lado em tratos (ou colunas), que são as vias por onde trafegam os impulsos nervosos na medula espinal: as vias ascendentes (sensoriais), através das quais a

informação sensorial alcança o córtex, e as vias descendentes (motoras) que carregam os comandos motores e as influências modulatórias do encéfalo aos músculos. (MACHADO, 2007; KANDEL, 2000).

Importante salientar que o tamanho e a forma da medula espinal variam no sentido rostrocaudal e isto se deve a dois fatores. Um deles é relativo à quantidade de substância branca, pois o número de axônios sensoriais que entram na medula diminui progressivamente dos segmentos cervicais em direção aos sacrais. Além disso, os axônios descendentes do encéfalo vão terminando em níveis superiores da medula e, de forma progressiva, uma menor quantidade desce até os níveis inferiores. Assim, há maior quantidade de substância branca do que substância cinzenta em níveis cervicais e o inverso em níveis sacrais. O outro fator é a variação no tamanho dos cornos dorsal e ventral da substância cinzenta, devido a presença de duas dilatações, sendo uma ao nível cervical formando a intumescência cervical e outra ao nível lombar formando a intumescência lombossacral. Essas intumescências originam os plexos braquial e lombossacral que inervam os músculos dos membros superiores e inferiores, respectivamente. Isso se deve a maior quantidade de neurônios motores do corno ventral que inervam muitos grupamentos musculares, regulando com eficiência a complexidade dos movimentos finos dos membros, e também de acordo com a maior informação sensorial proveniente dos membros que adentram no corno dorsal (MACHADO, 2007; KANDEL, 2000).

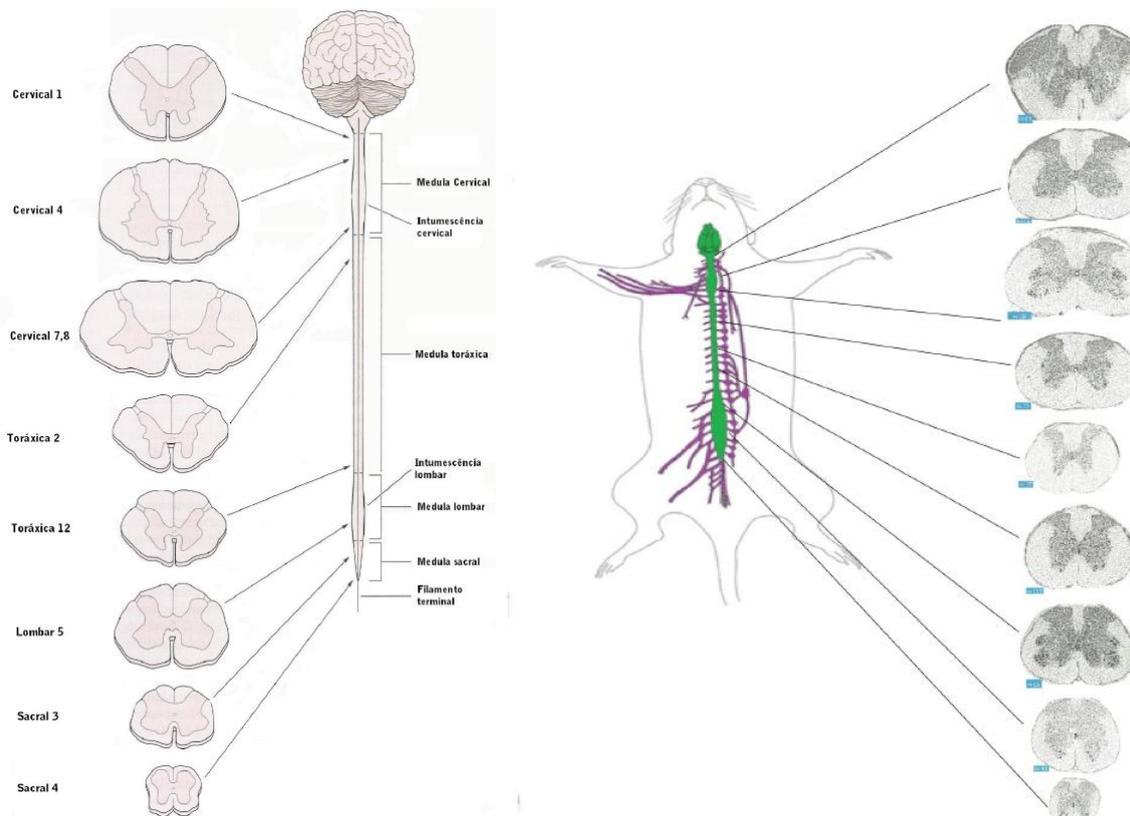


Figura 5: Esquema do padrão de distribuição da substância branca e cinzenta ao longo dos segmentos da medula espinal humana (A) e do rato (B) em cortes transversais. (A) Modificado de KANDEL, 2000; (B) Modificado de WATSON et al, 2009 e ANDERSEN & TUFIK, 2000.

Os conceitos anatômicos e histológicos permitem definir a principal função da medula espinal que é a transmissão de informações ascendentes e descendentes entre o encéfalo e o restante do corpo permitindo o pleno funcionamento do organismo. Todavia, também possui circuitos locais que possibilitam respostas reflexas estereotipadas sem que haja prévio comando do sistema nervoso supraespinal. Sendo assim, a medula recebe informação sensorial da pele, das articulações, dos músculos do tronco e dos membros e contém os neurônios motores responsáveis tanto pelos movimentos voluntários como pelos reflexos (KANDEL, 2000).

2.2 Epidemiologia da lesão medular espinal

Uma lesão na medula espinal é uma das patologias mais debilitantes ao ser humano e ocorre principalmente por traumas, mas também por doenças na coluna vertebral ou na medula espinal em si. Pode afetar em diferentes graus a capacidade da medula de mandar e receber informações, levando a deficiências sensoriais, motoras e autonômicas. A associação de outros sintomas decorrentes destas deficiências como dor, espasticidade, úlceras de decúbito, problemas urológicos, vasculares, cardiocirculatórios e psicológicos faz com que a lesão medular seja considerada uma dos estados mais devastadores, tanto físico como emocionais (LIANZA et al., 2001). Além de interferir de forma profunda e negativa na qualidade de vida do indivíduo afetado, também diminui a qualidade de vida da família e gera custos muito altos para a mesma e para a sociedade (OYINBO, 2011).

Cada paciente com lesão medular custa para a sociedade aproximadamente 10 milhões de dólares com tratamentos, cuidados na hospitalização e reabilitação, assim como com custos médicos durante a vida da vítima e com a perda dos seus ganhos. Além das perdas pessoais sofridas pelo acometido e sua família (FEHLINGS & NGUYEN, 2010).

Há uma escassez de dados epidemiológicos disponíveis referentes à lesão medular traumática. Informações sobre o número de pessoas vivendo nessa condição (prevalência) e da quantidade de novos casos por ano (incidência) é ínfimo, o que dificulta a prevenção à lesão, assistência médica e outros planos sociais. Existe de forma majoritária dados de incidências em regiões específicas, entretanto, muitas regiões do mundo não possuem nenhum dado estatístico. Sendo assim, muitos dados são estimativas de incidência (LEE et al., 2013).

A taxa de incidência global datada de 2007 é estimada em 23 casos por milhão de habitantes de indivíduos com lesão medular espinal traumática, o que indica que ocorrem 179.312 casos por ano. Na América do Norte são estimados 40 casos por milhão de habitantes e na América do Sul 25 casos por milhão de habitantes (LEE et al., 2013). No Brasil, segundo dados da Secretaria de Saúde do estado de São Paulo e do DATASUS, ocorreram cerca de 8950 novos casos de SCI no Brasil em 2004, sendo 250 mil pacientes com esta síndrome no Brasil (MOLINA, 2006).

Em países desenvolvidos e em desenvolvimento o principal grupo afetado são homens de 18 a 32 anos. No entanto, em países desenvolvidos outro grande grupo acometido são homens e mulheres com idade acima de 65 anos, devido a grande população de idosos nesses países (LEE et al., 2013).

A etiologia da lesão varia de acordo com a condição econômica, estrutural, demográfica e social de cada país, assim dependendo dessas condições há maior ou menor prevalência de casos de lesão medular traumática de diferentes causas. As principais causas em humanos ocorrem por acidentes com veículos automotivos, quedas, lesões corporais decorrentes de violência, acidentes de trabalho, acidentes com práticas esportivas e recreação. E dependendo da gravidade da lesão e do segmento medular acometido pode causar paraplegia ou tetraplegia (LEE et al., 2013; PROFYRIS et al., 2004).

O alto custo social em países desenvolvidos, a alta taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento e o aumento da etiologia em diversas regiões do planeta enfatiza a importância de programas de prevenção primários e secundários de acordo com cada região (LEE et al., 2013).

É necessário que haja um ótimo serviço de recuperação ao paciente com traumatismo medular e que este seja atendido dentro das primeiras 72 horas após a lesão e encaminhado para centros de tratamento especializados, pois desta maneira há redução das complicações, otimização do tratamento e melhoras a longo prazo (SCHILLER et al., 2011).

2.3 Patogênese da lesão medular espinal

Uma lesão na medula espinal provoca uma profunda alteração na homeostase do SNC, há o rompimento de estruturas neurais (neurônios e glias), vasculares e da barreira hematoencefálica. A fisiopatologia da lesão medular aguda por trauma consiste numa cascata complexa que envolve dois mecanismos distintos: os mecanismos primários e os mecanismos secundários (OYINBO, 2011). A lesão primária desencadeia diversos danos secundários que provocam aumento progressivo da destruição do tecido nervoso e culmina em disfunção neurológica (HAGG & OUDEGA, 2006).

A lesão inicial ocorre por um impacto mecânico havendo o deslocamento de estruturas ósseas e ligamentares que comprimem a medula espinal (Figura 6), portanto, é inesperada e a sua ocorrência não pode ser evitada (CARLSON & GORDEN, 2002; KWON et al., 2004). O impacto inicial gera hemorragia imediata e rápida morte celular no local da lesão. Esse mecanismo primário induz a uma cascata de eventos vasculares, celulares e bioquímicos correspondentes aos múltiplos mecanismos secundários que, por sua vez, amplificam a lesão inicial e a disfunção tecidual (Figura 7) (RAY et al., 2002; SIMON et al., 2009). Além disso, a severidade da lesão primária parece estar correlacionada de forma direta com a extensão da lesão secundária, devido às evidências de que lesões brandas promovem alterações secundárias menos exacerbadas do que em casos de lesões moderadas ou mais severas (KLOOS et al., 2005; SIEGENTHALER et al., 2007).

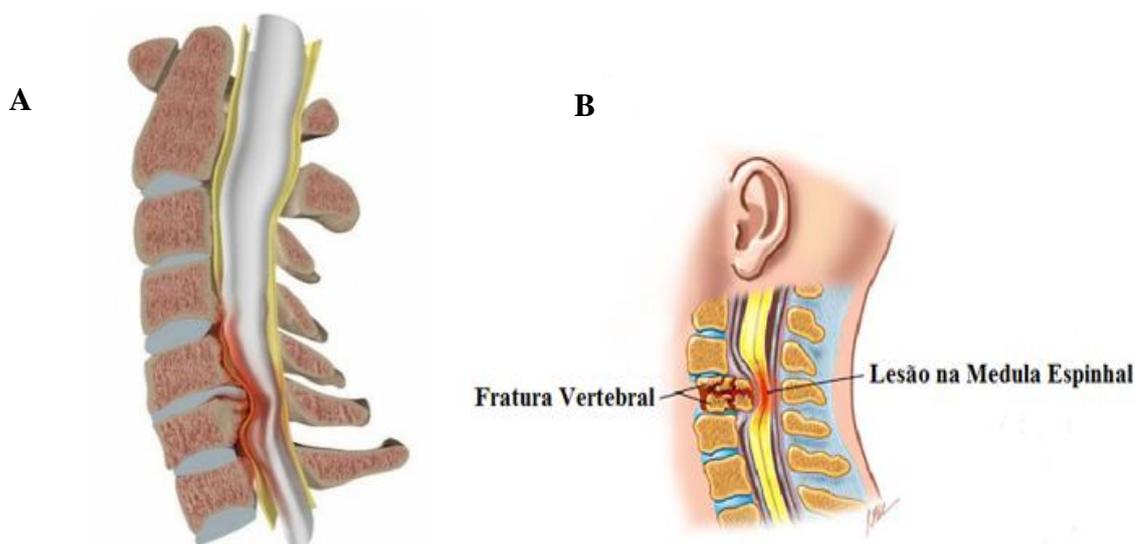


Figura 6: Ilustração da lesão traumática na medula espinal. (A) Ilustração da lesão compressiva na medula espinal. (B) Ilustração de uma fratura vertebral com deslocando estruturas ósseas e ligamentares que comprimem a medula. Retirado em 04/02/2014, de world wide web: <http://servidoresjt.wordpress.com>

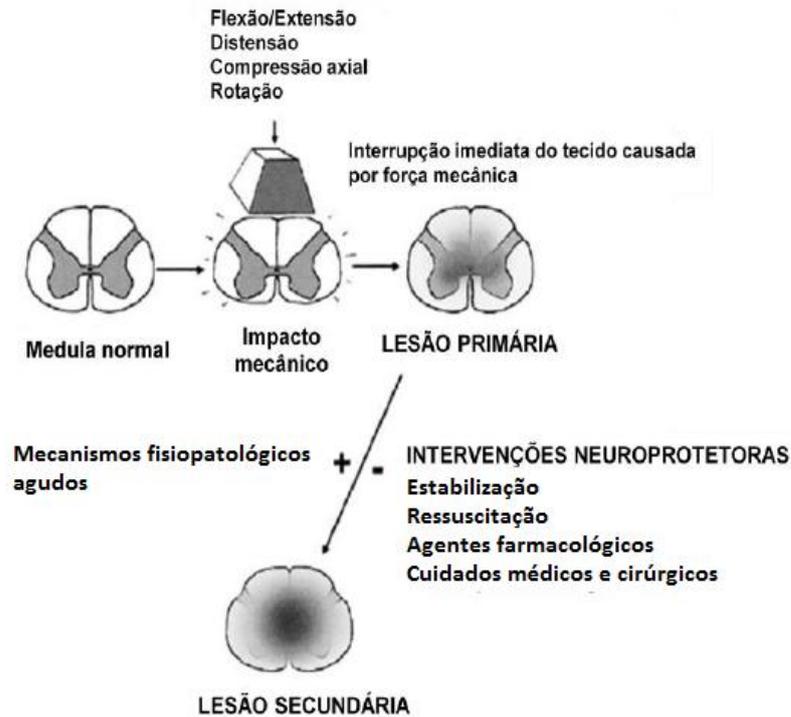


Figura 7: Esquema da lesão traumática primária e danos secundários subsequentes ao impacto na medula. O impacto mecânico na medula causa interrupção do tecido no local da lesão primária e o tecido sadio adjacente fica vulnerável aos eventos secundários subsequentes à lesão inicial. As intervenções neuroprotetoras visam minimizar esse processo destrutivo. Modificado de KWON et al., 2004.

Como a lesão primária é inevitável, muitos pesquisadores têm investigado terapias de intervenção para atenuar ou bloquear os mecanismos secundários, já que há uma extensa janela terapêutica no decorrer desses eventos secundários que podem ser manipulados por intervenções exógenas apropriadas. Sendo assim, a compreensão dos mecanismos secundários e sua complexidade é o requisito indispensável para o planejamento de estratégias terapêuticas que promovam: neuroproteção, regeneração axonal e/ou neuroplasticidade no local da lesão para integrar, de forma funcional, a região lesionada ao tecido neural que se manteve sadio após o dano inicial (OYINBO, 2011).

A resposta biológica à lesão medular espinal é dividida em três fases que seguem uma sequência temporal distinta, porém um pouco sobrepostas (Tabela 1). A primeira é a fase aguda que se inicia segundos após a lesão medular e persiste por alguns minutos, em seguida a fase subaguda surge minutos após a lesão e continua por semanas e por último a fase crônica que aparece após meses e se perpetua por anos após a lesão. Sendo que, alguns eventos da fase aguda continuam na fase subaguda, bem como alguns eventos da fase subaguda continuam na fase crônica (OYINBO, 2011).

Tabela 1: Principais características das três fases da lesão medular espinal. Retângulos sombreados indicam eventos em comum entre as fases. Modificado de OYINBO, 2011.

AGUDA	SUB-AGUDA	CRÔNICA
Hipotensão sistêmica e choque espinal		
Vasoespasmos	Vasoespasmos	
Morte celular pelo impacto	Morte celular pelo impacto	
Isquemia	Isquemia	
Edema	Edema	
Desarranjo da homeostase iônica	Desarranjo da homeostase iônica	
Acúmulo de neurotransmissores	Excitotoxicidade glutamatérgica	
Comprometimento da membrana plasmática	Comprometimento da membrana plasmática e da permeabilidade	
	Produção de radicais livres	
	Peroxidação lipídica	
	Excesso de óxido nítrico	
	Bloqueio da condução	
	Excesso de noradrenalina	
	Falha energética e diminuição de ATP	
	Invasão de células do sistema imunológico e liberação de citocinas	
	Morte celular mediada pela inflamação	
	Fatores inibitórios do crescimento do tecido neural	
	Cromatólise central	
	Compressão vertebral / instabilidade da coluna	
	Desmielinização de axônios intactos após a lesão	Continuação da desmielinização
	Apoptose	Continuação da apoptose
	Iniciação da cavitação central	Continuação da cavitação central
	Cicatriz astrogliar	Cicatriz glial / formação de siringe
		Alteração de canais iônicos e receptores
		Processos regenerativos
		Alteração de circuitos neurais
		Siringomielia

Na fase aguda a lesão inicial ocorre como resultado direto do trauma medular, que causa não só danos e destruição instantânea de células residentes como também levando a alterações celulares físicas e bioquímicas. É caracterizado por eventos sistêmicos e locais (TATOR et al., 1998; HULSEBOSCH, 2002), como: hipotensão sistêmica, choque espinal, vasoespasmos, isquemia, comprometimento da membrana plasmática, alteração da homeostase iônica e acúmulo de neurotransmissores (OYINBO, 2011).

A fase subaguda é caracterizada pelo surgimento dos mecanismos secundários à lesão inicial que amplificam a área lesionada. Nesta fase, alguns eventos da fase aguda permanecem como a alteração na homeostase eletrolítica, edema e necrose celular. Além destes, novas alterações surgem como a formação de radicais livres, aumento no influxo de cálcio, resposta do sistema imunológico, inflamação e morte celular apoptótica (LIVERMAN et al., 2005).

Existem aproximadamente 25 mecanismos secundários descritos e bem estabelecidos na literatura (Tabela 2) e estes estão interligados em um ciclo de auto propagação, um perpetuando o outro, formando uma rede deletéria à medula espinal (OYINBO, 2011).

Tabela 2: Lista de mecanismos secundários à lesão medular. Modificado de OYINBO, 2011.

MECANISMOS SECUNDÁRIOS À LESÃO MEDULAR ESPINAL
Apoptose
Cicatriz astrogliar
Influxo celular de cálcio
Cavitação central
Cromatólise central
Compressão e instabilidade da coluna vertebral
Bloqueio da condução neural e choque espinal
Expressão deficiente de genes associados à mielina após a lesão medular
Desmielinização de axônios residuais e desmielinização de axônios intactos após a lesão
Desarranjo da homeostase iônica
Falha energética e diminuição da produção de ATP
Excessiva secreção de noradrenalina
Acumulação de fluidos / edema no local da lesão
Excitotoxicidade glutamatérgica
Hemorragia
Invasão de células do sistema imunológico e liberação de citocinas
Inflamação
Isquemia / dano endotelial induzido pela reperfusão
Peroxidação lipídica / estresse oxidativo
Fatores inibitórios do crescimento de tecido neural
Choque neurogênico
Excesso de óxido nítrico
Morte de oligodendrócitos por apoptose secundária
Comprometimento da membrana plasmática / aumento da permeabilidade da membrana plasmática
Hipotensão sistêmica devido à perda da inervação simpática
Produção de TNF- α no local da lesão na medula
Vasoespasmos e inconsistência da microcirculação medular

Dentre estes mecanismos as alterações vasculares e a isquemia são considerados como um dos aspectos mais importantes na lesão secundária. Ocorrem tanto mudanças sistêmicas como locais (TATOR & FEHLINGS, 1991). Na fase aguda, o impacto mecânico gera efeitos sistêmicos que são manifestados com choque neurogênico, bradicardia, hipotensão e diminuição do débito cardíaco, isso ocorre devido a diminuição do tônus simpático e efeitos parassimpáticos no miocárdio (TATOR & FEHLINGS, 1991; CARLSON & GORDEN, 2002). Essas alterações causam perda do fluxo de sangue para a medula. Além disso, o rompimento da microcirculação no local da lesão gera hemorragia no parênquima medular (principalmente na substância cinzenta). Por consequência ocorre anóxia, edema tecidual e trombose intravascular, que, em combinação com vasoespasmos e a perda da autorregulação normal dos vasos intactos, provocam uma profunda hipoperfusão e isquemia do tecido medular (TATOR & FEHLINGS, 1991; HAGG & OUDEGA, 2006).

Durante o período de isquemia, a perda de suprimento de oxigênio e glicose se manifesta a nível celular com a perda da via glicolítica e da fosforilação oxidativa, inibindo o metabolismo energético da célula e causando necrose por depleção de adenosina trifosfato (ATP). A ausência de ATP induz necrose por perda da permeabilidade da membrana plasmática, secreção de conteúdo lisossômico e ativação de enzimas autodestrutivas dependentes de Ca^{2+} (proteases, fosfolipases, ATPases e endonucleases) que degradam a membrana plasmática, o núcleo e componentes do citoesqueleto (PROFYRIS et al., 2004; TATOR, 1995).

Ademais, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são produzidas durante a isquemia e contribuem para a perda tecidual por possuírem efeito citotóxico, causando dano à membrana celular. Vários tipos celulares produzem ROS e RNS,

que são radicais livres (moléculas altamente reativas para lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) que causam progressiva oxidação dos ácidos graxos das membranas celulares (peroxidação lipídica), gerando mais radicais livres que podem se propagar pela superfície da membrana rompendo a célula. Além disso, esse estresse oxidativo também pode desativar enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, alterar o DNA, desnaturar proteínas e inibir a bomba de Na^+/K^+ ATPase. Todos esses fatores induzem a um colapso metabólico e por conseguinte morte celular necrótica ou apoptótica (KWON et al., 2004; HAGG & OUDEGA, 2006). Vale ressaltar que alguns dias após a lesão e a isquemia ocorre reperfusão da medula aumentando o dano tecidual, pois a reexposição das células endoteliais ao oxigênio leva a uma reação enzimática que produz mais ROS e intensifica o processo de morte celular (PROFYRIS et al., 2004).

Outro mecanismo secundário crucial é a excitotoxicidade, que contribui para a morte neuronal após a lesão (KNOW et al., 2004; CARLSON & GORDEN, 2002). Ocorre por um acúmulo de glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, e aspartato atingindo níveis tóxicos 15 minutos após a lesão experimental (KNOW et al., 2004). O excesso de glutamato no compartimento extracelular no local da lesão parece ser resultado da sua liberação após a lise da membrana plasmática causada pela própria lesão e por exocitose do glutamato das vesículas sinápticas após influxo de Ca^{2+} (KNOW et al., 2004). O glutamato provoca morte celular excitotóxica através da hiperativação dos seus receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato (AMPA)/Kainato causando um aumento massivo de Ca^{2+} e Na^+ no compartimento intracelular, principalmente em neurônios e oligodendrócitos, e um desarranjo na homeostase iônica.

A alta concentração de Na^+ intracelular também ocorre através da ativação dos canais de Na^+ voltagem-dependentes e dos canais trocadores de Na^+ e Ca^{2+} . No entanto, a falta de ATP impede sua saída pela bomba de Na^+/K^+ ATPase, ocorrendo grande despolarização da membrana e acumulação tóxica de Na^+ com consequente influxo de água e edema celular. Ademais, ativação dos receptores NMDA pelo glutamato provoca a liberação de Ca^{2+} de compartimentos citosólicos e o aumento da sua concentração no citosol e na mitocôndria, que normalmente é baixo, altera vários processos do metabolismo celular dependentes de Ca^{2+} (CHOI, 1998). Dentre esses processos estão a ativação de enzimas líticas (calpaína, fosfolipase A_2 e lipoxigenase), geração de radicais livres e desregulação da fosforilação oxidativa mitocondrial, processos esses que culminam em morte celular apoptótica devido ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (KNOW et al., 2004).

Na fase aguda, ocorre rápida morte celular por necrose no local do trauma mecânico na medula. Subsequente a este evento, algumas horas depois, as células ao redor da lesão inicial que mantiveram-se intactas sofrem os efeitos dos insultos bioquímicos secundários e iniciam uma autodestruição através da apoptose (OYINBO, 2011; KNOW et al., 2004). Esse tipo de morte celular apoptótica predomina na fase subaguda e crônica, pode ocorrer por semanas após a lesão e a uma relativa distância do impacto mecânico (EMERY et al., 1998; SPRINGER et al., 1999). Ambos são iniciados por muitos dos mesmos insultos, como isquemia, estresse oxidativo e excitotoxicidade, entretanto, possuem fisiopatologias e morfologias distintas. (KNOW et al., 2004).

A necrose ocorre após um insulto celular que destrói os mecanismos homeostáticos da célula e leva a sua tumefação, perda na produção de ATP, danos e rompimento das organelas, depois lise da membrana e liberação do conteúdo intracelular que pode incitar uma reação inflamatória local (KNOW et al., 2004). Por outro lado, a apoptose é uma morte celular programada que requer a participação ativa da própria célula, depende de ATP, em que um insulto celular inicia uma cascata de vias intracelulares (KNOW et al., 2004), que culminam em retração da célula com as organelas intactas e fragmentação em corpos apoptóticos que

são fagocitados sem que haja uma resposta inflamatória significativa (RAFF, 1998). Essa cascata apoptótica na lesão medular é ativada em neurônios, oligodendrócitos, microglia e, talvez, astrócitos (LIU et al. 1997; BEATTIE et al., 2000). As vias intracelulares que participam do processo apoptótico ativam enzimas chamadas caspases, essas enzimas ativam proteínas nucleares e do citoesqueleto responsáveis por fragmentar a célula de forma ordenada (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997). Parece que a maior causa para a apoptose é o influxo massivo de Ca^{2+} na célula induzida pela lesão (HAPPEL et al., 1981; IMAIZUMI et al., 1997; XIONG et al., 2007) que promove a ativação das enzimas caspases e calpaína (RAY et al., 2003). As caspase 3, caspase 8 e caspase 9 são implicadas na apoptose após a lesão medular, principalmente de neurônios e oligodendrócitos (KNOBLACH et al., 2005). Nos neurônios, além do Ca^{2+} , os radicais livres em alta concentração após a lesão também contribuem para a liberação do citocromo C pela mitocôndria que ativa caspase 3 e 9 dentro de poucas horas, levando a apoptose em neurônios motores (SUGAWARA et al., 2002; BAO & LIU, 2003). Os oligodendrócitos parecem ser particularmente vulneráveis a apoptose por expressarem receptores como Fas e p75 após a lesão, que quando estimulados iniciam o processo apoptótico (CASHA et al., 2001). A morte dos oligodendrócitos envolve a via extrínseca de ativação de caspase 8, induzida por TNF- α e excesso de glutamato que ativam Fas e p75, e a via intrínseca que ativa caspase 9 e 3, induzida pela mitocôndria através da liberação do citocromo C (KNOBLACH et al., 2005). As micróglias ativadas e outras células do sistema imune expressam o receptor Fas-L que se liga ao receptor Fas dos oligodendrócitos e também ativam caspase 8 (CASHA et al., 2001). Portanto, a apoptose dos oligodendrócitos por diversos mecanismos resulta em desmielinização dos axônios o que contribui para a perda de função neurológica distal (KNOW et al., 2004).

A disfunção neurológica e a limitada recuperação funcional após a lesão medular também é exacerbada por outro evento secundário: a neuroinflamação, que representa a coordenada resposta celular ao dano tecidual (KRAFT & HARRY, 2011) e persiste por meses e anos após a lesão (FLEMING et al., 2006; NORENBORG et al., 2004; PROFYRIS et al., 2004). No entanto, o papel da inflamação no trauma medular é controverso, há evidências de efeitos benéficos (reparo tecidual) e deletérios (dano tecidual) desse processo inflamatório (TRIVEDI et al., 2006), caracterizando-a como uma "faca de dois gumes", com propriedades neurotóxicas e neuroprotetoras após a lesão medular (BETHEA, 2000). Postula-se que as respostas inflamatórias precoces participem dos processos de danos secundários gerando maior dano tecidual, enquanto os processos mais tardios são reparadores (BETHEA & DIETRICH, 2002).

A inflamação é uma reação de defesa ativa do organismo em que células do sistema imunológico atuam contra diversos insultos. É designada a remover ou inativar agentes nocivos e a inibir ou reverter seus efeitos deletérios para manter a homeostase. (WYSS-CORAY & MUCKE, 2002). Portanto, a regulação apropriada da neuroinflamação ajuda na recuperação do tecido. Entretanto, se o processo inflamatório não for controlado e persistir tornando-se crônico, o mesmo desenvolve propriedades neurotóxicas que prejudicam e causam maior destruição (KRAFT & HARRY, 2011).

Contudo, embora a inflamação seja uma consequência após um trauma no SNC, a resposta neuroimunológica é desencadeada de maneira diferente da que ocorre em outros tecidos (SCHWARTZ et al., 1999). Devido a presença de células especializadas específicas do SNC, neurônios e células gliais (astrócitos, micróglias e oligodendrócitos) e o fato de que o perfil temporal da resposta imune é mais demorado do que ocorre em outros tecidos periféricos (BETHEA & DIETRICH, 2002). Além da sequência temporal, a composição e a magnitude da resposta imune na medula espinal é distinta e parece ser mais exacerbada que no cérebro (SCHNELL et al., 1999a; SCHNELL et al., 1999b; CAMPBELL et al., 2002).

A inflamação é parte da resposta inicial à lesão na medula (VIDAL et al., 2013). Há ativação de células residentes (astrócitos e micróglia) e a expressão de clássicos mediadores imunológicos e inflamatórios (complemento, citocinas e quimiocinas), rompimento da barreira hematoencefálica, acumulação de fluido (formação de edema) e um recrutamento orquestrado de células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) da circulação sistêmica para o parênquima medular (STOLL et al., 2002).

Após a lesão na medula existem quatro estágios inflamatórios distintos: aguda, sub-aguda, crônica precoce e crônica tardia. O trauma inicial evoca rápida resposta inflamatória, provocando maior perda do tecido neural na fase aguda da inflamação (FLEMING et al., 2006), que perdura por poucas horas e é caracterizado pela ativação microglial e aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (BETHEA et al., 1999; PINEAU & LACROIX, 2007). Essa fase tem sido definida pelo aumento do dano por morte de neurônios e axônios, assim como desmielinização próxima a região lesionada (SCHWAB et al., 2006). Também há a infiltração de neutrófilos atingindo seus maiores níveis no parênquima da medula um dia após a lesão (BECK et al., 2010). Na fase sub-aguda, entre 2 e 7 dias após a lesão, começa a diminuir os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias (DONNELLY & POPOVICH, 2008; PINEAU & LACROIX, 2007). Enquanto isso, há um aumento no número de monócitos/macrófagos e linfócitos e os níveis de mediadores anti-inflamatórios (VIDAL et al., 2013). As fases crônica precoce e tardia podem perdurar por semanas ou meses e são caracterizadas por específicas respostas imunológicas humorais e celulares que facilitam a limpeza do local da lesão. Há nesta fase um segundo aumento dos níveis de células T, macrófagos e neutrófilos (DONNELLY & POPOVICH, 2008).

A ativação microglial é um dos fatores mais importantes na fase aguda da inflamação, pois são componentes do sistema imune inato residentes no SNC sensíveis a eventos que ocorrem no seu microambiente (LOANE & BYRNES, 2010; KRAFT & HARRY, 2011). Em condição normal de homeostase estão em estado inativo, porém após uma lesão no tecido neural e quebra da homeostase detectam sinais extracelulares, como ATP, proteínas emitidas por células necróticas, DNA, proteases, dentre outros, através de receptores expressos em sua membrana, receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como o receptor Toll-like (TLR), e tornam-se ativas (KRAFT & HARRY, 2011). Portanto, é a primeira linha de defesa contra danos no SNC e as primeiras células a detectarem mudanças na atividade e integridade neuronal, através da sua íntima interação com os neurônios (LOANE & BYRNES, 2010; KRAFT & HARRY, 2011). No estado ativado as micróglia alteram sua morfologia, migram para o local da lesão e fagocitam debris celulares, restos de mielina e elementos tóxicos presentes no microambiente. No entanto, a persistência em seu estado ativado torna suas ações deletérias e contribui para a disfunção tecidual e progresso da neurodegeneração. Essa consequência negativa se deve a interação entre neurônios danificados e hiperatividade microglial, que induz a liberação de uma gama de mediadores citotóxicos pelas micróglia e geram um ciclo de auto propagação perpetuando o processo inflamatório que se torna deletério e causa morte celular (LOANE & BYRNES, 2010). Os mediadores produzidos pelas micróglia, que modulam os danos secundários após a lesão, incluem citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas, óxido nítrico, prostaglandinas, fatores de crescimento e superóxidos. Nesse sentido, a ativação microglial por um curto período é benéfica devido ao seu papel fagocítico para manutenção da homeostase no SNC, porém a sua ativação crônica e sustentada aumenta a produção de fatores citotóxicos que geram maior dano tecidual (LOANE & BYRNES, 2010).

As citocinas são proteínas que naturalmente funcionam como mediadores da comunicação intracelular em situações de homeostase, porém respondem a situações de dano tecidual como mecanismo de defesa (WANG & SHUAIB, 2002; VIDAL et al., 2013), portanto, são importantes mediadores da resposta inflamatória (BETHEA & DIETRICH,

2002). São produzidas e liberadas no local da lesão dentro de poucas horas e induzem vários eventos celulares e moleculares que podem ser neurotóxicas por sua interação com astrócitos, micróglias, monócitos/macrófagos e neutrófilos induzindo a produção de mais citocinas, além de ROS, aminoácidos excitatórios, eicosanóides, COX-2 e iNOS nesses tipos celulares. No entanto, podem também induzir a produção de fatores de crescimento (BETHEA & DIETRICH, 2002).

Poucas horas após a lesão medular ocorre o aumento na produção e liberação de citocinas tanto de perfil pró-inflamatório (como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ) como de perfil anti-inflamatório (como IL-10 e IL-4) (PINEAU & LACROIX, 2007; VIDAL et al., 2013).

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzem a ativação e migração de astrócitos e micróglias, aumentam a permeabilidade vascular permitindo a infiltração de mais leucócitos, além de ativar eventos citotóxicos secundários como produção de radicais livres, ativação de complemento, produção de aminas vasoativas, eicosanóides e de mais citocinas todos esses fatores têm o potencial de amplificar mais ainda a resposta inflamatória (MERRILL & BENVENISTE, 1996; SCHNELL et al., 1999b; PAN et al., 2002).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α é um mediador multifuncional implicado no aumento da permeabilidade das células endoteliais facilitando o recrutamento e ativação de mais leucócitos, perpetuando a inflamação (MAIER et al., 2006), e é um potente mediador da morte celular. Estimula a apoptose por ligação ao seu receptor (TNFR1) levando a ativação de caspase 8 e caspase 3 (AKASSOGLU et al., 1998; HISAHARA et al., 1997). Outro possível mecanismo é a ligação do TNF- α ao seu receptor de membrana ativando NF κ B e sua translocação ao núcleo que promove a expressão de NOS, essa enzima produz excessiva quantidade de NO que gera apoptose pelo estresse oxidativo (LEE et al., 2000). A ativação microglial também é potencialmente induzida por TNF- α . Sua ligação aos receptores de membrana Toll-like (TLRs) nas micróglias ativa NF κ B e sua translocação ao núcleo que provoca a expressão de mais citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, sustentando o processo inflamatório que provoca maior dano (LAWRENCE, 2009). Portanto, após uma lesão no SNC, quando monócitos e micróglias ativadas estão muito próximos de neurônios e oligodendrócitos, a liberação de TNF- α e outras moléculas pró-inflamatórias podem ser citotóxicas a esses tipos de células levando a morte celular (BETHEA & DIETRICH, 2002).

IL-6 também sustenta processos deletérios na inflamação (GRUOL & NELSON, 1997), o seu bloqueio demonstrou ser benéfico após a lesão medular por aumento da sobrevivência neuronal, diminuição dos danos secundários e recuperação locomotora indicando um efeito deletério da IL-6 após a lesão (GUERRERO et al., 2012).

A citocina anti-inflamatória IL-10 também está aumentada após a lesão e influencia no processo regenerativo inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas micróglias (SAWADA et al., 1999) e, assim, limitando os seus efeitos citotóxicos e reduzindo a inflamação (VIDAL et al., 2013). IL-10 ainda inibe monócitos/macrófagos e modula as respostas dos linfócitos e neutrófilos (VIDAL et al., 2013).

Nesse sentido, as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α estão envolvidos na patogênese após um trauma no SNC gerando efeitos deletérios (YANG et al., 2004). Por outro lado, a maior expressão dos mediadores anti-inflamatórios inibe a produção das citocinas pró-inflamatórias e atenuam os seus efeitos negativos (VIDAL et al., 2013).

Os neutrófilos acumulam-se na área da lesão dentro de horas com máxima infiltração 3 dias depois, atingindo um segundo pico muitas semanas após a lesão. Atuam como fagócitos de debris celulares, mas também secretam ROS e RNS, citocinas, quimiocinas e proteases causando maior dano tecidual. Além disso, os neutrófilos convocam macrófagos para a região lesionada na primeira semana após a lesão e sua infiltração é máxima entre 7 a 14 dias pós-lesão. Também tem ação fagocitária e, da mesma forma que os neutrófilos, secretam mediadores que causam toxicidade em neurônios e glias (TRIVEDI et al., 2006).

Nesse contexto, o processo inflamatório após o dano medular tem sido estudado de forma extensiva para que estratégias de tratamento mais eficazes e seguras sejam desenvolvidas com o intuito de modular a neuroinflamação e minimizar a neurodegeneração enquanto proporciona plasticidade e regeneração tecidual (DONNELLY & POPOVICH, 2008).



Figura 8: Esquema dos danos secundários à lesão na medula espinal. Os eventos bioquímicos e celulares que sucedem ao trauma inicial induzem outros eventos secundários formando um ciclo destrutivo e aumento progressivo da lesão pela medula espinal. Perpetuando a neurodegeneração pelo aumento de estímulos à morte celular necrótica e apoptótica, culminando em maior disfunção tecidual. Modificado de KWON et al., 2004.

2.4 Elementos inibitórios da regeneração no SNC

O ambiente externo influencia na habilidade de crescimento intrínseco de neurônios danificados e durante a lesão muitas moléculas exibem efeito inibitório na regeneração axonal. Após a lesão, os axônios mielínicos são danificados e ocorre morte dos oligodendrócitos resultando em debris de mielina que inibem a regeneração (Figura 9). Entre estes, estão arretina, a proteína Nogo-A, glicoproteína da mielina do oligodendrócito (OMgp), glicoproteína associada à mielina (MAG), proteoglicanos como o proteoglicano de sulfato de heparano (HSPG), proteoglicano de sulfato de dermatano (DSPG), proteoglicano de sulfato de keratano (KSPG) e proteoglicano sulfato de condroitina (CSPG) (KWON et al., 2002a; SILVA et al., 2014).

Nogo-A e OMgp estão envolvidos na inibição do crescimento e colapso do cone de crescimento quando se ligam ao seu receptor na membrana dos neurônios (SCHWAB, 2004; WANG et al., 2002). MAG é um forte inibidor da regeneração da substância branca (DOMENICONI et al., 2002). Os proteoglicanos são expressos por astrócitos, precursores de oligodendrócitos e células meningeais e estão envolvidos na formação da cicatriz glial, que exerce uma barreira física e química contra a regeneração (FAWCETT & ASHER, 1999).

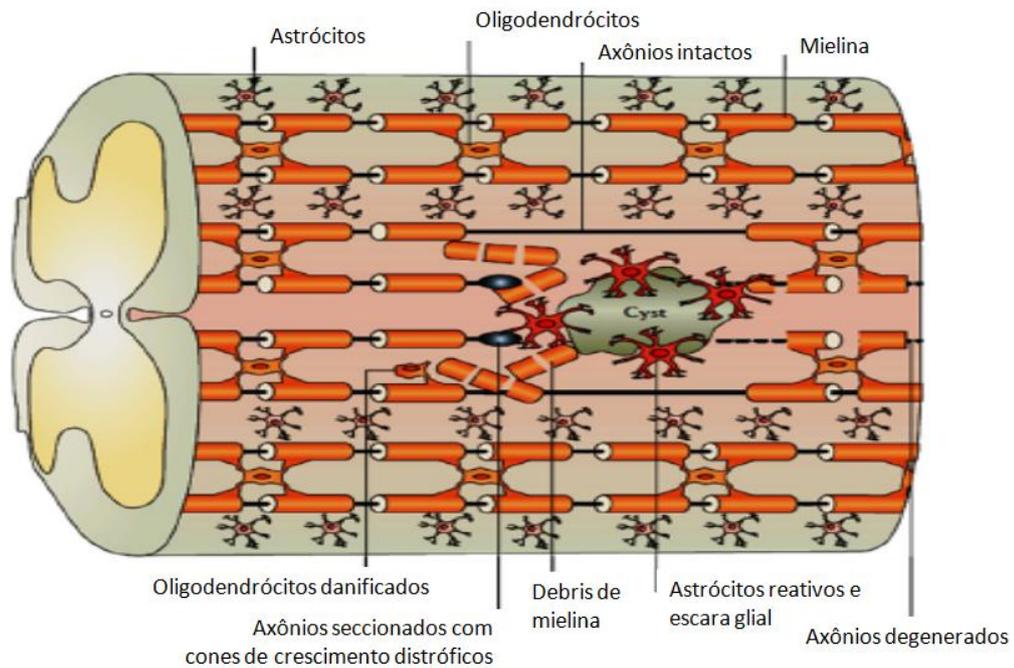


Figura 9: Representação esquemática da lesão na medula espinal e formação de cavidade cística e da cicatriz glial. Modificado de SILVA et al., 2014.

O termo “cicatriz glial”, também denominado "escara glial", se refere a uma reação complexa de interação de diferentes tipos celulares no local da lesão. O centro da lesão é formado por precursores de células gliais e de oligodendrócitos, fibroblastos, células endimárias e macrófagos, enquanto na região de penumbra (ao redor da lesão) é composta por astrócitos reativos que são hipertrofiados (Figura 10). A escara glial serve como uma barreira que preserva as células que ficaram intactas após a lesão contra danos por impedir que a intensa inflamação no centro da lesão se alastre. Contudo, a formação da escara glial cria uma barreira física e molecular que impede a regeneração dos axônios (CREGG et al., 2014).

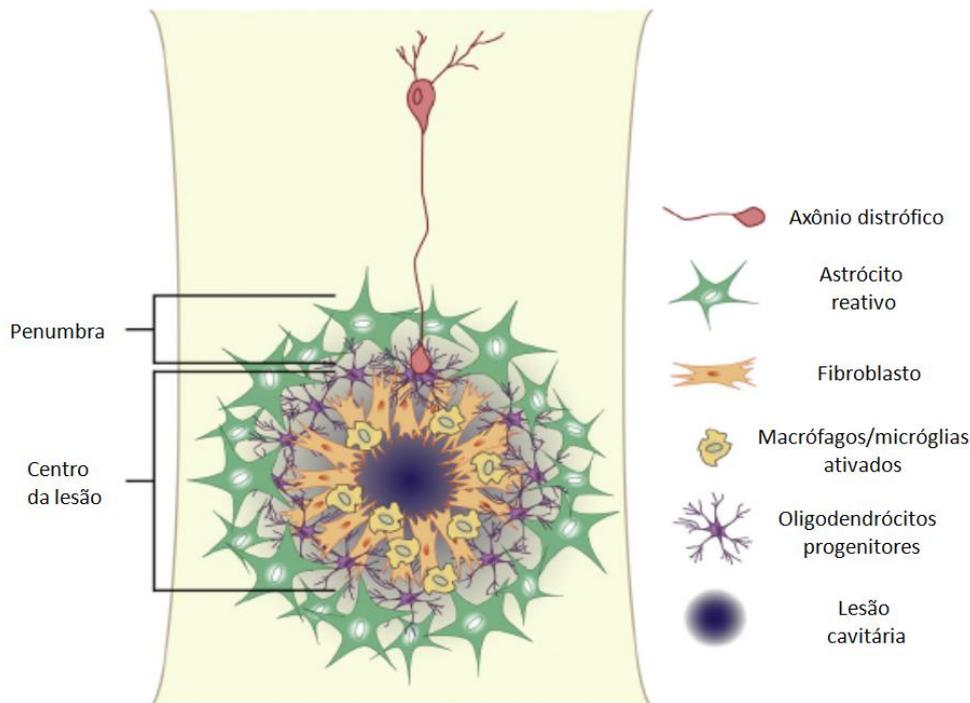


Figura 10: Representação esquemática do centro da lesão traumática na medula e a região de penumbra com as interações celulares que formam a escara glial. Modificado de CREGG et al., 2014.

2.5 Estrogênio: mecanismos de ação celular e função protetora tecidual

Os estrogênios são hormônios esteroides endógeno clássico, que são produzidos principalmente pelas gônadas e em pequena quantidade pela adrenal a partir do colesterol. Os três estrogênios produzidos são a estrona, o estriol e o estradiol (Figura 11), sendo o último o biologicamente mais importante e seu isômero mais ativo é o 17- β -estradiol (E_2) (BEHL, 2002a). E_2 é reconhecido como um hormônio sexual que regula o crescimento, desenvolvimento e a fisiologia do sistema reprodutivo dos mamíferos. Contudo, esse hormônio esteroide também influencia no desenvolvimento, crescimento, diferenciação, maturação e função de outros tecidos, como o nervoso, esquelético, adiposo e cardiovascular (BEHL, 2002a; FORYST-LUDWIG & KINTSCHER, 2010; XING et al., 2009; LEE et al., 2012a).

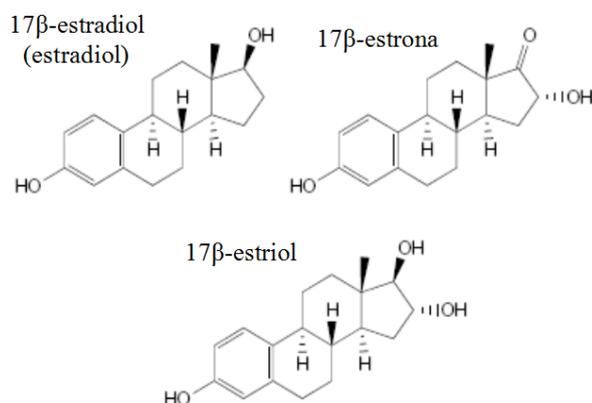


Figura 11: Estrutura química do estradiol, estrona e estriol. São compostos monofenólicos. Modificado de BEHL, 2002a.

O mecanismo molecular das suas ações são mediados por dois tipos de via de sinalização: a via clássica (genômica) que é dependente da ligação do E₂ à uma das duas isoformas de receptores nucleares (ER) ditos clássicos (ER- α e ER- β) e a via de sinalização não clássica (não genômica) (LEE et al., 2012a; SOLTYSIK & CZEKAJ; 2013).

Os receptores ER- α e ER- β da via clássica, pertencem a superfamília de receptores nucleares para hormônios esteroides. Sua ação consiste na ligação do E₂, que é uma molécula lipofílica, a esses receptores no citoplasma. Após translocação desse complexo ao núcleo ocorre dimerização com conseqüente dissociação de proteínas co-repressoras, associadas aos ER's, e associação de proteínas co-ativadoras que permitem a interação com os genes promotores do DNA, denominado elemento responsivo ao estrogênio (ERE), iniciando, assim, a transcrição de respostas apropriadas (Figura 12A). A ação do E₂ dependente de ER ocorre dentro de horas ou dias (NILSSON et al., 2001). Contudo, alguns dos seus efeitos ocorrem em um tempo muito menor do que o requerido para a via clássica de ligação do ER ao DNA. Essas ações rápidas acontecem em segundos a minutos através da ligação do E₂ ao seu receptor de membrana (mER), que está associado a outras proteínas de sinalização de acordo com o tipo celular (como os receptores IGF-1 e EGF, as proteínas Ras e Shc e kinases c-Src e PI3K), formando um complexo que quando ativado pelo E₂ ativa segundos mensageiros e modula vias intracelulares, como as vias da MAPK e PI3K/Akt, que por fim estimulam a transcrição de fatores nucleares (Figura 12B), além de também ativar receptores do fator de crescimento (SOLTYSIK & CZEKAJ; 2013; MORIARTY et al., 2006). O mER é considerado o componente central desse complexo de sinalização intracelular associado à membrana (MORIARTY et al., 2006). Vale ressaltar que, assim como ocorre com outros receptores de membrana, a estimulação crônica do mER provoca sua internalização como forma de mecanismo regulatório para atenuar a estimulação excessiva (SOLTYSIK & CZEKAJ; 2013). Em adição, outra forma de ação rápida do E₂ é por sua ligação ao seu receptor acoplado à proteína G (GPER) que têm sido encontrado na membrana celular, no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi e no núcleo de diversos tipos celulares e tecidos, inclusive no SNC. A ligação do E₂ ao GPER ativa segundos mensageiros, aumentando a concentração de Ca²⁺ e AMPc intracelular que ativa a via PKA/CREB, além da ativação de outras vias como MAPK e PI3K, todas culminam em estimulação da transcrição gênica (SOLTYSIK & CZEKAJ; 2013; MORIARTY et al., 2006).

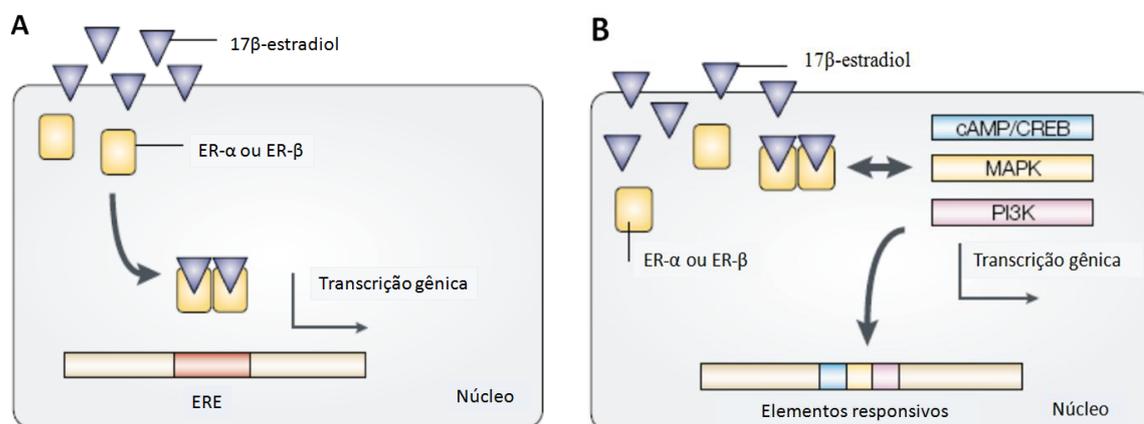


Figura 12: (A) Mecanismo de ação do E₂ na célula através da via genômica e ativação do ERE no DNA. (B) Mecanismo de ação do E₂ na célula através da via não-genômica e ativação de cascatas de sinalização intracelular e por fim estímulo à transcrição gênica no DNA. Modificado de BEHL, 2002a.

Tanto os receptores nucleares como os de membrana para E₂ possuem uma ampla distribuição no organismo, ou seja, são encontrados em tecidos que não estão envolvidos com a reprodução. No entanto, o padrão de distribuição dos receptores (ER- α , ER- β , mER e GPER) difere entre os diversos tipos celulares e o gênero, o que indica ações específicas e diferentes de acordo com o tecido-alvo e uma grande gama de efeitos biológicos (SOLTYSIK & CZEKAJ; 2013; NILSSON et al., 2001).

Por exemplo, está bem estabelecido o efeito protetor conferido pelo E₂ no sistema cardiovascular, principalmente em mulheres antes da menopausa. Diversas evidências mostram que a perda dos hormônios ovarianos está associado com o aumento do risco de doenças cardiovasculares. O que sugere que o E₂ é um hormônio protetor dos vasos sanguíneos (HAGE & OPARIL, 2013). Essa proteção é devido a alguns fatores, como o aumento da secreção de NO pelo endotélio vascular, o responsável por gerar vasodilatação e inibição da agregação plaquetária (SIMONCINI et al., 2003). A maior produção de NO também é observada em monócitos, impedindo a sua adesão celular nos vasos e infiltração nos tecidos, o que evidencia um papel imunossupressor e antiaterogênico (STEFANO et al., 1999). Ademais, há evidências do seu papel anti-inflamatório nos vasos sanguíneos através da inibição do fator nuclear kappa B (NF κ B), que é um promotor da expressão de genes inflamatórios (XING et al., 2009). Além de inibir a hipertensão e doenças associadas, o E₂ também atua nos cardiomiócitos inibindo sua hipertrofia induzida por endotelina-1 e angiotensina II (PEDRAM et al., 2005).

Outros sistemas também são influenciados de forma positiva pelo E₂. No osso é capaz de atenuar o estresse oxidativo, a apoptose de osteoblastos maduros e a osteoblastogênese através de mER, prevenindo a osteoporose (ALMEIDA et al., 2010). Também é importante na regulação da homeostase metabólica, no metabolismo da glicose e dos lipídios, prevenindo diabetes do tipo 2, diminuindo os níveis de glicose plasmática, aumentando a sensibilidade sistêmica à insulina e inibindo a lipogênese, protegendo contra a resistência à insulina e a obesidade (FORYST-LUDWIG & KINTSCHER, 2010).

No SNC supraespinal estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos indicam que o E₂ atua não só no hipotálamo e hipófise, mas também em áreas não relacionadas com a atividade reprodutiva, modulando memória, cognição, estabilidade postural, habilidades motoras finas, humor e afetividade (POZZI et al., 2006). Evidenciando um aprimoramento geral na atividade neuronal induzida pelo E₂, o que sugere o seu envolvimento na manutenção normal da função neuronal. Além disso, muitos desses estudos associam sua participação na diminuição do risco, do surgimento e retardo na progressão ou uma melhor recuperação de muitas doenças neurológicas, traumáticas ou crônicas, e doenças mentais como: disfunção do desenvolvimento (dislexia e autismo), deficiências na neurotransmissão (depressão, anorexia e bulimia), doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica), lesões e traumas (acidente vascular cerebral, epilepsia e trauma crânio-encefálico), disfunções no sistema imunológico (esclerose múltipla) e danos isquêmicos, conferindo neuroproteção (Figura 13) (GARCIA-SEGURA et al., 2001; MANTHEY & BEHL, 2006; POZZI et al., 2006).

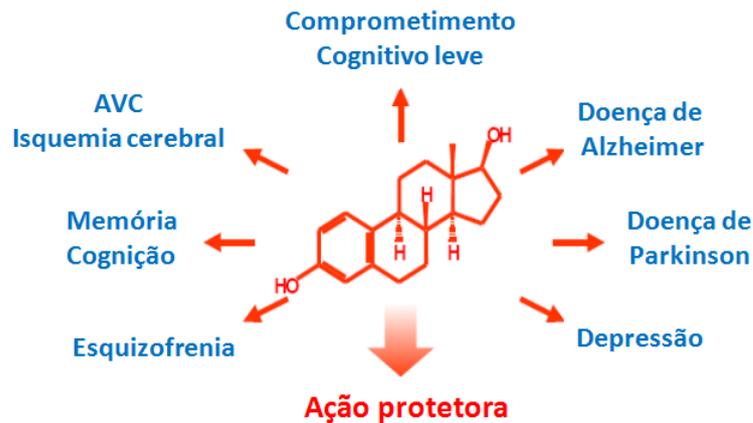


Figura 13: Hipóteses de ações protetoras do E₂ em doenças neurodegenerativas e síndromes psiquiátricas não relacionadas entre si. Modificado de MANTHEY & BEHL, 2006.

O termo neuroproteção não se refere a um único fenômeno, mas engloba uma gama de processos independentes que podem estar associados (GREEN & SIMPKIN, 2000). O E₂ pode diretamente promover sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica e prevenir perda axonal e dendrítica (GARCIA-SEGURA et al., 2001; POZZI et al., 2006). Também é capaz de atenuar diretamente a atividade dos receptores NMDA e AMPA/Kainato modulando a atividade glutamatérgica e protegendo contra a morte celular excitotóxica e mantendo a homeostase de Ca²⁺ e Na⁺ (WEAVER et al., 1997; WONG & MOSS, 1992), aumenta a expressão de fatores de crescimento em neurônios e astrócitos (neurotrofinas como BDNF, NGF, IGF-1, TGFβ) (PEREZ-POLO et al., 1977; CARDONA-GOMEZ et al., 2010; GIBBS, 1999), protege contra a apoptose regulando a expressão de proteínas anti (bcl-2 e bcl-xL) e pró apoptóticas (Bax, bad, bcl-xs) que são importantes reguladores da apoptose (GARCIA-SEGURA et al., 1998; PIKE, 1999), modula a bomba de Na⁺/K⁺ ATPase mitocondrial mantendo a homeostase iônica (ZHENG & RAMIREZ, 1999), tem ação anti-inflamatória atenuando a atividade da NFκB, importante indutor da expressão de citocinas inflamatórias, em células gliais (DODEL et al., 1999) e possui atividade antioxidante inibindo a peroxidação lipídica (MOOSMAN & BEHL, 1999). Sendo que essas diversas ações neuroprotetoras ocorrem por diferentes mecanismos celulares, podendo ser dependentes ou não de ligação do E₂ a ER's nucleares ou de membrana (Figura 14 e 15). Portanto, o efeito protetor do E₂ é multifacetado, induzindo múltiplas ações celulares (GARCIA-SEGURA, 2001; GREEN & SIMPKIN, 2000; BEHL, 2002b).

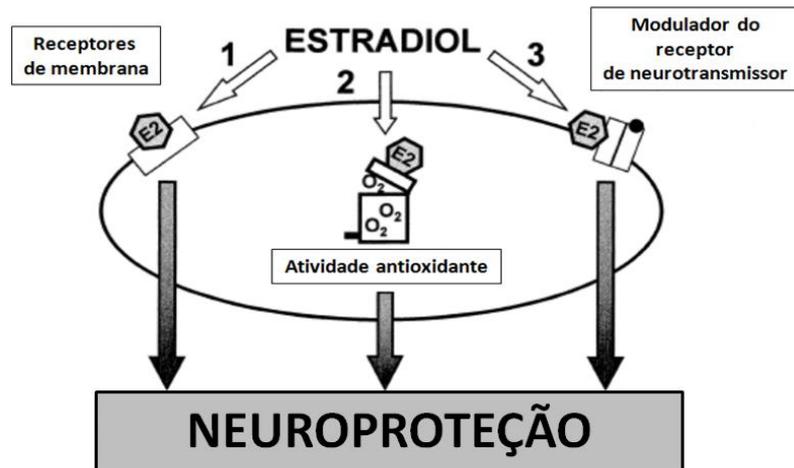


Figura 14: Ações neuroprotetoras do E₂ através da via não clássica/não genômica, independente de receptores nucleares. (1) E₂ age em mER e ativa cascata de sinais intracelulares associados resultando em neuroproteção. (2) Ação antioxidante do E₂ diminuindo ROS e o estresse oxidativo. (3) E₂ pode interagir com receptor de neurotransmissor, como receptores de glutamato, e regular a atividade ionotrópica e metabotrópica. Modificado de GARCIA-SEGURA et al., 2001.

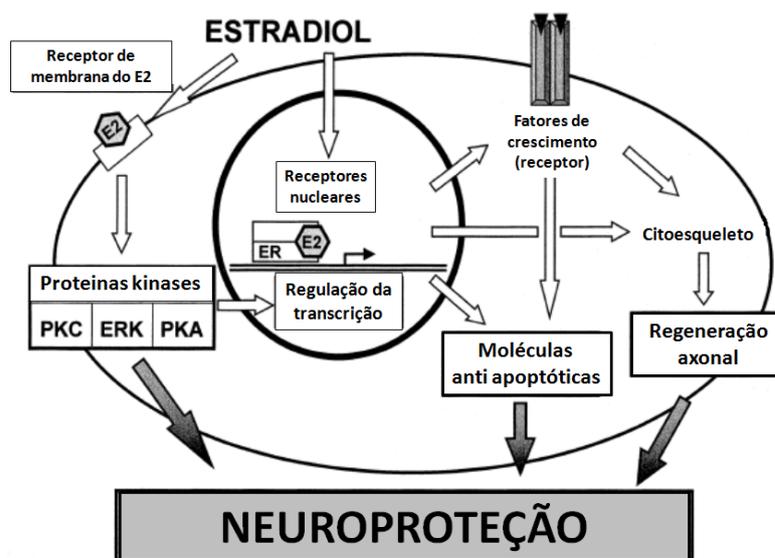


Figura 15: Ações neuroprotetoras da E₂ através da ativação da via genômica/clássica, dependente da ativação de ER nuclear, regulando a transcrição de fatores de crescimento, proteínas do citoesqueleto e moléculas anti apoptóticas, todos esses fatores resultam em neuroproteção. E₂ também pode se ligar a mER e ativas cascata de sinais intracelulares associados à membrana. Modificado de GARCIA-SEGURA et al., 2001.

Estudos *in vitro* mostram que o E₂ é um fator que aumenta a sobrevivência, viabilidade e diferenciação de culturas neuronais primárias. Esses efeitos neuroprotetores *in vitro* são observados contra uma variedade de estressores indutores da morte neuronal, incluindo privação de fatores nutricionais e tróficos, aminoácidos excitatórios (como glutamato) e estresse oxidativo (BISHOP & SIMPKINS, 1994; BEHL et al., 1995; GREEN & SIMPKIN, 2000; WISE et al., 2001). Essa neuroproteção também é evidenciada *in vivo*, em modelos de neurotoxicidade, trauma, isquemia e neurodegeneração (BEHL, 2002a; GARCIA-SEGURA, 2001; AMANTEA et al., 2005).

A propriedade antioxidante do E₂ é bem estabelecida, protegendo os neurônios e glias contra o estresse oxidativo e evitando a peroxidação lipídica da membrana celular, sendo essa ação independente de ativação de ER's devido a sua estrutura fenólica (BEHL et al, 1997). Todavia, esse efeito é observado com altas concentrações desse hormônio (GARCIA-SEGURA, 2001).

Vale ressaltar que Garcia-segura e colaboradores (1999) descreveram um aumento na atividade da enzima aromatase, que sintetiza E₂ a partir da testosterona, em astrócitos reativos após lesão cerebral provocada por ácido cáínico ou lesões físicas, sugerindo a existência de mecanismos fisiológicos que propiciam grande aumento da concentração de E₂ local após um dano neuronal. Além disso, foi descrito um aumento no número de receptores expressos no SNC após lesão isquêmica no córtex cerebral (DUBAL et al., 1999). Esses fatores sugerem que a lesão inicia uma resposta de sobrevivência do SNC aumentando os níveis de E₂ e do seu receptor.

Alguns estudos mostram que altas doses locais de E₂ geram neurotoxicidade em neurônios hipotalâmicos (DES-JARDINS et al., 1995). Indicando que essa neuroproteção pode ser dose-dependente, em que altas concentrações de E₂ podem ser deletérias enquanto baixas concentrações induzem neuroproteção (GARCIA-SEGURA, 2001). A severidade e tipo da lesão e a via de administração são importantes para determinar a concentração hormonal requerida para contrabalancear a lesão (GARCIA-SEGURA, 2001; GREEN & SIMPKIN, 2000).

Em suma, a exposição ao E₂ tem demonstrado melhorar a viabilidade de células neuronais em condições tóxicas e deletérias ao SNC tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Inclusive em modelos de estresse neuronal e neurodegeneração (GREEN & SIMPKIN, 2000; GARCIA-SEGURA, 2001; AMANTEA et al., 2005).

2.6 Estrogênio e lesão medular: evidências de neuroproteção espinal

Estudos epidemiológicos evidenciam que as mulheres apresentam uma recuperação locomotora após um dano medular mais eficiente que os homens (SIPSKI et al., 2004), surgindo a hipótese de que o hormônio feminino E₂ estaria influenciando nessa recuperação. De fato, alguns estudos estão investigando a participação do E₂ na melhora da função locomotora em modelos de lesão medular e os resultados corroboram com essa hipótese.

Yune e colaboradores (2004) foram os pioneiros a investigar o efeito do E₂ na lesão medular. Evidenciaram que o pré-tratamento associado ou não ao pós-tratamento da lesão medular em ratos machos com uma única dose suprafisiológica de E₂ promoveu recuperação locomotora em ratos machos e diminuição da apoptose na medula. Posteriormente, evidenciaram que o E₂ induziu aumento na expressão de bcl-2, uma proteína anti apoptótica, e postularam que a redução da apoptose neuronal seria, em parte, mediada através da ativação da via intracelular de segundos mensageiros CREB/PI3K/Akt que induz a expressão de bcl-2 (YUNE et al., 2008). Outro grupo também evidenciou aumento de bcl-2, além de diminuição na expressão de Bax, induzida pelo tratamento com E₂ prévio à lesão, associado à diminuição do grau de lesão na medula (CUZZOCREA et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que morte celular na medula também pode ser atenuada pelo E₂ através da inibição da calpaína (SRIBNICK et al., 2006)

O efeito da reposição hormonal com E₂ na lesão medular em ratas na pré e pós-menopausa, intactas ou ovariectomizadas em ambos os modelos, demonstrou efeito neuroprotetor por promover recuperação locomotora, preservar a substância branca e reduzir a apoptose neuronal em todos os casos (CHAOVIPOCH et al., 2006).

Além disso, o E₂ demonstrou efeito anti-inflamatórios na lesão medular. O tratamento com E₂ prévio à lesão em roedores foi capaz de reduzir o edema, a infiltração de neutrófilos, a

expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), iNOS, nitrotirosina e COX-2, elementos que participam do processo inflamatório e geração dos danos secundários. Ainda, todos esses efeitos anti-inflamatórios do E₂ foram atenuados com a administração de um antagonista do seu receptor, indicando que esses efeitos protetores podem ser mediados, em parte, pela ativação do receptor pelo E₂ (CUZZOCREA et al., 2008). A administração do E₂ após a lesão, também evidenciou efeito anti-inflamatório reduzindo a ativação da via do NF κ B e o edema, associado a menor degeneração da mielina (SRIBNICK et al., 2005). O mesmo grupo avaliou a participação do E₂ na lesão medular crônica que diminuiu a ativação astrogliar e de micróglia/macrófagos, freando a inflamação, além de ter efeito na melhora da capacidade locomotora e diminuição do dano axonal (SRIBNICK et al., 2010).

Devido a estrutura fenólica do E₂ este hormônio possui atividade antioxidante, com o potencial de recolher radicais livres que são citotóxicos quando em grande quantidade, como ocorre após a lesão medular. Mosquera e colaboradores (2014), através de um implante subcutâneo liberando E₂ continuamente, colocado previamente à lesão, observaram grande redução de ROS dois dias após a lesão que foi acompanhado de melhora locomotora e redução do dano tecidual (MOSQUERA et al., 2014).

Nesse sentido, o E₂ influencia de forma positiva em vários eventos secundários após a lesão medular reforçando seu papel neuroprotetor no SNC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito agudo do E₂ (Cipionato de estradiol) no modelo de lesão medular por compressão em ratas ovariectomizadas (OVX).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar se o E₂ (Cipionato de estradiol) altera a **capacidade locomotora** após a lesão medular por compressão em ratas OVX;
- ✓ Avaliar se o E₂ (Cipionato de estradiol) interfere na **severidade do trauma medular** analisado pela morfologia do parênquima medular e quantificação da extensão da lesão;
- ✓ Avaliar se o E₂ (Cipionato de estradiol) atenua a inflamação, após a lesão medular, interferindo na expressão gênica de **citocinas pró** (TNF- α e IL-6) e **anti-inflamatórias** (IL-10);

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Utilizamos ratas fêmeas da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, pesando 250 gramas, sendo mantidos em ciclo de claro/escuro de 12 horas, em temperatura constante, com água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas nacionais e internacionais de uso de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Nº do protocolo 23083.003385/2014-01).

4.2 Desenho experimental

Inicialmente as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Após uma semana, esses animais foram submetidos à lesão medular espinal moderada por compressão ou lesão *sham*, sendo que um dia antes da lesão todos os animais foram avaliados pelo teste comportamental BBB (Tabela 3). Quinze minutos após a cirurgia de lesão medular os animais receberam uma única dose (100 µg/Kg) de E₂ (Cipionato de estradiol) por via subcutânea. O teste comportamental BBB foi realizado nos dias 1, 4, 7, 10 e 14 após a lesão compressiva. Parte desses animais foi perfundida para a análise da severidade das lesões através da análise histopatológica, outra parte dos animais foi eutanasiada, 14 dias após a lesão, e as suas medulas coletadas para detecção da expressão gênica de interleucinas pró (TNF-α e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) pela técnica do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) (Figura 16).

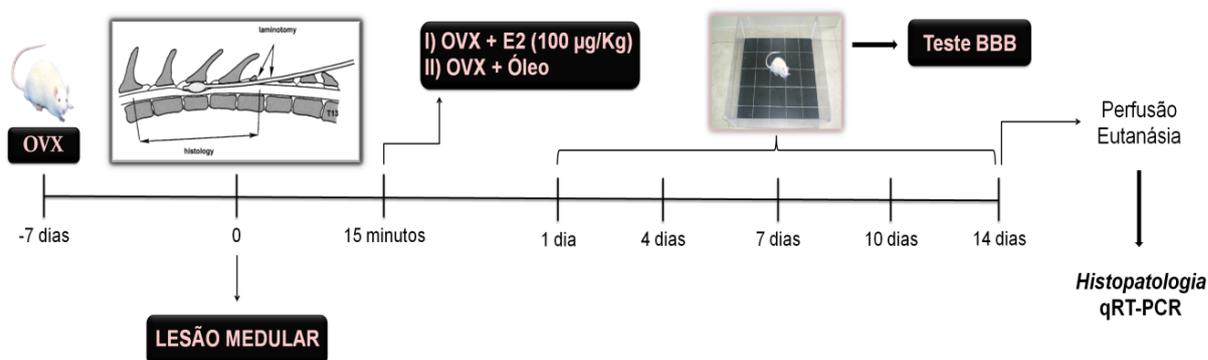


Figura 16: Esquema ilustrativo do desenho experimental. Procedimentos metodológicos realizados em relação ao tempo experimental.

4.2.1 Avaliar se uma única dose de E₂ (100 µg/Kg) melhora a capacidade locomotora de ratas OVX submetidas à lesão medular por compressão moderada.

Ratas OVX foram submetidas à lesão medular espinal por compressão moderada, sendo administrado 100 µg/Kg de E₂ (Cipionato de estradiol) ou veículo por via subcutânea 15 minutos após a cirurgia de lesão medular. A avaliação da capacidade locomotora foi então analisada no 1º, 4º, 7º, 10º e 14º dias após a lesão através do teste BBB.

4.2.2 Avaliação histopatológica para determinar se o E₂ altera a severidade da lesão de ratas OVX submetidas à lesão medular por compressão moderada.

No 14º dia, após a análise do comportamento locomotor, as ratas foram submetidas à perfusão transcardíaca e suas medulas coletadas e analisadas por histopatologia para determinar se o E₂ altera a severidade da lesão medular espinal.

4.2.3 Avaliar se o E₂ atenua a inflamação no local da lesão de ratas OVX submetidas à lesão medular por compressão moderada.

Outro grupo de animais submetidos a avaliação do comportamento locomotor, foram eutanasiados por decapitação no 14º dia pós lesão e suas medulas coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e processadas para avaliação da expressão gênica de citocinas de perfil pró-inflamatório, IL-6 e TNF- α , e perfil anti-inflamatório, IL-10, através do qRT-PCR.

4.3 Procedimentos cirúrgicos

4.3.1 Ovariectomia bilateral (OVX)

As ratas inicialmente foram anestesiadas com ketamina (75 mg/Kg, Ventil®) e xilazina (25 mg/Kg, Syntec®) administrados por via intraperitoneal. Em plano anestésico, foi feita tricotomia bilateral na região do flanco e em seguida antissepsia com iodopovidona na região tricotomizada. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele e na musculatura do flanco obtendo acesso à cavidade abdominal. Em seguida, com uma pinça anatômica de dissecação o ovário foi exposto, ligado com fio de sutura e extirpado. Por fim, a musculatura e pele foram suturadas em camadas anatômicas. O mesmo procedimento foi realizado na região contralateral. No pós-operatório foi feita a administração profilática de antibiótico (pentabiótico 40.000 UI/Kg, Fort Dodge®) por via intramuscular e os animais mantidos em ambiente aquecido para recuperação e retorno do plano anestésico.

4.3.2 Lesão medular por compressão

Uma semana após a cirurgia de ovariectomia bilateral, as ratas OVX foram submetidas a um novo procedimento cirúrgico para gerar a lesão medular espinal. Para tal, utilizamos uma adaptação do modelo desenvolvido por Vanický *et al* (2001). De início os animais foram anestesiados com ketamina (75 mg/kg, Ventil®) e xilazina (25 mg/kg, Syntec®) administrados por via intraperitoneal. Em plano anestésico, foi feita tricotomia extensa do dorso, na região das vértebras torácicas, seguida de antissepsia com iodopovidona na região tricotomizada. Com um bisturi foi realizada uma incisão longitudinal na pele, na linha média do dorso, de aproximadamente 3 a 4 cm sobre os processos espinhosos de T7 a T11. Posteriormente, a musculatura inserida nos processos espinhosos de T7 a T11 foi dissecada e com a ajuda de um afastador o animal foi estabilizado na mesa cirúrgica, possibilitando desta forma a abertura de um pequeno orifício de 2 mm de diâmetro na região cranial do processo espinhoso T11 com o auxílio de uma furadeira dental. Com a dura-máter intacta, foi introduzido através do orifício no espaço epidural a ponta de um cateter de embolectomia sendo avançado cranialmente por 1 cm, para que o centro do balão ficasse entre T8 e T9. Para esse procedimento foi utilizado o cateter Fogarty 2F (Edwards Lifesciences®) conectado a uma microseringa Hamilton de 50 μ l, ambos previamente preenchidos com solução salina 0,9%. Com o cateter posicionado corretamente, o balão foi inflado com um volume definido de 15 μ l de solução salina durante 5 minutos (Figura 17). Após este período o balão do cateter

foi desinflado e removido cuidadosamente seguido de sutura do tecido muscular e a pele em camadas anatômicas. Gerou-se, assim, uma lesão medular espinal de gravidade intermediária.

No pós-operatório foi feita a administração de uma dose profilática de antibiótico (pentabiótico, 40.000 UI/kg, Fort Dodge®) por via intramuscular e 5 ml de uma solução de dextrose e salina administrado por via subcutânea. Os animais foram mantidos em ambiente aquecido para recuperação e retorno do plano anestésico e duas horas após a cirurgia foi feita a administração do analgésico Fentanil (0,032 mg/kg) por via subcutânea. Os animais submetidos à lesão medular por compressão foram mantidos por, no máximo, 14 dias.

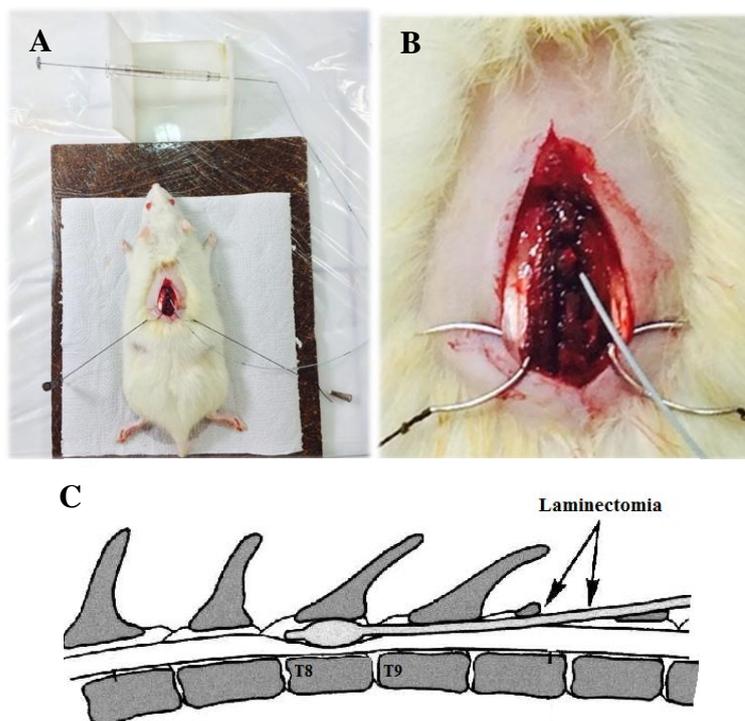


Figura 17: Cirurgia de lesão medular por compressão. (A e B) Fotografia da rata anestesiada sendo submetida à compressão da medula espinal através da inflação do balão do cateter forgaty do tipo 2 de embolectomia. (C) Posição do balão do cateter em relação as vértebras durante a compressão medular. (A e B) Fotografia tirada pela autora. (C) Modificado de VANICKÝ et al., 2001.

4.4 Tratamento com E_2

Quinze minutos após a cirurgia de lesão medular espinal compressiva foi administrado em cada animal uma única dose na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de E_2 (Cipionato de estradiol, Pfizer®) em veículo (óleo de soja), por via subcutânea. A dose e o tempo de administração foram adotadas de acordo com estudos prévios (YUNE et al., 2004; SAMANTARAY et al., 2011).

Em cada um dos experimento os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

- I. TRATADO (OVX+ E_2): Os animais deste grupo foram tratados com uma dose de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de E_2 por via subcutânea 15 minutos após a lesão medular por compressão;
- II. CONTROLE (OVX+ÓLEO): Os animais deste grupo foram tratados com veículo (óleo de soja) por via subcutânea 15 minutos após a lesão medular por compressão;
- III. FALSA LESÃO (OVX+SHAM): Os animais deste grupo não foram submetidos à lesão medular, sendo feita somente a incisão de pele e laminectomia, e não receberam nenhum tratamento.

4.5 Teste BBB: Avaliação funcional da capacidade locomotora

Avaliação do comportamento locomotor é uma medida importante de recuperação funcional a longo prazo após a lesão medular espinal.

O teste BBB foi desenvolvido pelos pesquisadores Basso, Beattie e Bresnahan a fim de estudar a sequência de padrões de recuperação locomotora e leva em consideração as fases iniciais (escore BBB 0-7), intermediárias (escore BBB 8-13) e tardias (escore BBB 14-21) de recuperação (BASSO et al., 1995). Serve como uma importante ferramenta para avaliar a eficácia terapêutica de várias drogas e tipos de tratamento para ratos submetidos à lesão medular espinal, sendo utilizado para a avaliação funcional da capacidade locomotora. Qualquer tratamento capaz de aumentar o escore BBB pode ser considerado neuroprotetor nesse modelo animal.

A avaliação da recuperação locomotora foi realizado através do teste BBB desenvolvido por Basso, Beattie e Bresnahan (BASSO et al., 1995). O procedimento consistiu na observação dos animais por dois pesquisadores, treinados para a realização do teste, que eram cegos ao experimento e desconheciam, portanto, os animais e os respectivos tratamentos. Estes atribuíram escores de acordo com a escala funcional BBB (Tabela 3) apenas para a movimentação de cada membro traseiro, e o escore de cada animal foi atribuído através da média aritmética das patas direita e esquerda.

Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto, uma caixa de acrílico transparente de 80 X 80 X 30 cm com fundo forrado de material antiderrapante na cor preta, subdividido em 25 quadrantes iguais (16 cm² cada). No campo aberto os animais podiam movimentar-se livremente, sendo observados pelos pesquisadores durante quatro minutos (Figura 18).

De acordo com a escala de avaliação funcional, os escores BBB atribuídos seguiram uma escala de zero a 21, em que 21 indica uma locomoção executada de forma plena e zero indica nenhum movimento espontâneo no membro posterior. Os critérios de avaliação deste teste consideram: movimentações de articulações (quadril, joelho e tornozelo); se há somente apoio da pata ou passo plantar durante a marcha; analisa se o movimento ocorre com ou sem suporte de peso e se há coordenação entre as patas dianteiras e traseiras; avalia a posição das patas traseiras em relação ao tronco durante a locomoção; verifica se há liberação dos dedos (analisando, por esse parâmetro, os movimentos finos de controle voluntário); além da análise da movimentação da cauda e da estabilidade do tronco durante a locomoção nos estágios finais de recuperação.

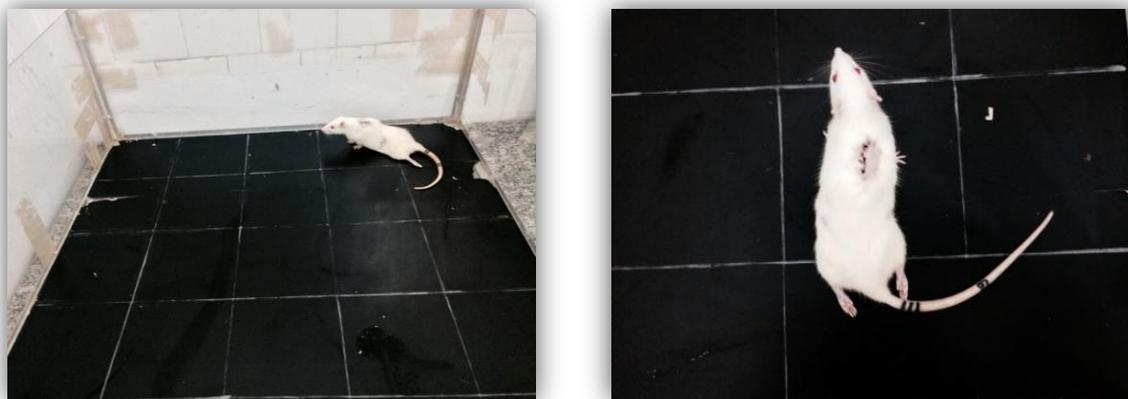


Figura 18: Animais sendo submetidos ao teste BBB no campo aberto. Fotografia tirada pela autora no Departamento de Ciências Fisiológicas na UFRRJ.

Tabela 3: Escala BBB de 21 pontos e definições operacionais de categorias e atributos para avaliação da capacidade locomotora dos membros posteriores de ratos após a lesão medular. BASSO et al., 1995.

Escore	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou de duas articulações, geralmente do quadril ou joelho
2	Movimento extenso de uma articulação e discreto na outra
3	Movimento extenso nas duas articulações e nulo na terceira
4	Movimento discreto das três articulações do membro posterior
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente na fase de apoio (ex. quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com o suporte de peso e nenhuma passada plantar
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
11	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
12	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior
13	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior
14	Passo plantar com suporte de peso consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externa) durante a locomoção, no contato inicial com a superfície e antes de liberar os dedos na fase final de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com frequente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodado no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com frequente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodado no instante da liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos e apresenta cauda para baixo em parte do tempo ou o tempo todo.
20	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos com consistente elevação da cauda e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, consistente liberação dos dedos, posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda fase de apoio, estabilidade consistente do tronco e consistente elevação da cauda.

4.6 Perfusão transcárdíaca

Quatorze dias após a lesão medular espinal os animais destinados à análise da severidade da lesão medular (histopatologia) foram submetidos à perfusão intracárdíaca. Para tal, as ratas foram anestesiadas profundamente com thiopental sódico (50 mg/Kg, Cristalia®) por via intraperitoneal e o procedimento era iniciado assim que o animal entrava em plano anestésico, verificado pela ausência de reflexos musculares e corneanos.

O animal foi posicionado em decúbito dorsal sendo realizada a abertura da caixa torácica através de uma incisão na pele e em seguida na musculatura na região do processo Xifóide, prosseguindo com a incisão para ambos os lados do gradil costal desarticulando todas as costelas. Em seguida, o diafragma foi incisado expondo toda a cavidade torácica e o coração. Uma agulha romba conectada a uma bomba peristáltica através de um cateter, foi inserido no ápice do ventrículo esquerdo sendo posicionada na entrada da artéria aorta ascendente, seguida de uma incisão do átrio direito e por fim ligou-se a bomba peristáltica.

Neste procedimento, foi infundido 300 ml de solução salina 0,9% com heparina (Eurofarma®, 5000 UI/ml - 0,1 ml heparina/1000 ml de solução salina) por aproximadamente 10 minutos, seguida de 700 ml de Paraformaldeído a 4% em tampão fosfato pH 7,4 a 4°C durante 20 minutos em cada animal.

Logo após o término da perfusão, a região da medula espinal que continha o sítio da lesão e as penumbras cranial e caudal foi retirada cuidadosamente do canal vertebral e pós-fixadas por 4 horas na mesma solução de perfusão. Passado esse tempo, as medulas espinais foram armazenadas em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato de sódio (PBS) sob refrigeração a 4°C até o momento do corte histológico.

4.7 Histopatologia: Análise da severidade do trauma medular

As medulas espinhais contendo o epicentro da lesão e as porções cranial e caudal à lesão (1,5 cm de comprimento) foram coletadas para avaliação da severidade da lesão medular.

As medulas foram embebidas em parafina e, posteriormente, em um micrótomo foram feitos cortes longitudinais com uma espessura de 5 µm. A cada corte disposto em lâmina 40 µm de tecido subsequente foi desprezado até o próximo corte. Assim, para cada medula foram feitos 16 cortes, sendo 2 cortes por lâmina num total de 8 lâminas, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Destes, selecionamos cortes seriados, os primeiros cortes das lâminas 3, 4, 5 e 6, num total de 4 cortes representativos por medula. Os 4 cortes selecionados foram, posteriormente, analisados em microscópio óptico (Nikon®).

Esses cortes representativos foram fotografados através do programa de captura ImagePro conectado ao microscópio óptico (Nikon®) na objetiva de 10 vezes. As fotografias de cada corte foram montadas através do programa Adobe Photoshop e posteriormente analisadas no programa Image J. Foi realizada a análise quantitativa da lesão, para isso a régua de calibração de 1 mm do microscópio óptico na objetiva de 10 vezes foi calibrada no programa Image J. Em seguida, foram mensurados o comprimento, a largura e a área total da lesão de cada medula. Sendo a média, de cada mensuração, dos quatro cortes de cada animal utilizada para análise estatística.

Na mensuração do comprimento, foram considerados limites da lesão as bordas mais afastadas a partir do centro da lesão no sentido craniocaudal da medula, a extensão foi delimitada por uma linha horizontal. A determinação da largura da lesão foi realizada em forma de porcentagem, para isso foi mensurado a largura total do corte, delimitada por uma linha vertical a partir da borda superior do corte até a borda inferior do corte, e a largura da lesão, delimitada por uma linha vertical da borda superior da lesão até a borda inferior da

lesão, ambas mensuradas na região onde fica a metade do tamanho do comprimento da lesão. Em seguida, foi determinada a porcentagem da largura da lesão realizando a proporção entre a largura do corte e a largura da lesão, considerando o valor da largura do corte como 100% e, desta forma, determinou-se a quantidade proporcional de tecido danificado no sentido laterolateral da medula. Para a mensuração da área total da medula as bordas da lesão intensivamente coradas por HE e sem interrupções no tecido foram consideradas como limite da lesão e a delimitação da área foi feita por toda a extensão da borda da lesão (Figura 19).

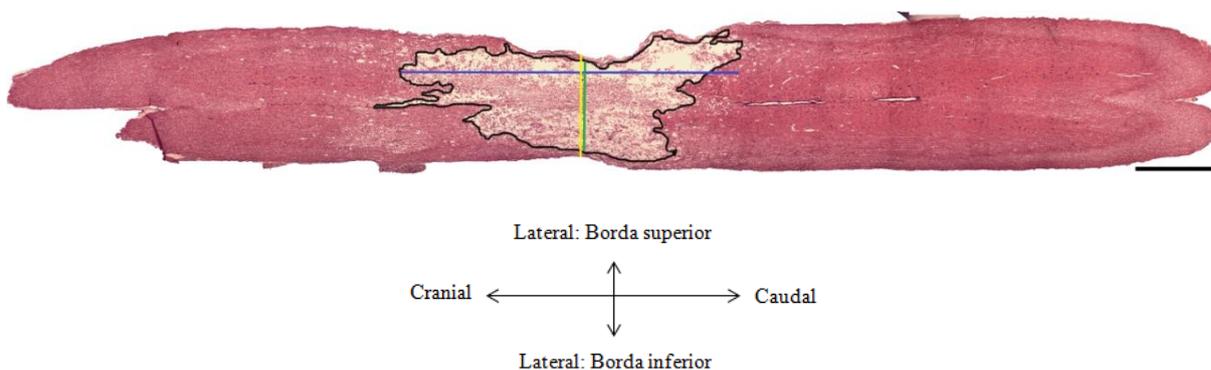


Figura 19: Corte longitudinal da medula (5 μm de espessura e 1,5 cm de comprimento) contendo a lesão e coradas com HE. As mensurações quantitativas do comprimento (em azul), da altura (do corte, em amarelo; da lesão, em verde) e da área total da lesão (em preto) de cada corte foram realizadas no programa Image J e a média dos quatro cortes por animal para cada mensuração foi utilizada na análise estatística. Barra de calibração = 1 mm. As setas indicam as direções das mensurações realizadas na região da lesão no tecido.

4.8 qRT-PCR para interleucinas pró e anti-inflamatórias: Avaliação da inflamação no sítio da lesão medular

No intuito de avaliar se o E₂ interfere no processo inflamatório no local da lesão na medula espinal, foi realizada a técnica de qRT-PCR para detecção da expressão gênica de citocinas de perfil pró-inflamatório, TNF- α e IL-6, e anti-inflamatório, IL-10.

Para melhor compreender se o E₂ estaria atuando somente de forma aguda na inflamação ou por um período mais prolongado, medulas espinais lesionadas foram coletadas 6 horas, 24 horas e 14 dias após a lesão para análise da expressão destas citocinas. Entretanto, no presente trabalho só serão apresentados os resultados preliminares da expressão gênica dessas citocinas das medulas coletadas no 14º dia pós lesão.

Nesse sentido, uma parte das ratas OVX submetidas à lesão medular compressiva e tratadas com E₂ ou veículo foram eutanasiadas 6 horas, outra parte 24 horas e os demais 14 dias após a lesão. A eutanásia para coleta da medula espinal foi realizada sob condições estéreis e em local *RNAase free*, para tal todo material utilizado foi autoclavado e a bancada de experimentação foi esterilizada com álcool a 70% preparado com água destilada autoclavada. A eutanásia foi realizada por decapitação, em seguida foi feita a retirada da pele por completo do dorso além dos resquícios de pelos que por ventura ficaram em contato com a musculatura. Posteriormente, toda a musculatura ao redor das vértebras espinhais foi dissecada e cada vértebra foi cuidadosamente desarticulada e retirada para exposição da medula espinal, seguida de incisão das raízes dorsais e ventrais. A região da medula com o sítio da lesão, aproximadamente 1 cm, foi retirada, acondicionada em tubos tipo Eppendorf e imediatamente congelada em nitrogênio líquido (-196 °C). Após esse procedimento, as medulas foram mantidas a -80°C para posterior processamento em duas etapas:

1) Obtenção do RNA e síntese de cDNA:

As amostras de medula com o sítio da lesão foram homogeneizadas em 1 mL do reagente Trizol e em seguida incubadas por 5 minutos a 15-30 °C (bancada). A cada 1 mL de Trizol, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e em seguida os tubos foram agitados com a mão por 15 segundos e incubados a 15-30 °C de 2 a 3 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos a 2-8 °C, observando-se após esse período a separação da mistura em três partes. A fase aquosa superior foi separada e transferida para um novo tubo onde foram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico para a precipitação do RNA da amostra. Em seguida as amostras foram incubadas a 15-30 °C durante 10 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 2-8 °C. O RNA precipitado foi então diluído em 20 µL de água DEPC e quantificado no Nanodrop (Thermo Scientific, USA). A partir de amostras equivalentes em 500 ng de RNA, sintetizamos cDNA utilizando-se SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA), na presença de primer randômico, de acordo com a recomendação do fabricante.

2) PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR):

Para as análises de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real, foram utilizadas amostras de 100 ng de cDNA diluídas em Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), no sistema ABI PRISM 7500 FAST RealTime PCR System (Applied Biosystems, USA). O qPCR foi realizado a 95 °C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. A expressão constitutiva de RPL-13 foi utilizada para verificar a uniformidade das amostras utilizadas. A especificidade dos produtos do PCR foi analisada através da curva de dissociação. Os dados foram analisados por ABI Prism SDS v1.3.1 “software”. Todos os primers foram desenhados utilizando-se Primer Express 3.0 specific for 7500 FAST Real Time PCR System:

IL-6 - *forward primer* 5'-CCCACCAGGAACGAAAGTCA-3'

reverse primer 5'-ACTGGCTGGAAGTCTCTTGC-3'

TNF- α - *forward primer* 5'-TGTCTACTGAACTTCG GGGT-3'

reverse primer 5'-TCCACTTGGTGGTTTGCTAC-3'

IL-10 - *forward primer* 5'-GGTGACAATAACTGCACCCA-3'

reverse primer 5'-GGCAACCCAAGTAACCCTT A-3'

RPL-13 - *forward primer* 5'-ACAAGAAAATGGCACGCACC-3'

reverse primer 5'-CCAGCCGCGCATTATTTCTT-3'.

Os níveis de expressão gênica relativos foram calculados a partir do método de análise comparativa Ct (2- Δ CT).

4.9 Análise estatística

A capacidade locomotora foi avaliada pelo escore do teste comportamental (BBB) e as médias entre os grupos expressas como média \pm erro padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, admitindo-se os fatores grupo, tempo e interação. Posteriormente, foi executado o pós-teste de Bonferroni e a diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

Na avaliação histopatológica, foram calculadas as médias dos quatro cortes histológicos de cada animal para cada mensuração (comprimento, altura e área total da lesão). O teste t-Student não pareado paramétrico foi utilizado na análise estatística e a diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

Posteriormente foi realizado uma regressão linear entre as médias da área total da lesão, analisadas através da histopatologia, e a capacidade locomotora.

As concentrações das citocinas foram expressas como média \pm erro padrão. O teste t-Student não pareado paramétrico foi utilizado na análise estatística e a diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas e as apresentações gráficas dos resultados foram obtidas pelo programa GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito de uma única dose de E_2 (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) na capacidade locomotora de ratas OVX submetidas à lesão medular espinal por compressão moderada.

A Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores grupo (OVX+E₂, OVX+óleo e OVX+sham), tempo (1, 4, 7, 10 e 14 dias após a lesão) e interação (Tabela 4).

Tabela 4 : Resultados estatísticos - Anova de duas vias para medidas repetidas na avaliação da capacidade locomotora (teste BBB) doas animais do grupo OXV+E₂, OVX+óleo e OVX+sham.

Grupo	$F_{(2,192)} = 293,8$	$P < 0,0001$
Tempo	$F_{(4,192)} = 49,88$	$P < 0,0001$
Interação	$F_{(8,192)} = 10,36$	$P < 0,0001$

Os resultados do comportamento locomotor demonstram que um dia após a lesão medular por compressão os animais apresentaram baixos escores BBB, verificado na média do escore tanto no grupo OXV+E₂ ($0,1591 \pm 0,05082$) como no grupo OVX+óleo ($0,1200 \pm 0,04359$). Esses valores configuram paraplegia ou paresia significativa dos membros posteriores, ou seja, os animais não demonstraram movimentos espontâneos ou apresentaram apenas movimento discreto de uma ou duas articulações dos membros posteriores um dia após a lesão. O grupo OVX+sham apresentou uma locomoção normal em todos os tempos analisados ($21,0 \pm 0$).

O pós teste de Bonferroni detectou que o grupo OXV+E₂ apresentou escore BBB significativamente maior no 10° ($6,568 \pm 0,4633$) e 14° ($8,000 \pm 0,6505$) dia após a lesão em comparação ao grupo OVX+óleo (10° dia, $4,360 \pm 0,5224$; 14° dia, $5,720 \pm 0,4891$) (Figura 20). Isso indica uma recuperação locomotora significativamente superior dos animais do grupo OXV+E₂ a partir do 10° dia após a lesão medular (Tabela 5). Como esperado, também foi detectado que o grupo OVX+sham obteve escore máximo ($21,0 \pm 0$) e significativamente maior em todos os tempos após a lesão em comparação ao grupo OVX+óleo e ao grupo OXV+E₂.

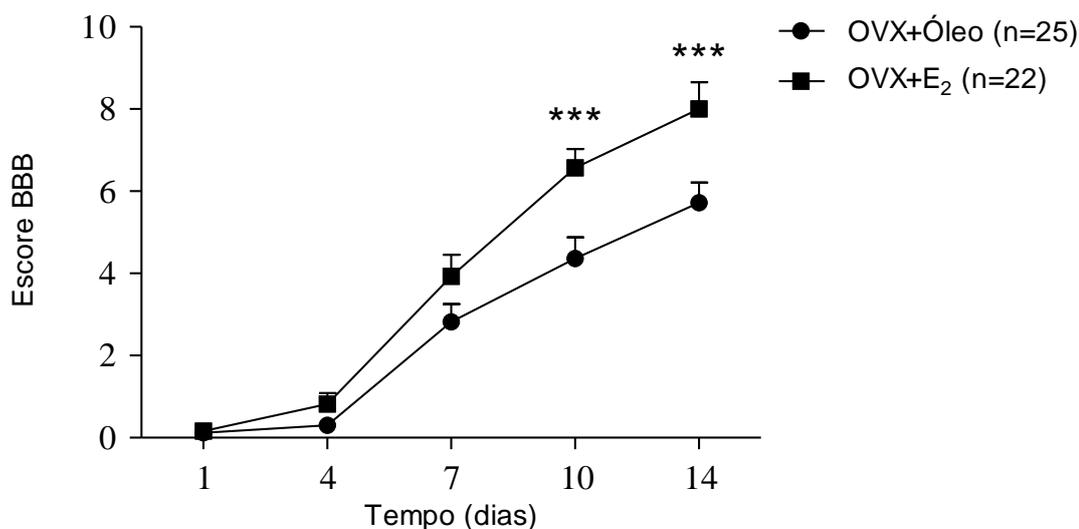


Figura 20: Efeito de uma dose única de E₂ (100 µg/Kg) na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos ovx submetidas à lesão medular por compressão moderada. Ratos Wistar OVX foram submetidas à uma única administração de 100 µg/Kg de E₂ (OVX+E₂, n=22) ou óleo (OVX+óleo, n=25) 15 minutos após a lesão medular por compressão moderada. Valores são apresentados como média ± erro padrão. Pós teste Bonferroni, P<0,05. *** indica que o grupo OVX+ E₂ apresentou escore BBB significativamente maior que o grupo OVX+óleo no 10º (P<0,001) e no 14º (P<0,001) dia após a lesão medular por compressão. Os animais do grupo OVX+sham (n=5) foram submetidos apenas a laminectomia e obtiveram média de escore BBB significativamente maior em comparação ao OVX+E₂ e ao OVX+óleo em todos os tempos (P<0,001) e não estão representados no gráfico.

Tabela 5: Resultado estatístico do pós teste Bonferroni na capacidade locomotora (teste BBB) do grupo OVX+E₂ (n=22) e do grupo OVX+óleo (n=25). O grupo OVX+sham apresentou escores significativamente maiores (p<0,001) em comparação ao grupo OVX+E₂ e ao grupo OVX+óleo e não são apresentados na tabela. São apresentados valores da média ± erro padrão e valores de P na comparação do grupo OVX+E₂ com o OVX+óleo.

Dias após a lesão	OVX+óleo	OVX+E ₂	Valor de P
1	0,1200 ± 0,04359	0,1591 ± 0,05082	P>0,05
4	0,3000 ± 0,07638	0,8182 ± 0,2684	P>0,05
7	2,820 ± 0,4377	3,932 ± 0,5225	P>0,05
10	4,360 ± 0,5224	6,568 ± 0,4633	P<0,001
14	5,720 ± 0,4891	8,000 ± 0,6505	P<0,001

5.2 Efeito do E_2 na severidade da lesão de ratas OVX submetidas à lesão medular por compressão moderada: avaliação histopatológica.

Na análise histológica, a média dos 4 cortes selecionados de cada medula foi utilizada para a análise estatística em cada uma das mensurações (comprimento, largura e área total da lesão). Como o grupo OVX+sham tem apenas um animal ($n=1$), não foi possível incluí-lo nas análises estatísticas e foi somente utilizado para fins de análise da ausência de lesão, sendo representado apenas de forma quantitativa nos gráficos e qualitativa na fotografia (Figura 21).

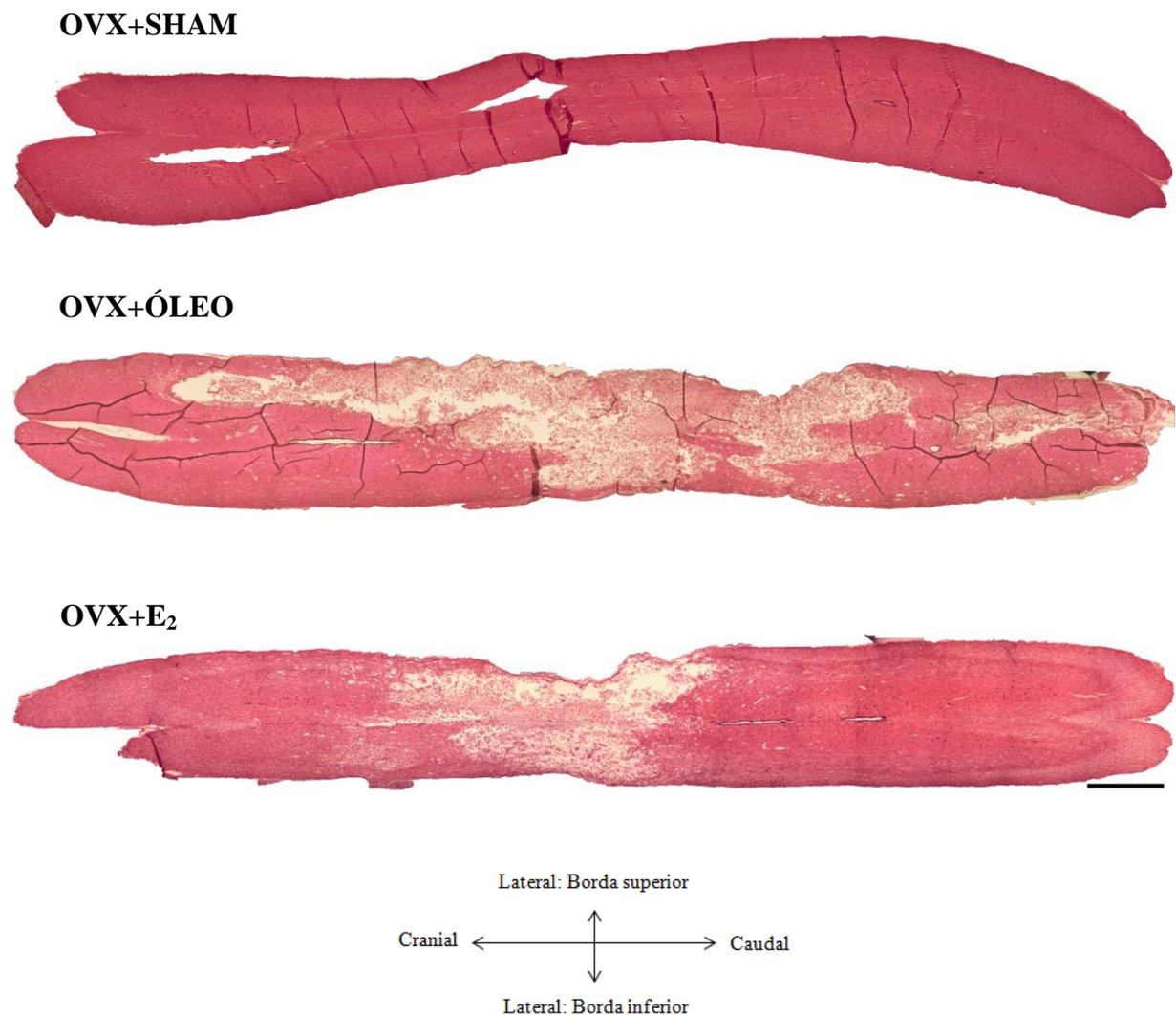


Figura 21: Cortes histológicos transversais de medula corados com hematoxilina e eosina (HE). Os animais OVX submetidos à falsa lesão (OVX+sham) ou lesão medular por compressão moderada foram tratados com uma única dose de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de E_2 (OVX+E₂) ou óleo (OVX+óleo), 1,5 cm das suas medulas contendo a lesão foram coletadas após perfusão tecidual no 14º dia pós lesão para realização de cortes histológicos longitudinais (5 μm de espessura) e coloração com HE. Corte de medula representativo do grupo OVX+sham, OVX+óleo e OVX+E₂. Barra = 1 mm. As setas indicam as direções das mensurações realizadas na região da lesão no tecido.

Na mensuração do comprimento da lesão (extensão no sentido craniocaudal da medula) o teste t-Student detectou que o grupo OVX+E₂ (5.672 ± 0.5005 mm) apresentou comprimento de lesão significativamente menor (P<0,05) comparado ao grupo OVX+óleo (10.22 ± 1.807 mm). Sendo t=2.638, df=9 e a diferença entre as médias = 4.544 ± 1.722 mm (Figura 22).

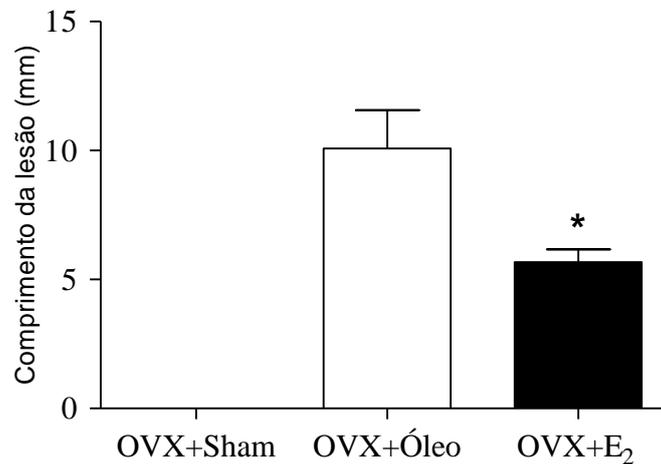


Figura 22: Efeito de uma única dose de E₂ (100 µg/Kg) na extensão da lesão no sentido craniocaudal da medula (comprimento da lesão). As ratas OVX submetidas a lesão medular por compressão e tratadas com uma única dose de E₂ (100 µg/Kg, s.c.) ou óleo 15 minutos pós lesão, foram perfundidas e suas medulas coletadas 14 dias após a lesão. Foi determinado o comprimento dos 4 cortes da medula de cada animal e a média por animais utilizada para análise estatística. Valores são apresentados como média ± erro padrão. Teste t-Student, P<0,05. * indica que o grupo OVX+E₂ (n=6) apresentou um comprimento de lesão significativamente menor (P<0,05) comparado ao grupo OVX+óleo (n=5). O grupo OVX+sham (n=1) não apresentou lesão no tecido medular.

A análise quantitativa da largura da lesão (sentido laterolateral da medula) foi realizada de forma percentual. O teste t-Student detectou uma porcentagem de largura da lesão significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo OVX+E₂ (83.12 ± 5.241 %) comparado com o grupo OVX+óleo (97.43 ± 0.6334 %). Sendo $t=2.458$, $df=9$ e a diferença entre as médias= 14.31 ± 5.823 % (Figura 23).

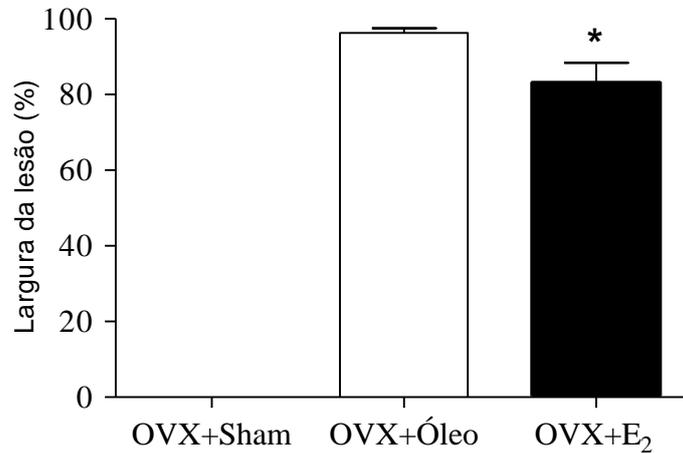


Figura 23: Efeito de uma única dose de E₂ (100 µg/Kg) na extensão da lesão no sentido laterolateral da medula (largura da lesão). As ratas OVX submetidas a lesão medular por compressão e tratadas com uma única dose de E₂ (100 µg/Kg, s.c.) ou óleo 15 minutos pós lesão, foram perfundidas e suas medulas coletadas 14 dias após a lesão. Foi determinado o percentual da largura da lesão dos 4 cortes da medula de cada animal e a média por animais utilizada para análise estatística. Valores são apresentados como média ± erro padrão. Teste t-Student, $P < 0,05$. * indica que o grupo OVX+E₂ (n=6) apresentou uma porcentagem de largura da lesão significativamente menor ($P < 0,05$) comparado ao grupo OVX+óleo (n=5). O grupo OVX+sham (n=1) não apresentou lesão no tecido medular.

Na determinação quantitativa da área total de lesão (tamanho geral da lesão medular) o teste t-Student detectou que o grupo OVX+E₂ (6.182 ± 0.8642 mm²) apresentou uma área de lesão significativamente menor (P<0,05) comparada ao grupo OVX+óleo (10.00 ± 1.926 mm²). Sendo t=1.926, df=9 e a diferença entre as médias=3.821 ± 1.984 mm² (Figura 24).

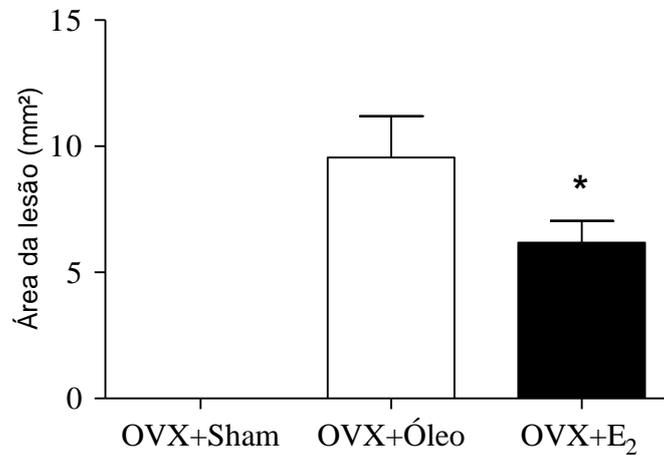


Figura 24: Efeito de uma única dose de E₂ (100 µg/Kg) no tamanho geral da lesão na medula (área total da lesão). As ratas OVX submetidas a lesão medular por compressão e tratadas com uma única dose de E₂ (100µg/Kg, s.c.) ou óleo 15 minutos pós lesão, foram perfundidas e suas medulas coletadas 14 dias após a lesão. Foi determinada a área total da lesão nos 4 cortes da medula de cada animal e a média por animais utilizada para análise estatística. Valores são apresentados como média ± erro padrão. Teste t-Student, P<0,05. * indica que o grupo OVX+E₂ (n=6) apresentou uma área de lesão significativamente menor (P<0,05) comparado ao grupo OVX+óleo (n=5). O grupo OVX+sham (n=1) não apresentou lesão no tecido medular.

Para verificar a existência de uma correlação entre a severidade da lesão medular e a capacidade locomotora dos animais foi realizada uma regressão linear simples. Nessa análise foram utilizadas as médias da área total de lesão na medula de cada animal de ambos os grupos (OVX+E₂ e OVX+óleo) relacionando-os com seus respectivos escores BBB obtidos no 14º dia pós lesão medular. O teste de regressão linear simples detectou diferença significativa (P<0,05) e, portanto, uma correlação positiva dos dados em que $r^2=0,3749$ admitindo-se um intervalo de confiança de 95% (Figura 25). O que indica que quanto menor a área da lesão na medula espinal, ou seja, quanto menor for a severidade dessa lesão, maior o escore BBB obtido e, conseqüentemente, maior a capacidade locomotora do animal.

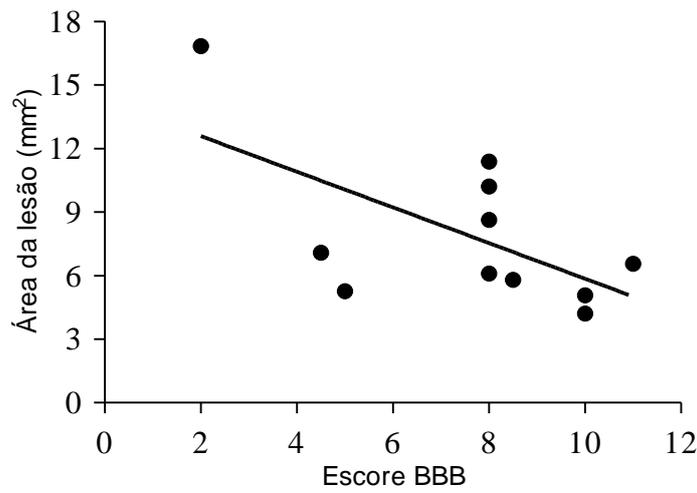


Figura 25: Correlação entre a severidade da lesão medular e a capacidade locomotora dos animais. Gráfico de regressão linear simples para correlação das médias da área total da lesão de cada medula de ambos os grupos (OVX+E₂, n=6; OVX+óleo, n=5) com os respectivos escores BBB obtidos no 14º dia pós lesão medular por compressão moderada. O teste de regressão linear evidenciou uma correlação positiva ($r^2=0,3749$ e $P<0,05$, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%) entre a severidade da lesão medular e a capacidade locomotora dos animais. A reta indica que quanto maior o escore BBB menor a área total de lesão medular, ou seja, quanto maior a capacidade locomotora menor a severidade da lesão medular.

5.3 Efeito do E_2 na inflamação no local da lesão em ratas OVX submetidas à lesão medular por compressão.

Na investigação da possível modulação do processo inflamatório pelo E_2 após a lesão medular espinal, foi realizada a quantificação da expressão gênica das citocinas IL-6 e TNF- α que são de perfil pró-inflamatório e da citocina IL-10 que é de perfil anti-inflamatório no tecido medular, que foi coletado ao 14º dia após a lesão. O teste t-Student não detectou diferença ($P > 0,05$) na expressão gênica de nenhuma das citocinas entre o grupo OVX+óleo (n=2) e o grupo OVX+ E_2 (n=3). Sendo $t=1.568$ e $df=8$ (TNF- α), $t=1.150$ e $df=8$ (IL-6) e $t=0.2244$ e $df=8$ (IL-10) (Figura 26).

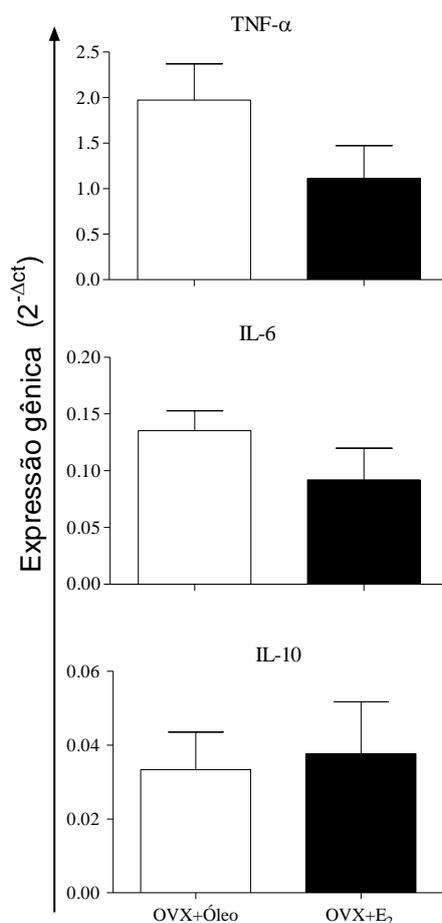


Figura 26: Efeito de uma única dose de E_2 na modulação da inflamação na lesão medular espinal compressiva. As medulas dos animais do grupo OVX+óleo (n=2) e do grupo OVX+ E_2 (n=3) foram coletadas 14 dias após a lesão medular através da eutanásia por decapitação e aproximadamente 1 cm da medula contendo o epicentro da lesão foi processado através da técnica do qRT-PCR que quantificou a expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10. O teste t-Student não detectou diferença entre os grupos na expressão de nenhuma das citocinas analisadas ($P > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos o efeito de uma única dose de 100 µg/Kg de E₂ administrada por via subcutânea 15 minutos após a lesão medular por compressão moderada em ratas OVX. Os resultados evidenciaram que o E₂ promoveu uma melhora significativa da capacidade locomotora dos membros posteriores dos animais, e essa melhora motora se deve a redução do tamanho da lesão no tecido medular induzida pelo E₂. Além disso, nossos resultados preliminares mostram que o E₂ não alterou a expressão gênica das citocinas TNFα, IL-6 e IL-10 ao 14º dia após a lesão. Nós postulamos que sua ação moduladora sobre as citocinas deve ocorrer na fase aguda da inflamação, visto que os demais resultados da literatura evidenciaram um efeito neuroprotetor anti-inflamatório do E₂ na lesão medular.

6.1 Modelos experimentais: lesão medular espinal e capacidade locomotora

A lesão medular espinal ainda é um problema frequente e devastador na sociedade atual. Promover o reparo de lesões crônicas na medula espinal e recuperação da função neurológica é o principal objetivo, mas isso é amplamente dependente do quão cedo e eficaz os primeiros cuidados e intervenções terapêuticas são prestados. Portanto, agentes neuroprotetores são uma grande promessa no tratamento da lesão medular espinal (SAMANTARAY et al., 2010a).

Apesar dos grandes avanços na pesquisa experimental, que têm gerado um enorme progresso em desvendar a natureza da lesão medular espinal nas últimas décadas, ainda não há um tratamento eficaz que reestabeleça a função medular. Várias terapias celulares, moleculares e de reabilitação têm sido desenvolvidas através de técnicas experimentais e algumas testadas na fase de triagem clínica. Entretanto, até agora nenhum tratamento provou ser eficiente em pacientes com essa patologia (SILVA et al., 2014). Nesse sentido, o uso de modelos experimentais para indução de uma lesão traumática na medula é crítico para propiciar avanços nas pesquisas de novas terapias nessa área.

Diversos modelos animais têm sido utilizados com esse propósito tais como gatos, cães, suínos, ratos, camundongos e primatas não humanos (BLIGHT, 1983; BLIGHT et al., 1991; CROWE et al., 1997; MODI et al., 2011; WELLS et al., 2003). No entanto, os modelos animais mais utilizados são os roedores (ratos e camundongos), pois além do baixo custo, melhor acessibilidade e manutenção, a resposta fisiológica e morfológica à lesão medular em humanos é qualitativamente muito similar ao observado em roedores. Contudo, existem diferenças que devem ser analisadas com cautela (Tabela 6). Devido a essas diferenças é importante que o tratamento testado seja eficaz em diferentes modelos em ratos e camundongos. Embora os roedores continuem a ser as espécies mais usadas e adequadas para os estudos preliminares, é aconselhável testar em uma espécie intermediária como o primata não humano, pois nesses a lesão medular espinal se aproxima melhor da que ocorre em humanos, antes de realizar a triagem em humanos que só é garantida quando é esperado que a terapia ofereça o mínimo risco. Sendo assim, é necessário que os tratamentos sejam testados em uma grande variedade de modelos, e se for efetivo em todos pode-se prever que também será em humanos (HAGG & OUDEGA, 2006; SILVA et al., 2014).

Tabela 6: Similaridades e diferenças na resposta da medula espinal à lesão entre humanos e roedores. Modificado de HAGG & OUDEGA, 2006.

	<i>Roedores</i>	<i>Humanos</i>
<u>Processos degenerativos</u>		
Respostas vasculares	Hemorragia	Hemorragia
Inflamação	Extensa	Menos pronunciada, apesar da similar expressão de citocinas
Desmielinização	Sim	Sim, mas talvez menos pronunciada
Degeneração axonal	Degeneração Walleriana	Degeneração Walleriana muito mais prolongada
Escara glial	Extensa, com CSPG astrogliar	Menor, CSPG principalmente nos vasos sanguíneos
Formação cística	Ratos: sim; Camundongos: não	Sim
Resposta da célula de Schwann	Alguma invasão	Extensa invasão
<u>Processos regenerativos</u>		
Brotamento axonal	Sim	Sim
Remielinização	Sim	Sim
Plasticidade de circuitos não danificados	Sim	Sim

CSPG, proteoglicanos de sulfato de condroitina

Os modelos desenvolvidos para indução de uma lesão traumática na medula são classificados com base no mecanismo de lesão em: contusão, compressão, deslocamento, transecção ou modelos químicos. Na contusão (uma lesão aguda e transitória) são utilizados dispositivos para provocar a lesão. Uma das técnicas é a de soltar um determinado peso na superfície dorsal da medula a uma determinada distância (do inglês, *weight-drop*) onde o impulso, energia, velocidade e força são controlados e monitorados por computador (GRUNER, 1992) e também há a técnica do pêndulo eletromagnético (BEHRMANN et al., 1992), parecida com a técnica do *weight-drop*. No modelo de compressão um dispositivo comprime a medula, como no modelo de clip de aneurisma, pinça e balão inflável (RIVLIN & TATOR, 1978; BORGENS & SHI, 2000; VANICKÝ et al., 2001), podendo criar diferentes graus de lesão por ajuste da força e duração da compressão. O deslocamento mecânico das vértebras é um modelo utilizado para reproduzir os deslocamento vertebrais típicos de uma lesão medular. A transecção cirúrgica da medula, total ou parcial, é particularmente útil nas análises de regeneração tecidual. Por fim, a lesão induzida quimicamente reproduz componentes específicos da cascata de danos secundários (SILVA et al., 2014; KWON et al., 2002b).

Em todos esses modelos procura-se reproduzir e mimetizar a lesão medular espinal em seres humanos, tanto quanto possível, e cada modelo apresenta uma característica investigativa distinta. Por exemplo, os modelos de transecção são importantes para avaliar o poder regenerativo axonal de determinado tratamento (KWON et al., 2002b; SILVA et al., 2014). Por outro lado, os modelos mais utilizados são os de contusão e compressão que

proporcionam uma evolução fisiopatológica cronologicamente muito similar (KWON et al., 2002b; SILVA et al., 2014) e também promovem lesões teciduais muito parecidas (BASSO et al., 1996; NOBEL & WRATHALL, 1985) ao que ocorre em humanos (BUNGE et al., 1993; HAYES & KAKULAS, 1997), promovendo um bom cenário para analisar de forma funcional e histológica agentes neuroprotetores na fase aguda da lesão medular (KWON et al., 2002b; SILVA et al., 2014). Contudo, os modelos de lesão por contusão, apesar de serem os mais utilizados, não reproduzem a compressão contínua gerada pelo deslocamento de vértebras sobre a medula espinal que normalmente ocorre na lesão em humanos, mas esse fator adicional é reproduzido nos modelos de lesão por compressão.

No presente estudo foi adotado o modelo por compressão, por inflação de um balão no espaço epidural, desenvolvido por Vanický e colaboradores (2001) para a indução de uma lesão moderada na medula espinal de ratas. Essa escolha se deu por ser uma técnica de baixo custo, de fácil execução, que mimetiza bem a morfologia e fisiopatologia da lesão que ocorre em humanos e por ser um modelo em que os animais apresentam uma recuperação gradual que permite avaliar a eficácia terapêutica aguda do agente a ser investigado. Desta forma, é um modelo adequado na avaliação da ação neuroprotetora e aguda do E₂ na lesão medular espinal do presente estudo.

A recuperação funcional após a lesão medular espinal é normalmente o resultado final que determina a eficácia de qualquer terapia de intervenção (GOLDBERGER et al., 1991). O elemento chave para qualquer teste comportamental é que ele seja confiável, que possa ser reproduzido e que gere dados que estejam de acordo com o que está sendo investigado (BASSO, 2004). Muitos testes foram desenvolvidos para avaliar o comportamento de animais nessa condição, dentre estes tem sido dada grande importância à avaliação da performance locomotora. A avaliação mais comumente utilizada nessa determinação é a escala de avaliação locomotora BBB descrita por Basso, Beattie e Bresnahan em 1995 (BASSO et al., 1995) para a mensuração da performance motora dos membros posteriores em ratos, ou a escala BBB modificada para camundongos (BASSO et al., 2006). Esse teste tem demonstrado resultados confiáveis da capacidade locomotora de ratos e reflete de forma sensível os graus de dano tecidual após uma lesão medular por compressão ou contusão, permitindo avaliar de forma mais acurada os tratamentos investigados. Ademais, é de fácil reprodução e implementação em qualquer laboratório, o que torna possível a comparação dos resultados entre os estudos realizados. Além disso, possibilita uma correlação positiva entre a capacidade locomotora e o tecido medular poupado, ou seja, o aspecto histológico após a lesão (BASSO et al., 1995). Fatores importantes para enfatizar a possível eficiência de determinado tratamento aplicado. Portanto, postula-se que um tratamento capaz de aumentar o escore BBB pode ser considerado neuroprotetor nesse modelo animal.

A escala de 21 pontos BBB (teste BBB) avalia a sequência de padrões de recuperação locomotora e leva em consideração as fases inicial (escores BBB 0-7), intermediária (escores BBB 8-13) e final (escores BBB 14-21) de recuperação. A fase inicial é caracterizada primeiramente por paralisia flácida dos membros posteriores e conforme recuperam os movimentos começam a apresentar movimentos discretos ou extensos de uma ou mais articulações. Durante a fase intermediária o comportamento observado é a posição da pata com a superfície plantar voltada para o solo na fase de postura e, após recuperação, também na fase de balanço, além das características da passada associada ao suporte de peso ou não e a coordenação entre os membros anteriores e posteriores começa a ser evidenciada. Na fase final de recuperação a coordenação dos membros é consistente e são observados a liberação dos dedos durante a passada, a predominante posição da pata em relação ao corpo durante e após o movimento de passada, que primeiro apresenta-se rodada e torna-se paralela ao corpo conforme há recuperação locomotora, e também observa-se a posição da cauda e a

estabilidade ou não do tronco. No entanto, ratos com lesão traumáticas moderadas e severas na medula não alcançam essa fase final de recuperação locomotora (BASSO et al., 1995).

6.2 Eficácia do E₂ na recuperação funcional da capacidade locomotora

A maior barreira no desenvolvimento de novas terapias para a melhora da função medular reside na complexidade das múltiplas e interligadas alterações moleculares e celulares envolvidas em propagar os processos secundários que causam maior dano após a lesão medular espinal. Nesse sentido, os pesquisadores têm enfatizado a importância no desenvolvimento de terapias eficazes que sejam combinações de múltiplos agentes neuroprotetores ou um único agente multifatorial (SAMANTARAY et al., 2010a). Crescentes evidências experimentais suportam a hipótese de que o E₂ é um agente multifatorial modulando vários aspectos dos danos secundários que ocorrem após a lesão como redução do processo inflamatório e do estresse oxidativo, aumento da viabilidade e função de células neuronais que refletem em melhora funcional da medula e recuperação locomotora (SRIBNICK et al., 2010; CUZZOCREA, 2008; MOSQUERA et al., 2014; CHAOVIPOCH et al., 2006).

Os estudos experimentais em roedores que investigaram o efeito do tratamento com E₂ na recuperação da função locomotora após a lesão medular utilizaram de forma majoritária a escala de avaliação locomotora BBB, ou a escala BBB modificada para camundongos, na mensuração do comportamento motor (YUNE et al., 2004; FAROOQUE et al., 2006; CHAOVIPOCH et al., 2006; RITZ & HAUSMANN, 2008; HU et al., 2012; LEE et al., 2012b; MOSQUERA et al., 2014;). Os resultados obtidos em diferentes modelos de indução da lesão sugerem que o E₂ melhora o déficit locomotor dos membros posteriores dos animais. Vale ressaltar, que os modelos de lesão, as doses utilizadas, as vias e protocolos de administração do E₂ ainda variam de maneira substancial. A grande gama de estratégias de tratamento podem impactar em diferentes mecanismos provocados pela lesão e, assim, em diferentes resultados que dificultam comparações (ELKABES & NICOT, 2014). Contudo, os resultados obtidos por diversos estudos geram expectativas promissoras, pois a grande maioria demonstrou uma ação neuroprotetora do E₂ em promover maior recuperação locomotora após uma lesão na medula espinal (Tabela 7).

Tabela 7: Modelos utilizados e protocolos de administração do E₂ de estudos que evidenciaram uma melhora na capacidade locomotora através da escala BBB após tratamento da lesão medular espinal com E₂.

Modelo de lesão	Modelo animal	Dose e via de adm. do E ₂	Protocolo de administração	Referência
Contusão em T10	Ratos machos	100 µg/Kg, i.v.	1-2 h antes da lesão ou 1 h após a lesão	Yune <i>et al.</i> (2004)
Compressão em T8-T9	Ratas intactas e OVX	Cápsulas 180 µg/Kg, s.c.	1 semana antes da lesão.	Chaovipoch <i>et al.</i> (2006)
Compressão em T8-T9	Ratos machos	0,1 ou 4 mg/Kg, i.p.	Imediatamente após a lesão	Ritz e Hausmann (2008)
Compressão em T6-T7	Camundongos machos	300 µg/Kg	1 h antes da lesão seguida por 3 e 6 h após a lesão	Cuzzocrea <i>et al.</i> (2008)
Compressão em T8-T9	Ratos intactos ou gonadectomizados	Peletes 0,5 ou 5 mg/Kg, s.c.	30 min antes da lesão	Kachadroka <i>et al.</i> (2010)
Contusão em T10	Ratos machos	4 mg/Kg, i.v. e 2 mg/Kg, i.p.	15 min seguida por 24h (4mg/kg) e durante mais 5 dias (2mg/kg) após a lesão	Sribnick <i>et al.</i> (2010)
Contusão em T9	Ratos machos	100 µg/Kg, i.v.	15 min seguida por 24 h após a lesão	Hu <i>et al.</i> (2012)
Contusão em T10	Ratos machos	300 e 600 µg/Kg	5 min seguida por 6 e 24 h após a lesão	Lee <i>et al.</i> (2012b)
Contusão em T9-T10	Ratas OVX	Implante 3 mg, s.c.	1 semana antes da lesão	Mosquera <i>et al.</i> (2014)

No presente estudo demonstramos que o tratamento com uma única dose de 100 µg/Kg de E₂ administrado por via subcutânea 15 minutos após a lesão medular por compressão moderada promoveu uma melhora na recuperação locomotora dos membros posteriores de ratas OVX a partir do 10º dia pós lesão, atingindo a fase intermediária de recuperação locomotora ao 14º dia segundo a escala BBB. Nessa fase os animais eram capazes de movimentar de forma extensa as três articulações dos membros posteriores fazendo movimento de pedalada e também conseguiam apoiar a pata com a superfície plantar voltada para o solo sem, contudo, sustentar o peso do corpo sobre as patas. Enquanto os animais tratados somente com veículo (óleo) atingiram somente a fase inicial de recuperação e eram capazes apenas de realizar movimento discreto em duas articulações e um movimento extenso na terceira articulação dos membros posteriores.

A dose de 100 µg/Kg de E₂, utilizada nesse estudo, foi adotada por ser a menor dose utilizada em estudos prévios capaz de gerar diminuição dos danos secundários e recuperação funcional após uma lesão medular a nível torácico. Por exemplo, promoveu uma melhor recuperação locomotora em ratos machos quando administrada por via intravenosa 1-2 horas antes ou imediatamente após a lesão medular provocada por contusão leve (YUNE *et al.*,

2004) ou administrada por via intraperitoneal imediatamente depois de uma lesão induzida por compressão moderada (RITZ & HAUSMANN, 2008). Outro estudo também demonstrou essa melhora funcional quando feita a administração por via intravenosa dessa mesma concentração de E₂ após 15 minutos seguido por outra dose 24 horas após a lesão por contusão leve em ratos machos (HU et al., 2012). Em contrapartida, apenas um grupo de pesquisadores não detectou melhora locomotora de ratos machos submetidos à administração por via intravenosa de 100 µg/Kg de E₂ 5 minutos após uma lesão medular por contusão moderada seguida de mais duas doses 6 e 24 horas após (LEE et al., 2012b). Essa diferença em relação aos outros estudos provavelmente se deve ao modelo de lesão utilizado, que no estudo de Lee e colaboradores (2012b) foi o modelo de contusão moderada. No entanto, esse grupo evidenciou que, com concentrações mais elevadas de E₂ (300 e 600 µg/Kg), a melhora locomotora é evidenciada a partir do 21º até o 35º dia após a lesão, corroborando com a ação positiva de E₂ na recuperação funcional dos animais.

Em todos esses estudos, em que os animais submetidos à lesão medular obtiveram uma melhora na capacidade locomotora após a administração de 100 µg/Kg de E₂, atingiram a fase final de recuperação locomotora segundo a escala BBB ao 14º dia pós lesão. Portanto, obtiveram escores superiores ao encontrado por nosso grupo que evidenciou uma melhora até a fase intermediária. Entretanto, a maioria dos estudos usou para indução da lesão o modelo de contusão leve que parece provocar menor lesão tecidual do que modelo por compressão moderada que o nosso grupo utilizou. Além disso, ao comparar o modelo compressivo por clip de aneurisma utilizado por Ritz e Hausmann (2008) em que a compressão foi feita durante apenas 15 segundos, nosso modelo parece provocar maior dano ao tecido medular já que a compressão perdurou por 5 minutos. Essas diferenças nos modelos e no tempo de compressão podem ter influenciado as respostas locomotoras dos animais.

Ademais, existem outros fatores que dificultam a comparação entre os estudos como a diferença do gênero e espécie dos animais utilizados. Farooque e colaboradores (2006) reportaram que camundongos fêmeas intactas (com ciclo estral normal) obtiveram escores BBB maiores que os machos durante os 14 dias avaliados, apresentando escore muito elevado e bem superior ao dos machos desde o primeiro dia após a lesão por compressão moderada. Nesse estudo, as fêmeas atingiram a fase final de recuperação enquanto os machos somente a fase intermediária. Em contraste, apenas um estudo não detectou melhora locomotora e nem diferenças entre os gêneros ao pré-tratar ratos (fêmeas e machos) com doses fisiológicas ou maiores de E₂ (180 µg/mL e 1 mg/mL, gerando níveis plasmáticos constantes de 25 e 75 pg/mL, respectivamente) uma semana antes da lesão por contusão (SWARTZ et al., 2007), aumentando o debate entre os estudos pré-clínicos acerca do papel neuroprotetor do E₂. Contudo, as diferentes respostas terapêuticas também são hipoteticamente atribuídas à dose de E₂, via de administração e a demora na iniciação da terapia (KWON et al., 2011). Além disso, um estudo interessante analisou uma possível modulação do efeito protetor do E₂ pela testosterona endógena após a lesão medular em ratos intactos ou orquiectomizados. A discussão dessa hipótese é importante, pois a enzima aromatase converte o andrógeno testosterona a E₂ em neurônios e astrócitos (ROSELLI, 2007), podendo aumentar o efeito neuroprotetor produzido pelo E₂. No entanto, os autores não detectaram nenhuma interferência da testosterona endógena na proteção mediada pela administração do E₂ (0,08 ou 0,8 mg/Kg/dia) que conferiu recuperação locomotora muito similar entre os ratos intactos e os orquiectomizados, ambos atingindo a fase intermediária de recuperação segundo a escala BBB (KACHADROKA et al., 2010).

Embora a maioria dos modelos utilizem machos para investigar o papel do E₂ na lesão medular, devido a maior incidência dessa patologia em homens (LEE et al., 2013), alguns outros trabalhos também analisaram em fêmeas e enfatizaram o importante papel do E₂ em promover melhora motora. Um desses estudos utilizou ratas intactas ou OVX, na pré e pós-

menopausa, em que as ratas OVX receberam uma cápsula subcutânea com 180 µg/mL de E₂ uma semana antes da lesão medular por compressão, que liberava E₂ lentamente mantendo sua concentração sérica em níveis fisiológicos, equivalente ao observado no ciclo estral de ratas (20 pg/mL). Foi observado uma melhor recuperação que se estendeu até a fase intermediária da escala BBB das ratas OVX na pré-menopausa e até a fase inicial das ratas OVX na pós-menopausa ao 21º dia pós lesão por compressão (CHAOVIPOCH et al., 2006). Interessante que nesse estudo as ratas intactas na pré e na pós-menopausa obtiveram uma recuperação motora inferior as ratas OVX tratadas com E₂ exógeno. Evidenciando que o E₂ exógeno, mesmo em níveis fisiológicos do ciclo estral na pré-menopausa, estimula maior neuroproteção atenuando de forma mais eficiente os déficits locomotores uma vez que o E₂ endógeno secretado pelos ovários não foi capaz de suficiente neuroproteção, provavelmente devido as variações hormonais que ocorrem durante o ciclo. Mosquera e colaboradores (2014) em um estudo mais recente também evidenciaram que essa neuroproteção do E₂ refletiu em aumento da recuperação locomotora até a fase intermediária ao 14º dia pós lesão, por contusão moderada, de ratas OVX pré-tratadas com infusão contínua de concentrações elevadas de E₂ (variando de 154 pg/mL a 86,3 pg/mL), através de um implante subcutâneo, sendo que ao 28º dia pós lesão os animais atingiram a fase final de recuperação locomotora segundo a escala BBB. Esse grupo demonstrou que essa resposta comportamental parece ser dependente de ER- α , uma vez que a administração de E₂ em conjunto com um antagonista de ER- α inibe essa melhora motora. Embora na fase aguda a neuroproteção pareça ser mediada pela atividade antioxidantes do E₂ pela diminuição de superóxidos independente da ativação de ER- α (2º dia após a lesão).

Esses estudos em fêmeas, intactas ou OVX, sugerem que a exposição prévia e continuada após a lesão medular espinal de níveis plasmáticos fisiológicos ou supra-fisiológicos de E₂, endógenos ou exógenos, promovem neuroproteção evidenciada comportamentalmente pela recuperação da função locomotora. No presente estudo, demonstramos ainda que apenas uma única dose de E₂ aplicada logo após a lesão medular também é capaz de melhorar a locomoção de fêmeas OVX, reforçando o papel neuroprotetor do E₂.

6.3 E₂ reduz o tamanho da lesão tecidual provocada na medula espinal

O E₂ parece exercer um efeito neuroprotetor importante na medula espinal evidenciada pela melhora da capacidade locomotora e os resultados obtidos na análise histológica da medula no presente estudo corroboram com esta hipótese. Cortes histológicos dos animais submetidos à lesão medular revelaram perda neuronal e de células gliais evidentes no epicentro da lesão e desarranjo dos segmentos axonais da substância branca. Entretanto, em todos os parâmetros analisados as medulas dos animais tratados com E₂ mostraram menor dano tecidual ao 14º dia pós lesão. Ademais, demonstramos uma correlação positiva entre o resultado histológico e a melhora da capacidade locomotora, ambos analisados na fase crônica após a lesão, o que indica um efeito benéfico do E₂ contra a degeneração do tecido medular induzida pela lesão.

Esses resultados apresentados estão de acordo com o reportado por Yune e colaboradores (2004) que demonstraram que o pré-tratamento com uma dose única de 100µg/Kg de E₂ foi capaz de reduzir a área total de lesão, analisado por cortes longitudinais do tecido medular coletados na fase crônica da lesão. Após análises moleculares, os pesquisadores sugeriram que esse efeito neuroprotetor ocorre pela diminuição da morte neuronal mediado em parte pela modulação do E₂ na expressão de proteínas anti apoptóticas (bcl-2 e bcl-x1) e em parte pela diminuição da atividade da caspase 3. O mesmo grupo em 2008 demonstrou que o mecanismo pelo qual o E₂ induz a expressão de bcl-2 após a lesão e

por consequência inibe a apoptose celular, parece ocorrer através do aumento na ativação de CREB dependente de PI3K/Akt. A cascata de sinalização PI3K/Akt/CREB/bcl-2 foi evidenciada de forma aguda, 8 horas após a lesão, conferindo atividade neuroprotetora por essa ação anti apoptótica. Essa propriedade e outras ações moleculares que parecem ser induzidas e moduladas pelo E₂ e que justificam seu papel neuroprotetor culminando em redução do dano no tecido medular serão discutidas em maiores detalhes mais adiante.

Diversos outros estudos, com diferentes protocolos de tratamento e modelos de lesão traumática na medula espinal em roedores de ambos os gêneros, também sugerem essa neuroproteção do E₂ no tecido medular através de análises histológicas. Nesse âmbito, foi demonstrado que o tratamento com E₂ foi capaz de atenuar a área lesionada no tecido medular na fase aguda (CUZZOCREA et al, 2008), subaguda (RITZ & HAUSMANN, 2008) e crônica (SRIBNICK et al., 2010). Além disso, também foi capaz de promover maior integridade da mielina na substância branca (CHAOVIPOCH et al., 2006; SIRIPHORN et al., 2012; MOSQUERA et al., 2014; KACHADROKA et al., 2010; CUZZOCREA et al, 2008; SRIBNICK et al., 2005) e menor degeneração axonal (LEE et al., 2012b; SRIBNICK et al., 2010). Esses fatores parecem estar relacionados com a maior sobrevivência de neurônios no corno ventral da medula (CHAOVIPOCH et al., 2006; SIRIPHORN et al., 2012; KACHADROKA et al., 2010) e de oligodendrócitos (LEE et al., 2012b).

6.4 Efeito anti-inflamatório do E₂

O papel neuroprotetor do E₂ têm sido postulado por sua ação moduladora do processo inflamatório no SNC e suas ações nesse âmbito têm configurado esse hormônio como um agente anti-inflamatório (DIMAYUGA et al., 2005).

No presente estudo, tínhamos a intenção de investigar o papel do E₂ na modulação da inflamação que ocorre após a lesão medular. Para isso iríamos determinar a expressão gênica das citocinas de perfil pró-inflamatório IL-6 e TNF- α e a citocina de perfil anti-inflamatório IL-10 em diferentes tempos após a lesão (6 horas, 24 horas e 14 dias) e investigar se o E₂ influencia na modulação desses mediadores. No entanto, até o momento só foi possível gerar dados prévios com um número pequeno de animais onde verificamos a expressão gênica dessas citocinas somente no 14º dia pós lesão, apesar de já terem sido coletadas as medulas dos animais em todos os tempos propostos para que em breve seja feita uma determinação mais concisa desses dados. Os resultados prévios indicam que o tratamento com E₂ não gerou alteração na expressão das citocinas ao 14º dia pós lesão. Apesar do pequeno número de animais analisados, esses resultados parecem estar de acordo com o reportado por outros estudos que indicam que o aumento na expressão das citocinas inflamatórias ocorre rapidamente, poucas horas após a lesão, e retornam a níveis basais após 24 a 72 horas (STREIT et al., 1998; YANG et al., 2005; NAKAMURA et al., 2003).

Nesse âmbito, um estudo reportou que o E₂ reduziu a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 detectada 24 horas após a lesão, que foi acompanhado de redução do dano tecidual, do edema, da infiltração de neutrófilos, da expressão de quimiocina pró-inflamatória, do estresse oxidativo e da apoptose, associado a melhora da locomoção (CUZZOCREA et al., 2008). Em confronto com esses dados, um grupo detectou que o tratamento com E₂ induziu o aumento da expressão de IL-1 β , IL-1 α e IL-6 apenas 6 horas após a lesão, que foi acompanhado por diminuição da infiltração de monócitos/macrófagos, aumento da ativação de astrócitos, redução da área da lesão e melhora da função motora (RITZ & HAUSMANN, 2008). A complexidade tanto da cascata de danos secundários que ocorrem após a lesão como dos eventos imunológicos no SNC tornam difícil a determinação da exata modulação do E₂ sobre o sistema imune no tecido neural. A expressão de citocinas após uma lesão na medula pode depender da severidade da lesão (YANG et al., 2005), do curso temporal da expressão dessas

citocinas (NAKAMURA et al., 2003; PINEAU & LACROIX, 2007), assim como a concentração e o tempo de administração do E₂ também podem estar influenciando de maneira significativa. Por exemplo, o imunossupressor clássico corticosteróide suprime toda a reação imune quando aplicada em altas doses, enquanto baixas doses são apenas imunomoduladoras (VIDAL et al., 2013).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α é um mediador multifuncional implicado como um potente mediador da morte celular (LEE et al., 2000; LAWRENCE, 2009). Nesse sentido, a inibição de TNF- α através da ativação de IL-10 melhorou a resposta funcional após uma lesão na medula espinal (BETHEA et al., 1999) e foi reportado que o E₂ reduziu diversos marcadores apoptóticos induzidos por TNF- α aumentando a viabilidade de motoneurônios *in vitro* (DAS et al., 2011).

IL-6 é considerada como uma citocina que promove o gatilho dos danos secundários (GRUOL & NELSON, 1997; BETHEA & DIETRICH, 2002). O bloqueio dos seus receptores, impedindo a sinalização do IL-6, foi capaz de reduzir diversos fatores deletérios do processo inflamatório como redução de INF- γ e TNF- α , aumento da citocina anti-inflamatórias IL-4, diminuiu a degeneração da mielina, aumentou o poder fagocítico dos macrófagos, promoveu recuperação funcional após a lesão medular (GUERRERO et al., 2012) e atenuou a expressão de iNOS (TUNA et al., 2001).

Além disso, IL-1 β estimula a proliferação dos astrócitos formando uma escara glial na fase subaguda da inflamação (YANG et al., 2004) e têm sido documentado que o E₂ age nos astrócitos aumentando a síntese e liberação de vários fatores de crescimento que são neuroprotetores como NGF, IGF-1, bFGF, TGF- α , TGF- β , BDNF e GDNF (KARKI et al., 2014). O E₂ também parece induzir a expressão de transportadores para glutamato (GLAST e GLT-1) nos astrócitos que removem o excesso de glutamato da fenda sináptica levando a diminuição da excitotoxicidade após a lesão (KARKI et al., 2014).

Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias são moduladoras da plasticidade neural e regeneração axonal, controlando a respostas das citocinas pró-inflamatórias e limitando os efeitos da inflamação excessiva e sustentada que pode ser deletéria à função tecidual (VIDAL et al., 2013). A administração de IL-10 após a lesão medular demonstrou ser neuroprotetora por diminuir o volume da lesão e melhorar a função motora (BETHEA et al., 1999; BREWER et al., 1999, PLUNKETT et al., 2001), além disso, atenuou os níveis de TNF- α entre 1 hora e 1 dia após a lesão em ratos e melhorou a capacidade locomotora até 2 meses depois (BETHEA et al., 1999). Essas ações neuroprotetora podem ser, também, através da atuação direta da IL-10 nos neurônios reduzindo a apoptose, por inibir a ativação das caspases e do NF κ B (BACHIS et al., 2001).

Em conjunto, esses estudos indicam que o balanço entre as citocinas, através da diminuição das pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias, nas primeiras horas após a lesão pode reduzir o processo inflamatório deletério e a subsequente morte celular. Portanto, a modulação das citocinas pode ser um alvo das terapias regenerativas (VIDAL et al., 2013) e esses estudos demonstram que o E₂ é capaz de modular a inflamação através do balanço dessas citocinas.

Apesar das citocinas terem um papel fundamental no processo inflamatório no SNC, outros mediadores também estão envolvidos. Nesse âmbito, estudos em modelos *in vivo* de lesão medular detectaram, na fase aguda e crônica após a lesão, que o E₂ atenuou a atividade de COX-2, reduziu iNOS e diminuiu a degradação de I κ B- α e a translocação do NF κ B para o núcleo (SRIBNICK et al., 2005; SRIBNICK et al., 2010; CUZZOCREA et al., 2008). A redução da ligação do NF κ B ao DNA possivelmente diminuiu a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias que também foi observada no tecido (CUZZOCREA et al., 2008), evitando a perpetuação da inflamação na medula e seus efeitos neurotóxicos (Figura 27). Além disso,

também é possível que tenha reduzido o estímulo a expressão de marcadores apoptóticos por essa via do NFκB diminuindo a morte celular.

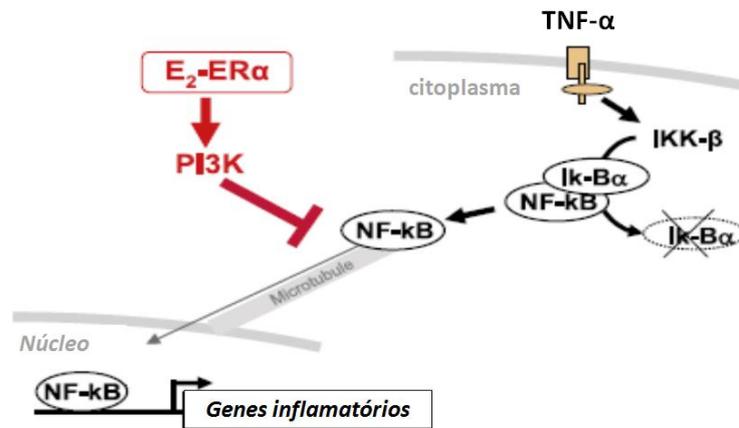


Figura 27: Esquema ilustrativo representando um dos possíveis efeitos anti-inflamatórios do E₂. O E₂ ativa ER-α no citoplasma induzindo a ativação de PI3K que inibe o transporte intracelular do NFκB ao núcleo e diminui a expressão gênica de mediadores inflamatório induzidos por NFκB, sendo que este que pode ser ativado por TNF-α. Esse mecanismos possivelmente ocorre nas micróglias. Modificado de VEGETO et al., 2008.

A resposta inflamatória após um trauma na medula espinal também é caracterizada pela infiltração de leucócitos circulantes e ativação de células do sistema imune residentes na região lesionada (BETHEA & DIETRICH, 2002). A persistência dessas células ativadas no tecido podem causar maior dano por produzirem continuamente mediadores inflamatórios que se tornam citotóxicos (HAUSMANN, 2003; LOANE & BYRNES, 2010). Nesse sentido, o tratamento com E₂ foi capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos, macrófagos e micróglias ativadas e também reduziu o edema na região lesionada da medula de roedores (SRIBNICK et al., 2005; CUZZOCREA et al., 2008; SRIBNICK et al., 2010; SAMANTARAY et al., 2011; SIRIPHORN et al., 2012). O E₂ também demonstra papel inibitório na ativação microglial em outras patologias neurodegenerativas do SNC (VEGETO et al., 2008). Alguns estudos identificaram uma diminuição da ativação dos astrócitos induzido por E₂ (SRIBNICK et al., 2010; SIRIPHORN et al., 2012), porém outros pesquisadores detectaram que o E₂ provocou o aumento no número de astrócitos reativos após a lesão medular (RITZ & HAUSMANN, 2008) (Figura 28). As diferentes respostas observadas podem ser, em parte, devido a duração do tratamento com E₂ (várias administrações ou liberação contínua de E₂ vs. única administração imediatamente após a lesão na medula).

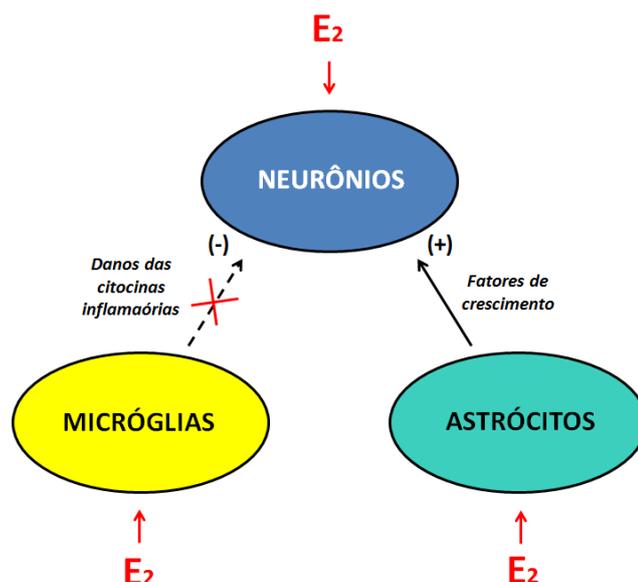


Figura 28: Mecanismos neuroprotetores e neurotróficos do E₂ em células que estão ativas na inflamação do SNC. Esses mecanismos do E₂ são por atuação direta em neurônios ou indireta através de astrócitos, aumentando nestes a síntese e liberação de fatores de crescimento, e micróglia, por diminuir sua síntese e liberação de citocinas inflamatórias. Modificado de BRANN et al., 2007.

A determinação das ações específicas do E₂, de acordo com o quadro inflamatório, nos diferentes tipos celulares presentes na lesão medular e os mecanismos moleculares deletérios e benéficos provocados pelo E₂ nesse processo inflamatório ainda precisam ser melhor elucidados. Possibilitando, assim, determinar a melhor concentração e janela terapêutica para sua administração no intuito de inibir os processos neurotóxicos sem interferir nos mecanismos neuroprotetores da inflamação que influenciam positivamente na regeneração após a lesão. Contudo, a maioria dos estudos indicam que o E₂ exerce um papel neuroprotetor na modulação de diversos processos da inflamação no SNC.

6.5 E₂ como um agente neuroprotetor multifatorial: possíveis mecanismos de ação

Como já foi exposto, a complexa cascata de danos secundários amplificam e propagam a lesão pelo tecido medular, fatores que dificultam o desenvolvimento de um tratamento eficaz e recuperação funcional da medula. Como esses danos secundários iniciam-se segundos a minutos após o trauma mecânico, o tratamento deve ser aplicado o mais cedo possível após a lesão inicial no intuito de atenuar ou evitar maior dano e disfunção da medula espinal. Até o momento, o único agente terapêutico indicado e utilizado na triagem clínica para o tratamento de humanos acometidos por essa patologia são altas doses de metilprednisolona. As funções principais desse corticosteroide são atenuar a peroxidação lipídica e a inflamação, contudo, só é indicado quando administrado poucas horas após a lesão, no máximo até 8 horas porque após esse período não provou ser eficaz em prover melhora dos pacientes (BRACKEN et al., 1984, 1990, 1997). Todavia, os resultados obtidos em diversos estudos clínicos e experimentais são controversos e essas crescentes evidências demonstram uma ineficiência da metilprednisolona em reverter os danos gerados pela lesão medular, além de gerar complicações médicas devido a intensa imunossupressão ocasionadas pelo seu uso, embora ainda seja o único tratamento medicamentoso utilizado na triagem clínica (BYDON et al., 2013; BOTELHO et al., 2009; SAYER et al., 2006; LANKHORST et al., 2000).

Em contrapartida, estudos em modelos animais reportam de forma majoritária os efeitos benéficos do E₂ no SNC que, em conjunto, sugerem um ação multifatorial desse agente por sua capacidade em modular diversos mecanismos celulares e moleculares, correspondentes aos danos secundários que ocorrem após a lesão medular, favorecendo o aumento da sobrevivência neuronal. A modulação desses mecanismos parece refletir na melhora da capacidade funcional, por conseguinte, melhora da capacidade locomotora após uma lesão na medula espinal.

Os mecanismos pelos quais o E₂ confere neuroproteção é por redução da apoptose (CHAOVIPOCH et al., 2006; SRIBNICK et al., 2006), redução da excitotoxicidade (WEAVER et al., 1997), indução da ativação de genes associados a fatores anti apoptóticos (bcl-2; bcl-xL), neurotróficos e regenerativos (BDNF; NGF; IGF-1; TGF-β) (SCOTT et al., 2012; POZZI et al., 2006) e estímulo à angiogênese microvascular que aumenta a circulação sanguínea local (MILLER & DUCKLES, 2008). Em adição, possui efeito anti-inflamatório (DIMAYUGA et al., 2005), e a estrutura fenólica desse esteroide confere propriedades antioxidantes (BEHL et al., 1997, SUGIOKA et al., 1987; WINTERLE et al., 2001; NILSEN, 2008).

O estresse oxidativo é um fator significativo após um dano medular que leva ao dano mitocondrial e morte celular secundária. É caracterizado pela acumulação de ROS, como ânion superóxido (O⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais hidroxila (OH⁻) e peróxido de nitrito (ONOO⁻), que são produzidos rapidamente após a lesão na medula espinal. Estudos *in vitro* têm mostrado o efeito protetor do E₂ contra a morte celular induzida pelo estresse oxidativo em diversos tipos celulares, incluindo linhagens de células neuronais (BIEWENGA et al., 2005; WANG et al., 2006), células neuronais primárias (NUMAKAWA et al., 2007; YU et al., 2004) e oligodendrócitos (TAKAO et al., 2004). Outro estudo demonstrou que o pré-tratamento *in vitro* de células de Schwann com E₂ aumentou a viabilidade dessas células contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após o transplante dessas células na medula lesionada de animais houve aumento da sobrevivência celular *in vivo* (SIRIPHORN et al., 2010). Em adição, o E₂ também foi capaz de reduzir a quantidade total de superóxidos no tecido medular *in vivo*, e essa resposta protetora contra a oxidação só foi evidenciada na fase aguda após a lesão na medula espinal sendo independente de ER-α (MOSQUERA et al., 2014). A estrutura química fenólica do estradiol favorece uma ação independente de ativação de receptores e permite o sequestro e "limpeza" dos radicais livres (WINTERLE et al., 2001), reduzindo os níveis de ROS que são muito altos após o trauma medular. Essa atividade antioxidante do E₂ talvez possa explicar evidência de que há menos ROS no fluido cerebrospinal das mulheres comparado aos homens após uma lesão traumática no cérebro (BAYIR et al., 2004). Vale ressaltar, que essa proteção do E₂ contra o estresse oxidativo parece ocorrer somente na fase aguda após o trauma, em contrapartida, parece haver um estímulo pró oxidativo quando é feita a exposição do E₂ em ambiente com níveis muito altos de ROS (NILSEN, 2008), como ocorre na fase crônica após a lesão medular. Em geral, a redução do estresse oxidativo pelo E₂ aumenta a viabilidade celular por melhorar a função mitocondrial e reduzir a degradação das células induzida pela calpaína e a neurodegeneração (MOSQUERA et al., 2014).

O estresse oxidativo é um evento chave na morte celular. Após o trauma na medula e isquemia tecidual há formação de ROS que provocam danos à mitocôndria levando a falha na fosforilação oxidativa mitocondrial gerando mais acúmulo de ROS que aumenta o estresse oxidativo e leva a peroxidação lipídica, dano ao DNA e oxidação proteica. Em adição, há falha na produção de ATP diminuindo seus níveis intracelulares, que impede o funcionamento de canais iônicos dependentes de ATP levando à necrose celular pelo colapso osmótico. Além disso, a excitotoxicidade induzida por excesso de estimulação de receptores NMDA, AMPA dentre outros após a lesão medular, provoca o aumento excessivo de Ca²⁺ intracelular o que

leva a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e a ativação de proteases no citosol como a calpaína, que degrada o citoesqueleto e outras proteínas, e também induz a expressão de proteínas pró apoptóticas (Bax, bad e bcl-xs) que, por sua vez, induzem a formação de poros na membrana mitocondrial aumentando sua permeabilidade e permitindo a liberação do citocromo C que vai ativar, no citoplasma, as enzimas caspases indutoras da apoptose celular (SIMPKINS et al., 2010; SRIBNICK et al., 2006; CHI et al., 2014). Portanto, o correto funcionamento da mitocôndria é essencial para a manutenção da viabilidade neuronal e o E₂ parece ser um agente importante na proteção contra o dano provocado pela falha mitocondrial. O E₂ estimula a fosforilação oxidativa mitocondrial preservando os níveis intracelulares de ATP, possibilitando o funcionamento da bomba de Na⁺/K⁺/ATPase mantendo a homeostase eletrolítica, e diminuindo a formação de ROS e o estresse oxidativo por consequência. Além disso, o E₂ aumenta o sequestro de Ca²⁺ presente no citosol pela mitocôndria promovendo sua homeostase intracelular e esse aumento de Ca²⁺ no interior da mitocôndria estimula a expressão das proteínas anti apoptóticas, bcl-2 e bcl-xL, prevenindo a formação de poros permeáveis na membrana mitocondrial e a liberação do citocromo C e isso reduz a ativação das caspases no citoplasma e o estímulo a apoptose celular (NILSEN & BRINTON, 2004; SIMPKINS et al., 2010; ARNOLD & BEYER, 2009).

As proteínas apoptóticas são conhecidas pelo envolvimento na sinalização do processo apoptótico, por inibir (bcl-2; bcl-xL) ou estimular (Bax; bad; bcl-xs) a formação de poros transitório de permeabilidade na membrana externa mitocondrial que induz a apoptose celular, como ocorre em lesão no SNC e doenças neurodegenerativas (MARTIN, 2001; CHI et al., 2014) e a maior expressão de proteínas pró apoptóticas e menor das anti apoptóticas induz a ativação e atividade das caspases após lesão na medula espinal e no SNC supraespinal (ELDADAH & FADEN, 2000; CITRON et al., 2000; YAKOVLEV & FADEN, 2001; KNOBLACH et al., 2005; CHI et al., 2014). As caspases são enzimas proteolíticas que clivam uma variedade de substratos intracelulares de forma coordenada e desregulam a fisiologia celular provocando a apoptose (CHI et al., 2014).

Em modelos experimentais de lesão medular espinal *in vivo* já foi demonstrado que o tratamento com E₂ diminuiu o número de células positivas para TUNEL que é um marcador de morte celular apoptótica (YUNE et al., 2004; CHAOVIPOCH et al., 2006; YUNE et al., 2008; CUZZOCREA et al., 2008; KACHADROKA et al., 2010; SAMANTARAY et al., 2010b; SAMANTARAY et al., 2011; HU et al., 2012), reduziu a expressão da proteína pró apoptótica Bax (CUZZOCREA et al., 2008; SRIBNICK et al., 2010; KACHADROKA et al., 2010; SAMANTARAY et al., 2011) e aumentou a expressão das proteínas anti apoptóticas bcl-xL (YUNE et al., 2004; KACHADROKA et al., 2010) e bcl-2 (YUNE et al., 2004; YUNE et al., 2008; CUZZOCREA et al., 2008; SRIBNICK et al., 2010; SAMANTARAY et al., 2011), sendo que esse aumento da expressão de bcl-2 parece ser induzido pelo E₂ através da cascata de sinalização intracelular PI3K/Akt/CREB (YUNE et al., 2008). Também atenuou a liberação do citocromo C pela mitocôndria (SRIBNICK et al., 2006), reduziu a ativação e atividade da caspase-3 (YUNE et al., 2004; SRIBNICK et al., 2010; LEE et al., 2012b), caspase-9 (LEE et al., 2012b) e calpaína (SRIBNICK et al., 2010; SRIBNICK et al., 2006) conferindo neuroproteção contra a apoptose e aumentando a sobrevivência neuronal na lesão medular espinal. Lee e colaboradores (2012b) detectaram ainda que o E₂ produziu efeitos neuroprotetores através da redução da apoptose dos oligodendrócitos, diminuindo a degeneração axonal, através da inibição da ativação da via RhoA-JNK3. Essas moléculas também foram implicadas na apoptose celular após a lesão medular (DUBREUIL et al., 2003; LI et al., 2007).

Um estudo reportou que o efeito benéfico e protetor do E₂ contra a apoptose pode ser mimetizado por um agonista do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) e abolido quando a expressão de GPER é bloqueada (HU et al., 2012). Em adição, esse grupo

demonstrou que um antagonista de receptor nuclear para estrogênio (ER- α e ER- β) não aboliu o efeito protetor do E₂. Assim, em relação a apoptose, GPER pode ser o principal mediador das ações do E₂ após a lesão medular. Os autores detectaram a expressão de GPER em neurônio, oligodendrócitos e micróglias, mas não nos astrócitos, do corno ventral da medula e na substância branca, ambos diretamente associados com a função motora. Essa expressão não foi alterada após a lesão, porém, na presença do E₂ e do agonista de GPER houve aumento da expressão de GPER, fator adicional que pode intensificar a resposta neuroprotetora. Em conjunto, esses dados sugerem que a recuperação locomotora associada à exposição ao E₂ parece ser mediada por GPER nos neurônios motores da medula espinal.

Em contrapartida, outros estudos sugerem a participação da ação neuroprotetora do E₂ através da ativação dos receptores intracelulares, ER- α e ER- β , na neuroproteção à medula espinal. Foi demonstrada a expressão desses receptores na medula espinal em neurônios, glias e oligodendrócitos (PAPKA et al., 2001). Diversas populações neuronais expressam níveis baixos ou moderados de ER- α e ER- β , enquanto os astrócitos medulares expressam principalmente ER- α (GIRAUD et al., 2010) e as micróglias medulares expressam principalmente ER- β (WU et al., 2013). Também são encontrados em cultura de células de oligodendrócitos (LEE, 2012b).

Das e colaboradores (2011) investigaram o papel do E₂ na morte celular de motoneurônios induzida por TNF- α *in vitro* e reportaram que a exposição ao E₂ e agonistas específicos de ER- α e ER- β aumentou a expressão desses receptores e provocou neuroproteção pela aumento da expressão de marcadores anti apoptóticos (Akt, CREB, bcl-2, Src e ERK), sendo que antagonistas específicos de ER- α e ER- β nucleares diminuíram de forma significativa essa resposta protetora. Corroborando com essa hipótese, outro grupo reportou o aumento na expressão de ER- α na medula espinal induzida pela lesão *in vivo* e ainda que o tratamento com E₂ aumentou ainda mais a expressão desse receptor. Ademais, através de um antagonista específico de ER- α houve o bloqueio do efeito protetor observado pela melhora da capacidade locomotora e extensão da lesão tecidual, sugerindo que esse efeito é mediado por ER- α (MOSQUERA et al., 2014). Esses resultados estão de acordo com o reportado por Siriphorn e colaboradores (2012) que co-administraram E₂ e um antagonista competitivo de ER- α e ER- β e sugeriram que os efeitos benéficos do E₂ na sobrevivência neuronal, diminuição da inflamação e da gliose reativa após a lesão espinal são mediados por ligação do E₂ a esses receptores. Outros autores sugeriram que o efeito protetora do E₂ na redução da apoptose de oligodendrócitos e diminuição da degeneração axonal também ocorreu através da ativação de ER- α e ER- β , uma vez que o antagonista desses receptores reverteu esse efeito benéfico (LEE et al., 2012b). Em confronto com esses dados, outros estudos não detectaram diferença na expressão desses receptores pós lesão (KACHADROKA et al., 2010; LEE et al., 2012b) e outro detectou uma redução na expressão de ER- α e ER- β após a lesão medular espinal, porém observaram um aumento na expressão de ER- β nas medulas tratadas com E₂ (SRIBNICK et al., 2006).

Os dados em relação à expressão de todos os subtipos de receptores para E₂ na medula espinal e após sua lesão ainda são escassos e controversos, são necessários avanços nas pesquisas para melhor determinação. No entanto, essas diferenças podem ser atribuídas ao tipo de modelo para indução da lesão, a espécie animal utilizada, o gênero e o protocolo de administração do E₂, ou seja, se o animal foi tratado previamente ou após a lesão medular e se de forma contínua ou não (ELKABES & NICOT, 2014).

Apesar disso, muitos mecanismos protetores dependentes da ativação de receptor para E₂ têm sido propostos incluindo a ativação do elemento responsivo ao estrogênio (ERE) aumentando a expressão da proteína anti apoptótica bcl-2 (DONG et al., 1999; DUBAL et al., 1999) e induzindo a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (SOHRABJI et al., 1995; CARBONE & HANDA, 2013). O BDNF têm mostrado efeitos

protetores *in vivo* após a lesão medular espinal (NAKAJIMA et al., 2007). Por outro lado, muitos efeitos citoprotetores têm sido propostos por mecanismos independentes da ativação de receptores para E₂ incluindo a inibição dos canais de Ca²⁺ do tipo L (SRIBNICK et al., 2009) ou receptores NMDA (WEAVER et al., 1997) reduzindo a excitotoxicidade, ações antioxidantes (WINTERLE et al., 2001; PROKAI & SIMPKINS, 2007) e proteção contra a disfunção mitocondrial (NILSEN & BRINTON, 2003; SIMPKINS & DYKENS, 2008; ARNOLD & BEYER, 2009). Estudos a nível cerebral mostram que esses mecanismos de ação dependentes ou independentes de ativação dos receptores intracelulares para E₂ podem ser determinados pela dose do hormônio administrada. Em geral, sugere-se que os níveis farmacológicos de E₂ protegem através de mecanismos que não requerem a ativação de receptores, enquanto níveis fisiológicos agem através de mecanismos dependentes da ativação desses receptores (WISE, 2002).

Esses múltiplos mecanismos neuroprotetores celulares e moleculares do E₂ geram evidências promissoras que o E₂ possa ser um agente multifatorial para o uso no tratamento dessa patologia em homens e mulheres. Entretanto, a dose de E₂, o protocolo de administração e a janela terapêutica ideal que promova efeitos neuroprotetores ainda precisa ser determinada, embora as pesquisas enfatizem, de forma majoritária, os efeitos neuroprotetores do E₂. Nesse sentido, um estudo avaliou o efeito do E₂ na lesão medular em roedores comparando o pós-tratamento com uma dose alta ou uma dose baixa (200 µg/Kg/dia e 10 µg/Kg/dia, respectivamente). Houve redução da morte neuronal em ambas as doses 48 horas após a lesão (SAMANTARAY et al., 2010). Posteriormente, testaram o efeito de três diferentes doses de E₂ (1 µg/Kg, 5 µg/Kg e 10 µg/Kg), para determinar a menor concentração que produziria atenuação dos efeitos secundários à lesão medular, e utilizaram diferentes vias (subcutânea e intravenosa) e diferentes tempos de administração (15 minutos, 2 horas e 24 horas). Concluíram que 48 horas pós lesão as doses de 5 e 10 µg/Kg foram capazes de atenuar a ativação microglial e em todas as doses testadas houve diminuição da morte neuronal apoptótica evidenciada na menor expressão de Bax e maior de bcl-2. Entretanto, a dose de 10µg/Kg mostrou uma eficácia maior em todos os parâmetros analisados. Não observaram diferenças nas respostas quanto à via de administração e em todos os tempos que o E₂ foi administrado houve efeito neuroprotetor, todavia, essa proteção foi significativamente maior na administração feita 15 minutos após a lesão medular (SAMANTARAY et al., 2011). Isso sugere que quanto mais cedo for feita a intervenção com E₂ após a lesão mais eficaz será sua ação protetora e que a via de administração não parece interferir nessa resposta.

Importante salientar que a crônica administração de E₂ pode elicitar efeitos indesejáveis aos pacientes com lesão medular, como o aumento do risco trombose venosa, efeito mitogênico no tecido mamário e endometrial gerando câncer, além da feminilização nos homens (SAMANTARAY et al., 2011; MOSQUERA et al., 2014). Contudo, efeitos neuroprotetores de moduladores seletivos do receptor de estrogênio (do inglês, SERMs), como o Tamoxifen e o Raloxifen, têm sido reportados (DONCARLOS et al., 2009) sem as complicações que o E₂ pode gerar. Os SERMs são compostos que interagem com os receptores de estrogênio e produzem efeitos agonistas ou antagonistas de acordo com o tecido alvo e são clinicamente utilizados no tratamento do câncer mamário, devido o seu efeito anti-estrogênico nesse tecido (BEHL, 2002a). Todavia, têm demonstrado efeito agonista promovendo resposta estrogênica neuroprotetora no SNC, inclusive melhorando a recuperação locomotora, diminuindo o estresse oxidativo e o processo inflamatório na medula lesionada (GUPTARAK et al., 2014; ISMAILOĞLU et al., 2010, 2013; TIAN et al., 2009). Isso sugere que esses compostos também são possíveis agentes terapêuticos no tratamento da lesão medular. No entanto, ainda é necessário maior investigação para determinar de forma mais concisa os efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos nos diversos tecidos para evitar ações deletérias.

À luz dos dados reportados no presente estudo e dos evidenciados em tantos outros, vários mecanismos fisiológicos do E₂ influenciam positivamente na recuperação funcional de animais submetidos à lesão medular espinal, devido ao seu efeito neuroprotetor atenuando a gravidade de diversos danos secundários à lesão e diminuindo a degeneração tecidual. Conseqüentemente, o E₂ reduz a disfunção neurológica por suas múltiplas ações na medula: anti-inflamatória, anti apoptótica e antioxidante. Além de possuir uma ação multifatorial nessa cascata tão complexa na lesão medular, o E₂ é um hormônio esteroide endógeno o que o torna um agente em potencial para o tratamento de pacientes acometidos (Figura 29).

Contudo, a perspectiva da traslação do tratamento da lesão medular com E₂ dos estudos experimentais pré-clínicos para a fase de testes na triagem clínica em humanos ainda não parece segura, visto que poucos estudos experimentais pré-clínicos foram conduzidos dentro dos últimos 10 anos, apenas 17 estudos reportados. Estes foram conduzidos em roedores, em modelos de lesão um tanto quanto variável e o E₂ foi administrado em uma grande variedade de doses, de 0,01 mg/Kg a 600 mg/Kg. A maioria administrou o E₂ antes, imediatamente ou 15 minutos após a lesão. Portanto, a sua eficácia em modelos subagudos e crônicos de lesão ainda são muito escassos, porém clinicamente relevantes. Ademais, seria interessante conduzir estudos em animais maiores, como primatas, para corroborar a neuroproteção induzida pelo E₂ (KWON et al., 2012). Nesse sentido, embora muitos estudos sugiram que o E₂ seja um agente neuroprotetor promissor no tratamento adjuvante medicamentoso da lesão medular (KWON et al., 2011), muitas questões ainda precisam de maior investigação pré-clínica antes da considerar o E₂ como agente terapêutico para testes na fase de triagem clínica que são caros, escassos e desafiadores.

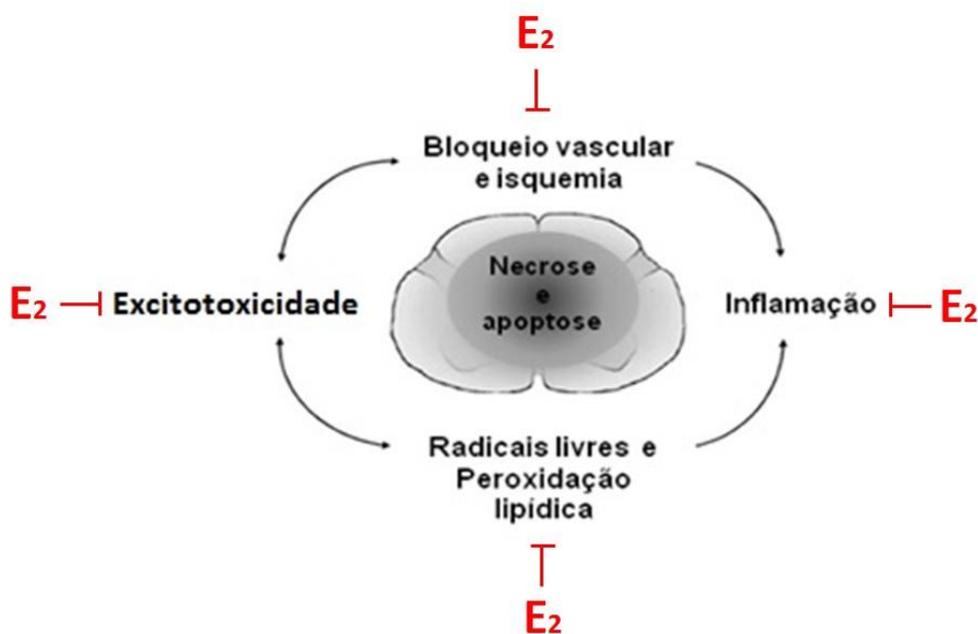


Figura 29: Ações neuroprotetoras do E₂ na lesão medular espinal: anti-inflamatório, angiogênico, inibidor da excitotoxicidade e da morte celular. O E₂ reduz o processo inflamatório diminuindo seus efeitos neurotóxicos, reduz os radicais livres atenuando o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, reduz a excitotoxicidade induzida por glutamato e outros aminoácidos excitatórios do SNC e diminui a isquemia tecidual por aumentar o fluxo sanguíneo local. A diminuição desses danos secundários após a lesão induzido por E₂, por fim, diminui a morte celular necrótica e apoptótica, no entanto, o E₂ também exerce ação direta nas células prevenindo a apoptose celular. Modificado de KWON et al., 2004.

7 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, concluímos que:

- ✓ O E₂ (Cipionato de estradiol) administrado 15 minutos após a lesão medular por compressão moderada promoveu uma melhora significativa da performance locomotora de ratas OVX em relação ao seu controle que foi a administração de óleo.
- ✓ O E₂ (Cipionato de estradiol) administrado 15 minutos após a lesão medular por compressão moderada reduziu a degeneração neural observada no tamanho da lesão no tecido da medula espinal que foi significativamente menor comparada ao seu controle que foi a administração de óleo.
- ✓ Houve uma correlação significativamente positiva entre a performance locomotora dos animais e a área da lesão no tecido medular indicando que a melhora da capacidade locomotora dos animais tratados com E₂ (Cipionato de estradiol) foi devido a menor perda de tecido na medula espinal.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o E₂ (Cipionato de estradiol) é capaz de reduzir o dano provocado no tecido da medula espinal após a lesão por proteger o tecido íntegro e, conseqüentemente, promover maior recuperação da função medular devido a melhora da performance locomotora. De acordo com esses dados, o presente estudo sugere que o E₂ é um agente neuroprotetor que tem potencial para ser uma terapia adjuvante no tratamento da lesão medular espinal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASSOGLU, K.; BAUER, J.; KASSIOTIS, G.; PASPARAKIS, M.; LASSMANN, H.; KOLLIAS, G.; PROBERT, L. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendrogliopathy. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 3, p. 801-813, 1998.

ALMEIDA, M.; MARTIN-MILLAN, M.; AMBROGINI, E.; BRADSHER, R.; HAN, L.; CHEN, X. D.; ROBERSON, P. K.; WEINSTEIN, R. S.; O'BRIEN, C. A.; JILKA, R. L.; MANOLAGAS, S. C. Estrogens attenuate oxidative stress and the differentiation and apoptosis of osteoblasts by DNA-binding-independent actions of the ER α . **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 769-781, 2010.

AMANTEA, D.; RUSSO, R.; BAGETTA, G.; CORASANITI, M. T. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 2, p. 119-132, 2005.

ANDERSEN M.L.; TUFIK S. Animal models as ethical tools in biomedical research. **CLR Balieiro Editores**, São Paulo, 1ª ed., 2010.

ARNOLD, S.; BEYER, C. Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 1, p. 1-11, 2009.

BACHIS, A.; COLANGELO, A. M.; VICINI, S.; DOE, P. P.; DE BERNARDI, M. A.; BROOKER, G.; MOCCHETTI, I. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 3104-3112, 2001.

BAO F.; LIU D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 59-70, 2003.

BARTHOLDI, D.; SCHWAB, M. E. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: An in situ hybridization study. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 1422-1438, 1997.

BASSO, M. D.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 1995.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Exp Neurol.**, v. 139, n. 2, p. 244-256, 1996.

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

BASSO, D. M.; FISHER, L. C.; ANDERSON, A. J.; JAKEMAN, L. B.; MCTIGUE, D. M.; POPOVICH, P. G. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. **Journal of Neurotrauma**, v. 23, n. 5, p. 635-659, 2006.

- BAYIR, H.; MARION, D. W.; PUCCIO, A. M.; WISNIEWSKI, S. R.; JANESKO, K. L.; CLARK, R. S.; KOCHANNEK, P. M. Marked gender effect on lipid peroxidation after severe traumatic brain injury in adult patients. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2004.
- BEATTIE, M. S.; FAROOQUI, A. A.; BRESNAHAN, J. C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 17, n. 10, p. 915-925, 2000.
- BECK K. D.; NGUYEN H. X.; GALVAN M. D.; SALAZAR D. L.; WOODRUFF T. M.; ANDERSON A. J. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. **Brain**, v.133, n. 2, p. 433–47, 2010
- BEHL, C.; WIDMANN, M.; TRAPP, T.; HOLSBOER, F. 17-[beta] Estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, n. 2, p. 473-482, 1995
- BEHL, C.; SKUTELLA, T.; FRANK, L. H.; POST, A.; WIDMANN, M.; NEWTON, C. J.; HOLSBOER, F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. **Molecular Pharmacology**, v. 51, n. 4, p. 535-541, 1997.
- BEHL, C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 433-442, 2002a.
- BEHL, C. Estrogen can protect neurons: modes of action. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 83, n. 1, p. 195-197, 2002b.
- BEHRMANN, D. L.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S.; SHAH, B. R. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. **Journal of Neurotrauma**, v. 9, n. 3, p. 197-217, 1992.
- BETHEA, J. R.; NAGASHIMA, H.; ACOSTA, M. C.; BRICENO, C.; GOMEZ, F.; MARCILLO, A. E.; DIETRICH, W. D. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 16, n. 10, p. 851-863, 1999.
- BETHEA J.R. Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. **Prog Brain Res**, v. 128, p. 33–42, 2000.
- BETHEA, J. R.; DIETRICH, D. W. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. **Current Opinion in Neurology**, v. 15, n. 3, p. 355-360, 2002.
- BIEWENGA, E.; CABELL, L.; AUDESIRK, T. Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress. **Neuroscience Letters**, v. 373, n. 3, p. 179-183, 2005.
- BISHOP, J.; SIMPKINS, J. W. Estradiol Treatment Increases Viability of Glioma and Neuroblastoma Cells *in vitro*. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 303-308, 1994.
- BLIGHT, A. R. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. **Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 521-543, 1983.

BLIGHT, A. R.; TOOMBS, J. P.; BAUER, M. S.; WIDMER, W. R. The effects of 4-aminopyridine on neurological deficits in chronic cases of traumatic spinal cord injury in dogs: a phase I clinical trial. **Journal of Neurotrauma**, v. 8, n. 2, p. 103-119, 1991.

BORGENS, R. B.; SHI, R. Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 1, p. 27-35, 2000.

BOTELHO, R. V., DANIEL, J. W., BOULOSA, J. L. R., COLLI, B. O., FARIAS, R. D. L., MORAES, O. J. S., PIMENTA JR., W. E.; RIBEIRO, C. H.; RIBEIRO, F. R. B.; TARICCO, M. A.; CARVALHO, M. V.; BERNARDO, W. M. Effectiveness of methylprednisolone in the acute phase of spinal cord injuries: a systematic review of randomized controlled trials. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 729-737, 2009.

BRACKEN, M. B.; COLLINS, W. F.; FREEMAN, D. F.; SHEPARD, M. J.; WAGNER, F. W. SILTEN, R. M.; HELLENBRAND, G. K.; RANSOHOFF, J.; HUNT, W. E.; PEROT JR, P. L.; GROSSMAN, R. G.; GREEN, B. A.; EISENBERG, H. M.; RIFKINSON, N.; GOODMAN, J. H.; MEAGHER, J. N.; FISCHER, B.; CLIFTON, G. L.; FLAMM, E. S.; STEPHEN E.; RAWE, S. E. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. **Jama**, v. 251, n. 1, p. 45-52, 1984.

BRACKEN, M. B.; SHEPARD, M. J.; COLLINS, W. F.; HOLFORD, T. R.; YOUNG, W.; BASKIN, D. S.; EISENBERG, H. M.; FLAMM, E.; LEO-SUMMERS, L.; MAROON, J.; MARSHALL, L. F.; PEROT, JR., P. L.; PIEPMEIER, J.; SONNTAG, V. K. H.; WAGNER, F. C.; WILBERGER, J. E.; WINN, H. R. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury: results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 20, p. 1405-1411, 1990.

BRACKEN, M. B.; SHEPARD, M. J.; HOLFORD, T. R.; LEO-SUMMERS, L.; ALDRICH, E. F.; FAZL, M.; FEHLINGS, M.; HERR, D. L.; HITCHON, P. W.; MARSHALL, L. F.; NOCKELS, R. P.; PASCALE, V.; PEROT JR, P. L.; PIEPMEIER, J.; SONNTAG, V. K. H.; WAGNER, F.; WILBERGER, J. E.; WINN, H. R.; YOUNG, W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. **Jama**, v. 277, n. 20, p. 1597-1604, 1997.

BRANN, D. W.; DHANDAPANI, K.; WAKADE, C.; MAHESH, V. B.; KHAN, M. M. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. **Steroids**, v. 72, n. 5, p. 381-405, 2007.

BREWER, K. L.; BETHEA, J. R.; YEZIERSKI, R. P. Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 159, n. 2, p. 484-493, 1999.

BUNGE, R. P.; PUCKETT, W. R.; BECERRA, J. L.; MARCILLO, A.; QUENCER, R. M. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. **Advances in Neurology**, v. 59, p. 75, 1993.

BYDON, M., LIN, J., MACKI, M., GOKASLAN, Z. L., & BYDON, A. The current role of steroids in acute spinal cord injury. **World Neurosurgery**, 2013.

- CAMPBELL, S. J.; JIANG, Y.; DAVIS, A. E.; FARRANDS, R.; HOLBROOK, J.; LEPPERT, D.; ANTHONY, D. C. Immunomodulatory effects of etanercept in a model of brain injury act through attenuation of the acute-phase response. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 6, p. 2245-2255, 2007.
- CARBONE, D. L.; HANDA, R. J. Sex and stress hormone influences on the expression and activity of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v. 239, p. 295-303, 2013.
- CARDONA-GÓMEZ, G. P.; CHOWEN, J. A.; GARCIA-SEGURA, L. M. Estradiol and progesterone regulate the expression of insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor binding protein-2 in the hypothalamus of adult female rats. **Journal of Neurobiology**, v. 43, n. 3, p. 269-281, 2000.
- CARLSON, D.; GORDEN, C. Current developments in spinal cord injury research. **The Spine Journal**, v. 2, n. 2, p. 116-128, 2002.
- CASHA, S. W. R. Y.; YU, W. R.; FEHLINGS, M. G. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. **Neuroscience**, v. 103, n. 1, p. 203-218, 2001.
- CHAOVIPOCH, P.; JELKS, K. A. B.; GERHOLD, L. M.; WEST, E. J.; CHONGTHAMMAKUN, S.; FLOYD, C. L. 17 β -Estradiol Is Protective in Spinal Cord Injury in Post-and Pre-Menopausal Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 23, n. 6, p. 830-852, 2006.
- CHI, X.; KALE, J.; LEBER, B.; ANDREWS, D. W. Regulating cell death at, on, and in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, p. 2100-2113, 2014.
- CHOI, D. W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends in Neurosciences**, v. 11, n. 10, p. 465-469, 1988.
- CITRON, B. A.; ARNOLD, P. M.; SEBASTIAN, C.; QIN, F.; MALLADI, S.; AMEENUDDIN, S.; LANDIS, M. E.; FESTOFF, B. W. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. **Experimental Neurology**, v. 166, n. 2, p. 213-226, 2000.
- CREGG, J. M.; DEPAUL, M. A.; FILOUS, A. R.; LANG, B. T.; TRAN, A.; SILVER, J. Functional regeneration beyond the glial scar. **Experimental Neurology**, v. 253, p. 197-207, 2014.
- CROWE, M. J.; BRESNAHAN, J. C.; SHUMAN, S. L.; MASTERS, J. N.; CROWE, M. S. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. **Nature Medicine**, v. 3, n. 1, p. 73-76, 1997.
- CUZZOCREA, S.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; PELI, A.; BRAMANTI, P.; CHAUDRY, I. H. Effect of 17 β -estradiol on signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma. **Shock**, v. 29, n. 3, p. 362-371, 2008.
- DAS, A.; SMITH, J. A.; GIBSON, C.; VARMA, A. K.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF- α -induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. **J Endocrinol.**, v. 208, n. 2, p. 171-182, 2011.

DESJARDINS, G.C.; BEAUDET, A.; MEANEY, M.J.; BRAWER, J.R. Estrogen-induced hypothalamic beta-endorphin neuron loss: a possible model of hypothalamic aging. **Exp. Gerontol.**, v. 30, n. 3-4, p. 253-267, 1995.

DIMAYUGA, F. O.; REED, J. L.; CARNERO, G. A.; WANG, C.; DIMAYUGA, E. R.; DIMAYUGA, V. M.; PERGER, A.; WILSON, M. E.; KELLER, J. N.; BRUCE-KELLER, A. J. Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 161, n. 1, p. 123-136, 2005.

DODEL, R. C.; DU, Y.; BALES, K. R.; GAO, F.; PAUL, S. M. Sodium salicylate and 17beta-estradiol attenuate nuclear transcription factor NF-kappaB translocation in cultured rat astroglial cultures following exposure to amyloid A beta(1±40) and lipopolysaccharides. **J. Neurochem.**, v. 73, n. 4, p. 1453-1460, 1999.

DOMENICONI, M.; CAO, Z.; SPENCER, T.; SIVASANKARAN, R.; WANG, K. C.; NIKULINA, E.; FILBIN, M. T. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. **Neuron**, v. 35, n. 2, p. 283-290, 2002.

DONCARLOS, L. L.; AZCOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, L. M. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. S113-S122, 2009.

DONG, L.; WANG, W.; WANG, F.; STONER, M.; REED, J. C.; HARIGAI, M.; SAMUDIO, I.; KLADDE, M. P.; VYHLIDAL, C.; SAFE S. Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 45, p. 32099-32107, 1999.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 209, n. 2, p. 378-388, 2008.

DUBAL, D. B.; SHUGHRUE, P. J.; WILSON, M. E.; MERCHENTHALER, I.; WISE, P. M. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 15, p. 6385-6393, 1999.

DUBREUIL, C. I.; WINTON, M. J.; MCKERRACHER, L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 2, p. 233-243, 2003.

ELDADAH, B. A.; FADEN, A. I. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 17, n. 10, p. 811-829, 2000.

ELKABES, S., NICOT, A.B.. Sex steroids and neuroprotection in spinal cord injury: A review of preclinical investigations, **Exp. Neurol.**, 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.008>>. Retirado 27 de jun 2014.

EMERY, E.; ALDANA, P.; BUNGE, M. B.; PUCKETT, W.; SRINIVASAN, A.; KEANE, R. W.; LEVI, A. D. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery**, v. 89, n. 6, p. 911-920, 1998.

FAROOQUE, M.; SUO, Z.; ARNOLD, P. M.; WULSER, M. J.; CHOU, C. T.; VANCURA, R. W.; S FOWLER, S.; FESTOFF, B. W. Gender-related differences in recovery of locomotor function after spinal cord injury in mice. **Spinal Cord**, v. 44, n. 3, p. 182-187, 2006.

- FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Research Bulletin**, v. 49, n. 6, p. 377-391, 1999.
- FEHLINGS, M. G.; NGUYEN, D. H. Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 1, p. 109-112, 2010.
- FLEMING, J. C.; NORENBERG, M. D.; RAMSAY, D. A.; DEKABAN, G. A.; MARCILLO, A. E.; SAENZ, A. D.; WEAVER, L. C. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. **Brain**, v. 129, n. 12, p. 3249-3269, 2006.
- FORYST-LUDWIG, A.; KINTSCHER, U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 1, p. 74-81, 2010.
- GARCIA-SEGURA, L. M.; CARDONA-GOMEZ, P.; NAFTOLIN, F.; CHOWEN, J. A. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. **Neuroreport**, v. 9, n. 4, p. 593-597, 1998.
- GARCIA-SEGURA, L. M.; WOZNIAK, A.; AZCOITIA, I.; RODRIGUEZ, J. R.; HUTCHISON, R. E.; HUTCHISON, J. B. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. **Neuroscience**, v. 89, n. 2, p. 567-578, 1999.
- GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L. L. Neuroprotection by estradiol. **Progress in Neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 29-60, 2001.
- GIBBS, R. B. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. **Brain Research**, v. 844, n. 1, p. 20-27, 1999.
- GIRAUD, S. N.; CARON, C. M.; PHAM-DINH, D.; KITABGI, P.; NICOT, A. B. Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and Nf-kappaB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 107, n. 18, p. 8416-8421, 2010.
- GOLDBERGER, M. E.; BREGMAN, B. S.; VIERCK JR, C. J.; BROWN, M. Criteria for Assessing Recovery of Function After Spinal Cord Injury: Behavioral Methods. **Journal of Neurotrauma**, v. 8, n. 1, p. 3-9, 1991.
- GRANT, G. Rat Nervous System. **Elsevier**, 2004.
- GREEN, P. S.; SIMPKINS, J. W. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 347-358, 2000.
- GRUNER, JOHN A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. **Journal of Neurotrauma**, v. 9, n. 2, p. 123-128, 1992.
- GRUOL, D. L.; NELSON, T. E. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v. 15, n. 3, p. 307-339, 1997.
- GUERRERO, A. R.; UCHIDA, K.; NAKAJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAMURA, M.; JOHNSON, W. E.; BABA, H. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic

pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. **J Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 40, 2012.

GUPTARAK, J.; WIKTOROWICZ, J. E.; SADYGOV, R. G.; ZIVADINOVIC, D.; PAULUCCI-HOLTHAUZEN, A. A.; VERGARA, L.; NESIC, O. The cancer drug tamoxifen: a potential therapeutic treatment for spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 31, n. 3, p. 268-283, 2014.

HAGE, F. G.; OPARIL, S. Ovarian hormones and vascular disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 28, n. 4, p. 411-416, 2013.

HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 263-280, 2006.

HAPPEL, R. D.; Smith, K. P.; BANIK, N. L.; Powers, J.M.; Hogan, E. L.; Balentine, D.J. Ca^{2+} accumulation in experimental spinal cord trauma. **Brain Research**, v. 211, n. 2, p. 476-479, 1981.

HAUSMANN, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 41, n. 7, p. 369-378, 2003.

HAYES, K. C.; KAKULAS, B. A. Neuropathology of human spinal cord injury sustained in sports-related activities. **J Neurotrauma**, v. 14, n. 4, 235-248, 1997.

HISAHARA, S.; SHOJI, S. I.; OKANO, H.; MIURA, M. ICE/CED-3 Family Executes Oligodendrocyte Apoptosis by Tumor Necrosis Factor. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 1, p. 10-20, 1997.

HU, R.; SUN, H.; ZHANG, Q.; CHEN, J.; WU, N.; MENG, H.; CUI, G.; HU, S.; LI, F.; LIN, J.; WAN, Q.; FENG, H. G-protein coupled estrogen receptor 1 mediated estrogenic neuroprotection against spinal cord injury*. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 12, p. 3230-3237, 2012.

HULSEBOSCH, C. E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Advances in Physiology Education**, v. 26, n. 4, p. 238-255, 2002.

IMAIZUMI, T.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S. G. Anoxie Injury in the Rat Spinal Cord: Pharmacological Evidence for Multiple Steps in Ca^{2+} -Dependent Injury of the Dorsal Columns. **Journal of Neurotrauma**, v. 14, n. 5, p. 299-311, 1997.

ISMAILOĞLU, O.; ORAL, B.; GÖRGÜLÜ, A.; SÜTCÜ, R.; DEMIR, N. Neuroprotective effects of tamoxifen on experimental spinal cord injury in rats. **J Clin Neurosci**, v 17, n. 10, p. 1306-1310, 2010.

ISMAILOĞLU, Ö.; ORAL, B.; SÜTCÜ, R.; KARA, Y.; TOMRUK, O.; DEMIR, N. Neuroprotective effects of raloxifene on experimental spinal cord injury in rats. **Am J Med Sci**, v. 345, n. 1, p. 39-44, 2013.

KACHADROKA, S.; HALL, A. M.; NIEDZIELKO, T. L.; CHONGTHAMMAKUN, S.; FLOYD, C. L. Effect of Endogenous Androgens on 17β -Estradiol-Mediated Protection after Spinal Cord Injury in Male Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 27, n. 3, p. 611-626, 2010.

KANDEL E.R.; SCHWARTZ J.M.; JESSELL T.M. Principles of Neuronal Science. **The McGraw-Hill Companies**, EUA, 4ed., 2000.

- KARKI, P.; SMITH, K.; JOHNSON, J. J.; LEE, E. Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: role of transforming growth factor- α in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 389, n. 1-2, p. 58-64, 2014.
- KLOOS A.D.; FISHER L.C.; DETLOFF M.R.; HASSENZAHL D.L.; BASSO D.M. Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. **Exp Neurol**, v. 191, n.2, p. 251–265, 2005.
- KNOBLACH, S. M.; HUANG, X.; VANGELDEREN, J.; CALVA-CERQUEIRA, D.; FADEN, A. I. Selective caspase activation may contribute to neurological dysfunction after experimental spinal cord trauma. **Journal of Neuroscience Research**, v. 80, n. 3, p. 369-380, 2005.
- KRAFT, A. D.; HARRY, G. J. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 7, p. 2980-3018, 2011.
- KWON, B. K.; BORISOFF, J. F.; TETZLAFF, W. Molecular targets for therapeutic intervention after spinal cord injury. **Molecular Interventions**, v. 2, n. 4, p. 244, 2002a.
- KWON, B. K.; OXLAND, T. R.; TETZLAFF, W. Animal models used in spinal cord regeneration research. **Spine**, v. 27, n. 14, p. 1504-1510, 2002b.
- KWON, B. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N.; BEINER, J.; VACCARO, A. R. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. **The Spine Journal**, v. 4, n. 4, p. 451-464, 2004.
- KWON, B. K.; OKON, E.; HILLYER, J.; MANN, C.; BAPTISTE, D.; WEAVER, L. C.; FEHLINGS, M. G.; TETZLAFF, W. A systematic review of non-invasive pharmacologic neuroprotective treatments for acute spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 28, n. 8, p. 1545-1588, 2011.
- KWON, B. K.; GHAG, A.; REICHL, L.; DVORAK, M. F.; ILLES, J.; TETZLAFF, W. Opinions on the preclinical evaluation of novel therapies for spinal cord injury: a comparison between researchers and spinal cord-injured individuals. **J Neurotrauma.**, v. 29, n. 14, p. 2367-2374, 2012.
- LANKHORST, A. J.; TER LAAK, M. P.; HAMERS, F.; GISPEN, W. H. Combined treatment with α MSH and methylprednisolone fails to improve functional recovery after spinal injury in the rat. **Brain Research**, v. 859, n. 2, p. 334-340, 2000.
- LAWRENCE T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 1, n. 6, 2009. doi: 10.1101/cshperspect.a001651. Disponivel em: <cshperspectives.cshlp.org>. Retirado 04 de out. 2013.
- LEE, B. B.; CRIPPS, R. A.; FITZHARRIS, M.; WING, P. C. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. **Spinal Cord**, v. 52, n. 2, p. 110-116, 2013.
- LEE, H. R.; KIM, T. H.; CHOI, K. C. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 2, p. 71-76, 2012a.

LEE, J. Y.; CHOI, S. Y.; OH, T. H.; YUNE, T. Y. 17β -Estradiol inhibits apoptotic cell death of oligodendrocytes by inhibiting RhoA-JNK3 activation after spinal cord injury. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3815-3827, 2012b.

LEE, Y. B.; YUNE, T. Y.; BAIK, S. Y.; SHIN, Y. H.; DU, S.; RHIM, H.; LEE, E. B.; KIM, Y. C.; SHIN, M. L.; MARKELONIS, G. J.; OH, T. H. Role of Tumor Necrosis Factor- α in Neuronal and Glial Apoptosis after Spinal Cord Injury. **Exp Neurol.**, v. 166, n. 1, p. 190-195, 2000.

LENT R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência. **Editora Atheneu**, 2^a ed., 2010.

LI, Q. M.; TEP, C.; YUNE, T. Y.; ZHOU, X. Z.; UCHIDA, T.; LU, K. P.; YOON, S. O. Opposite regulation of oligodendrocyte apoptosis by JNK3 and Pin1 after spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 31, p. 8395-8404, 2007.

LIANZA, S.; CASALIS, M.E.P.; GREVE, J.M.D.; EICHBERG, R. Lesão medular. In: Lianza S. Medicina de Reabilitação. **Guanabara-Koogan**, São Paulo, 3^a ed., p. 299-321, 2001.

LIU, X. Z.; XU, X. M.; HU, R.; DU, C.; ZHANG, S. X.; MCDONALD, J. W.; CHOI, D. W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 14, p. 5395-5406, 1997.

LIVERMAN T.C.; ALTEVOGT M.B.; JOY E.J.; JOHNSON T.R. Spinal cord injury: progress, promise, and priorities. **National Academy of Sciences**. N.W. Washington, DC., 2005.

LOANE, D. J.; BYRNES, K. R. Role of microglia in neurotrauma. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 366-377, 2010.

MACHADO, Â. Neuroanatomia Funcional. **Editora Atheneu**, São Paulo, 2^a ed., 2007.

MAIER B.; LEHNERT M.; LAURER H. L.; MAUTES A. E.; STEUDEL W. I.; MARZI I. Delayed elevation of soluble tumor necrosis factor receptors p75 and p55 in cerebrospinal fluid and plasma after traumatic brain injury. **Shock**, v. 26, n. 2, p. 122-127, 2006.

MANTHEY, D.; BEHL, C. From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. **Neuroscience**, v. 138, n. 3, p. 845-850, 2006.

MARTIN, L. J. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 7, n. 5, p. 455-478, 2001.

MERRILL, J. E.; BENVENISTE, E. N. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 331-338, 1996.

MILLER, V. M.; DUCKLES, S. P. Vascular actions of estrogens: functional implications. **Pharmacological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 210-241, 2008.

MODI, H. N.; SUH, S. W.; HONG, J. Y.; YANG, J. H. The effects of spinal cord injury induced by shortening on motor evoked potentials and spinal cord blood flow: an experimental study in Swine. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 93, n. 19, p. 1781-1789, 2011.

MOLINA, A. E. I. S. **Análise da sensibilidade e reprodutibilidade da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MOOSMANN, B.; BEHL, C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 16, p. 8867-8872, 1999.

MORIARTY, K.; KIM, K. H.; BENDER, J. R. Estrogen receptor-mediated rapid signaling. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5557-5563, 2006.

MOSQUERA, L.; COLÓN, J. M.; SANTIAGO, J. M.; TORRADO, A. I.; MELÉNDEZ, M.; SEGARRA, A. C.; RODRÍGUEZ-ORENGO, J. F.; MIRANDA, J. D. Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha. **Brain Res.**, v. 1561, p. 11-22, 2014.

NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; KOBAYASHI, S.; INUKAI, T.; HORIUCHI, Y.; YAYAMA, T.; SATO, R.; BABA, H. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 4, p. 703-712, 2007.

NAKAMURA, M.; HOUGHTLING, R. A.; MACARTHUR, L.; BAYER, B. M.; BREGMAN, B. S. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. **Experimental Neurology**, v. 184, n. 1, p. 313-325, 2003.

NICHOLSON, D. W.; THORBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

NILSEN, J. Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 4, p. 463-475, 2008.

NILSEN, J.; BRINTON, R. D. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2842-2847, 2003.

NILSEN, J.; BRINTON, R. D. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. **Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders**, v. 3, n. 4, p. 297-313, 2004.

NILSSON, S.; MÄKELÄ, S.; TREUTER, E.; TUJAGUE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G.; ENMARK E.; PETTERSSON K.; WARN M.; GUSTAFSSON, J. Å. Mechanisms of estrogen action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1535-1565, 2001.

NOBLE, L. J.; WRATHALL, J. R. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. **Exp Neurol.**, v. 88, n. 1, p. 135-149, 1985.

NORENBERG, M. D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 4, p. 429-440, 2004.

NUMAKAWA, Y.; MATSUMOTO, T.; YOKOMAKU, D.; TAGUCHI, T.; NIKI, E.; HATANAKA H.; KUNUGI, H.; NUMAKAWA, T. 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-

activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 627-637, 2007.

OYINBO, C. A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 71, n. 2, p. 281-299, 2011.

PAN, J. Z.; NI, L.; SODHI, A.; AGUANNO, A.; YOUNG, W.; HART, R. P. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion. **Journal of Neuroscience Research**, v. 68, n. 3, p. 315-322, 2002.

PAPKA, R. E.; STOREY-WORKLEY M.; SHUGHRUE, P. J.; MERCHENTHALER, I.; COLLINS, J. J.; USIP, S.; SAUNDERS, P. T.; SHUPNIK, M. Estrogen receptor-alpha and beta-immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. **Cell Tissue Res.**, v. 304, n. 2, p. 193-214, 2001.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; AITKENHEAD, M.; LEVIN, E. R. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26339-26348, 2005.

PEREZ-POLO, J. R.; HALL, K.; LIVINGSTON, K.; WESTLUND, K. Steroid induction of nerve growth factor synthesis in cell culture. **Life Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1535-1543, 1977.

PIKE, C.J. Estrogen modulates neuronal Bcl-XL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. **J. Neurochem**, v. 72, n. 4, p. 1552-1563, 1999.

PINEAU I.; LACROIX S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the celltypes involved. **Journal of Comparative Neurology**, v. 500, n. 2, p. 267-85, 2007.

PLUNKETT, J. A.; YU, C. G.; EASTON, J. M.; BETHEA, J. R.; YEZIERSKI, R. P. Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. **Experimental Neurology**, v. 168, n. 1, p. 144-154, 2001

POZZI, S.; BENEDEUSI, V.; MAGGI, A.; VEGETO, E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1089, n. 1, p. 302-323, 2006.

PROFYRIS, C.; CHEEMA, S. S.; ZANG, D.; AZARI, M. F.; BOYLE, K.; PETRATOS, S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiology of Disease**, v. 15, n. 3, p. 415-436, 2004.

PROKAI, L.; SIMPKINS, J. W. Structure–nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 1, p. 1-12, 2007.

RAFF, M. Cell suicide for beginners. **Nature**, v. 396, n. 6707, p. 119-119, 1998.

RAY, S. K.; DIXON, C. E.; BANIK, N. L. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. **Histol Histopathol.**, v. 17, n. 4, p. 1137-1152, 2002.

RAY, S. K.; HOGAN, E. L.; BANIK, N. L. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 2, p. 169-185, 2003.

- REXED B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in cat. **J Comp Neurol.**, v. 100, p. 297-379, 1954.
- RITZ, M. F.; HAUSMANN, O. N. Effect of 17 β -estradiol on functional outcome, release of cytokines, astrocyte reactivity and inflammatory spreading after spinal cord injury in male rats. **Brain Research**, v. 1203, p. 177-188, 2008.
- RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. **Surgical Neurology**, v. 10, n. 1, p. 38-43, 1978.
- ROSELLI, C. F. Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 106, n. 1, p. 143-150, 2007.
- SAMANTARAY, S.; SRIBNICK, E. A.; DAS, A.; THAKORE, N. P.; MATZELLE, D.; YU, S. P.; RAY, S. K.; WEI, L.; BANIK, N. L. Neuroprotective efficacy of estrogen in experimental spinal cord injury in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1199, n. 1, p. 90-94, 2010a.
- SAMANTARAY, S.; MATZELLE, D. D.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Physiological low dose of estrogen-protected neurons in experimental spinal cord injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1199, n. 1, p. 86-89, 2010b.
- SAMANTARAY, S.; SMITH, J. A.; DAS, A.; MATZELLE, D. D.; VARMA, A. K.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Low dose estrogen prevents neuronal degeneration and microglial reactivity in an acute model of spinal cord injury: effect of dosing, route of administration, and therapy delay. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 10, p. 1809-1816, 2011.
- SAWADA, M.; SUZUMURA, A.; HOSOYA, H.; MARUNOUCHI, T.; NAGATSU, T. Interleukin-10 Inhibits Both Production of Cytokines and Expression of Cytokine Receptors in Microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 4, p. 1466-1471, 1999.
- SAYER, F. T.; KRONVALL, E.; NILSSON, O. G. Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. **The Spine Journal**, v. 6, n. 3, p. 335-343, 2006.
- SCHILLER, M. D.; MOBBS, R. J.; LEE, B.B.; STANFORD, R.E.; MARIAL, O. Acute care for spinal cord injured patients at spinal injury units: the influence of early and direct admission on complications and length of stay. **ANZCoS Brisbane**, Australia, 2011.
- SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M. E.; PERRY, V. H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 3648-3658, 1999a.
- SCHNELL, L.; FEARN, S.; SCHWAB, M. E.; PERRY, V. H.; ANTHONY, D. C. Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 58, n. 3, p. 245-254, 1999b.
- SCHWAB J. M.; BRECHTEL K.; MUELLER C. A.; FAILLI V.; KRAPS H. P.; TULI S. K.; SCHLUESENER H. J. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. **Progress in Neurobiology**, v. 78, n. 2, p. 91–116, 2006.
- SCHWAB, M. E. Nogo and axon regeneration. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 1, p. 118-124, 2004.

- SCHWARTZ, M.; MOALEM, G.; LEIBOWITZ-AMIT, R.; COHEN, I. R. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 7, p. 295-299, 1999.
- SCOTT, E.; ZHANG, Q. G.; WANG, R.; VADLAMUDI, R.; BRANN, D. Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 85-104, 2012.
- SIEGENTHALER, M. M.; TU, M. K.; KEIRSTEAD, H. S. The extent of myelin pathology differs following contusion and transection spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 10, p. 1631-1646, 2007.
- SILVA, N. A.; SOUSA, N.; REIS, R. L.; SALGADO, A. J. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. **Progress in Neurobiology**, v. 114, p. 25-57, 2014.
- SIMON M.C.; SHARIF S.; TAN P.R.; LAPLACA C.M. Spinal Cord Contusion Causes Acute Plasma Membrane Damage. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 4, p. 563-574, 2009.
- SIMONCINI, T.; RABKIN, E.; LIAO, J. K. Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 198-203, 2003.
- SIMPKINS, J. W.; DYKENS, J. A. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 421-430, 2008.
- SIMPKINS, J. W.; YI, K. D.; YANG, S. H.; DYKENS, J. A. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1800, n. 10, p. 1113-1120, 2010.
- SIPSKI, M. L.; JACKSON, A. B.; GÓMEZ-MARÍN, O.; ESTORES, I.; STEIN, A. Effects of gender on neurologic and functional recovery after spinal cord injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 85, n. 11, p. 1826-1836, 2004.
- SIRIPHORN, A.; CHOMPOOPONG, S.; FLOYD, C. L. 17 β -Estradiol protects Schwann cells against H₂O₂-induced cytotoxicity and increases transplanted Schwann cell survival in a cervical hemicontusion spinal cord injury model. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 4, p. 864-872, 2010.
- SIRIPHORN, A.; DUNHAM, K. A.; CHOMPOOPONG, S.; FLOYD, C. L. Postinjury administration of 17 β -estradiol induces protection in the gray and white matter with associated functional recovery after cervical spinal cord injury in male rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 12, p. 2630-2646, 2012.
- SOHRABJI, F.; MIRANDA, R. C.; TORAN-ALLERAND, C. Dominique. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 24, p. 11110-11114, 1995.
- SOLTYSIK, K.; CZEKAJ, P. Membrane estrogen receptors-is it an alternative way of estrogen action?. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, p. 129-42, 2013.
- SPRINGER, J. E.; AZBILL, R. D.; KNAPP, P. E. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. **Nature Medicine**, v. 5, n. 8, p. 943-946, 1999.

- SRIBNICK, E. A.; WINGRAVE, J. M.; MATZELLE, D. D.; WILFORD, G. G.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Estrogen attenuated markers of inflammation and decreased lesion volume in acute spinal cord injury in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 82, n. 2, p. 283-293, 2005.
- SRIBNICK, E. A.; MATZELLE, D. D.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Estrogen treatment of spinal cord injury attenuates calpain activation and apoptosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, n. 5, p. 1064-1075, 2006.
- SRIBNICK, E. A.; DEL RE, A. M.; RAY, S. K.; WOODWARD, J. J.; BANIK, N. L. Estrogen attenuates glutamate-induced cell death by inhibiting Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated Ca²⁺ channels. **Brain Res.**, v. 1276, p. 159-170, 2009.
- SRIBNICK, E. A.; SAMANTARAY, S.; DAS, A.; SMITH, J.; MATZELLE, D. D.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Postinjury estrogen treatment of chronic spinal cord injury improves locomotor function in rats. **J Neurosci Res.**, v. 88, n. 8, p. 1738-1750, 2010.
- STEFANO, G. B.; PREVOT, V.; BEAUVILLAIN, J. C.; FIMIANI, C.; WELTERS, I.; CADET, P.; BREATON, C.; PESTEL, J.; SALZET, M.; BILFINGER, T. V. Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3758-3763, 1999.
- STOLL G.; JANDER S.; SCHROETER M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. **Adv Exp Med Biol**, v. 513, p. 87–113, 2002.
- STREIT, W. J.; SEMPLE-ROWLAND, S. L.; HURLEY, S. D.; MILLER, R. C.; POPOVICH, P. G.; STOKES, B. T. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. **Experimental Neurology**, v. 152, n. 1, p. 74-87, 1998.
- SUGAWARA T.; LEWEN A.; GASCHÉ Y, Y. U. F.; CHAN P.H. Overexpression of sod1 protects vulnerable motor neurons after spinal cord injury by attenuating mitochondrial cytochrome c release. **FASEB J**, v.16, p.1997–1999, 2002.
- SUGIOKA, K.; SHIMOSEGAWA, Y.; NAKANO, M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. **FEBS Lett.**, v. 210, n. 1, p. 37-39, 1987.
- SWARTZ, K. R.; FEE, D. B.; JOY, K. M.; ROBERTS, K. N.; SUN, S.; SCHEFF, N. N.; WILSON, M. E.; SCHEFF, S. W. Gender differences in spinal cord injury are not estrogen-dependent. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 3, p. 473-480, 2007.
- TAKAO, T., FLINT, N., LEE, L., YING, X., MERRILL, J., CHANDROSS, K. J. 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 3, p. 660-673, 2004.
- TATOR, C. H. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. **Brain Pathol.**, v. 5, n. 4 p. 407– 413, 1995.
- TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **Journal of Neurosurgery**, v. 75, n. 1, p. 15-26, 1991.

TATOR, C. H.; MCCORMICK, P. C.; PIEPMEIER, J. M.; BENZEL, E. C.; YOUNG, W. Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. **J Neurosurg**, v. 42, p. 696–708, 1998.

TIAN, D. S.; LIU, J. L.; XIE, M. J.; ZHAN, Y.; QU, W. S.; YU, Z. Y.; TANG, Z. P.; PAN, D. J.; WANG, W. Tamoxifen attenuates inflammatory-mediated damage and improves functional outcome after spinal cord injury in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 6, p. 1658-1667, 2009.

TRIVEDI, A.; OLIVAS, A. D.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. Inflammation and spinal cord injury: infiltrating leukocytes as determinants of injury and repair processes. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 5, p. 283-292, 2006.

TUNA, M.; POLAT, S.; ERMAN, T.; ILDAN, F.; GÖÇER, A. I.; TUNA, N.; TAMER, L.; KAYA, M.; CETINALP, E. Effect of anti-rat interleukin-6 antibody after spinal cord injury in the rat: inducible nitric oxide synthase expression, sodium- and potassium-activated, magnesium-dependent adenosine-5'-triphosphatase and superoxide dismutase activation, and ultrastructural changes. **J Neurosurg.**, v. 95, n. 1, p. 64-73, 2001.

VANICKÝ, I.; URDZÍKOVÁ, L.; SAGANOVÁ, K.; CÍZKOVÁ, D.; GÁLIK, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **Journal of Neurotrauma**, v. 18, n. 12, p. 1399-1407, 2001.

VEGETO, E.; BENEDUSI, V.; MAGGI, A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 4, p. 507-519, 2008.

VIDAL, P. M.; LEMMENS, E.; DOOLEY, D.; HENDRIX, S. The role of “anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2013.

WANG, C. X.; SHUAIB, A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 2, p. 161-172, 2002.

WANG, K. C.; KOPRIVICA, V.; KIM, J. A.; SIVASANKARAN, R.; GUO, Y.; NEVE, R. L.; HE, Z. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 941-944, 2002.

WANG, X.; DYKENS, J. A.; PEREZ, E.; LIU, R.; YANG, S.; COVEY, D. F.; SIMPKINS, J. W. Neuroprotective effects of 17 β -estradiol and nonfeminizing estrogens against H₂O₂ toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 395-404, 2006.

WATSON C.; PAXINOS G.; KAYALIOGLU G. The Spinal Cord - A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas. **Elsevier**, 2009.

WEAVER, C. E. J.; PARK-CHUNG, M., GIBBS, T. T.; FARB, D. H. 17 β -Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. **Brain Research**, v. 761, n. 2, p. 338-341, 1997.

WELLS, J. E.; HURLBERT, R. J.; FEHLINGS, M. G.; YONG, V. W. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. **Brain**, v. 126, n. 7, p. 1628-1637, 2003.

WINTERLE, J. S.; MILL, T.; HARRIS, T.; GOLDBECK, R. A. Absolute kinetic characterization of 17-beta-estradiol as a radical-scavenging, antioxidant synergist. **Arch Biochem Biophys.**, v. 392, n. 2, p. 233-244, 2001.

WISE, P. M. Estrogens and neuroprotection. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 6, p. 229-230, 2002.

WISE, P. M.; DUBAL, D. B.; WILSON, M. E.; RAU, S. W.; BÖTTNER, M.; ROSEWELL, K. L.. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. **Brain Research Reviews**, v. 37, n. 1, p. 313-319, 2001.

WONG, M.; MOSS, R. L. Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 3217-3225, 1992.

WU, W. F.; TAN, X. J.; DAI, Y. B.; KRISHNAN, V.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. Å. Targeting estrogen receptor β in microglia and T cells to treat experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3543-3548, 2013.

WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. **Neuron**, v. 35, n. 3, p. 419-432, 2002.

XING, D.; NOZELL, S.; CHEN, Y. F.; HAGE, F.; OPARIL, S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 3, p. 289-295, 2009.

XIONG, Y.; RABCHEVSKY, A. G.; HALL, E. D. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 3, p. 639-649, 2007.

YAKOVLEV, A. G.; FADEN, A. I. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. **Molecular Neurobiology**, v. 24, n. 1-3, p. 131-144, 2001.

YANG, L.; BLUMBERGS, P. C.; JONES, N. R.; MANAVIS, J.; SARVESTANI, G. T.; GHABRIEL, M. N. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in human traumatic spinal cord injury. **Spine**, v. 29, n. 9, p. 966-971, 2004.

YANG, L.; JONES, N. R.; BLUMBERGS, P. C.; VAN DEN HEUVEL, C.; MOORE, E. J.; MANAVIS, J.; SARVESTAN, G. T.; GHABRIEL, M. N. Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 276-284, 2005.

YU, X., RAJALA, R. V., MCGINNIS, J. F., LI, F., ANDERSON, R. E., YAN, X., LI, S.; ELIAS, R. V.; KNAPP, R. R.; ZHOU, X.; CAO, W. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 β -estradiol-mediated neuroprotection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13086-13094, 2004.

YUNE, T. Y.; KIM, S. J.; LEE, S. M.; LEE, Y. K.; OH, Y. J.; KIM, Y. C.; MARKELONIS, G. J.; OH, T. H. Systemic administration of 17 β -estradiol reduces apoptotic cell death and improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 3, p. 293-306, 2004.

YUNE, T. Y.; PARK, H. G.; LEE, J. Y.; OH, T. H. Estrogen-induced Bcl-2 expression after spinal cord injury is mediated through phosphoinositide-3-kinase/Akt-dependent CREB activation. **Journal of Neurotrauma**, v. 25, n. 9, p. 1121-1131, 2008.

ZHENG, J.; RAMIREZ, V. D. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton FoF1-ATPase activity by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺-ATPase of porcine cortex. **Euro. J. Pharmacol.**, v. 368, n. 1, p. 95-102, 1999.