

LEONARDO PESSOA CAVALCANTE

**Efeito da administração aguda de
17 β -estradiol ou de progesterona em
modelo de isquemia-reperfusão
medular em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira

**SÃO PAULO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cavalcante, Leonardo Pessoa

Efeito da administração aguda de 17 β -estradiol ou de progesterona em modelo de isquemia-reperusão medular em ratos / Leonardo Pessoa Cavalcante. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Luiz Felipe Pinho Moreira.

Descritores: 1.Doenças da aorta/cirurgia 2.Complicações pós-operatórias/prevenção & controle 3.Estradiol 4.Progesterona 5.Isquemia do cordão espinal 6.Paraplegia 7.Traumatismo por reperusão 8.Ratos

USP/FM/DBD-362/16

Dedicatória

À Melissa, minha amada esposa, com admiração e gratidão por seu carinho, compreensão e apoio ao longo do período de execução deste trabalho.

Aos meus filhos, Laura, Leonardo e Melina, fonte de inspiração e verdadeiro sentido da vida.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Doutor Luiz Felipe Pinho Moreira, pela dedicação e orientação indispensáveis à realização deste trabalho, e, acima de tudo, pela confiança em mim depositada.

À bióloga Sueli Ferreira, pelo imprescindível auxílio na execução dos experimentos deste trabalho.

À Doutora Ana Cristina Breithaupt-Faloppa, pela valiosa participação na concepção intelectual deste trabalho, bem como na viabilização das análises imunohistoquímicas.

À Deus, fonte de sabedoria, saúde e força para a superação de obstáculos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lucíola Inês e José Wilson, pelo amor incondicional e pelo incentivo à pesquisa científica e à docência.

À minha esposa Melissa, pelo apoio, incentivo e paciência nos períodos de minha ausência para a execução deste trabalho.

Aos meus filhos, Laura, Leonardo e Melina, pelo carinho incondicional.

À banca de qualificação: Professor Doutor Renato Assad, Professora Doutora Paulina Sannomiya e Professora Doutora Carolina Munhoz, pela construtiva discussão e sugestões que, seguramente, melhoraram a qualidade desta tese.

Ao Professor Antônio Eduardo Martinez Palhares, patologista, pela valiosa contribuição nas análises histológicas deste trabalho.

Aos estudantes de medicina, Daniel Pereira e Sérgio Moraes, pelo auxílio nas análises deste trabalho.

Ao Doutor Rafael Simas, pelo auxílio nas análises dos experimentos deste trabalho.

Ao Doutor Gustavo Ieno Judas, pelo incentivo e auxílio na fase de concepção deste trabalho.

Aos amigos do LIM 11, Cristiano Correia, Leila Peralta e Sérgio Sales, pelo afável acolhimento em seu ambiente de trabalho.

Aos Diretores do Hospital Universitário Francisca Mendes, período de 2012-2016, por apoiarem meu desenvolvimento profissional, permitindo meu afastamento periódico para a execução deste trabalho.

À Direção e Chefia da Divisão de Cirurgia/Serviço de Cirurgia Vascular do Hospital Universitário Getúlio Vargas, período de 2012-2016, por apoiarem meu desenvolvimento profissional, permitindo meu afastamento periódico para a execução deste trabalho.

Aos colegas do Serviço de Cirurgia Vascular do Hospital Universitário Francisca Mendes, Marcos, Ricardo, José Emerson e Patrícia pelo cuidado dedicado aos nossos pacientes durante meus períodos de afastamento para a realização deste trabalho.

Aos amigos de doutorado, Sueli, Cristiano, Thales, Laura e Roberta, por compartilharem as angústias dessa jornada.

Às funcionárias da pós-graduação do Instituto do Coração, Neusa, Juliana, Valdecira e Mônica, pela afabilidade e eficiência com que fazem seu trabalho.

Ao CNPq, pelo reconhecimento científico e suporte financeiro na compra de materiais imprescindíveis à realização deste trabalho.

Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****ABSTRACT**

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Estradiol X lesão neurológica.....	05
1.2	Progesterona X lesão neurológica.....	08
1.3	Hormônios femininos X isquemia medular.....	10
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos Específicos.....	12
3	MÉTODOS.....	13
3.1	Caracterização da amostra.....	14
3.2	Formação dos grupos.....	14
3.3	Modelo de isquemia medular.....	16
3.3.1	Anestesia e preparo dos animais.....	17
3.3.2	Indução da isquemia medular.....	18
3.3.3	Controle das pressões durante a oclusão.....	19
3.3.4	Determinação do hemograma basal dos animais.....	19
3.3.5	Determinação dos níveis plasmáticos hormonais.....	20
3.4	Controles e cuidados no pós-operatório.....	20
3.5	Avaliação da função locomotora.....	21
3.6	Eutanásia, amostras dos tecidos e descarte dos animais.....	21
3.7	Análise histológica e morfométrica.....	22
3.8	Análise Imunohistoquímica.....	22
3.9	Análise estatística.....	23

4	RESULTADOS.....	25
4.1	Níveis plasmáticos hormonais.....	28
4.2	Análise da função locomotora.....	30
4.3	Análise histológica.....	31
4.4	Análise imunohistoquímica.....	31
5	DISCUSSÃO.....	33
5.1	17 β -estradiol.....	37
5.2	Progesterona.....	38
6	CONCLUSÕES.....	41
7	ANEXOS.....	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
	APÊNDICE.....	

ATA	Aorta Toracoabdominal
ATD	Aorta Torácica Descendente
AVCi	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESTRO	17 β -Estradiol
FiO ₂	Fração Inspirada de Oxigênio
GPER	Receptor Estrogênico de Membrana ligado à Proteína G
L3	Terceira Vertebral Lombar
LMI	Lesão Medular Isquêmica
PA	Pressão Arterial
PAi	Pressão Arterial Indireta
PROG	Progesterona
PI	Iodeto de Propídio
T10	Décima Vértebra Torácica
7TMPR β	Receptor 7 Transmembrana de Progesterona
25-Dx	Receptor de Membrana de Progesterona

Figura 1	Figura ilustrativa dos grupos experimentais e do protocolo de pesquisa. ESTRO: grupo tratado com 17 β -estradiol. PROG: grupo tratado com progesterona. PO: dia pós-operatório.....	16
Figura 2	Representação esquemática do modelo cirúrgico utilizado (Judas, 2013 – reproduzido com permissão). PA: pressão arterial. PAi Prox.: pressão arterial indireta proximal.....	18
Figura 3	Representação esquemática do modelo cirúrgico utilizado (Judas, 2013 – reproduzido com permissão). PA: pressão arterial. PAi Prox.: pressão arterial indireta proximal.....	29
Figura 4	Concentrações séricas de progesterona no grupo tratado com progesterona (PROG) e no grupo CONTROLE.....	29
Figura 5	Análise da função locomotora utilizando-se dos escores da escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) durante o período de observação de 14 dias nos 3 grupos estudados. ESTRO: grupo que recebeu 17 β -estradiol. PROG: grupo que recebeu progesterona. Números entre parênteses indicam o número de animais estudados em cada dia de análise. Dados estão apresentados em mediana, quartis, máximo e mínimo.....	30
Figura 6	Número de neurônios viáveis/área presentes na substância cinzenta da porção ventral medular no 14 ^o dia após trauma de isquemia-reperfusão medular nos 3 grupos de estudo. ESTRO: grupo que recebeu 17 β -estradiol. PROG: grupo que recebeu progesterona. Dados estão apresentados como media \pm erro padrão da média.....	31
Figura 7	Análise imunohistoquímica da porção ventral medular no 14 ^o dia após trauma de isquemia-reperfusão medular nos 3 grupos de estudo. ESTRO: grupo que recebeu 17 β -estradiol. PROG: grupo que recebeu progesterona. Dados estão apresentados como media \pm erro padrão da média.....	32

Tabela 1	Distribuição dos parâmetros hematimétricos nos grupos de estudo.....	27
Tabela 2	Distribuição dos parâmetros de gasometria arterial nos grupos de estudo.....	27
Tabela 3	Distribuição dos parâmetros hemodinâmicos nos grupos de estudo.....	28

Resumo

Cavalcante LP. *Efeito da administração aguda de 17 β -estradiol ou de progesterona em modelo de isquemia-reperfusão medular em ratos* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2016.

INTRODUÇÃO: A lesão medular isquêmica continua sendo uma complicação devastadora das intervenções cirúrgicas na aorta torácica descendente e aorta toracoabdominal. Relatos das diferenças de desfechos clínicos neurológicos entre os gêneros após lesões cerebrais isquêmicas e traumáticas têm levantado o interesse nas influências hormonais, bem como gerado outros estudos buscando a comprovação dos efeitos neuroprotetores do estradiol e da progesterona. Nossa hipótese foi a de que a administração aguda de 17 β -estradiol ou de progesterona seria capaz de prevenir ou atenuar a lesão medular isquêmica causada pela oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal. **OBJETIVO:** Analisar os efeitos na medula espinhal da administração aguda de 17 β -estradiol ou de progesterona em modelo experimental de isquemia-reperfusão medular por oclusão transitória da aorta torácica descende proximal de ratos machos. **MÉTODOS:** Ratos machos, da linhagem wistar, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos para a administração de 280 μ g/Kg de 17 β -estradiol (n=12) ou de 4mg/Kg de progesterona (n=8) ou do veículo de infusão (grupo controle) (n=12), 30 minutos antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente por 12 minutos. A confirmação da oclusão efetiva aórtica deu-se por meio da monitorização contínua da pressão arterial média distal com o uso de cateter colocado na artéria caudal dos animais (mantida em 10mmHg). A oclusão da aorta torácica descendente deu-se por meio do posicionamento de um cateter de Fogarty no. 2, passado no sentido caudal, via dissecação da artéria carótida comum esquerda do animal. A função locomotora dos animais foi avaliada no 1^o, 3^o, 5^o, 7^o, e 14^o dia pós-operatório. No 14^o dia pós-operatório, os animais, após anestesia profunda, foram sacrificados e tiveram suas medulas espinhais retiradas para análise histológica e imunohistoquímica. **RESULTADOS:** Houve comprometimento significativo da função locomotora inicialmente nos 3 grupos de estudo, com recuperação parcial da mesma ao longo do período de observação, não havendo diferença entre os grupos durante o período de observação. A análise histológica da substância cinzenta evidenciou escassos neurônios viáveis e importante vacuolização celular nos 3 grupos de estudo no 14^o dia. A análise imunohistoquímica da substância cinzenta medular com anticorpos anti-Bcl2 e anti-anexina V foi similar nos 3 grupos. Houve marcação positiva de necrose celular com o iodeto de propídio, sendo a mesma semelhante nos 3 grupos estudados. **CONCLUSÃO:** A administração aguda de estradiol ou de progesterona, 30 minutos antes da oclusão transitória da aorta descendente proximal de ratos machos não foi capaz de prevenir ou atenuar a lesão medular isquêmica, até o 14^o dia de observação, do ponto vista funcional ou histológico.

Descritores: doenças da aorta/cirurgia; complicações pós-peratórias/prevenção & controle; estradiol; progesterona; isquemia do cordão espinal; paraplegia; traumatismo por reperfusão; ratos.

Abstract

Cavalcante LP. *Effect of the acute administration of estradiol or of progesterone in a spinal cord ischemia-reperfusion model in rats* [thesis]. São Paulo: "Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina"; 2016.

BACKGROUND: Spinal cord ischemic injury remains a dreadful complication following thoracic and thoracoabdominal aortic interventions. Reports on gender-related neurological outcomes after ischemic and traumatic brain injuries have raised interest in hormonal influences, and have generated studies into neuroprotective effects of estrogen and progesterone. We hypothesized that the acute pre-operative administration of estradiol or of progesterone would prevent or attenuate spinal cord ischemic injury induced by transitory occlusion of the proximal descending thoracic aorta. **OBJECTIVE:** Evaluate the spinal cord effects of the acute administration of 17β -estradiol or of progesterone in a spinal cord ischemia-reperfusion model. **METHODS:** Male rats were divided to receive 280 μ g/Kg of 17β -estradiol (n=12) or 4mg/Kg of progesterone (n=8) or vehicle (control group) (n=12) 30 minutes before transitory occlusion of the proximal descending thoracic aorta, mean distal arterial blood pressure was maintained at 10mmHg during 12 minutes. Hind limb motor function was assessed at 1, 3, 5, 7 and 14 days after reperfusion. At the 14th day, a segment of the thoracolumbar spinal cord was harvested and prepared to histological and immunohistochemical analyses. **RESULTS:** There was an important hind limb motor function impairment initially in the 3 study groups, with partial improvement along time, but no difference was detected between groups during the observational period. Gray matter analysis showed scarce viable neurons and a marked cellular vacuolation in all three groups, but the number of viable neurons per section areas was not different between study groups at day 14th. Immunostaining of the spinal cord gray matter with antibodies anti-Bcl2 and anti-annexin V was similar among the 3 study groups. There was positive staining for the necrotic marker propidium iodide, with all groups presenting a similar staining pattern. **CONCLUSION:** We found that a single-dose administration of estradiol or of progesterone, 30 minutes before transitory occlusion of the proximal descending thoracic aorta of male rats, was not able to prevent spinal cord ischemic injury through analysis of functional and histological outcomes at 14 days of observation.

Descriptors: aortic diseases/surgery; postoperative complications/prevention & control; estradiol; progesterone; spinal cord ischemia; paraplegia; reperfusion injury; rats.

1. Introdução

A lesão medular isquêmica (LMI) continua sendo uma complicação devastadora da cirurgia da aorta torácica descendente (ATD) e aorta toracoabdominal (ATA) (Smith et al., 2012). Estudos contemporâneos (Messe et al., 2008; Cheng et al., 2010) têm relatado taxas de paraplegia e paraparesia ainda não desprezíveis (3-14%), principalmente quando levado em consideração o impacto desta complicação na qualidade de vida pós-operatória dos indivíduos que a desenvolvem. Embora tais taxas tenham melhorado com métodos de proteção medular já bem estabelecidos – drenagem liquórica, hipotermia local ou sistêmica, prevenção de hipotensão e derivação átrio-femoral (Jacobs e Schurink, 2010) – a LMI permanece uma importante causa de morbidade em pacientes submetidos à cirurgia da ATD e ATA convencional (Contreras et al., 2005) e, até mesmo, em procedimentos endovasculares (Gravereaux et al., 2001; Maeda et al., 2012; Katsargyris et al., 2015).

Acreditava-se que a LMI subsequente à cirurgia aórtica fosse decorrente do capeamento aórtico e da interrupção das artérias intercostais. Entretanto, o reimplante das artérias intercostais durante o tratamento cirúrgico aberto não aboliu a paraplegia pós-operatória (Lynen et al., 2016). Por outro lado, com o tratamento cirúrgico endovascular das doenças da ATD e ATA, o clampeamento aórtico foi abolido, manteve-se a interrupção das artérias intercostais e a paraplegia pós-operatória persistiu um problema importante (Maeda et al., 2012).

Clinicamente, após cirurgias envolvendo a ATD e ATA, alguns pacientes manifestam disfunção medular aguda pós-clampeamento aórtico, o que se acredita ser decorrente da hipoperfusão; já outros desenvolvem paraplegia ou paraparesia tardiamente (geralmente do 1º ao 5º dia pós-

operatório) – (Crawford et al., 1986; Hollier et al., 1992; Moore et al., 1991), evidenciando-se, assim, uma curva bimodal de paraplegia. Acredita-se que a isquemia medular e o déficit neurológico no pós-operatório de cirurgias da ATD e ATA tenham etiologia multifatorial. Postula-se que seu surgimento advenha da duração e severidade do insulto isquêmico, da taxa de metabolismo neuronal durante o período de isquemia e da lesão de isquemia-reperfusão subsequente (Gravereaux et al., 2001).

Atribui-se o desenvolvimento tardio de paraplegia ao fato de que, durante a fase de isquemia, algumas cascatas deletérias, levando à produção de radicais livres, são ativadas. Em decorrência da restauração do fluxo sanguíneo, durante as primeiras horas de reperfusão, há uma melhora do ponto de vista funcional. Entretanto, a exposição das cascatas deletérias e de seus produtos ao excesso de oxigênio, durante a reperfusão, pode resultar em piora da condição neurológica e, conseqüentemente, à paraplegia ou paraparesia irreversíveis tardiamente (Wisselink et al., 1995). Tais déficits neurológicos tardios provavelmente são decorrentes de edema medular em um espaço fechado, da ação citotóxica dos leucócitos ou micróglia, da vasoconstricção causada pelos metabólitos do ácido aracdônico, e da lesão causada pelos radicais livres produzidos durante o período de isquemia (Moore et al., 1991). Porém os caminhos fisiopatológicos envolvidos em cada fase ainda não foram plenamente elucidados (Khalaj et al., 2011).

Até o momento, nenhuma substância tem se mostrado eficaz na atenuação do insulto metabólico ou inflamatório causado na medula espinhal, inicialmente pela hipoperfusão durante o clampeamento e, posteriormente, pela injúria de reperfusão (Smith et al., 2011). Em decorrência do envolvimento das

várias vias deletérias ativadas durante a isquemia-reperfusão, uma terapia em potencial consistiria na utilização de um agente com múltiplas ações, ou uma combinação de drogas, particularmente drogas que ajam sobre a inflamação e sobre as vias que levam à morte celular.

Estudos experimentais utilizando modelos de isquemia cerebral em animais de ambos os sexos têm evidenciado melhor evolução nas fêmeas (Roof e Hall, 2000; Zhang et al., 1998). A explicação mais óbvia para esta melhor evolução, nos animais fêmeas, seria o possível efeito neuroprotetor dos hormônios gonadais circulantes, na lesão isquêmica cerebral. A maioria dos relatos sugere que as fêmeas podem ser menos suscetíveis à lesão isquêmica em decorrência de maiores níveis circulantes de estrogênio, embora a progesterona também já tenha sido associada a efeitos neuroprotetores (Chen et al., 1999; Roof e Hall, 2000; Stein et al., 2011; Feeser e Loria, 2011). Estudos comparando a evolução de animais fêmeas ovariectomizadas com fêmeas intactas e com machos, em modelo experimental de isquemia cerebral, com oclusão temporária da artéria cerebral média, evidenciaram que o grau de lesão cerebral das fêmeas ovariectomizadas foi mais similar ao grau de lesão cerebral dos machos do que ao grau de lesão das fêmeas intactas (Alkayed et al., 1998). Reforça-se, com isto, o indício do efeito neuroprotetor dos hormônios femininos.

Na espécie humana, estudos observacionais comparando desfecho neurológico nos dois sexos, após traumatismo crânio-encefálico e raquimedular, têm também despertado interesse nas influências hormonais, levando a pesquisas sobre o efeito neuroprotetor do estrogênio e da progesterona (Wunderle et al., 2014; Chan et al., 2013).

1.1 Estradiol X lesão neurológica

Com relação ao 17β -estradiol (principal hormônio sexual feminino dos mamíferos), seu uso terapêutico em modelos experimentais de isquemia cerebral, por meio de oclusão da artéria cerebral média, tem demonstrado efeitos neuroprotetores (Alkayed et al., 1998; Zhang et al., 1998). Postula-se que estes efeitos advenham de várias ações deste hormônio, provavelmente protegendo os neurônios da toxicidade associada com a liberação de glutamato durante e após a oclusão da artéria cerebral média, por meio de sua ação nos receptores excitatórios de aminoácidos ou pelo influxo de cálcio associado à estimulação de receptores N-metil D-Aspartato ou receptores do ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionico (Behl et al., 1995; Goodman et al., 1996; Singer et al., 1996). Alternativamente, o 17β -estradiol poderia também proteger o tecido cerebral antagonizando a lesão iniciada por radicais livres de oxigênio durante a reperfusão cerebral (Chan, 1994).

Em culturas de tecidos, estrógenos têm demonstrado exercer potente atividade antioxidante em resposta a vários estímulos oxidativos (Bishop e Simpkins, 1994; Goodman et al., 1996). Em um modelo *in-vitro* de lesão isquêmica cerebral (Wilson et al., 2000; Wilson et al., 2002), a administração de estradiol prévia ao insulto isquêmico foi capaz de reduzir significativamente o número de células apoptóticas por meio da análise imunohistoquímica. Suzuki et al. (2009) demonstraram que a administração de estradiol, previamente ao insulto isquêmico, atenuou a produção central e periférica de citocinas pró-inflamatórias em um modelo de acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi).

Ainda considerando o efetivo papel do 17β -estradiol na lesão neurológica isquêmica, Thomas et al. (1998), usando o pré-tratamento com 17β -estradiol em um modelo de AVCi, evidenciaram que a preservação de tecido cerebral não se correlacionou com a manutenção do fluxo cerebral, detectado por fluxometria com laser-Doppler, durante a oclusão da artéria cerebral média, sugerindo que a habilidade do estradiol de preservar o tecido cerebral não é dependente de sua ação na preservação de fluxo cerebral durante o período de isquemia. Deste modo, seus efeitos neuroprotetores devem ir além de seus conhecidos efeitos vasodilatadores por meio da potencialização da enzima sintase de óxido nítrico endotelial e da prostaciclina endotelial (Orshal e Khalil, 2004).

Acredita-se, portanto, que o 17β -estradiol seja um agente pleiotrópico, com ações genômicas e não-genômicas, sendo as genômicas por meio da sua ligação com dois receptores clássicos de estrogênio (alfa e beta) e as ações não-genômicas por meio do receptor estrogênico de membrana ligado à proteína G (GPER). Suas ações genômicas dão-se por meio da sua ligação com os receptores clássicos, no citoplasma ou no núcleo, tendo como alvos genes mediadores antiapoptóticos da família Bcl2 e citocinas pró-inflamatórias. Os três receptores têm sido associados às suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes, por meio da inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e potencializando a expressão de citocinas anti-inflamatórias e de enzimas antioxidantes (Revankar et al., 2005; Elkabes e Nicot, 2014).

Os estudos utilizando modelos experimentais de traumatismo medular contuso corroboram as evidências iniciais de que o 17β -estradiol exerça efeito antiapoptótico por meio de sua ação nos GPER, e seu efeito anti-inflamatório

por meio da sua ação nos 3 receptores, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e potencializando a expressão de citocinas anti-inflamatórias (Elkabes e Nicot, 2014).

Ainda em relação ao trauma medular contuso, Samantaray et al. (2011), utilizando um modelo experimental em ratos machos, observaram melhora da lesão medular, do ponto de vista histológico, com a utilização de dose fisiológica de 17β -estradiol ($10\mu\text{g}/\text{Kg}$) de liberação contínua (nas 48h após o traumatismo agudo), quando comparado a grupo controle. Não chegaram, porém, a avaliar a função locomotora dos animais em decorrência do sacrifício precoce. Já Swartz et al. (2007), também utilizando modelo de traumatismo medular contuso em ratos machos e fêmeas ovariectomizadas, tratados com 17β -estradiol por 21 dias, não encontraram diferença na avaliação da função locomotora e histológica dos animais tratados em relação aos controles. Em nosso meio, Letaif et al. (2015), de igual modo, utilizando um modelo de contusão medular em ratos, tratados com 17β -estradiol, em dose única, observaram melhora funcional do grupo tratado no 28^o e 42^o dias pós-trauma.

Resultados conflitantes, como os descritos acima, associados ao conhecimento prévio, advindo da terapia de reposição hormonal em pacientes no climatério, de que a utilização crônica de doses supra-fisiológicas, e até mesmo fisiológicas, de estrógenos pode desencadear efeitos colaterais importantes, tais como eventos trombóticos, câncer de mama/endométrio e feminização em homens (Samantaray et al., 2011), têm retardado a translação do uso terapêutico deste hormônio para a prática clínica no tratamento das doenças do sistema nervoso central.

1.2 Progesterona X lesão neurológica

Diversos estudos pré-clínicos, utilizando modelos experimentais de lesão neurológica, incluindo trauma cerebral contuso, lesão medular traumática e isquemia cerebral, também apontam para um provável efeito neuroprotetor da progesterona. Seu efeito mais relevante parece ser a redução do edema cerebral, limitando o aumento da pressão intracraniana que leva à perda secundária de células neurológicas vulneráveis. Entretanto, há evidência de que a progesterona tenha também efeitos antiinflamatórios, antiapoptóticos e, talvez, antioxidantes. Essas ações podem funcionar sinergicamente para a prevenção da morte celular de neurônios e células da glia, levando à melhora funcional neurológica (Stein et al., 2011).

Tal qual o estrogênio, a progesterona é similarmente um agente versátil, agindo por meio de receptores genômicos (A e B), para auxiliar na sobrevivência neuronal e minimizar dano celular e perda tecidual. Este hormônio também se liga a receptores não-genômicos, um receptor transmembrana (7TM $\text{PR}\beta$) e um receptor de membrana (25-Dx). Os quatro receptores estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central e em todos os tipos de neurônios (Schumacher et al., 2007). Na lesão cerebral isquêmica, seu efeito principal parece ser a redução do edema cerebral, embora tenha também sido postulada sua ação modulando o estresse oxidativo e a apoptose celular, por meio de suas ações genômicas e não-genômicas, diretamente via receptor nuclear de progesterona (A e B) ou, indiretamente, ao nível da membrana celular (Gibson et al., 2009).

Acredita-se que a progesterona atue na lesão cerebral isquêmica, inicialmente, modulando a inflamação por meio da redução da expressão de mediadores inflamatórios, incluindo interleucina-1 β , transformando o fator de crescimento β 2 e a sintase de óxido nítrico, bem como por meio da redução simultânea do volume de edema cerebral em modelos experimentais de AVCi (Gibson et al., 2005). Ishrat et al. (2012), também usando um modelo de AVCi, demonstraram que a progesterona foi capaz de reduzir apoptose, detectada pela menor marcação imunohistoquímica, apontando para seu efeito no segundo estágio da lesão neurológica isquêmica.

Kumon et al (2000), tratando ratos machos hipertensos, submetidos à oclusão transitória da artéria cerebral média, com a administração diária de progesterona, iniciada no período de reperfusão cerebral, observaram melhor desfecho neurológico funcional no grupo tratado, nas análises do 4^o e 7^o dias de observação. Também foi evidenciada uma redução do volume de lesão cerebral no grupo tratado, sacrificado no 7^o dia de observação.

Os estudos pré-clínicos chegaram a motivar estudos clínicos randomizados fase 2 (Wright et al., 2007; Xiao et al., 2008) e fase 3 (Wright et al., 2014; Skolnick et al., 2014) do uso terapêutico da progesterona em pacientes vítimas de traumatismo crânio-encefálico, bem como estudos randomizados (fase 2) do seu uso em pacientes vítimas de traumatismo raquimedular (Aminmansour et al., 2016), embora com resultados iniciais conflitantes.

1.3 Hormônios femininos X isquemia medular

Até onde sabemos, há dois relatos iniciais investigando o efeito do estradiol (Khalaj et al., 2011) e da progesterona (Vandenberk et al., 2013) em um modelo de isquemia-reperfusão por meio da oclusão temporária da aorta abdominal infrarrenal de coelhos que apontam para um efeito neuroprotetor de ambos os hormônios neste cenário. Entretanto, nenhum deles investigou o desfecho funcional ou histológico a longo prazo e ambos utilizaram coelhos, uma espécie animal com irrigação medular puramente segmentar (Kanellopoulos et al., 1997), bem diferente da irrigação medular da espécie humana (Morishita et al., 2003); enquanto que há evidência sólida (Tveten 1976; Koyanagi et al., 1993) de que ratos apresentam uma irrigação arterial medular muito semelhante à de humanos. Nossa proposta foi, então, a de estudar o efeito funcional e histológico de longo prazo, da administração aguda, em dose única, de estradiol ou de progesterona previamente à oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal de ratos machos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos na medula espinhal da administração aguda de 17β -estradiol ou de progesterona em modelo experimental de isquemia-reperfusão medular por oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a função locomotora dos animais submetidos ao trauma de isquemia-reperfusão medular, nas duas primeiras semanas de segmento, submetidos ou não a administração de 17β -estradiol;
- Comparar a função locomotora dos animais submetidos ao trauma de isquemia-reperfusão medular, nas duas primeiras semanas de segmento, submetidos ou não à administração de progesterona;
- Comparar as alterações histopatológicas do tecido medular dos animais submetidos ao trauma de isquemia-reperfusão medular, submetidos ou não à administração de 17β -estradiol, ao final do período de 2 semanas de observação;
- Comparar as alterações histopatológicas do tecido medular dos animais submetidos ao trauma de isquemia-reperfusão medular, submetidos ou não à administração de progesterona, ao final do período de 2 semanas de observação.

3. Métodos

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aprovado na sessão de 14/08/2013 (ANEXO A). Os animais utilizados foram obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e os experimentos conduzidos no Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11), desta mesma Faculdade. Todo o procedimento de execução e análise foi realizado em conformidade com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Cirurgia Experimental/Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

(http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=119) e com a legislação brasileira vigente (Lei Federal no. 11.794, de 8 de outubro de 2008).

3.1 Caracterização da amostra

Foram utilizados 65 ratos machos da linhagem Wistar (peso entre 300 e 430g), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ambiente controlado para temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade e exposição à luz, com ciclo claro/escuro de 12 horas, livre acesso à ração e água, bem como higiene adequada.

3.2 Formação dos grupos

Os 65 animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos de acordo

com a administração do tratamento hormonal ou a administração do veículo de infusão (ciclodextrina), todos diluídos em solução fisiológica. Os animais do grupo controle receberam somente o veículo de infusão, diluído no mesmo volume de solução fisiológica utilizado nos grupos de tratamento. Foram considerados para o estudo apenas os animais que sobreviveram as primeiras 24h pós-operatórias, permitindo, assim, a realização da primeira avaliação clínica (Figura 1).

Os grupos foram distribuídos da seguinte forma:

Grupo ESTRO: trinta minutos antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal, foi administrado 17β -estradiol, por via intra-arterial, na dose de $280\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Grupo PROG: trinta minutos antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal, foi administrada progesterona, por via intra-arterial, na dose de $4\text{ mg}/\text{Kg}$.

Grupo CONTROLE: antes da oclusão transitória da aorta descendente proximal, foi administrado, por via intra-arterial, apenas o veículo de infusão dos 2 hormônios (ciclodextrina).

Após os experimentos, os animais foram devolvidos às suas gaiolas para recuperação e avaliação neurológica. Por motivos éticos, animais com lesão neurológica grave e com critérios clínicos de sofrimento, pontuados pela escala de monitorização proposta por Ramsey et al. (2010) (ANEXO B), foram sacrificados. Os que apresentaram condições clínicas satisfatórias permaneceram em observação até o final do período de observação do estudo.

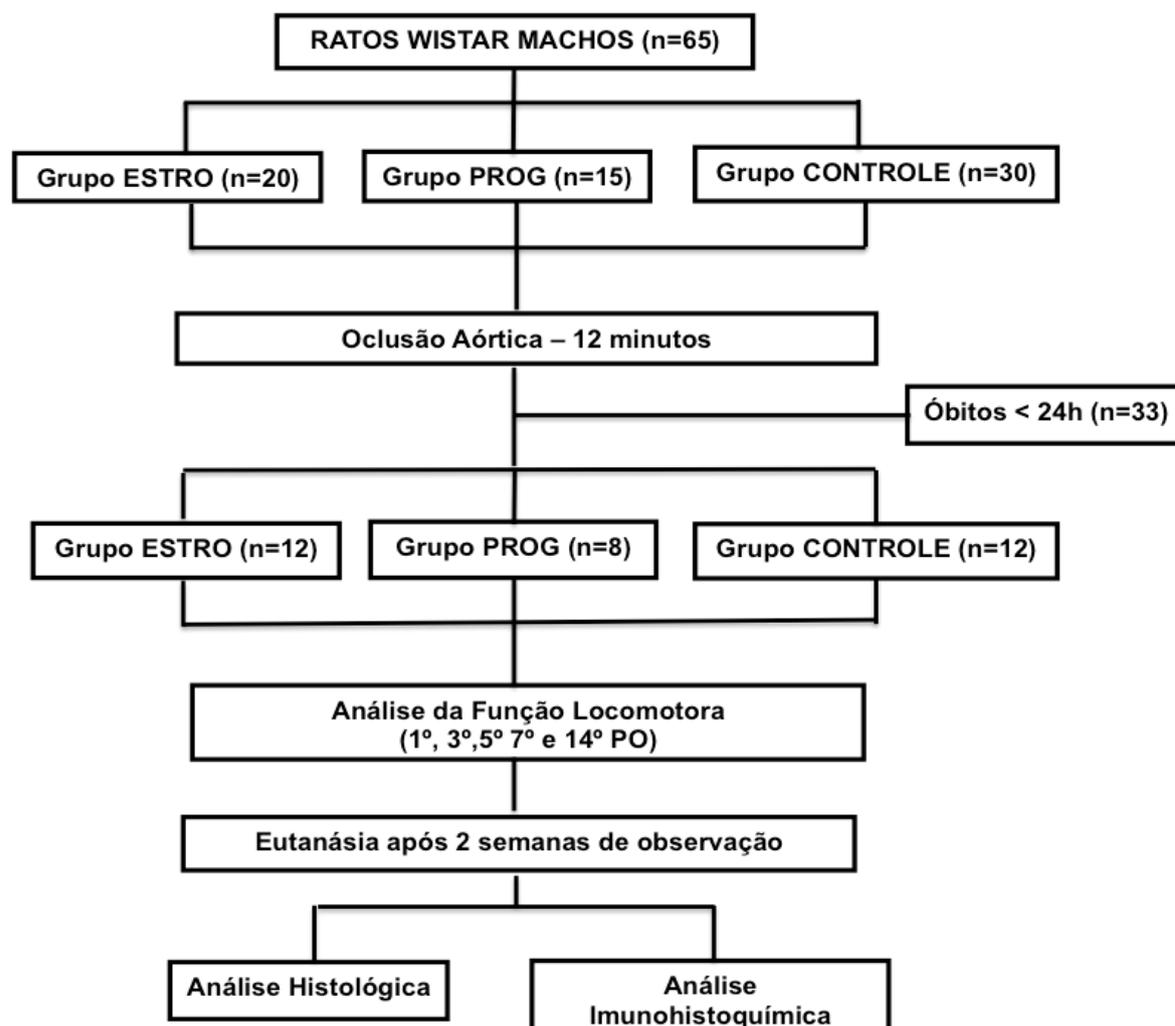


Figura 1. Figura ilustrativa dos grupos experimentais e do protocolo de pesquisa. ESTRO: grupo tratado com 17β -estradiol. PROG: grupo tratado com progesterona. PO: dia pós-operatório.

3.3 Modelo de isquemia medular

Como modelo de isquemia medular foi seguido aquele proposto por Taira e Marsala (1996), com as modificações descritas por Kanellopoulos et al. (1997) e já utilizado, em nosso meio, por Judas et al. (2014).

3.3.1 Anestesia e preparo dos animais

A anestesia foi induzida em câmara fechada com isoflurano a 5%, seguida de intubação e ventilação mecânica por meio de ventilador para roedores (Harvard 683, Harvard Apparatus, Inc, Holliston, EUA). O plano anestésico foi mantido com isoflurano a 1,5 – 2%. A ventilação foi realizada com FiO₂ de 100%, volume corrente de 10ml/kg e frequência de 70 ciclos por minuto. Quando em plano anestésico, os animais receberam tramadol na dose de 5mg/kg intraperitonealmente (para analgesia pós-operatória) e pentabiótico® veterinário pequeno porte (Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Campinas-SP) (ANEXO C), na dose de 0,05ml/Kg da solução reconstituída, por via intramuscular, sendo então colocados em decúbito dorsal horizontal, para realização da tricotomia e antissepsia da região cervical ventral e da região ventral, próximo à inserção da cauda, no abdômen. A fim de evitar-se broncoaspiração, os animais permaneceram em jejum para sólidos por 4 horas, antes do procedimento, e em jejum para líquidos por 2 horas, antes do procedimento.

Em seguida, os animais foram posicionados em plataforma cirúrgica com aquecimento local, para manutenção da temperatura (37°C). Foi realizada a dissecação e cateterização da artéria caudal com um cateter de politetrafluoroetileno tipo PE 10 para monitorização da pressão arterial média distal (PA Distal), coleta de gasometrias (pré e pós oclusão aórtica) e administração hormonal/veículo. O controle da pressão arterial média proximal (PAi proximal) foi feito de maneira indireta por meio da dissecação e cateterização distal (cranial) da artéria carótida comum esquerda com um

cateter de politetrafluoretileno tipo PE 50 (Figura 2).

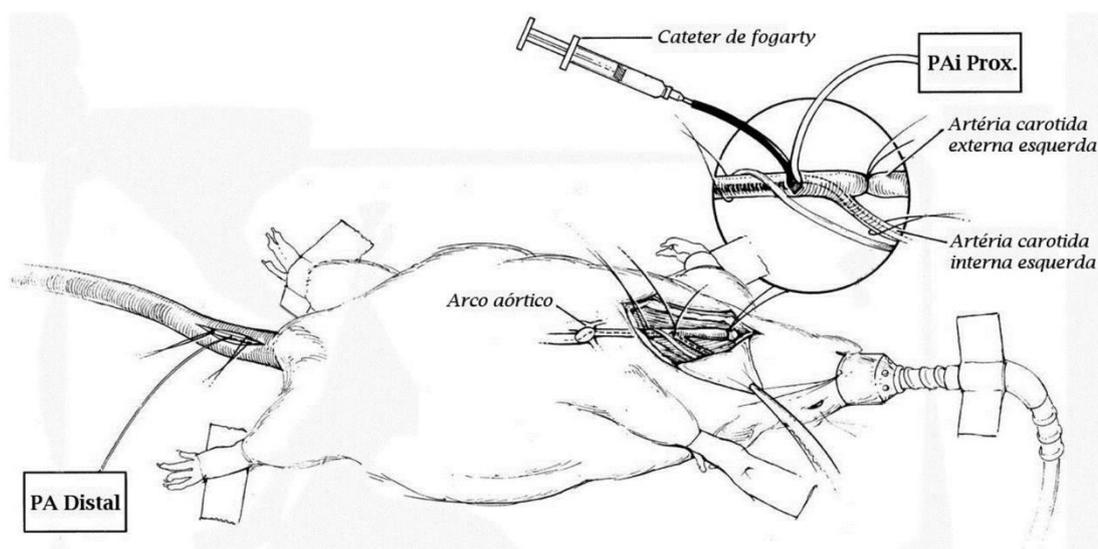


Figura 2. Representação esquemática do modelo cirúrgico utilizado (Judas, 2013 – reproduzido com permissão). PA: pressão arterial. PAi Prox.: pressão arterial indireta proximal

3.3.2 Indução da isquemia medular

Para a indução da isquemia medular foi, inicialmente, administrada heparina por via arterial (100UI/kg) e introduzido um cateter de Fogarty® 2Fr (Edwards Lifesciences LLC – Irvine, EUA) na artéria carótida comum esquerda, avançado caudalmente, por cerca de 10 a 12 cm na aorta torácica descendente/abdominal; em seguida, procedeu-se à insuflação parcial (0,04 ml de solução fisiológica a 0,9%) e posterior gentil tração no sentido cranial até o posicionamento correto do balão no óstio da artéria carótida comum esquerda. Nessa posição conseguiu-se também a oclusão do óstio da artéria subclávia esquerda, sendo o balão então completamente insuflado até a oclusão total da

aorta descendente (aproximadamente 0,08 a 0,1 ml de solução fisiológica a 0,9%). A aorta torácica desce proximal permaneceu então ocluída por um período total de 12 minutos.

3.3.3 Controle das pressões durante a oclusão

Neste modelo é de fundamental importância o controle da pressão PAi proximal durante a oclusão aórtica - seus valores devem permanecer o mais próximo possível a 40 mmHg (Taira e Marsala, 1996; Kanellopoulos et al., 1997). Com este intuito, a concentração do anestésico inalatório isoflurano foi aumentada para 5% logo após a insuflação do balão e graduada de acordo com a resposta pressórica do animal. Tal manobra permitiu o controle adequado da PAi proximal durante o tempo de oclusão aórtica.

Como critério de eficiência na oclusão aórtica, considerou-se a obtenção imediata e sustentada da perda da curva de pressão arterial média na artéria caudal (PA distal), com níveis pressóricos idealmente não superiores a 10 mmHg.

3.3.4 Determinação do hemograma basal dos animais

Amostras de sangue (20 µl) foram coletadas da cauda do animal após a indução anestésica. Contagens total e diferencial das células foram realizadas com auxílio de um analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China).

3.3.5 Determinação dos níveis plasmáticos hormonais

Dez minutos após a desinsuflação do cateter de Forgarty[®] (período de reperfusão) foram coletadas, nos três grupos de estudo, amostras sanguíneas para a realização de dosagens de 17 β -estradiol e progesterona. As amostras sanguíneas para este fim foram coletadas por meio do cateter da artéria caudal. As concentrações circulantes dos hormônios foram determinadas utilizando-se kits de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), seguindo as instruções do fabricante (USCN Life Science, Wuhan, China).

3.4 Controles e cuidados no pós-operatório

Após o procedimento cirúrgico, a condição hemodinâmica dos animais foi monitorada por meio da manutenção das linhas pressóricas por 20 minutos. Nos primeiros 10 minutos após a reperfusão foi colhida nova gasometria arterial pelo acesso da artéria caudal e feita reposição volêmica com solução fisiológica 0,9%, conforme necessário. Estando o animal hemodinamicamente estável, as linhas arteriais foram retiradas, as incisões fechadas e o animal extubado.

Para analgesia pós-operatória foi administrado paracetamol por via oral (8,3 ml de xarope com concentração de 32mg/ml diluídos em 500 ml de água ofertada ao animal – *ad libitum*) durante os primeiros 3 dias pós-procedimento. Considerando uma ingestão diária de 20ml de água, a dose administrada foi de aproximadamente 30mg/kg.

Para o controle de eventuais crises convulsivas no pós-operatório, foi

administrado midazolam intraperitonealmente na dose de 5mg/Kg.

3.5 Avaliação da função locomotora

A avaliação da função motora dos animais foi realizada no 1º, 3º, 5º, 7º e 14º dias pós-operatórios. Dois examinadores independentes, cegos em relação ao procedimento, realizaram a análise, baseando-se na escala de Basso/Beattie/Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995). Esta avaliação foi realizada dentro de um círculo de um metro de diâmetro e bordas laterais com 21 cm de altura, por um período de quatro minutos para cada animal. A variação de movimentos de cada articulação dos membros inferiores (tornozelo, joelhos e quadris), posição do abdômen, sustentação do corpo, posição das patas posteriores, equilíbrio, locomoção, coordenação de passo e posição de cauda foram avaliados. De acordo com esses critérios, os animais foram classificados em escore de 0 a 21 pontos, onde 0 representou ausência de movimentação e 21 movimentação, equilíbrio e coordenação normais (ANEXO D). Os dados foram coletados por meio de uma ficha própria para a coleta de dados do teste (ANEXO E).

3.6 Eutanásia, amostras dos tecidos e descarte dos animais

Ao final de 2 semanas os animais foram submetidos à anestesia profunda, por meio da injeção intraperitoneal de uma dose de 50 mg/kg de pentobarbital. Para a retirada da medula espinhal e sacrifício dos animais foi realizada a decapitação, com consequente abertura cervical do canal medular.

Por meio da injeção de solução salina fisiológica gelada na parte distal do canal, impeliu-se a saída da medula espinhal de maneira intacta. O material obtido foi então comparado à medição prévia da coluna vertebral de cada animal – realizada antes do sacrifício - e seccionado o segmento da transição toracolombar T10-L3. Este segmento foi imerso em hexano, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C. Os animais foram descartados segundo as normas vigentes para incineração.

3.7 Análise histológica e morfométrica

Três cortes histológicos parafinados da transição tóraco-lombar (T10-L3) da medula espinhal (4µm) de cada animal, devidamente identificados e corados pela hematoxilina e eosina (H&E), foram examinados à microscopia de luz, sem o conhecimento do patologista a qual grupo do experimento pertencia a amostra.

Foi analisado o número de neurônios viáveis por área de substância cinzenta da porção ventral medular (corno anterior). Para leitura das lâminas, foi utilizado o *software* de análise de imagens NIS-Elements (Nikon, Tóquio, Japão). Células neuronais foram consideradas viáveis quando apresentavam citoplasma claro, com pontilhados basofílicos (contendo substância de Nissl) e a presença de nucléolos (Saito et al., 2011; Judas, 2013).

3.8 Análise Imunohistoquímica

Após a eutanásia, a medula espinhal foi retirada e o segmento da

transição toracolombar T10-L3 foi imerso em hexano, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C . Cortes seriados ($8\ \mu\text{m}$ de espessura) foram colocados sobre lâminas de vidro silanizadas (Starfrost[®], Knittelglass, Alemanha) e as amostras, fixadas em acetona gelada por 10 min. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina (TBS), seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (Superblock[®], Thermo Scientific, EUA). Para a imunodeteção, os cortes teciduais foram incubados com anticorpos primários (anti-Bcl2 ou anti-anexina V; Abcam, Reino Unido), com diluição de 1:100, por 1 hora, a 37°C . Depois do enxágue, os cortes foram incubados com anticorpos conjugados-secundários FITC (Millipore, EUA), em uma diluição de 1:200, por 2 horas, a 37°C . Controles negativos foram realizados com a incubação na ausência dos anticorpos primários. Para a análise de necrose, os cortes foram incubados com iodeto de propídio (Abcam, Reino Unido). O sistema usado para aquisição das imagens incluiu uma câmera digital AxioCam MRc (Zeiss, Alemanha) combinada a um microscópio triocular fluorescente (Axio Imager A2, Zeiss, Alemanha). Todas as imagens foram captadas utilizando-se o *software* AxioVision L.E. (Zeiss, Alemanha). Os resultados são apresentados em fração de área marcada por área total.

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de acordo com o tipo de distribuição das variáveis. As variáveis paramétricas, ou seja, as que tiveram aceitas a hipótese de normalidade e igualdade das variâncias por meio, respectivamente, dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett's, foram expressas

por meio da média e erro padrão da média, sendo aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA), complementado pelo teste de Tukey. As variáveis com distribuição não paramétrica foram expressas pelas medianas e quartis, sendo aplicado o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn. O nível de significância fixado na aplicação dos testes estatísticos foi de 5% e o *software* utilizado para auxiliar nas análises foi o GraphPad[®] Prism, versão 6.0.

4. Resultados

Trinta e dois animais sobreviveram às primeiras 24 horas após o trauma cirúrgico inicial, tendo sido submetidos pelo menos à primeira avaliação clínica da sua função locomotora, compreendendo a amostra do presente estudo. A distribuição da amostra foi de 12 animais no grupo ESTRO, 8 animais no grupo PROG e 12 animais no grupo CONTROLE. O peso médio dos animais foi semelhante nos 3 grupos, sendo de 358 ± 7 g no grupo ESTRO, 358 ± 8 g no grupo PROG e 369 ± 12 g no grupo CONTROLE.

A mortalidade global após a primeira avaliação neurológica foi de 9 animais (28,1%). No grupo ESTRO houve 4 mortes (duas no 7^o dia, uma no 12^o dia e uma no 13^o dia); no grupo PROG houve 1 morte no 2^o dia (o animal foi submetido a eutanasia neste dia por apresentar critérios de sofrimento previamente estabelecidos) (ANEXO B); no grupo CONTROLE houve 4 mortes (três no 3^o dia e uma no 7^o dia).

Considerando os valores hematimétricos iniciais (Tabela 1), bem como os valores de gasometria pré e pós isquemia (Tabela 2), não houve diferença entre os grupos estudados. Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, durante o experimento não houve diferença nos valores da PAi proximal entre os grupos, porém houve diferença nos valores da PA distal ($P=0,013$). Esta diferença deveu-se exclusivamente a uma PA distal menor no grupo ESTRO aos 5 minutos de reperfusão, quando comparado ao grupo CONTROLE (Tabela 3).

Tabela 1- Distribuição dos parâmetros hematimétricos nos grupos de estudo.

Variáveis ^a	ESTRO (n=12)	PROG (n=8)	CONTROLE (n=12)	P ^b
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	13,22 ± 0,86	12,71 ± 1,06	13,49 ± 0,87	0,851
Linfócitos (x10 ⁹ /L)	8,25 ± 0,58	7,94 ± 0,62	8,27 ± 0,58	0,922
Monócitos (x10 ⁹ /L)	0,43 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,651
Granulócitos (x10 ⁹ /L)	4,53 ± 0,29	4,36 ± 0,44	4,76 ± 0,33	0,734
Hemácias (x10 ¹² /L)	8,40 ± 0,16	8,30 ± 0,27	8,50 ± 0,19	0,810
Hemoglobina (g/L)	13,6 ± 0,25	139,1 ± 0,57	13,8 ± 0,32	0,832
Hematócrito (%)	49,28 ± 0,77	50,36 ± 1,49	49,54 ± 0,91	0,763
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	999,3 ± 70,71	1146,0 ± 67,42	1129,0 ± 142,89	0,567

^a Dados apresentados como média ± erro padrão da média. ^b ANOVA.

ESTRO: grupo tratado com 17β-estradiol. PROG: grupo tratado com progesterona.

Tabela 2- Distribuição dos parâmetros de gasometria arterial nos grupos de estudo.

Variáveis ^a	ESTRO (n=12)	PROG (n=8)	CONTROLE (n=12)	P ^b
1' antes da oclusão aórtica				
pH	7,48 ± 0,03	7,50 ± 0,02	7,51 ± 0,03	0,624
PCO2 (mmHg)	23,03 ± 1,85	26,00 ± 1,43	21,86 ± 2,19	0,435
pO2 (mmHg)	231,6 ± 25,7	279,6 ± 34,9	288,9 ± 39,2	0,490
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	16,59 ± 0,71	20,09 ± 0,94	17,21 ± 1,01	0,059
Lactato (mmol/L)	4,43 ± 0,46	3,63 ± 0,32	4,31 ± 0,26	0,407
Hemoglobina (g/dL)	10,8 ± 0,5	11,2 ± 0,4	10,6 ± 0,5	0,717
10' após a oclusão aórtica				
pH	7,33 ± 0,03	7,33 ± 0,02	7,38 ± 0,03	0,394
PCO2 (mmHg)	29,16 ± 2,64	28,19 ± 1,87	24,99 ± 2,03	0,421
pO2 (mmHg)	258,6 ± 27,4	251,5 ± 31,1	328,8 ± 28,8	0,150
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	14,63 ± 0,79	14,54 ± 0,49	14,46 ± 0,83	0,989
Lactato (mmol/L)	6,19 ± 0,64	5,78 ± 0,53	6,36 ± 0,49	0,394
Hemoglobina (g/dL)	11,7 ± 0,5	12,2 ± 0,6	11,0 ± 0,6	0,363

^a Dados apresentados como média ± erro padrão da média. ^b ANOVA.

ESTRO: grupo tratado com 17β-estradiol. PROG: grupo tratado com progesterona.

Tabela 3- Distribuição dos parâmetros hemodinâmicos nos grupos de estudo.

Variáveis ^a	ESTRO (n=12)	PROG (n=8)	CONTROLE (n=12)
PA distal (mmHg)			
Basal	81.1 ± 6.5	84.1 ± 2.8	74.6 ± 6.9
4' oclusão aórtica	8.2 ± 0.9	10.9 ± 1.2	9.9 ± 0.9
8' oclusão aórtica	8.6 ± 0.8	9.1 ± 0.8	8.1 ± 0.8
12' oclusão aórtica	8.4 ± 0.7	8.7 ± 0.9	7.5 ± 0.5
5' reperfusão	43.1 ± 3.5 ^b	66.0 ± 5.5	78.0 ± 6.9
10' reperfusão	71.2 ± 5.6	86.8 ± 5.4	79.7 ± 8.0
15' reperfusão	80.0 ± 4.5	82.8 ± 3.5	72.7 ± 5.6
20' reperfusão	74,6 ± 3,8	81,0 ± 3,5	81,8 ± 6,1
PAi proximal (mmHg)			
Basal	34.4 ± 3.4	38.5 ± 2.5	38.2 ± 5.3
4' oclusão aórtica	34.8 ± 2.8	39.5 ± 2.9	42.8 ± 2.3
8' oclusão aórtica	41.0 ± 2.4	36.5 ± 2.7	41.0 ± 2.4
12' oclusão aórtica	40.5 ± 2.6	40.8 ± 2.8	41.3 ± 2.4
5' reperfusão	31.7 ± 4.6	29.8 ± 4.9	37.1 ± 4.9
10' reperfusão	42.9 ± 2.6	45.8 ± 4.0	41.8 ± 5.8
15' reperfusão	43.8 ± 2.1	39.7 ± 2.7	32.7 ± 5.6
20' reperfusão	37,5 ± 3,1	38,3 ± 3,0	47,5 ± 6,2

^aDados apresentados como média ± erro padrão da média. ^bP<0,0001.

PA=pressão arterial. PAi=pressão arterial indireta. ESTRO: grupo tratado com 17β-estradiol. PROG: grupo tratado com progesterona.

4.1 Níveis plasmáticos hormonais

A concentração de 17β-estradiol no grupo ESTRO foi de 707,1 ± 73,8 pg/ml, a concentração de progesterona no grupo PROG foi de 567,9 ± 213,5 ng/ml, enquanto que os níveis de 17β-estradiol e progesterona no grupo

CONTROLE foram, respectivamente, $24,0 \pm 6,1$ pg/ml e $0,73 \pm 0,36$ ng/ml (Figuras 3 e 4).

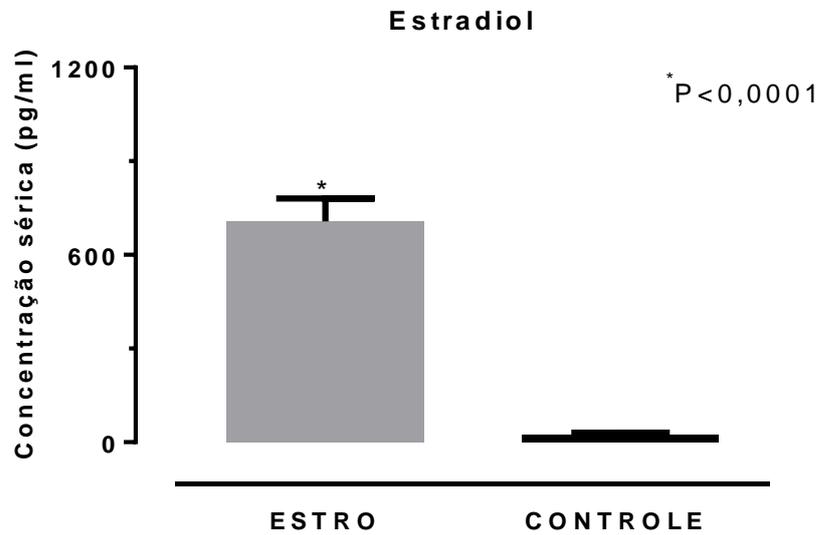


Figura 3 - Concentrações séricas de estradiol no grupo tratado com estradiol (ESTRO) e no grupo CONTROLE.

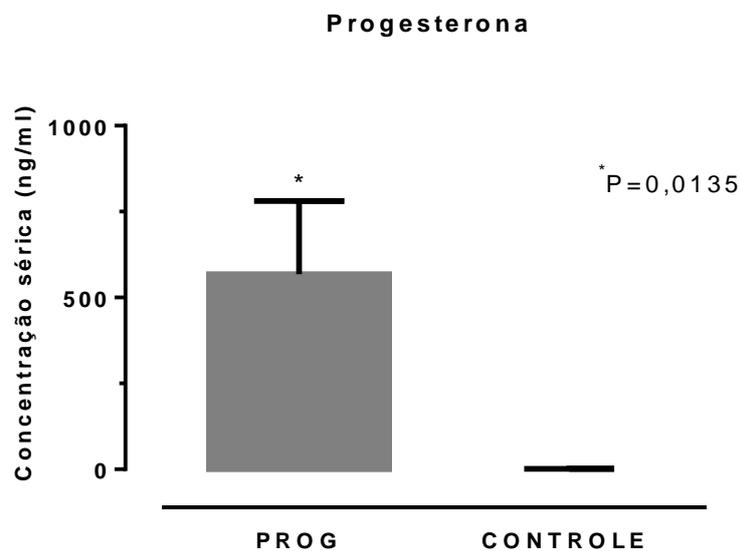


Figura 4 - Concentrações séricas de progesterona no grupo tratado com progesterona (PROG) e no grupo CONTROLE.

4.2 Análise da função locomotora

Conforme descrito na metodologia, dois avaliadores independentes (APÊNDICE A; APÊNDICE B), utilizaram a escala BBB para graduação da função locomotora dos animais, considerando-se a média das duas avaliações (Figura 5). No 1º dia pós-operatório houve comprometimento importante da função locomotora, nos três grupos estudados, havendo recuperação parcial do déficit motor, semelhante nos 3 grupos, ao final do período de observação (14º dia pós-operatório).

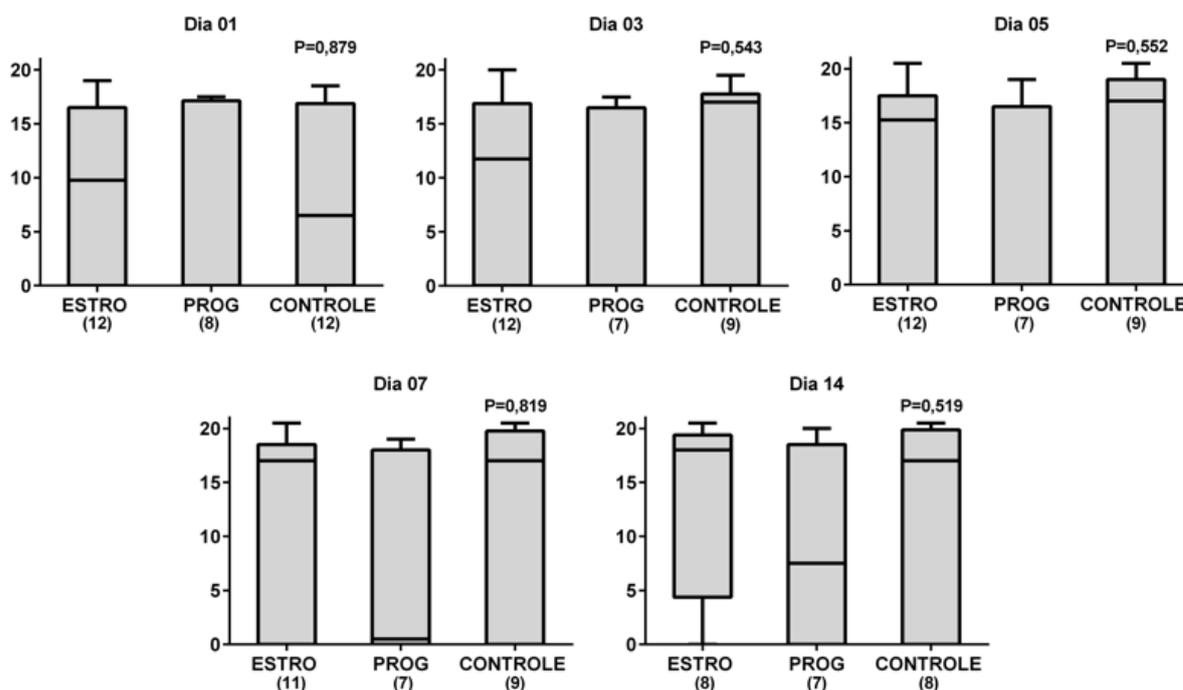


Figura 5 - Análise da função locomotora utilizando-se dos escores da escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) durante o período de observação de 14 dias nos 3 grupos estudados. ESTRO: grupo que recebeu 17β -estradiol. PROG: grupo que recebeu progesterona. Números entre parênteses indicam o número de animais estudados em cada dia de análise. Dados estão apresentados em mediana, quartis, máximo e mínimo.

4.3 Análise histológica

A análise histológica da substância cinzenta do corno anterior medular evidenciou neurônios escassos e vacuolização celular importante nos 3 grupos estudados. O número de neurônios viáveis por área de análise não foi diferente entre os grupos no 14^o dia de observação (Figura 6).

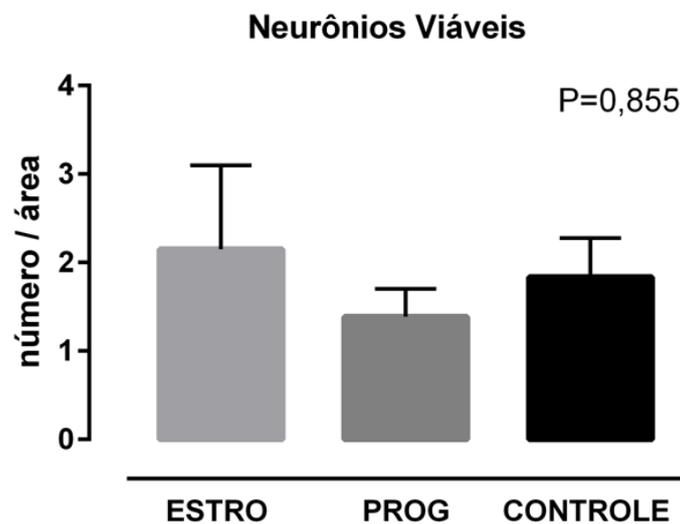


Figura 6 - Número de neurônios viáveis por área presentes na substância cinzenta da porção ventral medular no 14^o dia após trauma de isquemia-reperfusão medular nos 3 grupos de estudo. ESTRO: grupo que recebeu 17 β -estradiol. PROG: grupo que recebeu progesterona. Dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média.

4.4 Análise imunohistoquímica

A morte celular foi avaliada no tecido medular coletado por imunohistoquímica. A apoptose foi avaliada a partir da expressão dos marcadores anexina V e caspase 3. Além disso, foi realizada a marcação da proteína Bcl-2, que está envolvida no controle da apoptose. Não foi observada

marcação positiva nos ensaios com o anticorpo anti-caspase 3 utilizado. Em relação à anexina V e ao Bcl-2, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados. Para avaliação da presença de células necróticas foi utilizado o iodeto de propídio (PI) e a marcação obtida não diferiu entre os 3 grupos (FIGURA 7).

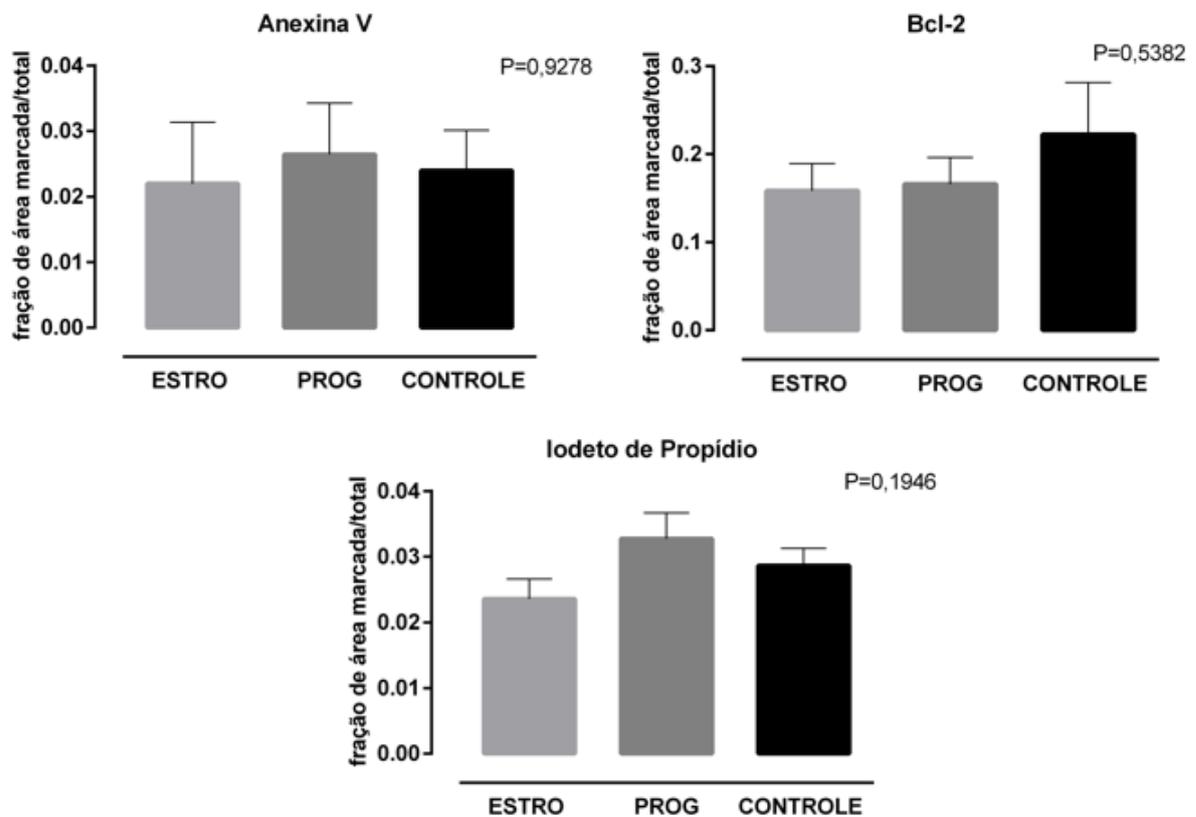


Figura 7- Análise imunohistoquímica da porção ventral medular no 14^o dia após trauma de isquemia-reperfusão medular nos 3 grupos de estudo. ESTRO: grupo que recebeu 17 β -estradiol. PROG: grupo que recebeu progesterona. Dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média.

5. Discussão

Levando-se em consideração o impacto da LMI, manifestada clinicamente como paraplegia ou paraparesia, no pós-operatório das intervenções na ATD e ATA, na qualidade de vida do indivíduo, bem como na repercussão social e econômica para sua família e para a sociedade, o desenvolvimento de novas terapias que previnam esta complicação devastadora torna-se primordial.

No presente estudo, evidenciamos que a administração aguda, em dose única, de estradiol ou de progesterona, 30 minutos antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal de ratos machos, não foi capaz de prevenir ou atenuar a lesão medular isquêmica, quando analisamos a função locomotora e as alterações histológicas dos animais até o 14^o dia de observação. Nossos achados não dão suporte para o uso de hormônios femininos como substância neuroprotetora da LMI.

Considerando especificamente a lesão medular secundária ao trauma de isquemia-reperusão, o presente modelo de isquemia-reperusão medular em ratos tem sido extensamente utilizado para testar medidas farmacológicas adjuntas de neuroproteção medular em cirurgia da ATD e ATA, tais como o uso de esmolol e landiolol (Umehara et al., 2010), a administração de sinvastatina (Saito et al., 2011) e o uso de interleucina-10 (Oruckaptan et al., 2009). Portanto, pareceu-nos adequada a utilização deste modelo para testar a hipótese de que a administração de 17 β -estradiol ou de progesterona poderia prevenir a LMI ou, pelo menos, atenuar a lesão inflamatória secundária, por meio dos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antiapoptóticos. Vale a pena salientar que, nos trabalhos acima citados, os animais foram sacrificados

em 24-48h pós-procedimento, não tendo sido estudados, portanto, os efeitos clínicos e histológicos de longo prazo das substâncias testadas.

Importante ressaltar que este modelo de isquemia-reperfusão medular acarreta, além da lesão de isquemia-reperfusão medular, uma lesão de isquemia-reperfusão visceral (fígado/intestino/rins) não menos importante, o que podemos comprovar pela alta mortalidade global (28,1%) por nós encontrada, mortalidade esta que seria ainda maior se considerássemos os animais que morreram antes da 1^a avaliação neurológica, situação que não fazia parte do escopo deste estudo. Dados oriundos do nosso Laboratório (ainda não publicados) já apontam positivamente para os efeitos anti-inflamatórios e antiapoptóticos agudos do 17 β -estradiol em ratos machos, previamente tratados com 17 β -estradiol, submetidos à trauma de isquemia-reperfusão intestinal, demonstrando inclusive melhora na elevada mortalidade pós-operatória precoce.

Confrontando nossos achados com os de estudos pré-clínicos do uso de hormônios femininos no traumatismo medular contuso (Swartz et al., 2007; Samantaray et al. 2011; Labombarda et al., 2011; Garcia-Ovejero et al., 2014), que apontam, ainda que não uniformemente, para um efeito neuroprotetor ou neuroregenerador de ambos hormônios, pontuamos que os mesmos tiveram como racional o tratamento de uma lesão medular secundária à contusão pregressa da medula espinhal, o que difere do nosso racional de prevenção ou atenuação de uma lesão medular secundária ao futuro trauma de isquemia-reperfusão. Há também a diferença nas alterações teciduais medulares nos dois mecanismos de trauma diferentes., O trauma contuso provoca uma lesão medular pontual, estando os demais segmentos medulares íntegros; já o

traumatismo por isquemia-reperfusão provoca uma lesão medular mais extensa.

Em relação à escolha das doses hormonais administradas, o 17β -estradiol na dose de $280\mu\text{g}/\text{Kg}$ foi utilizado, previamente, em modelo de isquemia-reperfusão intestinal, com resultados positivos (Breithaupt-Faloppa et al., 2013; Breithaupt-Faloppa et al., 2014) e a dose de $4\text{mg}/\text{kg}$ de progesterona foi escolhida por ser a menor dose utilizada na literatura em estudos de isquemia-reperfusão cerebral (Deutsch et al., 2013). É importante salientar que comprovamos a presença de níveis sistêmicos terapêuticos de ambos os hormônios durante o período de oclusão aórtica, já que ambos foram administrados 30 minutos antes da oclusão, por via intra-arterial e, 10 minutos após o início da reperfusão, foram detectados níveis terapêuticos elevados de ambos os hormônios nas dosagens séricas realizadas nos animais.

Os valores da PA distal e de PAi proximal durante o período de oclusão aórtica foram mantidos rigorosamente nos níveis recomendados pelo modelo utilizado (Taira e Marsala, 1996; Kanellopoulos et al., 1997), demonstrando a uniformização do trauma de isquemia-reperfusão por meio da técnica cirúrgica empregada no modelo experimental utilizado. Durante o período inicial de reperfusão, acreditamos que a hipotensão transitória no grupo ESTRO aos 5 minutos deveu-se aos conhecidos efeitos vasodilatadores 17β -estradiol, por meio da potencialização da enzima sintase de óxido nítrico endotelial e da prostaciclina endotelial (Orshal e Khalil, 2004; Kong et al., 2015); visto que houve boa resposta a reposição volêmica com solução fisiológica e que, não houve diferença entre os grupos nos valores de hemoglobina sérica dosados aos 10 minutos de reperfusão.

5.1 17 β -estradiol

Grande parte da evidência pré-clínica do efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol em lesão cerebral isquêmica advém de estudos nos quais os espécimes cerebrais foram coletados entre 22 e 24 horas pós lesão (Alkayed et al., 1998; Zhang et al., 1998; Thomas et al., 1998; Wise & Dubal, 2000). Sendo assim, há carência de informação sobre o desfecho neurológico a longo prazo. À parte do fato de estarmos estudando a lesão medular isquêmica medular e não cerebral, nossos animais foram observados por 2 semanas, ficando prejudicado o confronto dos nossos resultados com os desses estudos com sacrifício precoce.

Considerando especificamente a lesão medular secundária à isquemia-reperfusão, Khalaj et al. (2011), administrando 17 β -estradiol (1mg/Kg) 30 minutos antes da oclusão transitória da aorta abdominal de coelhos, e sacrificando os animais 48h após o trauma de isquemia-reperfusão, detectaram melhores escores clínicos nas análises de função locomotora de 6, 24 e 48h nos animais tratados. Em nosso estudo, mesmo no 1^o e 3^o dias pós-operatórios, não houve diferença na análise clínica da função locomotora entre os grupos. Khalaj et al. (2011) também encontraram mais neurônios viáveis nos espécimes medulares do grupo tratado com 17 β -estradiol, bem como menor marcação imunohistoquímica no grupo tratado, o que significa menor grau de apoptose celular 48h após o trauma de isquemia-reperfusão. Não fomos capazes de reproduzir seus resultados no presente estudo, mas acreditamos que alguns pontos merecem atenção. Primeiramente, eles utilizaram um modelo de oclusão de aorta abdominal infra-renal, o que acreditamos ter menor

impacto na extensão da lesão medular isquêmica e mesmo menor lesão de isquemia-reperfusão sistêmica e visceral do que a oclusão da aorta torácica descendente proximal (juntamente com a oclusão da artéria subclávia esquerda), utilizada em nosso estudo. Em segundo lugar, não foi avaliado o desfecho funcional e/ou histológico dos animais a longo prazo, chegando, os autores, a apontar que um período maior de acompanhamento pós-operatório poderia esclarecer se o 17 β -estradiol teria prevenido ou somente postergado o surgimento de eventuais déficits funcionais nos animais tratados. Finalmente, utilizaram uma espécie diferente de animal (coelho), com irrigação medular puramente segmentar (Kanellopoulos et al., 1997), bem diferente da irrigação medular da espécie humana (Morishita et al., 2003), enquanto que há evidência sólida (Tveten 1976; Koyanagi et al., 1993) de que ratos apresentam uma irrigação arterial medular muito semelhante a de humanos, sendo este um dos motivos de seu uso no presente trabalho.

5.2 Progesterona

Nossos resultados, utilizando a progesterona com intenção de neuroproteção, também não podem ser diretamente confrontados com os resultados positivos encontrados por Kumon et al (2000) em modelo de AVCi, visto que, além da diferença no modelo de isquemia-reperfusão por nós utilizado já pontuada anteriormente, nosso estudo difere no fato de termos usado uma administração em dose única da progesterona, em oposição à suplementação diária durante o período de observação por eles utilizada.

Levando-se em conta especificamente a lesão medular secundária à isquemia-reperfusão, Vandenberg et al. (2013) administraram progesterona imediatamente após a oclusão transitória da aorta abdominal de coelhos e sacrificaram os animais tratados, na 4^a e 6^a horas pós-reperfusão, e os animais não tratados (grupo controle), na 2^a hora pós-reperfusão. Histologicamente, observaram que o número de neurônios viáveis foi menor no grupo controle não tratado, mas não avaliaram o déficit neurológico funcional dos animais e nem o grau de apoptose celular. Em seu relato, além das diferenças já pontuadas no modelo de isquemia-reperfusão utilizado, não foi avaliada a função locomotora dos animais, tendo sido analisada somente a injúria do tecido medular na 4^a e 6^a hora após perfusão, em oposição à nossa avaliação histológica no 14^o dia após perfusão. Por fim, optaram pela administração hormonal no início da perfusão, provavelmente buscando o tratamento da lesão de perfusão, sem a intenção de prevenir a injúria isquêmica inicial durante o período de oclusão aórtica, o que foi parte do racional do nosso estudo.

Uma limitação do nosso estudo foi a opção pela utilização da administração hormonal aguda, em dose única. Entretanto, nossa intenção não foi a de tratar os animais portadores da LMI pós-operatória, mas sim a de prevenir ou atenuar a lesão causada pelo trauma inicial, razão pela qual administramos os hormônios 30 minutos antes da oclusão aórtica transitória dos animais. Tínhamos ciência de que a lesão de isquemia-reperfusão dar-se-ia ao longo do tempo, daí utilizarmos o 17 β -estradiol e a progesterona em doses terapêuticas, visto que, considerando suas meias-vidas de 14-16h e 34-

55h respectivamente, teríamos concentrações séricas elevadas tanto no período de oclusão aórtica quanto no período de reperfusão inicial, como demonstrado pelos níveis hormonais séricos aos 10 minutos de reperfusão. Ademais, preocupamo-nos em evitar os efeitos adversos da administração continuada de hormônios sexuais femininos, tais como eventos trombóticos e efeitos feminilizantes, especialmente quando levado em consideração o fato de que a maior parte dos portadores de patologia aórtica é do sexo masculino. Fundamentalmente, do ponto de vista translacional, a administração hormonal aguda nos pareceu ter maior aplicabilidade clínica antes das intervenções cirúrgicas na ATD e ATA. Todavia, novamente considerando que a lesão de isquemia-reperfusão, ao invés de um evento pontual, é um processo composto por uma cadeia de eventos que acontecem ao longo do tempo, não sabemos se uma eventual suplementação hormonal durante um período maior de tempo pós-operatório poderia ter nos levado a um desfecho neurológico diferente nos animais tratados.

6. Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que:

- A administração aguda, em dose única, de 17 β -estradiol, antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal de ratos, não preveniu as alterações da função locomotora dos animais, secundárias à lesão de isquemia-reperfusão medular, durante o período de 2 semanas de observação.
- A administração aguda, em dose única, de 17 β -estradiol, antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal de ratos, não preveniu as alterações histopatológicas do tecido medular, secundárias à lesão de isquemia-reperfusão medular, no período de 2 semanas de observação.
- A administração aguda, em dose única, de progesterona, antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal de ratos, não preveniu as alterações da função locomotora dos animais, secundárias à lesão de isquemia-reperfusão medular, durante o período de 2 semanas de observação.
- A administração aguda, em dose única, de progesterona, antes da oclusão transitória da aorta torácica descendente proximal de ratos, não preveniu as alterações histopatológicas do tecido medular, secundárias à lesão de isquemia-reperfusão medular, no período de 2 semanas de observação.

7. Anexos

ANEXO A

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/08/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **251/13** intitulado: **“EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE 17 BETA-ESTRADIOL E PROGESTERONA EM MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO MEDULAR”** que utilizará **30** animais da espécie **Rato Wistar macho**, apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

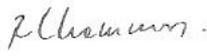
Pesquisador (a) Responsável: Luiz Felipe Pinho Moreira

Pesquisador (a) Executante: Leonardo Pessoa Cavalcante

CEP-FMUSP, 18 de Setembro de 2013.



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B

TABLE 4. ANIMAL MONITORING CRITERIA

	Score 0	2	5	10	15	20
Body weight	0–4% weight loss	5–9% weight loss	10–14% weight loss		15–19% weight loss (IT)	20% weight loss (IE)
Physical appearance	Normal		General lack of grooming or alopecia	Dermatitis or minor porphyrin or ocular/ nasal discharge	Piloerection, hunched up or severe porphyrin (IT)	Hunched and eyes half closed (IE)
Behavior/activity	Normal mobility above and contralateral to injury		Less mobile, but social and alert	Less mobile and isolated, but alert	Less mobile and very still, not alert (IT)	No response when stimulated (IE)
Clinical signs	None		Soft stools or blood in the urine	Shallow or increased respiratory effort	Severe diarrhea or skin tenting (1 sec) (IT)	Irregular gasping respirations or pale skin; seizures or temperature $\pm 3^{\circ}\text{C}$ of normal (IE)
Lesions/autotomy	No lesions	Redness or scab on wound		Open or weeping surgical wound (IT or ISA); open lesion; (self-mutilating) (ISA)	Digit autotomy beyond second knuckle on <2 digits (IT)	Autotomy of the metatarsals, digit autotomy beyond second knuckle on >2 digits or reopening of lesion (IE)
Tumors/cysts	None		Small subcutaneous tumor or cyst		Tumor or cyst with small scab; large tumor or cyst	Large tumor or cyst affecting mobility (IE)

The animals are assessed and scored in six categories to generate a composite score. Experimental animals are weighed and monitored daily. In addition to a number of well-defined humane endpoints, a composite score of 20 or above necessitates euthanasia. Using our monitoring system, scores for animals with T3 complete transection SCI and sham injury are generally similar by 14 days post-surgery.

IT, immediate treatment required; ISA, immediate surgical attention required; IE, immediate euthanasia.

Fonte: Ramsey et al. (2010).

ANEXO C

Pentabiótico® veterinário pequeno porte (bula)

(Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Campinas-SP)

Cada frasco-ampola (1,7g) com pó contém:

Benzilpenicilina benzatina.....	600.000 UI
Benzilpenicilina procaína	300.000 UI
Benzilpenicilina potássica	300.000 UI
Diidroestreptomicina base (sulfato)	250 mg
Estreptomicina base (sulfato)	250 mg
Ampola com diluente água destilada estéril	3 ml

Fonte: [https://www.zoetis.com.br/pentabiotico-veterinario-pequeno-
porte.aspx](https://www.zoetis.com.br/pentabiotico-veterinario-pequeno-
porte.aspx)

ANEXO D**Escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)**

-
- | | |
|----|--|
| 0 | Sem movimentos observáveis na pata traseira (PT) |
| 1 | Leve movimento de uma das duas articulações, usualmente o quadril e/ou o joelho |
| 2 | Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e um leve movimento de outra |
| 3 | Extenso movimento de duas articulações |
| 4 | Leve movimento de todas as três articulações da PT |
| 5 | Leve movimento de duas articulações e extenso movimento da terceira |
| 6 | Extenso movimento de duas articulações e leve da terceira |
| 7 | Extenso movimento de todas as três articulações da PT |
| 8 | Arrastar ou acomodação plantar da PT sem suporte de peso |
| 9 | Acomodação plantar da PT com suporte de peso somente quando imóvel ou ocasional. Freqüente ou consistente apoio dorsal e sem apoio plantar da pata |
| 10 | Ocasional suporte de peso plantar, sem coordenação PT-PD |
| 11 | Frequente a consistente suporte de peso plantar e sem coordenação PT-PD |
| 12 | Frequente a consistente suporte de peso plantar e ocasional coordenação PT-PD |
| 13 | Frequente a consistente suporte de peso plantar e frequente coordenação PT-PD |
| 14 | Suporte de peso plantar consistente, consistente coordenação PT-PD, posição predominante da pata durante a locomoção em rotação (interna ou externa), quando realizado contato inicial no solo quando solto, ou frequente suporte plantar, consistente coordenação PT-PD e ocasionais passadas dorsais |
| 15 | Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD e sem limpeza dos pés ou ocasional limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo |
| 16 | Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e frequente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar |
| 17 | Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e frequente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar |
| 18 | Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar |
| 19 | Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar e o rabo está para baixo parte ou todo o tempo |
| 20 | Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar, e instabilidade do tronco; o rabo está para cima consistentemente |
| 21 | Consistentes passadas plantares e coordenação de marcha, consistente limpeza dos pés. Posição predominante da pata é paralela por todo o instante, e consistente estabilidade do tronco; rabo consistentemente elevado |
-

Nota. **Leve:** movimento parcial menor que a metade da amplitude normal. **Extensivo:** movimento maior que a metade da amplitude. **Varrer:** movimentos rítmicos de extensão para flexão completa e novamente extensão da PT. **Sem suporte de peso:** sem contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou sem elevação do quarto traseiro. **Suporte de peso:** presença de contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou elevação do quarto traseiro. **Apoio plantar:** pata em contato plantar com suporte de peso. **Apoio dorsal:** peso suportado pela superfície dorsal em alguns pontos do ciclo da marcha. **Coordenação PT-PD:** para cada passo da pata dianteira um passo da pata traseira é dado. **Ocasional:** menor ou igual a 50%. **Frequente:** maior que a metade, mas não sempre (51-94%). **Consistente:** quase sempre ou sempre (95-100%). **Instabilidade de tronco:** deslocamento lateral do peso que cause balançar de latero-lateral ou colapso parcial do tronco.

FONTE: BASSO et al. (1995)

ANEXO E

Rat#: _____ Data: _____ DPO: _____ Score: E _____ D _____

Movimento do membro						Posição do Tronco		Abdomen	Posição da Pata				Passo			Coordination	Limpar Patas	Posição Predominante da pata				Instabilidade do Tronco	Rabo			
Quadril		Joelho		Tornoz.		Lado	Prop		Varrer	Plantar PL.		Dorsal		Plantar				contato Inicial	Elevar		Instabilidade do Tronco			Rabo		
E	D	E	D	E	D					E	D	E	D	E	D				E	D					E	D
Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	E	D	Arrasto	E	D	E	D	E	D	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	I	I	I	I		Acima
S	S	S	S	S	S			Paralelo							0	0	0	0	0	0	E	E	E	E		
E	E	E	E	E	E			Alto							F	F	F	F	F	F	P	P	P	P		Baixo
															C	C	C	C	C	C						

E= o esquerdo D=direito Tornoz=tornozelo

Comment: _____

Ø – Sem movimento
 S – Movimento leve
 E – Movimento extenso

Ø – Nada 0%
 0 – Ocasional <50%
 F – Freqüente 51 - 94%
 C – Consistente 95-100%

I – Rotação interna
 E – Rotação Externa
 P - Paralela

FONTE: BASSO et al. (1995)

8. Referências Bibliográficas

Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 1998;29(1):159-65.

Aminmansour B, Asnaashari A, Rezvani M, Ghaffarpasand F, Amin Noorian SM, Saboori M, Abdollahzadeh P. Effects of progesterone and vitamin D on outcome of patients with acute traumatic spinal cord injury; a randomized, double-blind, placebo controlled study. *J Spinal Cord Med* 2016;39(3):272-80.

Basso DM, Beattie S, Bresnahan JC. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *J Neurotrauma* 1995;12(1):1-21.

Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216(2):473-82.

Bishop J, Simpkins JW. Estradiol treatment increases viability of glioma and neuroblastoma cells in vitro. *Mol Cell Neurosci* 1994;5(4):303-8.

Breithaupt-Faloppa AC, Fantozzi ET, Ramos MMA, Vitoretti LB, Couto GK, Franco ALS, Rossoni LV, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Lima WT. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide. *Shock* 2013;40(3):203-9.

Breithaupt-Faloppa AC, Fantozzi ET, Romero DC, Rodrigues Ada S, de Sousa PT, Franco ALS, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Lima WT. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. *Shock* 2014;41(3):208-13.

Brown CM, Suzuki S, Jelks KA, Wise PM. Estradiol is a potente protective, restorative, and trophic factor after brain injury. *Semin Reprod Med* 2009;27(3):240-9.

Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 1994;4(1) 59-65.

Chan WM, Mohammed Y, Pearse DD. Effect of gender on recovery after spinal cord injury. *Transl Stroke Res* 2013;4(4):447-61.

Chen J, Chopp M, Li, Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci* 1999;171(1):24-30.

Cheng D, Martin J, Shennib H, Dunning J, Muneretto C, Schueler S, Segesser LV, Sergeant P, Turina M. Endovascular aortic repair versus open surgical repair for descending thoracic aortic disease. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(10):986-1001.

Contreras ISB, Moreira LFP, Ballester G, Mênaco BA, Lancellotti CLP, Dias AR, Oliveira SA. Immediate ischemic preconditioning based on somatosensory evoked potentials seems to prevent spinal cord injury following descending thoracic aorta cross-clamping. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;28(2):274-9.

Crawford ES, Crawford JL, Safi HJ, Coselli JS, Hess KR, Brooks B, Norton HJ, Glaeser DH. Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients. *J Vasc Surg* 1986;3(3):389-404.

Deutsch ER, Espinoza TR, Atif F, Woodall E, Kaylor J, Wright DW. Progesterone's role in neuroprotection, a review of the evidence. *Brain Res* 2013;1530:82-105.

Elkabes S, Nicot AB. Sex steroids and neuroprotection in spinal cord injury: a review of preclinical investigations. *Exp Neurol* 2014;259:28-37.

Feeser VR, Loria RM. Modulation of traumatic brain injury using progesterone and the role of glial cells on its neuroprotective actions. *J Neuroimmunol* 2011;237(1-2):4-12.

Garcia-Ovejero D, González S, Paniagua-Torija B, Lima A, Molina-Holgado E, De Nicola AF, Labombarda F. Progesterone reduces secondary damage, preserves white matter, and improves locomotor outcome after spinal cord contusion. *J Neurotrauma* 2014;31(9):857-71.

Gibson CL, Constantin D, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2005;193(2):522-30.

Gibson CL, Coomber B, Rathbone J. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke?. *Neuroscientist* 2009;15(4):324-32.

Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1996;66(5):1836-44.

Gravereaux EC, Faries PL, Burks JA, Latessa V, Spielvogel D, Hollier LH, Marin ML. Risk of spinal cord ischemia after endograft repair of thoracic aortic aneurysms. *J Vasc surg* 2001;34(6):997-1003.

Hollier LH, Money SR, Naslund TC, Proctor CD Sr, Buhrman WC, Marino RJ, Harmon DE, Kazmier FJ. Risk of spinal cord dysfunction in patients undergoing thoracoabdominal aortic replacement. *Am J Surg* 1992;164(3):210-3.

Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience* 2012;210:442-50.

Jacobs MJ, Schurink GW. Thoracic and Thoracoabdominal Aneurysms: Open Surgical Treatment. In: Cronenwett JL, Johnston KW, editors. Rutherford's Vascular Surgery. Philadelphia: WB Saunders; 2010. p. 2031-53.

Judas, GI. Efeito da injeção intratecal de células tronco do cordão umbilical humano na lesão isquêmica da medula espinhal em ratos. 2013. 67f. Tese (Doutorado em Ciências - Cirurgia Torácica e Cardiovascular), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Judas GI, Ferreira SG, Simas R, Sannomiya P, Benício A, Silva LFF, Moreira LFP. Intrathecal injection of human umbilical cord blood stem cells attenuates spinal cord ischaemic compromise in rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014;18(6):757-62.

Kanellopoulos GK, Kato H, Hsu CY, Kouchoukos NT. Spinal cord ischemic injury. - Development of a new model in the rat. *Stroke* 1997;28(12):2532-8.

Katsargyris A, Oikonomou K, Kouvelos G, Renner H, Ritter W, Verhoeven EL. Spinal cord ischemia after endovascular repair of thoracoabdominal aortic aneurysms with fenestrated and branched stent grafts. *J Vasc Surg* 2015;62(6):1450-6.

Khalaj L, Peirovi H, Khodaghali F, Abdi A, Dargahi L, Ahmadiani A. Acute 17 β -estradiol pretreatment protects against abdominal aortic occlusion induced spinal cord ischemic-reperfusion injury. *Neurochem Res* 2011;36(2):268-80.

Kong BWC, Vanhoutte PM, Man RYK, Leung SWS. 17 β -estradiol potentiates endothelium-dependent nitric oxide- and hyperpolarization-mediated relaxations in blood vessels of male but not female apolipoprotein-E deficient mice. *Vascul Pharmacol* 2015;71:166-73.

Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 1: Normal spinal cord. *Neurosurgery* 1993;33(2):277-84.

Kumon Y, Kim SC, Tompkins P, Stevens A, Sakaki S, Loftus CM. Neuroprotective effect of postischemic administration of progesterone in spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 2000;92(5):848-52.

Labombarda F, González S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2011;231(1):135-46.

Letaif OB, Cristante AF, Barros Filho TE, Ferreira R, Santos GB, Rocha ID, Marcon RM. Effects of estrogen on functional and neurological recovery after spinal cord injury: An experimental study with rats. *Clinics* 2015;70(10):700-5.

Maeda T, Yoshitani K, Sato S, Matsuda H, Inatomi Y, Tomita Y, Ogino H, Ohnishi Y. Spinal cord ischemia after endovascular aortic repair versus open surgical repair for descending thoracic and thoracoabdominal aortic aneurism. *J Anesth* 2012;26(6):805-11.

Messe SR, Bavaria JE, Mullen M, Cheung AT, Davis R, Augoustides JG, Gutsche J, Woo EY, Szeto WY, Pochettino A, Woo YJ, Kasner SE, McGarvey M. Neurologic outcomes from high risk descending thoracic and thoracoabdominal aortic operations in the era of endovascular repair. *Neurocrit Care* 2008;9(3):344-51.

Moore WM, Hollier LH. The influence of severity of spinal cord ischemia in the etiology of delayed-onset paraplegia. *Ann Surg* 1991;213(5):427-31.

Morishita K, Murakami G, Fujisawa Y, Kawaharada N, Fukada J, Saito T, Abe T. Anatomical study of blood supply to the spinal cord. *Ann Thorac Surg* 2003;76(6):1967-71.

Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(2):R233-49.

Oruckaptan HH, Ozisik P, Atilla P, Tuncel M, Kilinc K, Geyik PO, Basaran N, Yüksel E, Ozcan OE. Systemic administration of interleukin-10 attenuates early ischemic response following spinal cord ischemia reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 2009;155(2):345-56.

Ramsey JB, Ramer LM, Inskip JA, Alan N, Ramer MS, Krassioukov AV. Care of rats with complete high-thoracic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2010;27(9):1709-22.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005;307(5715):1625-30.

Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma* 2000;17(5):367-88.

Saito T, Tsuchida M, Umehara S, Kohno T, Yamamoto H, Hayashi J. Reduction of spinal cord ischemia/reperfusion injury with simvastatin in rats. *Anesth Analg* 2011;113(3):565-71.

Samantaray S, Simith JA, Das A, Matzelle DD, Varma AK, Ray SK, Banik NL. 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. *Neurochem Res* 2011;36(10):1809-16.

Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE. Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* 2007;28(4):387-439.

Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM. Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 1996;212(1):13-6.

Skolnick BE, Mass AI, Narayan RK, van der Hoop RG, MacAllister T, Ward JD, Nelson NR, Stocchetti N. A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med* 2014;371(26):2467-76.

Smith PD, Puskas F, Fullerton DA, Meng X, Cho D, Cleveland JC, Weyant MJ, Reece TB. Attenuation of spinal cord ischemia and reperfusion injury by erythropoietin. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;141(1):256-60.

Smith PD, Puskas F, Meng X, Cho D, Cleveland Jr JC, Weiyant MJ, Watkins MT, Fullerton DA, Reece TB. Isquemic dose-response in the spinal cord: both immediate and delayed paraplegia. *J Surg Res* 2012;174(2):238-44.

Stein DG. Progesterone in the treatment of acute traumatic brain injury: a clinical perspective and update. *Neuroscience* 2011;191:101-6.

Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol* 2009;30(2):201-11.

Swartz KR, Fee DB, Joy KM, Roberts KN, Sun S, Scheff NN, Wilson ME, Scheff SW. Gender differences in spinal cord injury are not estrogen-dependent. *J Neurotrauma* 2007;24(3):473-80.

Taira Y, Marsala M. Effect of proximal arterial perfusion pressure on function, spinal cord blood flow, and histopathologic changes after increasing intervals of aortic occlusion in the rat. *Stroke* 1996;27(10):1850-1858.

Thomas JK, Toung TJ, Traystman RJ, Hurn PD. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke* 1998;29(8):1666-70.

Tveten L. Spinal cord vascularity. IV: the spinal cord arteries in the rat. *Acta Radiol Diagn* 1976;17(4):385-98.

Umehara S, Goyagi T, Nishikawa T, Tobe Y, Masaki Y. Esmolol and landiolol, selective beta1-adrenoreceptor antagonists, provide neuroprotection against spinal cord ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg* 2010;110(4):1133-7.

Vandenberk N, Unluer EE, Gokmen N, Yurekli I, Okmen E, Yilmaz O, Yigit S, Kara PH. Neuroprotective effects of progesterone in spinal cord ischemia in rabbits. *Am J Emerg Med* 2013;31(3):581-4.

Wilson ME, Dubal DB, Wise PM. Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors. *Brain Res* 2000;873(2):235-42.

Wilson ME, Liu Y, Wise PM. Estradiol enhances Akt activation in cortical explant cultures following neuronal injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;102(1-2):48-54.

Wise PM, Dubal DB. Estradiol protects against ischemic brain injury in middle-aged rats. *Biol Reprod* 2000;63:982-5.

Wisselink W, Nguyen JH, Becker MO, Money SR, Hollier LH. Ischemia-reperfusion injury of the spinal cord: the influence of normovolemic hemodilution and gradual reperfusion. *Cardiovasc Surg* 1995;3(4):399-404.

Wright DW, Kellermann AL, Hertzberg VS, Clark PL, Frankel M, Goldstein FC, Salomone JP, Dent LL, Harris OA, Ander DS, Lowery DW, Patel MM, Denson DD, Gordon AB, Wald MM, Gupta S, Hoffman SW, Stein DG. ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann Emerg Med*. 2007 Apr;49(4):391-402.

Wright DW, Yeatts SD, Silbergleit R, Palesch YY, Hertzberg VS, Frankel M, Goldstein FC, Caveney AF, Howlett-Smith H, Bengelink EM, Manley GT, Merck LH, Janis LS, Barsan WG. Very early administration of progesterone for acute traumatic brain injury. *N Engl J Med* 2014;371(26):2457-66.

Wunderle K, Hoeger KM, Wasserman E, Bazarian JJ. Menstrual phase as a predictor of outcome after mild traumatic brain injury in women. *J Head Trauma Rehabil* 2014;29(5):E1-E8.

Wynn M, Acher C, Marks E, Acher CW. The effect of intercostal artery reimplantation on spinal cord injury in thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. *J Vasc Surg* 2016 Mar 16; pii: S0741-5214(16)00153-1. doi: 10.1016/j.jvs.2015.12.060. [Epub ahead of print] –CHECAR FORMATO

Xiao G, Wei J, Yan W, Wang W, Lu Z. Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Crit Care* 2008;12(2):R61.

Zhang Y, Shi J, Rajakumar G, Day AL, Simpkins JW. Effects of gender and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Res* 1998;784(1-2):321-4.

9. Apêndice

APÊNDICE A**AVALIADOR 1**

ESTRO	1o PO	3o PO	5o PO	7o PO	14o PO
E1	19	19	19	21	21
E2	0	0	0	0	0
E3	19	19	19	19	19
E4	0	0	0	0	0
E5	4	7	20	20	21
E6	19	21	21	21	21
E7	19	19	19	19	19
E8	19	19	19	19	19
E9	13	14	14	14	
E10	0	0	0		
E11	0	0	0	0	
E12	0	0	0	0	
mediana	8,5	10,5	16,5	19	19

PROG	1o PO	3o PO	5o PO	7o PO	14o PO
P1	0				
P2	19	19	19	20	20
P3	21	20	21	21	21
P4	0	0	0	0	7
P5	0	0	0	0	0
P6	20	7	13	17	17
P7	0	0	0	0	0
P8	0	0	0	0	0
mediana	0	0	0	0	7

CONTROLE	1o PO	3o PO	5o PO	7o PO	14o PO
C1	0	0	0	0	0
C2	20	20	20	20	20
C3	19	20	20	21	21
C4	20	20	20	20	20
C5	0	0	0	0	0
C6	19	19	20	20	20
C7	19	20	21	21	21
C8	0	0	0	0	0
C9	0				
C10	13				
C11	0				
C12	0	0	0	0	
mediana	6,5	19	20	20	20

APÊNDICE B**AVALIADOR 2**

ESTRO	1o PO	3o PO	5o PO	7o PO	14o PO
E1	14	14	14	14	14
E2	0	0	0	0	0
E3	14	14	16	16	16
E4	0	0	0	0	0
E5	9	12	14	14	18
E6	19	19	20	20	20
E7	14	15	16	18	18
E8	15	16	16	18	19
E9	13	14	14	14	
E10	0	0	0		
E11	0	0	0	0	
E12	0	0	0	0	
mediana	11	13	14	14	17

PROG	1o PO	3o PO	5o PO	7o PO	14o PO
P1	0				
P2	13	14	14	16	17
P3	14	15	17	17	19
P4	0	0	0	1	8
P5	0	0	0	0	0
P6	15	8	12	15	15
P7	0	0	0	0	0
P8	0	0	0	0	0
mediana	0	0	0	1	8

CONTROLE	1o PO	3o PO	5o PO	7o PO	14o PO
C1	0	0	0	0	0
C2	13	14	15	14	14
C3	14	15	17	18	18
C4	14	14	14	14	14
C5	0	0	0	0	0
C6	15	17	19	20	20
C7	18	19	20	20	20
C8	0	0	0	0	0
C9	0				
C10	13				
C11	0				
C12	0	0	0	0	
mediana	6,5	14	14	14	14