RAPHAEL MARTUS MARCON

# Estudo dos Efeitos do Monossialogangliosídio (GM1) e da Câmara de Oxigenoterapia Hiperbárica na Lesão Medular Aguda em Ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Dr. Alexandre Fogaça Cristante

**SÃO PAULO**
**2009**

À minha esposa Fátima, por me acompanhar em todos os momentos, sempre alegre e disposta.

Às minhas filhas Isadora e Raphaela, força e razão de todo esforço.

À minha mãe Eunice, pelo alicerce moral e exemplo de perseverança.

# AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, meu sincero agradecimento pela inestimável contribuição à minha formação como ortopedista e como pessoa, pela paciência ao longo destes anos de aprendizado e convivência, pelas inúmeras e inestimáveis oportunidades oferecidas ao longo deste período e pela sempre inabalável confiança em meu potencial.

Ao Professor Doutor Olavo Pires de Camargo, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade cultivada ao longo dos anos de convivência, pelas oportunidades oferecidas e por acreditar no meu trabalho.

Ao Professor Doutor Arnaldo Valdir Zumioti, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Ao Doutor Reginaldo Perilo Oliveira, Chefe do Grupo de Coluna Cervical da Disciplina de Coluna Vertrebral do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter-me acolhido e permitido que eu pudesse crescer profissionalmente.

Ao Doutor Alexandre Fogaça Cristante, médico assistente do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, meu amigo, pela convivência e parceria ao longo destes anos, pela ajuda sempre inestimável nos momentos difíceis e pela capacidade exemplar, incansável e contagiante de trabalho.

Ao Biólogo Gustavo Bispo dos Santos, sempre prestativo e disposto a ajudar, pela inestimável colaboração na execução deste trabalho.

À Sra. Rosana Moreno Costa e à Sra. Tânia Maria Borges, funcionárias da Pós-Graduação do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela inestimável paciência e solicitude ao longo deste trabalho.

À Sra. Sandra Maria Silveira e à Sra. Cláudia Helena dos Santos, secretárias do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela sempre disponibilidade de ajuda na resolução dos problemas.

À Sra. Jane Ferreira e à Sra. Veroneide Folha, funcionárias do LETRAN – Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos, pela ajuda com os cuidados e manutenção dos animais.

A todos os funcionários do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que direta ou indiretamente contribuíram à realização desta pesquisa.

## Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com:
Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO DA LITERATURA..... 12

3. MÉTODOS..... 55

4. RESULTADOS..... 78

5. DISCUSSÃO..... 98

6. CONCLUSÕES..... 112

7. ANEXOS..... 114

8. REFERÊNCIAS..... 126

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Procedimentos para a realização da lesão medular através de equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso - NYU Impactor. A – detalhe da laminectomia, com exposição da medula espinal; B – detalhe das garras de fixação nos processos espinhosos e C – vista geral do posicionamento do animal no dispositivo de impacto.

FIGURA 2 Equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso - NYU Impactor. A – diagrama esquemático sem escala e B – vista geral, CPU, vídeo monitor, teclado, dispositivo de interfaceamento, "mouse" e dispositivo de impacto.

FIGURA 3 Câmara de oxigenoterapia hiperbárica. A – vista geral do tubo de oxigênio circuito e câmara hiperbárica; B – lateral direita da câmara, válvula de entrada, manômetro diferencial, termômetro e fluxímetro de coluna e C – manutenção de até 8 ratos simultâneos (1h/dia)

FIGURA 4 Determinação da capacidade locomotora após lesão pela escala BBB de avaliação funcional (Basso et al. 1995). A – rato posicionado na caixa forrada com campo azul para facilitar observação e B – rato em vista lateral, avaliação da movimentação do quadril, joelho e tornozelo da pata posterior direita e posição da cauda.

FIGURA 5 Análise anatomopatológica do grau de degeneração da substância nervosa (ausente, discreto, moderado e acentuado) do tecido medular lesado dos ratos. Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 100 vezes de um resultado acentuado. Lâmina 4B do grupo 2 Coloração por HE

FIGURA 6 Análise anatomopatológica do grau de hiperemia (ausente, discreto, moderado e acentuado) do tecido medular lesado dos ratos. Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 200 vezes de um resultado acentuado. Lâmina 3B do grupo 1. Coloração por HE

FIGURA 7 Análise anatomopatológica do grau de infiltrado celular e degeneração cística (ausente, discreto, moderado e acentuado) do tecido medular lesado dos ratos. Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 50 vezes de um resultado moderado e acentuado, respectivamente. Lâmina 4B do grupo 2. Coloração por HE

FIGURA 8 Análise anatomopatológica de uma região sem alterações (controle). Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 50 vezes. Lâmina 2C do grupo 2. Coloração por HE

# RESUMO

Marcon RM. *Estudo dos efeitos do monossialogangliosídio (GM1) e da câmara de oxigenoterapia hiperbárica na lesão medular aguda em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do monossialogangliosídio (GM1), da câmara de oxigenoterapia hiperbárica e de ambos no tratamento da lesão medular experimental em ratos. Trinta e dois ratos Wistar com lesão medular foram divididos em 4 grupos: um grupo recebeu o monossialogangliosídio (GM1), um segundo foi submetido à oxigenoterapia hiperbárica, um terceiro recebeu os dois tratamentos e um quarto não recebeu tratamento (controle). Não houve diferença significativa entre os grupos na análise histológica, em todas as variáveis (necrose, hemorragia, hiperemia e degeneração cística, p>0,06). Também não houve nenhuma diferença na comparação entre os lados direito e esquerdo nos testes funcionais (p>0,06 para todos). Não foram encontradas diferenças nos testes motores, na comparação entre os grupos após 2, 7 21 e 28 dias de lesão medular. Mas, na avaliação após 14 dias, o Grupo 3, o qual recebeu a terapia combinada, mostrou um escore BBB significantemente maior que os outros grupos (p=0,015). Na avaliação de 28 dias, houve uma tendência dos Grupos 1 (GM1) e 3 (terapia combinada) apresentarem um escore BBB maior que o do Grupo 4 (controle), embora sem significância estatística (p=0,057). Concluiu-se que, quanto aos índices motores, a utilização do GM-1 tem efeito benéfico, embora sem diferença estatisticamente significante e que o efeito benéfico do GM-1 é antecipado através da utilização concomitante da oxigênio terapia hiperbárica.

Descritores: traumatismos da medula espinhal, ratos Wistar. oxigenoterapia hiperbárica, gangliosídio GM1.

# SUMMARY

Marcon RM. *Experimental study with GM1 ganglioside and hyperbaric oxygenation in spinal cord injury in rats* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

The objectives were to evaluate the effect of GM1 ganglioside, hyperbaric oxygen, and both in combination, in the treatment of experimental spinal cord lesions in rats. Thirty-two Wistar rats with spinal cord lesions were divided into four groups: one group received GM1 ganglioside, one was submitted to hyperbaric oxygen therapy, the third received both treatments, and the fourth received no treatment (control). There were no significant differences between the groups in the histological analysis, for any of the variables (necrosis, hemorrhage, hyperemia, cystic degeneration, $p > 0.06$). Neither were there any significant differences in the comparison of left and right sides in the functional tests ($p > 0.06$ for all). No significant differences were found in the locomotor ratings, in the comparison of groups at 2 days, 7 days, 21 days and 28 days after the surgical procedure. However, in the evaluation on day 14, Group 3, which received the combined therapy, showed a significantly higher BBB score than the other groups ($p = 0.015$). In the evaluation on day 28, there was a trend to Group 1 (GM1) and 3 (combined therapy) showed a higher BBB score than the group 4 (control), but with no significance ($p=0,057$). In conclusion, the is a benefit in the use of GM1 ganglioside, but with no significance and the therapeutic effect of GM1 in locomotor evaluation of rats submitted to spinal cord lesion is anticipated by hyperbaric oxygen therapy.

Keywords: spinal cord injuries, Wistar rats, hyperbaric oxygenation, GM1 ganglioside.

# 1. INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

A lesão medular é incapacitante, irreversível e de alto custo econômico e social. A mesma apresenta efeito devastador na qualidade de vida da vítima, com alterações fisiopatológicas nos sistemas cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, urogenital, neurológico e músculo-esquelético. A extensão destas alterações é relacionada com a gravidade do dano neurológico. Tem como causa mais freqüente o traumatismo, mas também é produzida por tumores, infecção, lesão vascular ou mesmo produzida iatrogenicamente.

O progresso dos procedimentos terapêuticos depende, no entanto, de um melhor conhecimento de fisiopatologia da lesão medular.

A lesão medular apresenta mecanismos primários ou secundários de dano à medula espinal, sendo primária a lesão mecânica e secundária a lesão resultante de um ou mais processos bioquímicos e celulares desencadeados pela lesão primária (Bunge et al. (1993)). O conceito de lesão secundária foi primeiro postulado por Allen em 1911, que propôs a existência de agentes nocivos presentes no material necrótico e hemorrágico que causam danos adicionais à medula espinal e esses agentes são fatores bioquímicos.

A lesão primária consiste da interrupção fisiológica e estrutural aguda dos axônios e é resultado de impacto sobre a substância da medula espinal com conseqüente rompimento dos axônios, com danos às células nervosas e da ruptura de vasos sanguíneos. Na fase aguda, ocorrem a hemorragia e a necrose na substância cinzenta central na primeira hora após a lesão, seguida de edema e de hemorragia nas sete horas seguintes. Essa lesão é resultante da isquemia causada pela redução do fluxo sangüíneo para o segmento medular afetado. Esta redução pode ser causada por uma alteração do canal vertebral, pela hemorragia e pelo edema significante da medula espinal ou pela redução da pressão sangüínea sistêmica. A isquemia cria uma cadeia de reações bioquímicas que resulta em morte celular. Em seguida, células inflamatórias migram para o local lesado e ocorre, simultaneamente, a proliferação glial. A formação de tecido cicatricial e de cisto ocorre na fase crônica, no período de uma a quatro semanas, decorrente da proliferação de astrócitos e da hipertrofia tecidual, formando uma cicatriz glial (Kakulas (1985)).

Os estudos mais recentes sobre os processos fisiopatológicos após a lesão do sistema nervoso central proporcionam um suporte mais racional para as estratégias de tratamento e demonstram alguma melhora da função neurológica em pacientes com lesão medular. O melhor conhecimento dos processos fisiopatológicos primários e secundários abre campo de pesquisa experimental com modelos de lesão da medula espinal provocada em laboratórios (De La Torre (1984); Kunkel-Bagden et al. (1992)). A padronização da lesão medular permite a reprodutibilidade e a análise dos resultados (De La Torre; Boggan (1980) ; Rodrigues (1999)).

A frustração diante de uma lesão medular grave já foi descrita nos papiros egípcios de Edwin Smith, de 1700 a.C. que relatam as fraturas da coluna vertebral como sendo uma "enfermidade que não deve ser tratada" (Breasted (1930), Hughes (1988)).

Nas últimas duas décadas, várias pesquisas foram realizadas na tentativa de se obter um tratamento mais efetivo para a lesão medular espinal. Todas essas pesquisas envolvem basicamente quatro formas de abordagem do paciente com lesão medular aguda, a cirúrgica, a por meios físicos, a biológica e a farmacológica.

As técnicas operatórias são utilizadas desde os últimos 40 anos (Hansebout (1987)), contudo os resultados dessas têm sido discutíveis e os dados disponíveis são amplamente questionados.

A tática operatória mais utilizada é a laminectomia descompressiva com ou sem artrodese. Contudo, na revisão dessas tentativas cirúrgicas, Hansebout (1987) encontra que somente 1% a 1,8% dos pacientes com lesões medulares cervicais e torácicas completas tornam-se deambuladores após realização da laminectomia descompressiva. Outro procedimento utilizado é a mielotomia. Com referência a revisão dos resultados desse procedimento, Hansebout (1987) mostra uma melhora do déficit neurológico em 50% dos casos e o retorno à deambulação em 17% dos pacientes, entretanto, essa técnica é acompanhada de uma alta taxa de mortalidade

(42%) quando comparada com os procedimentos convencionais. O papel desempenhado pela cirurgia na lesão medular aguda limita-se, na maioria dos procedimentos, ao alinhamento vertebral, à descompressão neural e à estabilização da coluna vertebral impedindo um dano neurológico adicional ao paciente. Outras operações são: a anastomose direta do segmento lesado, a enxertia de medula espinal de cadáver e as pontes de nervos periféricos. Até o momento, as cirurgias reparadoras da medula e restauradoras da função neurológica têm se mostrado pouco eficazes ou mesmo inócuas.

Conceitua-se como terapia biológica a utilização de fatores que estimulam a regeneração neuronal. Com essa finalidade, empregam-se fatores de crescimento tecidual, de células tronco totipotentes, pluripotentes ou multipotentes, autólogas ou homólogas. São terapias que, devido ao curto prazo de seguimento e de avaliação, não apresentam dados concretos sobre os resultados, entretanto, apesar das controvérsias, esta é uma possibilidade futura de se obter a cura (Cristante et al. (2009)).

Os meios físicos são empregados também com o intuito de minimizar os danos medulares secundários. Os principais meios pesquisados são a hipotermia e a terapia com o oxigênio hiperbárico.

Vários estudos demonstram os efeitos benéficos locais com o resfriamento medular por perfusão ou irrigação com solução salina hipotérmica (Ducker; Hamit (1969), Albin; White (1987), Kelly Jr et al. (1970)). Alguns autores relatam taxas de

recuperação semelhantes em magnitude àquelas de cães tratados com dexametasona (Hansebout et al. (1975), Kuchner; Hansebout (1976)). Embora igualmente benéfica, a terapia com resfriamento não impede a perda de potássio, como ocorre na terapia com esteróides e, de acordo com Albin; White (1987), é benéfica quando iniciada nas primeiras oito horas após o trauma, benefício que, após esse período de tempo, se torna menos aparente. Essa abordagem é baseada na suposição de que a temperatura baixa protege os tecidos do sistema nervoso central contra os efeitos da hipóxia e da isquemia. Entretanto, essa é uma técnica de difícil aplicação e que apresenta alta taxa de mortalidade, tornando preocupante a sua aplicação clínica (Schwab; Bartholdi (1996)).

Já a oxigenoterapia hiperbárica é uma modalidade terapêutica fundamentada na obtenção de pressões parciais elevadas de oxigênio tecidual, ao respirar-se o oxigênio puro no interior de uma câmara hiperbárica, a uma pressão superior à da atmosfera (Yeo (1976)).

A oxigenoterapia hiperbárica é usada de longa data para tratar uma condição conhecida como “doença da descompressão”, que ocorre quando mergulhadores de águas profundas vêm à superfície muito rapidamente e em aviadores, mineiros ou operários de túneis quando se movem de altas para baixas pressões. O ar normal tem 16% de oxigênio e a terapia em câmara com oxigênio hiperbárico usa uma porcentagem maior que o normal, chegando a 100% de oxigênio.

No século XVII, Charles Hensaw (1662), um clérigo britânico, ajusta a pressão (hipo e hiperpressão) dentro de uma câmara selada chamada *domicilium*, com o auxílio de foles, na tentativa de tratar doenças. Em 1670, Robert Boyle explica o comportamento dos gases (Lei de Boyle). Os efeitos da compressão, da descompressão e da recompressão começam a ser melhor compreendidos em meados do século XIX (Triger (1845), Pol; Watelle (1854), Bert (1876) apud Morrison). A terapia hiperbárica começa a se definir no início do século XX. Currigham, apud Morrison, em Kansas City (EUA), em 1921, instala o primeiro "hospital hiperbárico", fechado e demolido alguns anos depois por falta de resultados satisfatórios.

Apenas em 1966, a National Academy of Sciences (EUA) publica os fundamentos da medicina hiperbárica e em março de 2000 o American Board of Medical Specialties (EUA) aprova a medicina hiperbárica e submarina como sub-especialidade da medicina de emergência e da medicina preventiva. A partir de então, a Terapia por Oxigênio Hiperbárico (TOHB) passa a ser aceita, normatizada, e difundida no meio médico (Desola et al. (1998); Covarrubias; Rodriguez (2002)).

No Brasil, em 1971, médicos utilizam uma câmara hiperbárica em operários durante a construção da Ponte Rio-Niterói. Em 1973 a Companhia Metropolitana de São Paulo – Metrô também a utiliza em seus operários (Medicina do Trabalho). Em 1974, aparecem os primeiros cursos de Medicina Hiperbárica nas disciplinas de Saúde Ocupacional de diversas Escolas de Medicina. Em 1977, realiza-se o primeiro uso clínico de uma câmara hiperbárica em um caso de gangrena gasosa, com êxito. Várias câmaras para uso individual ou múltiplo (até 10 pacientes) são instaladas por todo o Brasil (Histórico do Hiperbarismo). Em 1992, o Pronto-Socorro do Hospital das

Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo instala sua primeira câmara hiperbárica (Histórico da Câmara Hiperbárica no PSC-HCFMUSP (1993)).

A utilização de tratamento com oxigênio hiperbárico obtém resultados positivos (Holbach et al. (1977); Kelly Jr et al. (1972); YEO et al. (1976), Jones et al. (1978), Gamache et al. (1980), Hansebout (1982) apud Janssen; Hansebout (1987)). A justificativa para este tipo de abordagem terapêutica baseia-se no fato de que a diminuição da perfusão pode ser compensada pelo aumento da pressão parcial de oxigênio.

A farmacologia desempenha papel relevante no tratamento da lesão medular e é, sem dúvida, o método mais pesquisado. Através de ensaios clínicos e experimentais, ela contribuí efetivamente para o tratamento dos danos medulares secundários. Entre as drogas em teste, os bloqueadores dos canais de cálcio, o naloxone, os gangliosídeos, os lazaróides, o dimetil-sulfoxido e a alfa metilparatirosina são estudadas preferencialmente. Os corticóides e os gangliosídeos já estão protocolados para uso em humanos. Dentre os corticóides, os mais pesquisados são a dexametasona e a metilprednisolona. Essa última, em ensaios clínicos randomizados, prospectivos, duplo-cegos, tem comprovação clínica de sua eficácia (Bracken et al. (1992)). Inicialmente, o tratamento com esteróides baseia-se na ação antiinflamatória e na efetividade em tratar o edema cerebral. Acredita-se que, além desta sua ação, a metilprednisolona atue aumentando o fluxo sangüíneo, estabilizando a membrana celular e inibindo a peroxidação lipídica, com conseqüente diminuição da formação de radicais livres.

Está contra-indicada a administração em pacientes politraumatizados devido aos seus efeitos sistêmicos.

O GM-1 (monosialotetraeosilgangliosídeo) é uma opção terapêutica no tratamento de lesões do Sistema Nervoso Central (Walker et al. (1993)). São atribuídas ao GM-1 diversas propriedades, como a redução do edema neuronal pelo aumento da atividade das bombas de sódio, potássio e magnésio, a homeostase das células nervosas pelo restabelecimento do equilíbrio de membrana (Gebrin et al. (1997b)) e, principalmente, o aumento de fatores neurotróficos endógenos. Isto diminui a destruição de neurônios após o traumatismo, aumentando os mecanismos de plasticidade dos circuitos medulares lesados, e potencializa a recuperação de conexões funcionais (Cuello et al., 1989).

A análise dos resultados dos trabalhos envolvendo o GM-1 em humanos revela melhora de função locomotora (Geisler et al. (2001)), mas a interpretação destes resultados, segundo Blight et al. (2001), é complexa devido ao uso de metilprednisolona ter ocorrido antes da administração do GM-1.

Existem estudos experimentais que buscam elucidar o possível sinergismo entre fatores farmacológicos de intervenção na lesão medular (Constantini et al. (1994)). Oxigenoterapia hiperbárica e GM-1 podem ter efeitos aditivos ou sinérgicos na lesão medular contusa. No entanto, os efeitos deste tratamento ainda não foram claramente estudados em modelos de lesão medular.

Assim, este estudo tem como objetivo avaliar, em modelo experimental padronizado, a influência do tratamento de ratos submetidos a lesão medular aguda, com câmara de oxigenoterapia hiperbárica, monossialogangliosídeo (GM-1) e uma combinação destes fatores, no resultado funcional e anátomo-patológico.

*Utiliza-se a Terminologia Anatômica em Português conforme a TERMINOLOGIA ANATÔMICA INTERNACIONAL DA FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY - FCAT (COMISSÃO FEDERATIVA DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1. Ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole Ltda 2001. 248p.*

*A elaboração do original desta tese segue as normas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo conforme o GUIA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÕES, TESES E MONOGRAFIAS / Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Serviço de Biblioteca e Documentação; elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. – 2. ed. –São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.*

*Utilizam-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o GUIA PARA EXPRESSÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO, Segunda Edição Brasileira do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.*

*As abreviaturas dos nomes das revistas baseiam-se na LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS (1992) e na LILACS - LITERATURA LATINO-AMERICANA E DO CARIBE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (1995).*

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

Schmaus (1890) apud Yeo (1976) é o primeiro a realizar um estudo experimental em animais para avaliação da lesão da medula espinal, através da aplicação de um golpe em uma tábua presa nas costas de coelhos. Observa o aparecimento de áreas de degeneração e cavitação no interior da medula espinal.

Kirchgässer (1897) apud Dohrmann (1972) e Scagliosi (1898) apud Dormann (1972) estudam as alterações na medula espinal de coelhos submetidos a traumatismo da região dorsal e descrevem a degeneração da bainha de mielina e das células neuronais dos cornos anteriores da medula espinal, não havendo, entretanto, evidências de hemorragia intramedular ou fratura da coluna vertebral.

Allen (1911) é o primeiro pesquisador a criar um modelo experimental, reprodutível e quantificável de lesão da medula espinal, através da queda de peso direto sobre a dura-máter da medula espinal de cães. Esse modelo é conhecido como queda do peso. É capaz, assim, de produzir uma lesão dinâmica da medula espinal, quantificada por meio do produto do peso em gramas, pela altura em centímetros, e o resultado pelo cálculo é expresso em gramas-centímetros (g.cm).

Allen (1914) relata que um impacto produzido pela queda de 240 g.cm produz lesão parcial da medula com recuperação melhor que aquele produzido pela queda de 400 g.cm. Observa a presença de edema e hemorragia nas substâncias cinzenta e branca da medula espinhal nos primeiros 15 minutos, sendo que, após quatro horas do traumatismo, há evidência de edema dos axônios na coluna lateral e posterior da substância branca da medula espinhal. Salienta que a redução da pressão intramedular por mielotomia melhora a recuperação clínica dos animais deste estudo e sugere que o aumento da pressão intramedular causado pelo edema e hemorragia agrava a necrose isquêmica após a lesão traumática inicial.

McVeigh (1923) estuda as mudanças ocorridas em cães submetidos à lesão da medula espinal através de compressão digital no nível TVII-TVIII e medulas espinais obtidas de cadáveres frescos que também são submetidas à compressão entre os dedos. Observa edema na coluna lateral e anterior oito horas após a lesão, que progride até o 2º dia. Hemorragia está presente na substância cinzenta e se estende acima e abaixo do nível da lesão e através da substância branca anterior e lateral. Acredita que as lesões experimentais produzidas em cães e em medulas espinais humanas obtidas de necropsia são comparáveis às lesões medulares que ocorrem nos homens em todos os aspectos, especialmente no que diz respeito aos fatores mecânicos que causam a lesão e às mudanças observadas nas alterações histológicas.

Holdsworth (1953) apud Holdsworth (1970) revoluciona o tratamento através da classificação das fraturas em estáveis e instáveis. Define as lesões completas como aquelas em que não há função neurológica nos níveis distais à lesão (podendo ser reversíveis ou irreversíveis), não ocorrendo recuperação neurológica e com a persistência de déficit depois de finalizada a fase de choque medular.

Tarlov (1954) realiza estudo experimental em cães, produzindo compressão medular gradual, e estuda a perda e recuperação da função sensitiva e motora nestes animais. Utiliza um balão que é introduzido dentro da região torácica média, através de uma laminectomia de T12 e, quando inflado, produz a lesão medular compressiva extradural. Apresenta um método de avaliação da função locomotora em animais que sofreram lesão medular experimental e conclui que a recuperação funcional, após aumento gradual da compressão extradural, depende da duração do tempo de compressão selecionado para produzir a paralisia.

Woodward; Freeman (1956) estudam experimentalmente a isquemia da medula espinal em 27 cães adultos, através da secção dos vasos sanguíneos juntos aos pares de raízes nervosas de TVI a TXI. Os animais foram sacrificados entre uma e quatro semanas após a lesão. Encontram alterações precoces na avaliação histológica. Na isquemia leve, há a perda de neurônios no corno dorsal, seguido por redução da substância cinzenta posterior com separação passiva dos elementos neurais intersticiais e pela formação de cavitação. Em graus mais graves de isquemia, ocorre

necrose através dos tratos longos e dos elementos neurais e redução no número de neurônios, produzindo um quadro de mielomalácea com cavitação.

Ducker; Hamit (1969) avaliam tratamentos experimentais em cães submetidos à lesão experimental por queda de peso de 25 g de uma altura de 15cm. Comparam quatro grupos: grupo 1: controle, sem tratamento específico; grupo 2: os animais que recebem tratamento com hipotermia local através da irrigação da ferida com solução salina circulando através de um tubo com água gelada a 0 ºC na taxa de 75 a 100 ml/min.; grupo 3: tratados com administração de dexametasona, aplicados por via intramuscular três horas após a lesão. A dose de dexametasona é de 0,5 mg/kg/24h no dia do trauma e 0,24 mg/kg/24h no 1º dia de pós-operatório, administrada em doses divididas. Doses de 1,3mg/kg/24h de metilprednisolona foram administradas nos sete dias subseqüentes; grupo 4: os animais recebem uma única dose de metilprednisolona de 8 mg/kg, intratecal, administrada sob visão direta. A avaliação da recuperação neurológica é baseada na escala de função motora de Tarlov. Observam melhora estatisticamente significante e melhor recuperação neurológica, nos grupos que recebem dexametasona intramuscular e hipotermia local.

Holdsworth (1970) publica artigo baseado na observação de mais de 1000 pacientes paraplégicos ou tetraplégicos traumáticos. Descreve a anatomia e os mecanismos de trauma, as características radiográficas e o diagnóstico da lesão neurológica. Mostra casos com fraturas estáveis, luxações e fraturas-luxações, fraturas rotacionais e por cisalhamento. Defende que a presença de sensibilidade sacral e de

função motora distal à lesão são indicativos de uma lesão medular incompleta. Advoga, ainda, a redução aberta e a fixação interna das fraturas, com placas inseridas nos processos espinhosos, com o objetivo de restaurar o alinhamento da coluna e prover melhores condições de recuperação neurológica. Recomenda, ainda, cautela quanto à realização de laminectomia em pacientes com lesão medular, devido à falha em demonstrarem recuperação neurológica significativa e ao aumento do potencial desses pacientes de desenvolverem deformidades espinais tardias e piora do déficit neurológico.

Kelly Jr. et al. (1970) avaliam os efeitos da hipotermia local e os níveis de oxigênio tecidual em cães submetidos à lesão por impacto de queda de peso, concluindo que a hipotermia oferece uma proteção à medula espinal traumatizada, pela diminuição da demanda metabólica.

Ducker et al. (1971) realizam estudo prospectivo, randomizado, com 32 macacos *Rhesus* pesando entre 4 a 8 kg, submetidos ao trauma por queda de peso de 10, 15, 20 e 25 g, em forma de cilindro, da altura de 20 cm, de forma que a resultante do impacto sobre a medula é de 200 g.cm, 300g.cm, 400 g.cm, 500 g.cm, respectivamente. São divididos em quatro grupos de oito animais cada, sendo que cada grupo é randomizado novamente dentro de categorias agudas e subagudas, sendo os primeiros sacrificados seis horas após a lesão e os últimos cinco a seis dias após a lesão. Os achados patológicos na microscopia são graduados sem conhecimento da quantidade prévia de trauma. Nos animais categorizados de agudos, o edema, a

diapedese, a hemorragia petequial, a hemorragia em chama e o hematoma globular são graduados em leve, moderado e grave. Nos animais subagudos, o edema, a desmielinização, a necrose, a hemorragia, e a deformidade vascular também são similarmente graduados. Os animais subagudos também são submetidos a teste neurológico motor, sendo o exame sensitivo considerado não objetivo. Os níveis funcionais são graduados de zero a quatro, onde 0 = capacidade de correr com pequeno ou com nenhum déficit motor, 1 = a capacidade de ficar em pé, caminhar e correr embora com espasticidade, 2 = bom movimento dos membros, os quais permitem ao animal ficar em pé, mas não andar e 4 = paraplegia completa sem nenhum movimento voluntário. Observam que os vários graus de progressão do trauma medular, desde uma pequena área de necrose central até uma extensa necrose central, bem como necrose periférica, são dependentes e diretamente relacionados à gravidade do trauma. Não concluem porque a substância cinzenta é mais vulnerável, mas postulam que provavelmente a anatomia, o metabolismo celular, o suprimento arterial e a drenagem venosa contribuem para o efeito cumulativo da fragilidade do centro da medula. Concluem que o desenvolvimento das mudanças patológicas não é paralelo às condições clínicas, pois, enquanto pode haver melhora nos achados clínicos, as mudanças patológicas podem ser progressivas em gravidade por aproximadamente uma semana, mesmo na presença de melhora clínica e que as mudanças são inicialmente mais proeminentes no centro da medula, mesmo sendo o trauma dirigido à sua superfície, e que a localização e a progressão da área medular lesada são dependentes da quantidade de trauma aplicado. Em traumas leves, em que o animal se recupera, as mudanças são somente centrais. Em traumas moderados, com

paresia significante, as mudanças também envolvem a substância branca adjacente. Em traumas graves, com resultante paraplegia, as mudanças envolvem toda a substância medular.

Fairholm; Turnbull (1971) estudam prospectivamente 34 coelhos, pesando entre 2 e 3 kg, e cinco cães, com modelo de contusão por queda de peso. Os animais são sacrificados em tempos variáveis desde 19 minutos até 14 dias após a lesão. Após o sacrifício, são infundidos com solução coloidal de bário e a microangiografia, feita sete a 14 dias após o traumatismo, define duas zonas de lesão na medula espinal. Na zona 1, localizada na porção póstero-central da medula espinal, os capilares perdem progressivamente a capacidade de condução de sangue, e na zona 2, ao redor da zona 1, o padrão microvascular é normal. Concluem que a recuperação dos neurônios e axônios danificados depende da preservação da microcirculação.

Wagner Jr. et al. (1971) apresentam um estudo prospectivo com 27 macacos *Rhesus* adultos, utilizando o modelo de impacto por queda de peso de 20 g e de uma altura de 15 cm, gerando uma força de contusão de 300 g.cm ao nível de TX. Esses animais (n=18) são divididos em cinco grupos e os segmentos da medula sujeitos ao trauma são removidos em diferentes intervalos de tempo pós-contusão: 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas. Em nove animais, a laminectomia é realizada, mas a medula espinal não é traumatizada, servindo como grupo controle. Um adicional de quatro animais são traumatizados e mantidos vivos durante seis meses, durante os quais são realizados freqüentemente exames motores. Notam que, neste

grupo, denominado de grupo crônico, todos os animais apresentam paralisia sensitiva e motora completa dos membros inferiores. Dentro de 12 horas, movimentos isolados dos dedos estão presentes, em torno de 24 horas, frágeis respostas de reação são obtidas aos estímulos dolorosos, entre sete e 10 dias, todos os animais são capazes de se moverem facilmente em suas gaiolas e, em seis meses, os animais são indistinguíveis dos não operados. Nas observações da microscopia em relação aos vasos sanguíneos, nota-se que, em cinco minutos, a aparência da medula espinal não está grandemente alterada, estando os vasos com menos fibras musculares ao redor do canal central, distendidos, mas intactos, e foram observados fluidos serosos, mas não formação de trombos. Em 15 minutos, rupturas isoladas de vasos mais finos, com extravasamento de eritrócitos para os espaços perivasculares, são observadas dentro da substância cinzenta central. Em 30 minutos, os eritrócitos e o fluido seroso são notados em discretas coleções nos espaços perivasculares e estendem-se dentro e ao redor do parênquima. Essas alterações concentram-se principalmente nas áreas do canal central, mas incluem também o corno dorsal. Entre uma e quatro horas, as hemorragias perivasculares, inicialmente discretas, começam a coalescer. Essas alterações não estão mais confinadas ao canal central e ao corno dorsal, mas são evidentes na substância branca. As alterações edematosas menos marcantes observadas nas camadas mais internas da substância branca, em contraste com as mudanças hemorrágicas na substância cinzenta, explicam, em parte, a natureza transiente da paraplegia.

Kelly Jr. et al. (1972) publicam um estudo prospectivo em 40 cães adultos, sem raça definida, submetidos à lesão por impacto da medula espinal e divididos em quatro grupos: o grupo controle não recebe nenhuma terapia, excluídos os suportes necessários, o grupo 1, denominado de tratamento imediato, é exposto, uma hora após a lesão medular, a 100% de oxigênio a 2 atmosferas por quatro horas; o grupo 2, denominado de tratamento retardado, é submetido, após um período de quatro horas da lesão, às mesmas condições e tempo do grupo 1 e o grupo 3, denominado de tratamento seriado, recebe, uma hora após a lesão, 100 % de oxigênio a 2 atmosferas, por quatro horas, e esse tratamento é repetido em 24 e 48 horas. Encontram que, no grupo não tratado, nove animais são incapazes de caminhar e desses, quatro ficam completamente paraplégicos. No grupo 1, sete cães apresentam boa recuperação e desses, quatro são considerados normais. No grupo 2, nove animais apresentam boa recuperação e um animal apresenta grande incapacidade e função urinária anormal. No grupo 3, a taxa de recuperação é idêntica ao grupo 2. Notam que a medula espinal traumatizada se torna muito hipóxica por um período de tempo de 30 minutos após lesão. Inalação com oxigênio a 100 %, não afeta esses níveis, mas, com oxigênio hiperbárico a 2 atmosferas, é possível aumentar a $PO_2$ tecidual na medula espinal traumatizada.

Tator; Deecke (1973) estudam o valor das perfusões hipotérmica e normotérmica e da durotomia, em lesão experimental em macacos *Rhesus*. Observam que a perfusão, hipotérmica ou normotérmica, melhora a recuperação neurológica mas, em compressões maiores, somente a perfusão normotérmica produz melhora

significativa. Esses resultados indicam que não se pode afirmar que a perfusão exerça efeito benéfico, mas sugerem que a diálise de substâncias nocivas da medula espinal lesada tem um importante papel na recuperação neurológica.

De La Torre et al. (1975) estudam 32 cães submetidos à lesão experimental por queda de peso e avaliam o tratamento com drogas. Divide em quatro grupos de oito cães, que são submetidos a tratamento com solução salina, manitol, dexametasona e dimetil-sulfóxido. Encontram que a utilização de solução salina isotônica e de manitol são incapazes de reverter a paralisia. Cães que recebem dimetil-sulfóxido (6 de 8) ou dexametasona (2 de 8) têm recuperação parcial ou total da função.

Hansebout et al. (1975) estudam os efeitos da hipotermia e dos corticosteróides no tratamento de cães fêmeas adultas submetidas à lesão experimental da medula espinal pelo método de compressão com balão, por um período de tempo de uma hora. Os animais submetidos à experimentação são divididos em cinco grupos: somente laminectomia; laminectomia + aparato de troca de calor a 37º C; laminectomia + lesão; laminectomia + lesão + corticosteróide e laminectomia + lesão + resfriamento a 6º C por quatro horas. Observam, em sete semanas, que os grupos que recebem tratamento com qualquer corticosteróide ou com resfriamento conseguem taxas de recuperação motora significativamente superiores aos do grupo não tratado, sendo que o grupo não tratado é incapaz de caminhar, enquanto ambos os grupos tratados são capazes. Os grupos que não sofrem lesão

necessitam de duas semanas para total recuperação motora, não havendo diferença significativa entre o grupo em que é realizada a laminectomia e o grupo que recebe o aparato de troca de calor a 37º C (normotérmico).

Yeo et al. (1975), estudando autópsias de pacientes que sofreram lesão medular, observam que, embora aparentemente intactos, os neurônios contundidos têm cessado sua função, que, através de métodos químicos ou físicos, pode ser parcialmente revertida. Procuram diferenciar a concussão, a contusão e a laceração em medulas recentemente lesadas em ovelhas, tentam reproduzir a lesão contusiva experimental em animais e a seqüência dos eventos patológicos e usar a mielografia com isótopos para definir o grau de lesão da medula espinal. Observam uma tendência similar nos padrões de recuperação sensitiva e motora, sugerindo que a isquemia e a hipóxia poderiam contribuir significativamente na patogênese da paraplegia pós-traumática.

Dohrmann et al. (1976) descrevem um aparelho para produzir uma lesão experimental da medula espinal com monitoração do grau do traumatismo em relação à velocidade de deformação da medula espinal, ao impulso e à energia, podendo ser usado em diferentes tipos de animais, com maior acurácia para se poder correlacionar a quantidade de lesão, o grau de disfunção neurológica e a eficácia dos vários métodos de tratamento. Este aparelho consiste de um modelo de queda de peso com a haste contida dentro de um tubo de plástico transparente. A orientação vertical do impacto era assegurada através de um nível colocado no topo do tubo.

Dohrmann et al. (1976) realizam estudo experimental de lesão da medula espinal em 15 gatos, através de queda de peso no nível TV-TVI. Aplica-se um trauma de 400 g.cm, sendo dividido em cinco grupos, 5 g x 80 cm; 10 g x 40 cm; 20 g x 20 cm; 40 g x 10 cm e 80 g x 5 cm. Comparam os parâmetros biomecânicos e o volume de lesão entre os cinco grupos, observando que o volume de lesão é diferente em todos grupos, embora todos tenham recebido a mesma lesão de 400 g.cm. A quantidade de energia transferida para a medula é dependente de vários fatores como, altura, velocidade e massa sobre a medula. A energia absorvida pela medula é 100 vezes maior no grupo 4 que no grupo 1.

Kuchner; Hansebout (1976) avaliam cães com lesão experimental por compressão com balão extra-dural submetidos a tratamento isolado com dexametasona, hipotermia sem irrigação, ou associação de dexametasona e hipotermia sem irrigação. A hipotermia é realizada através da colocação de uma bolsa de *Silastic* local com conteúdo fluido resfriado entre 6 ºC ± 3 ºC, não havendo a possibilidade da irrigação contribuir para a recuperação funcional. Os resultados mostram que os grupos que recebem tratamentos isolados com dexametasona e hipotermia apresentam a capacidade de deambulação enquanto o grupo não tratado não pode caminhar. O grupo que recebe tratamento associado de hipotermia e dexametasona é o que apresenta melhor índice de recuperação motora final.

YEO (1976) realiza estudo prospectivamente do uso de terapia com oxigênio hiperbárico para controlar o início de paraplegia depois de lesão medular espinal

recente em ovelhas. Os relatos preliminares sugerem que a terapia com oxigênio hiperbárico instituída dentro de duas horas após a lesão, resulta em melhora da recuperação motora.

YEO et al. (1976) estudam o grau de recuperação motora em ovelhas submetidas a uma contusão controlada da medula espinal torácica e comparam com a recuperação em ovelhas tratadas com oxigênio hiperbárico. Confirmam os resultados preliminares previamente publicados. O grau de necrose cística central da medula espinal e a degeneração ao redor da substância branca são comparados nos animais do grupo controle e de tratamento. A melhora na recuperação motora e o grau de degeneração medular depois do tratamento com oxigênio hiperbárico sugerem que a isquemia tem um papel significante nos animais experimentados com uma lesão de contusão da medula espinal.

Holbach et al. (1977) estudam prospectivamente 15 pacientes, sendo 13 homens e duas mulheres, entre 18 e 65 anos com média das idades de 44 anos, com lesões compressivas da medula espinal No pós-operatório são incluídos aqueles pacientes em que o déficit neurológico pré-operatório permanece ou se agrava. A terapia é administrada diariamente por 10 a 15 sessões por 40 minutos cada a uma pressão de 1,5 atmosferas. Os critérios de avaliação baseiam-se em exames clínicos realizados imediatamente antes, durante e após as sessões de oxigênio hiperbárico, na avaliação através da eletroneuromiografia (ENMG) e na avaliação da pressão de oxigênio ($PO_2$) arterial e do líquido cerebrospinal. Encontram melhora do déficit

neurológico em seis dos 13 pacientes e aumento considerável da $PO_2$ arterial e no líquido cerebrospinal. Nos pacientes em que é realizada a ENMG encontram aumento significante na amplitude dos sinais, resultante do aumento do recrutamento dos neurônios motores. Concluem que o tratamento com oxigênio hiperbárico pode ser útil no tratamento das lesões compressivas da medula espinal, mas que estudos clínicos adicionais têm de ser realizados para demonstrar a eficácia dessa modalidade de tratamento.

Rivlin; Tator (1977) desenvolvem um novo método de avaliação clínica da função motora em ratos, que consiste em colocar o rato em plano inclinado. O método permite o ajuste da inclinação em vários graus e a verificação do plano do ângulo mínimo que o animal pode sustentar-se na posição, sem cair. Esse método é utilizado para quantificar a função motora em ratos normais (controle) e ratos sujeitos à mielectomia e demonstra consistente diferença entre os dois grupos.

Yeo et al. (1977) estudam os resultados das mudanças patológicas associadas com a necrose central pós-traumática da medula espinal em ovelhas submetidas à lesão experimental pelo modelo de queda de peso. Foram divididos em grupo controle, isto é, sem tratamento algum a não ser os cuidados básicos, e animais tratados com metilprednisolona intratecal, alfa metil paratirosina e oxigênio hiperbárico. Encontram, no grupo sem tratamento, intensa necrose da substância cinzenta central e microcistos e desmielinização ao redor e na substância branca, com vários graus de fibrose, gliose, e extensa degeneração cística central. Apesar do

intenso grau de degeneração, havia recuperação motora significante, com todos animais desse grupo recuperando pelo menos os movimentos antigravitacionais. Nenhum animal do grupo controle ou dos grupos tratados obtém recuperação motora total. No grupo dos animais tratados com metilprednisolona intratecal, o grau de degeneração cística central e desmielinização parecia idêntico ao do grupo não tratado. No grupo tratado com alfa-metil-paratirosina, há recuperação motora significante e menor degeneração cística central e microcistos na substância branca. Nos animais tratados com oxigênio terapia hiperbárica, há melhora significante da recuperação motora por um período de oito semanas depois da lesão e menor degeneração cística central e formação de microcistos nas colunas anterior e lateral. Na análise estatística, há melhora em todas as semanas, com exceção da quinta semana. A possível aplicação clínica da alfa-metil-paratirosina é impedida, pela sua toxicidade renal, em pacientes com lesão medular.

Balentine (1978) estuda a lesão necrótica da medula espinal em ratos adultos, submetidos à lesão experimental pelo modelo de queda de peso através da análise da mudança patológica seqüencial das alterações dos vasos sanguíneos e da necrose tecidual da medula espinal, em períodos de tempo que variam de três a cinco minutos, 30 minutos, uma hora, duas horas, quatro horas, oito horas, e uma semana após a lesão. Esse estudo confirma a evolução seqüencial do desenvolvimento de necrose, primeiro na substância cinzenta e depois na substância branca. A observação dos vasos sanguíneos demonstra que a necrose é devida à ruptura dos vasos sanguíneos, tanto artérias quanto veias principais, lesadas durante o traumatismo.

Ducker et al. (1978) medem os níveis de oxigênio tecidual e o fluxo sangüíneo na medula em cães paraplégicos, decorrentes de traumatismo medular. Documentam que a lesão medular produz grande diminuição do fluxo sangüíneo. Sugerem que os esforços terapêuticos devem ter como objetivo melhorar a oxigenação e aumentar o fluxo sangüíneo para medula.

Rivlin; Tator (1978) estudam prospectivamente o fluxo sanguíneo regional em 12 ratos *Wistar*, pesando entre 350 e 400g, sendo o fluxo regional medido em cinco minutos, duas horas e 24 horas após a lesão. Utilizam a técnica radiográfica com C-antypirina para avaliação do fluxo sanguíneo. Concluem que lesões por compressão medular grave produzem grave isquemia pós-traumática na medula espinal, por pelo menos 24 horas. Descrevem um novo modelo de lesão medular através da utilização de clipes de aneurisma modificados para compressão, colocados ao redor da medula, extra-duralmente.

Tator; Rowed (1979) salientam a importância da lesão medular secundária após o trauma inicial. Afirmam que, raramente, uma lesão medular causa transecção anatômica na medula, embora freqüentemente cause paralisia completa ou incompleta da função medular.

Descrevem que, inicialmente, pelo exame histológico da medula, são observados pontos hemorrágicos na substância cinzenta e edema na substância branca. Semanas após a lesão inicial, é observada a substituição do tecido medular necrótico

por cavidades. Observam haver dois tipos de lesão vascular após o trauma medular. O primeiro é a lesão imediata de pequenos vasos medulares, especialmente vênulas da substância cinzenta, o que resulta em hemorragia poucos minutos após o trauma. O segundo tipo de lesão vascular é mais destrutivo, com isquemia grave e infarto das substâncias branca e cinzenta. Acreditam na hipótese de que o tratamento deve ser direcionado para a fase aguda, a fim de impedir o infarto secundário e melhorar a recuperação. Citam os corticoesteróides como drogas a serem utilizadas para impedir a cascata secundária de lesões após o trauma medular agudo.

Gamache et al. (1980) avaliam prospectivamente 25 pacientes com lesão aguda da medula espinal por um período de 18 meses, sendo submetidos à terapia com oxigênio hiperbárico, aproximadamente sete horas e trinta minutos após a lesão. Todos os pacientes de ambos os grupos recebem metilprednisolona. São comparados os escores motores pré e pós-tratamento. Observam que apesar de apresentarem os mesmos escores motores ao final da avaliação em quatro meses e um ano em relação aos que recebem terapia tradicional (realinhamento ósseo com ou sem estabilização cirúrgica), o grupo submetido a oxigênio terapia hiperbárica obteve uma velocidade de recuperação mais rápida. Concluem que existe, portanto, evidência de que o tratamento com oxigênio hiperbárico altera o tempo de recuperação sem alterar o resultado final.

Lohse et al. (1980) realizam estudo experimental em 24 gatos que são submetidos a lesão medular na coluna torácica ao nível de T5, aplicando forças de 100

g.cm ou 260 g.cm. O fluxo sangüíneo na medula foi medido pelo método de clearence de hidrogênio antes e após a lesão.

Observam, após o trauma, aumento da pressão sangüínea (137%) e arritmia cardíaca em todos os grupos. Demonstram que, no grupo com trauma de 100 g.cm, não foi observada diferença significante quanto ao fluxo sangüíneo, enquanto no grupo com trauma de 260 g.cm, houve aumento do fluxo sangüíneo nas seis horas posteriores ao trauma. Concluem não existir isquemia da substância branca nas lesões medulares, assim, a paraplegia resultante deve ser transitória. Estes dados suportam o conceito de que a isquemia da substância branca, na fase aguda de um trauma medular grave, deve estar relacionada à lesão secundária e, subseqüentemente, à paraplegia permanente.

Means et al. (1981) comprovam, em estudo experimental de lesão medular aguda em gatos, que a metilprednisolona apresenta efeitos benéficos quanto à recuperação motora. Avaliam parâmetros morfométricos da medula lesada, porcentagem de área cavitária e porcentagem ocupada pela cavidade na medula, e comparam estes parâmetros com a avaliação da recuperação neurológica dos animais. Observam uma correlação negativa entre o tamanho da cavidade e o índice de recuperação motora.

De La Torre (1981), em artigo de revisão sobre as estratégias de pesquisa básica e aplicada sobre lesão medular, analisa os modelos experimentais, as técnicas de avaliação do trauma medular experimental, os estudos neurofisiológicos e

morfológicos, o mecanismo vascular, o fluxo sanguíneo medular, as mudanças bioquímicas e metabólicas e o tratamento da lesão medular aguda e crônica. Na lesão crônica, destaca três possíveis caminhos de regeneração axonal no sistema nervoso central: 1- brotamento colateral, 2- plasticidade e 3- regeneração axonal. Refere que a regeneração pode ser conseguida através de transplante de tecido neural (células fetais) e do uso de fatores de crescimento. Cita a existência de evidências de sobrevivência e crescimento dessas células.

Young et al. (1981) estudam, prospectivamente, os efeitos do naloxene em 25 gatos adultos submetidos à lesão traumática da medula espinal, em modelos de impacto por queda de peso. Estudam o fluxo sanguíneo da medula espinal através da depuração de hidrogênio, observando melhora do fluxo sangüíneo no grupo tratado com naloxene em comparação com o grupo controle sem tratamento e com grupo que recebe solução salina. Observam também a preservação da função sensitiva e o potencial evocado somato-sensitivo, registrados de eletrodos bipolares no espaço epidural, em 24 horas pós-lesão no grupo tratado com naloxene.

Anderson et al. (1982) produz estudo prospectivo em gatos adultos fêmeas, com lesão medular produzida e divididos em três grupos. O primeiro grupo não recebe tratamento, o segundo é tratado com altas doses de metilprednisolona (15 mg/Kg/24h) e o terceiro, com megadose de metilprednisolona (60 mg/Kg/24h). Avaliam a microvascularização no sítio da lesão por método indireto, através do uso de carbono coloidal. Observam que o grupo tratado com altas doses de

metilprednisolona apresenta preservação substancial da perfusão microvascular quando comparado com o grupo não tratado.

Young; Flamm (1982) relatam estudo prospectivo com 15 gatos adultos submetidos à lesão traumática pelo modelo de contusão de impacto por queda de peso de 400 gm.cm. Os animais foram divididos em três grupos: 1º grupo sem tratamento, 2º grupo, que recebe a dose de 15 mg/Kg de succinato sódico de metilprednisolona 45 minutos após a lesão; e o 3º grupo, que recebe a dose de 30 mg/Kg de succinato sódico de metilprednisolona. Observam que, no grupo tratado com altas doses de metilprednisolona (30 mg/Kg), ocorre melhora do fluxo sangüíneo na primeira hora após lesão, medido pela depuração de hidrogênio. Há melhora da concentração de cálcio extracelular e do potencial evocado somato-sensitivo ativado pela estimulação do nervo ciático e registrado bipolarmente por eletrodos colocados no espaço epidural sobre o córtex somato-sensitivo. Esses dados sugerem que o tratamento com altas doses de corticosteróide causa dilatação dos vasos sangüíneos da medula espinal. O conseqüente aumento do fluxo sanguíneo pode explicar os efeitos benéficos das altas doses de corticosteróide na recuperação funcional.

Braughler; Hall (1983) publicam estudo de lesão medular em 87 gatos submetidos a laminectomia de L2 a L5. Aplicam uma carga compressiva de 400 g.cm para produzir lesão medular. Alguns animais recebem uma dose única de succinato de metilprednisolona, que varia de 7,5 a 60 mg/kg, em bolo, 30 min. após a lesão. Relatam que a lesão produz uma rápida elevação do lactato, duas vezes maior, após

cinco minutos, e três vezes maior, após duas horas, sendo que seu valor declina após quatro e oito horas da lesão. O piruvato diminui na primeira hora após a lesão, mas sua concentração aumenta entre duas e oito horas depois. Sugerem que o uso do corticóide pode melhorar o fluxo sangüíneo nas lesões medulares.

Ford (1983) modifica o método de lesão medular descrito por Allen (1911) e realiza lesão medular em 33 gatos. Avalia a recuperação funcional dos membros inferiores e observa os achados histológicos da medula lesada após 6 semanas do traumatismo medular. Comprova que as modificações realizadas no método de ALLEN são efetivas para causar lesão medular e que este método reduz as variáveis. Revela que a metodologia utilizada para avaliar a recuperação motora não satisfaz as necessidades de uma avaliação completa e detalhada.

Hall et al. (1984) estudam o fluxo sangüíneo medular em 25 gatos adultos submetidos à contusão medular padronizada ao nível de L3. Após a lesão, realizam estudo do fluxo sangüíneo em todos os gatos 10 minutos, 30 minutos, uma, duas, três e quatro horas após a lesão. Estes animais são divididos em quatro grupos, o primeiro sendo o grupo controle, o segundo recebendo 15 mg/Kg de metilprednisolona, o terceiro recebendo 30 mg/kg e o quarto recebendo 60 mg/Kg de metilprednisolona. Demonstram que os gatos que recebem 30 mg/Kg mantêm o fluxo sangüíneo dentro da normalidade, os que recebem 15 mg/Kg apresentam benefícios menores e aqueles que recebem 60 mg/Kg não têm nenhum benefício. Concluem que o corticóide

diminui a isquemia medular pós-traumática, quando administrado na dose de 30 mg/Kg, dentro das primeiras horas após o trauma, mas não reverte a isquemia, quando esta já ocorreu.

Anderson et al. (1985) descrevem uma série de eventos fisiopatológicos que ocorrem no tecido medular lesado, subseqüentes ao trauma raquimedular agudo, que acarretam destruição tecidual e paraplegia. Citam, como evento secundário ao trauma medular agudo, necrose hemorrágica, isquemia, edema, inflamação, perda de cálcio no espaço extracelular e perda de potássio no espaço intracelular. Lembram a importância da peroxidação lipídica, que pode lesar, direta e indiretamente, as células. Afirmam que a metilprednisolona, em estudos experimentais de lesão medular em animais, tem sido efetiva na prevenção da ocorrência desta cascata de eventos secundários que leva à lesão medular, atenuando a ação de radicais livres de oxigênio na peroxidação lipídica.

Bracken et al. (1985) publicam um estudo multicêntrico da eficácia do uso de altas doses de metilprednisolona (1000 mg em bolo e diariamente por 10 dias) comparado com a dose padronizada (100 mg em bolo e diariamente por 10 dias). Relatam não haver diferença significativa entre os grupos em relação à recuperação motora num prazo de seis semanas a seis meses após a lesão. Observam que houve maior índice de infecção no trato cirúrgico e maior mortalidade no grupo que recebeu altas doses, mas ressaltam que estes dados não foram estatisticamente significativos.

Gale et al. (1985) realizam um estudo da análise comportamental em ratos submetidos à lesão por contusão da medula espinal. Com base nessas análises, desenvolvem um protocolo para avaliação do déficit funcional. Esse protocolo é administrado por pessoas treinadas e consiste de uma contagem comportamental combinada de vários testes em que o componente principal da avaliação comportamental é a escala motora, que envolve uma avaliação passiva das patas traseiras (membros posteriores) dos animais e consiste de uma versão modificada da escala descrita por Tarlov. Os animais são observados em campo aberto, sendo cada membro traseiro observado individualmente e graduado em: 0- nenhum movimento das patas traseiras e nem suporte de peso; 1- movimento fracamente perceptível dos membros traseiros, mas sem suporte de peso; 2- movimentos freqüentes e/ou vigorosos nos membros traseiros mas sem suporte de peso; 3- suporte de peso nos membros traseiros, podendo trocar um ou dois passos; 4- caminhar com déficit leve; 5- caminhar normal.

Noble; Wrathall (1985) estudam as alterações morfométricas da medula espinal em 51 ratos *Sprague-Dawley* submetidos à lesão medular experimental pela técnica de queda de peso de 10 gramas, das alturas de 2,5; 5,0; 7,5; 10; 17,5 cm. Quatro semanas após a lesão, o volume, a extensão e as dimensões do tecido no epicentro da lesão (área de lesão, área da substância branca e área da sustância cinzenta), são medidos e correlacionados com a altura da queda do peso e os resultados do déficit comportamental, motor e sensitivo. Concluem que a técnica de queda de peso pode ser usada em ratos para produzir lesões leves, moderadas e

graves, sendo, portanto, uma técnica apropriada para prover estudos em modelos de ratos para estudar a lesão contusa da medula espinal.

Albin; White (1987) demonstram que o traumatismo da medula espinal, além da destruição mecânica, desencadeia hemorragia, diminuição da perfusão, hipóxia tecidual, edema e finalmente necrose dos elementos neurais.

Bresnahan et al. (1987) desenvolvem um aparelho de impacção com função eletromecânica. Afirmam que a lesão medular experimental reprodutível depende de uma resposta imediata das propriedades mecânicas do impacto. Documentam que o aparelho apresentado é sensível às características do tecido lesado e permite manipulação contínua da força de impacto ou do deslocamento tecidual. Descrevem os resultados anatômicos e comportamentais de um determinado índice de impacto e examinam a capacidade do aparelho em produzir uma lesão traumática consistente.

Hansebout; Janssen (1987), em revisão da literatura, analisam a patogênese da lesão da medula espinal e os novos tratamentos químicos e físicos que podem diminuir o dano secundário entre eles e encontram que a terapia com oxigênio hiperbárico tem demonstrado resultados positivos. A razão pela qual é explicada essa abordagem é que a diminuição da perfusão tecidual pode ser compensada pelo aumento dos níveis de oxigênio no sangue. Concluem que, nos casos onde ocorre cessação completa da circulação na área medular lesada, esse tratamento pode não ser efetivo.

Noble; Wrathall (1987) descrevem um modelo de aparelho para provocar lesão experimental por contusão da medula espinal em ratos, utilizando a queda de peso. Utilizam pinças para fixar os processos espinhosos adjacentes e, com essas modificações, diminuem as variáveis que podem produzir lesões assimétricas, sendo a energia de impacto direcionada mais para a medula espinal, com diminuição do efeito de amortecedor da caixa torácica, da coluna vertebral e dos movimentos respiratórios, tornando-se um dos modelos mais utilizados atualmente.

Barros Filho et al. (1990) em estudo retrospectivo, analisam 428 casos de trauma raquimedular no período de 1982 a 1987, encontrando como etiologias mais freqüentes os ferimentos por arma de fogo (36,7%), acidentes em água rasa (7,7%), queda de objeto sobre o paciente (4,2%), e outras causas (2,3%). Chama a atenção o fato de que, neste estudo, 28% dos pacientes são atendidos nas primeiras 6 horas, 33,3% são atendidos no hospital um dia após o acidente e 3,3% são atendidos no hospital com 15 dias ou mais depois do acidente.

Goldberger et al. (1990) propõem critérios para avaliação da recuperação da função depois da lesão da medula espinal, através de métodos comportamentais. Discutem a necessidade de reconhecimento das capacidades comportamentais específicas não conhecidas durante a recuperação neurológica e que, na maioria dos casos, não se distingue entre a recuperação das funções inicialmente perdidas e o uso de mecanismos de compensação. Acreditam e sugerem métodos pelos quais se possa

analisar a natureza particular do déficit comportamental e definir qual capacidade comportamental retorna e qual falha em se recuperar. A melhora da análise comportamental leva a hipóteses sobre os mecanismos de recuperação da função.

Geisler et al. (1991) realizam estudo prospectivo randomizado duplo-cego com gangliosídeo GM1 em 37 pacientes com lesão medular. Desses, 34 completam o experimento. Iniciam o tratamento nas primeiras 72 horas após a lesão e passam a receber, diariamente, 100 mg de GM1 por um período de 18 a 32 dias. São avaliados pelas escalas de Frankel e da American Spine Injury Association – ASIA. Observam, neste estudo, evidências de que o GM1 aumenta a recuperação da função neurológica após 1 ano. Sugerem que um grande estudo deva ser conduzido antes de se considerar eficaz e seguro o tratamento da lesão medular com GM1.

Tator; Fehlings (1991) procuram comprovar, através de estudos microangiográficos, a lesão isquêmica secundária através do uso de angiograma de carbono coloidal com o uso de vários modelos de lesão medular experimental, na tentativa de simular o trauma medular agudo tipo compressão: modelo de queda de peso, tração e o grampo de compressão extra-dural. Concluem que existem fortes evidências de que a isquemia pós-traumática é um importante mecanismo de lesão secundária e que esses efeitos vasculares podem ser tratados.

Behrmann et al. (1992) apresentam um aparelho para produzir contusão medular em ratos que são comparados com um outro grupo que foi submetido a

secção anatômica da medula. Realizam análise histológica e comportamental da recuperação locomotora pela modificação da escala de TARLOV. Observam a marcha dos animais em campo aberto, em plano inclinado e em grade. Demonstram haver recuperação funcional nos animais que sofreram contusão medular quando comparado com o grupo que foi submetido à secção.

Bracken et al. (1992), em estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, multicêntrico, em pacientes com lesão medular aguda, observam que os pacientes que recebem metilprednisolona dentro de oito horas após a lesão, na dose de 30 mg/kg em bolo na primeira hora e 5,4 mg/kg/h por 23 horas, apresentam melhora da função neurológica nas primeiras seis semanas e no sexto mês. O grupo tratado com naloxene (5,4 mg/kg em bolo na primeira hora e 4,0 mg/kg/h por 23 horas), não apresenta recuperação significativamente maior. Os pacientes tratados após oito horas, recebendo metilprednisolona ou naloxene, apresentam menor recuperação da função motora quando comparados ao grupo placebo. Concluem que o tratamento com a dose utilizada de metilprednisolona está indicado para o trauma agudo da medula espinal, mas somente se iniciado dentro de oito horas da lesão.

Hall (1992) relata que um regime intensivo de metilprednisolona em altas doses dentro de oito horas após o traumatismo medular tem melhorado a recuperação funcional de pacientes e de animais de laboratório. Ressalta que a ação neuroprotetora da metilprednisolona envolve a capacidade de inibir os radicais livres de oxigênio induzidos pela peroxidação lipídica e discute a possibilidade de novas drogas ou

associação de drogas diminuir os efeitos colaterais do uso de altas doses de metilprednisolona.

Nockels; Young (1992), em artigo sobre estratégias farmacológicas no tratamento experimental da lesão medular espinal aguda e crônica, relatam que, na fase crônica, a mielina possui fatores de inibição da regeneração axonal. O bloqueio destes fatores aumenta a regeneração da medula espinal, constituindo-se em nova possibilidade terapêutica.

Basso et al. (1993), em nota publicada na Sociedade de Neurociência, afirmam que existe recuperação incompleta da função motora em ratos. Sugerem que grandes lesões do SNC resultam em recuperação incompleta da coordenação com concomitante perda dos neurônios vestibuloespinhais e propriceptivos.

Bracken; Holford (1993) publicam artigo em que apresentam os resultados observados pela *National Acute Spinal Cord Injury Study* (NASCIS). Relatam que o NASCIS1 (1977) conduziu estudo randomizado e controlado das terapias que podem melhorar a lesão medular e o NASCIS2 comparou o uso de altas doses de metilprednisolona ou nalaxone ao placebo e reportou que pacientes que iniciaram tratamento dentro das primeiras oito horas tiveram melhora significante da função motora com seis semanas, seis meses e um ano após a lesão.

Afirmam que a metilprednisolona, aplicada precocemente após lesão medular, melhorou a função motora de pacientes diagnosticados inicialmente com lesão

completa ou incompleta. Destacam que o tratamento tardio com metilprednisolona está associado à diminuição da recuperação neurológica. Concluem que esta análise suporta o uso de metilprednisolona em altas doses para o tratamento das lesões medulares no traumatismo raquimedular.

Walker; Harris (1993) publicam estudo randomizado e duplo cego em humanos que apresentavam lesão medular crônica. Observam que aqueles que foram tratados com o gangliosídeo GM1 mostraram melhora funcional em relação àqueles que receberam placebo. Afirmam que o GM1 é uma opção terapêutica no tratamento destes pacientes

Constantini; Young (1994) estudam os efeitos do tratamento com a metilprednisolona, gangliosídeo GM1 e da associação metilprednisolona e gangliosídeo GM1, em modelos experimentais de lesão medular por queda de peso em ratos. O peso utilizado é de 10 g e as alturas de 12,5 mm, 25 mm e 50 mm, ao nível de TX. A metilprednisolona administrada em dose única de 30mg/kg, cinco minutos após a lesão, teve efeito significativo em reduzir o volume da lesão e impedir a hiponatriemia induzida pela lesão. O GM1 administrado isoladamente na dose de 10 a 30mg/kg teve pouco ou nenhum efeito em qualquer das variáveis medidas. A associação da metilprednisolona e GM1 bloqueia os efeitos da metilprednisolona. Concluem, portanto, que o GM1 antagoniza ambos efeitos, central e periférico, da metilprednisolona em ratos com lesão medular, e recomendam que ambos não sejam

usados concomitantemente para tratar lesão medular aguda em humanos, até que essa interação seja mais bem conhecida.

Basso et al. (1995) verificam o comportamento depois da lesão medular contusa em ratos fazendo uma modificação da escala locomotora desenvolvida por TARLOV et al. (1953). Os dados obtidos indicam que a escala é válida e é uma medida preditiva da recuperação motora, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais devido às diferentes lesões e de predizer alterações anatômicas no centro da lesão. Os testes inter-ratos indicam que examinadores com experiência no seu uso conseguem aplicá-la consistentemente e obter resultados similares. A escala BBB oferece aos avaliadores uma medida mais discriminatória dos resultados comportamentais para avaliar o tratamento depois da lesão da medula espinal.

Basso et al. (1996) padronizam um aparelho, o *New York University*, desenhado para realizar lesão medular contusa em ratos. Citam o teste BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) como sendo mais sensível que os demais até então descritos para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram lesão medular contusa. Demonstram que o sistema NYU permite produzir uma contusão medular graduada, consistente e reprodutível em todos os ratos. Afirmam que um exame dos efeitos terapêuticos para índices lentos e rápidos de recuperação é mais evidente nos grupos graduados com 12,5 e 25 mm de altura da queda do peso de 10 g sobre a medula. Confirmam que uma maior quantidade de tecido poupado está diretamente relacionada com melhor função locomotora final quando aplicada a escala BBB.

Documentam aumento dos movimentos dos membros inferiores em duas semanas após lesão compressiva ou por transecção medular e concluem que a escala BBB é aplicável, após a utilização do sistema NYU, na análise da recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular contusa.

Chen et al. (1996) investigam se a regeneração axonal em enxertos de células de Schwann é aumentada quando a metilprednisolona é administrada no momento da transecção medular e da implantação de células de Schwann. Nos resultados deste estudo, evidenciam que a metilprednisolona melhora a regeneração axonal na medula com enxerto de células de Schwann.

Schwab; Bartholdi (1996) realizam estudo de revisão dos conhecimentos dos mecanismos envolvidos na degeneração e regeneração axonal após lesão da medula espinal, particularmente, em mamíferos e humanos. Concluem que as pesquisas endereçadas ao tratamento da lesão primária e secundária podem, no futuro, levar a uma alta porcentagem de lesões incompletas, possibilitando melhores condições de reabilitação. Portanto, a redução do dano secundário associado com a otimização do uso das conexões remanescentes, o aumento da plasticidade e a regeneração a longa distância dos axônios lesados são os ideais a serem obtidos no futuro.

Bracken et al. (1997), em ensaio clínico randomizado duplo-cego, multicêntrico, em 499 pacientes com lesão medular aguda diagnosticada dentro das primeiras oito horas, comparam a eficácia da metilprednisolona, administrada por 24

e 48 horas, e do mesilato de tirilazade, administrado por 48 horas. Concluem que pacientes com lesão medular aguda que recebem metilprednisolona nas primeiras três horas devem manter o tratamento por 24 horas, enquanto, naqueles que iniciam o tratamento entre três e oito horas, a metilprednisolona deve ser mantida por 48 horas. Os pacientes que são tratados com mesilato de tirilazade têm taxas equivalentes de recuperação motora às taxas daqueles que recebem metilprednisolona por 24 horas.

Bregman et al. (1997) realizam estudo experimental em ratos adultos submetidos a hemissecção medular nos níveis cervical e torácico e que foram transplantados com tecido medular espinal fetal e tiveram fatores neurotróficos injetados no sítio da lesão. Observam, neste estudo, um claro aumento das interações entre as células hospedeiras do sistema nervoso central e o tecido medular fetal transplantado. Os fatores neurotróficos podem exercer uma influência no tropismo dos neurônios maduros do sistema nervoso central, aumentando a extensão do crescimento axonal das células transplantadas e a densidade destas (número e ramificações das fibras), levando, em alguns aspectos, à melhora da função locomotora.

Gebrin et al. (1997a) revisam as pesquisas existentes sobre drogas para tratamento da lesão medular aguda e descrevem as principais substâncias endógenas que participam do dano medular secundário e as drogas, em estudo, para combater este efeito. Indicam a metilprednisolona como droga com efeitos positivos comprovados e citam as pesquisas promissoras com aminoesteróides. Encerram o

artigo ressaltando a grande importância e contribuição dos estudos multicêntricos NASCIS I, II e III, desenvolvidos na América do Norte.

Gebrin et al. (1997b) publicam artigo de revisão da literatura, discutindo as perspectivas de recuperação do paciente lesado medular. Chamam atenção para o fato de que o SNC adulto não apresenta a mesma capacidade de regeneração que os nervos periféricos. Descrevem os resultados da National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS), apontando a metilprednisolona como droga que melhora função neurológica, e citam o GM – 1 como sendo uma substância eficiente na recuperação de pacientes com lesões crônicas do SNC. Concluem, afirmando que trabalhos experimentais demonstram que axônios íntegros, mesmo que poucos, podem propiciar integridade de arco reflexos viscerais, como vesical, sexual e intestinal, e que 10% de axônios remanescentes podem oferecer condições de marcha para o paciente.

Bracken et al. (1998) realizam ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com intuito de comparar a recuperação funcional e neurológica e as taxas de morbidade e mortalidade um ano após a lesão medular aguda, em pacientes que recebem metilprednisolona por 24 horas ou por 48 horas ou mesilato de tirilazade por 48 horas. Observam a recuperação neurológica similar nos três grupos de pacientes que recebem o tratamento dentro das primeiras três horas da lesão. Nos pacientes que recebem tratamento após três horas da lesão, o grupo que recebe metilprednisolona por 24 horas apresenta menor recuperação da função motora e os que recebem metilprednisolona por 48 horas, apresentam maior recuperação da função motora em

um ano. O grupo que recebe mesilato de tirilazade teve recuperação semelhante àqueles que recebem metilprednisolona por 24 horas. As taxas de mortalidade e morbidade são iguais nos três grupos. Concluem que, nos pacientes que iniciam o tratamento dentro das primeiras três horas, a manutenção do tratamento por 24 horas é apropriada. Nos pacientes que iniciam a terapia três a oito horas após a lesão, o regime de tratamento deve ser mantido por 48 horas, a menos que haja contra-indicações clínicas.

Ramón-Cueto et al. (1998) estudam o transplante de células olfatórias gliais, em ratos adultos submetidos à secção medular. Observaram que as células olfatórias, transplantadas através de pontes de células de Schwann, atravessam a fibrose glial e migram longitudinalmente e lateralmente na distância máxima de 1,5 cm através das substâncias branca e cinzenta. Crescimento à longa distância, de pelo menos 2,5 cm, ocorre na porção rostral da medula espinal. Concluem que esta forma de estudo criará novas possibilidades para tratamento das lesões do sistema nervoso central que requeiram regeneração axonal.

Amar; Levy (1999) revisam a patogênese e estratégias farmacológicas para atenuar o dano secundário na lesão medular aguda. Através de observações em modelos experimentais e clínicos, acreditam que os conceitos de lesão primária e secundária estão bem estabelecidos e têm amplas implicações no tratamento da lesão medular aguda. Avaliam os efeitos de vários agentes farmacológicos, entre eles dos glicocorticóides, lazeróides, gangliosídeos, antagonistas dos opióides, bloqueadores

dos canais de cálcio, antagonistas dos receptores do glutamato, agentes antioxidantes, radicais livres e outros agentes farmacológicos, em experimentos em modelos animais e humanos. Concluem que, dentro de um espaço de tempo limitado, esses agentes podem ser úteis e enfatizam que, futuramente, é provável que a terapia envolva a combinação de vários desses agentes.

Delamarter; Coyle (1999) relatam que o NASCIS III concluiu que a metilprednisolona melhora a recuperação neurológica após lesão medular aguda e recomendam que os pacientes que recebem metilprednisolona dentro de três horas da lesão inicial devem ser mantidos em regime de tratamento por 24 horas. Quando a terapia é iniciada entre três a oito horas após a lesão, deve ser mantida por 48 horas. Adotam, como conduta, o uso da metilprednisolona e a imediata redução e estabilização da lesão que causa compressão medular.

Jeffery; Blakemore (1999) afirmam que, até o momento, apenas a cirurgia descompressiva e o uso de metilprednisolona têm se mostrado eficazes no tratamento do traumatismo medular agudo.

Rodrigues (1999) padroniza um modelo de lesão de medula espinhal em ratos Wistar e utiliza equipamento computadorizado para impacto por queda de peso, de acordo com parâmetros determinados pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* – MASCIS. Verifica a existência de correlação estatisticamente significante

entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Conclui que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos.

Vialle et al. (1999), em estudo experimental de lesão medular em ratos *Long-Evans*, utilizando o modelo de queda de peso com NYU-Impactor, avaliam a histologia da lesão da medula espinal dos ratos sacrificados a cada seis horas até 48 horas após a lesão. Utilizam a coloração com hematoxilina – eosina. Observam, nos ratos sacrificados, em seis horas, uma redução volumétrica dos neurônios, em 24 horas pós-lesão, redução no número de neurônios e indícios de vacuolização e, em 48 horas, intensa degeneração neuronal e vacuolização.

Yoon et al. (1999) comprovam que, em lesão medular produzida pelo sistema NYU, uma dose única de 30 mg/Kg de metilprednisolona, aplicada 10 minutos após o traumatismo medular, reduz significantemente o volume de lesão em 24 horas, quando comparado com o grupo controle. Afirmam que, no modelo de lesão medular produzido pelo sistema NYU, exista uma janela terapêutica muito curta.

Bracken (2000) apresenta uma revisão randomizada dos agentes farmacológicos para o tratamento da lesão medular aguda. Conclui, nesta revisão, que altas doses de metilprednisolona são a única terapia farmacológica que mostra ter eficácia no tratamento da lesão medular aguda.

Debrovner (2000) publica artigo, em meio eletrônico, sobre o uso de células tronco, células primitivas capazes de formar muitos tipos diferentes de células do corpo, como chaves para a cura de doenças fatais ou crônicas. Define os diferentes tipos de células, sítio e momento da evolução nos quais são encontradas, suas características, processo de especialização e de crescimento tecidual e possíveis aplicações: células tronco, totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Aborda aspectos éticos, morais e religiosos, riscos e controvérsias. Refere algumas recomendações do "American Association for the Advancement of Science" e do "Institute for Civil Liberty" quanto ao uso dessa tecnologia. Chama a atenção quanto a possíveis riscos de criação de expectativas miraculosas e dos dilemas morais.

Short et al. (2000) realizam revisão sistemática da literatura utilizando critérios de inclusão, exclusão e validade pré-definidos. Fica evidente, nesta revisão sistemática, não haver suporte para o uso de altas doses de metilprednisolona na lesão medular aguda a fim de melhorar a recuperação neurológica.

Blight, Zimber (2001) chamam atenção para o fato de não haver drogas específicas que ajam diretamente na lesão medular. Discutem a importância de drogas que possam evitar a cascata de efeitos secundários após o traumatismo medular e ressaltam a importância da metilprednisolona como droga de escolha.

Bracken (2001) utiliza o método de medicina baseada em evidências para verificar a eficácia do uso de metilprednisolona no traumatismo medular agudo.

Baseado em evidências, conclui que a metilprednisolona, quando utilizada até oito horas após lesão medular aguda, é uma terapia segura e efetiva, podendo resultar em importante recuperação funcional clínica de alguns pacientes. Sugere que novos estudos com outras drogas ou drogas de uso concomitante com a metilprednisolona devem ser estimulados.

Geisler et al. (2001) publicam estudo clínico multicêntrico radomizado, duplo cego e seqüencial de duas doses do GM1, comparado com placebo, para determinar a eficácia desta droga na lesão medular aguda. Ressaltam que, embora não provem a eficácia primária do GM1 nesta análise, parece haver benefícios em seu uso em pacientes com lesão medular grave.

Hall (2001) demonstra que a maioria das lesões medulares não são lesões completas e que parte da substância branca permanece íntegra. Salienta que a recuperação neurológica depende da preservação das estruturas que permaneceram íntegras após o traumatismo, principalmente axônios descendentes e ascendentes da substância branca e de sua mielinização normal. Discute que as estratégias farmacológicas enfocam o controle do processo de lesão secundária, primariamente a peroxidação lipídica e a manutenção do máximo de substância branca remanescente possível. Afirma que a metilprednisolona é a única droga que, em altas doses, melhora a função neurológica em animais.

Hurlbert (2001) revisa a literatura com métodos de medicina baseada em evidência para avaliar o uso de metilprednisolona na lesão medular aguda. Seus resultados mostram que a metilprednisolona não deve ser recomendada como um uso rotineiro na lesão medular aguda não penetrante. O uso prolongado pode ser de risco para o paciente e considera a metilprednisolona uma droga sob investigação.

Legos et al. (2001) estudam os efeitos da metilprednisolona e da solução salina nos resultados funcionais e de fluxo sangüíneo após lesão da medula. Mostram que a solução salina pode aumentar a liberação de metilprednisolona e prevenir imunossupressão, levando à melhora da função neurológica e elevando os índices de sobrevida, após a lesão medular.

Taoka; Okajima (2001) salientam a importância dos eventos secundários ao traumatismo medular, como eventos vasculares progressivos e dano celular endotelial. Enfatizam que poucos agentes farmacológicos possuem ação no sistema nervoso central lesado e destacam a ação da MP e do GM1, dizendo ser estas as únicas duas drogas que estão disponíveis para o uso clínico.

Cristante et al. (2002), em estudo prospectivo, experimental, com 20 ratos adultos submetidos à lesão hemimedular, transplantam células do sistema nervoso fetal no sítio da lesão em 15 destes ratos. Cinco animais permanecem como grupo controle sem transplante. Os ratos são sacrificados após 48 horas e submetidos a exame histológico. Encontram que, em 60 % dos casos, as células fetais

transplantadas permanecem viáveis e observam que a reação inflamatória é maior do que no grupo controle.

Merola et al. (2002) publicam estudo da resposta histológica da medula de ratos que foram submetidos à lesão medular contusa. Demonstram que, histologicamente, a metilprednisolona reduz o desenvolvimento de edema grave e preserva a arquitetura da medula adjacente ao local da lesão, mas, em contraste, a metilprednisolona não altera o desenvolvimento de necrose medular ou a resposta astrocítica na zona de lesão.

**Galvão (2003) avaliou a eficácia da aplicação da oxigenoterapia hiperbárica em ratos Wistar, com lesão medular contusa produzida por equipamento computadorizado para impacto por queda de peso, NYU Impactor. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupo controle e grupo oxigênio hiperbárico. Observou melhora na recuperação locomotora nos ratos tratados com oxigênio hiperbárico nas fases iniciais de avaliação mas no final da avaliação não havia diferença estatisticamente significante entre ambos grupos. O exame anatomopatológico comprovou as alterações estruturais da medula espinal nos dois grupos.**

Marcon (2006) em estudo experimental de lesão medular em ratos Wistar, utilizando o modelo de queda de peso com NYU-Impactor e a escala de avaliação funcional BBB, estuda os possíveis efeitos benéficos da utilização da

metilprednisolona utilizada previamente ao trauma raquimedular, como forma de prevenir prováveis lesões associadas a algumas intervenções cirúrgicas. Não só não observa nenhum efeito benéfico da utilização prévia ao traumatismo raquimedular como descreve possíveis complicações associadas ao uso da mesma.

Cristante (2009), em estudo experimental de lesão medular em ratos *Wistar*, utilizando o modelo de queda de peso com NYU-Impactor, a escala de avaliação funcional BBB e avaliação anatomopatológica, mostra possíveis efeitos benéficos da utilização da combinação das vitaminas C e E nas análises anatomopatológicas, por provável efeito antioxidante e menor resposta inflamatória, apesar desta diferença não se refletir em uma melhora funcional.

Hita (2008) estudou os efeitos de • fator neurotrófico, proteína que auxilia na maturação e desenvolvimento do sistema nervoso, no traumatismo medular. Conduziu testes que propiciaram a análise dos efeitos da recuperação funcional locomotora e regeneração axonal em ratos submetidos a testes experimentais com a utilização da substância neurotropina-4. Concluiu que a neurotropina-4 promove a recuperação locomotora funcional e diminui os efeitos secundários da lesão medular, comparativamente ao grupo controle.

Cristante (2009) avalia o efeito da infusão de células tronco indiferenciadas autógenas no sitio de lesão, através de arteriografia, em pacientes com lesão medular crônica (mais de 2 anos). Através de avaliação com potencial evocado sômato

sensitivo, observou-se que 66,7 % dos pacientes apresentaram melhora do mesmo, em 2 anos e meio de seguimento.

# 3. MÉTODOS

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

## 3.1 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR

### Animais de Experimentação

Avaliaram-se 32 ratos *Wistar* machos, com peso variando de 300 a 340 g, com 20 a 21 semanas de vida, oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. No momento da recepção, todos os ratos foram avaliados quanto às condições gerais e à motricidade e identificados (grupo e número). Acondicionaram-se até 5 ratos de uma mesma ninhada por gaiola (40 x 60 cm)[1]. Mantiveram-se as gaiolas em ambiente climatizado, sob condições de higiene,

[1] Ratos Wistar não familiarizados tendem a ser agressivos e podem mutilar-se.

alimentação e hidratação adequadas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos – LETRAN - do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Realizou-se o manuseio contínuo dos animais antes da lesão para acostumá-los ao manejo dos experimentadores e para estimulá-los a movimentarem-se (condicionamento), facilitando a avaliação da capacidade motora após a lesão.

Adotaram-se os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Ratos da raça *Wistar*
- Machos adultos jovens (20 a 21 semanas de vida, inclusive);
- Peso entre 300 a 340 gramas, inclusive;
- Condição geral (pelagem e estado clínico) e motricidade normais;

Critérios de exclusão:

- Óbito após lesão;
- Anomalias da medula na área lesada observada macroscopicamente;
- Autofagia ou mutilação entre os animais;

- Movimentação normal na primeira avaliação após lesão (21 pontos na escala BBB (BASSO, BEATTIE e BRESNAHAN) de avaliação funcional).

Todas as complicações foram analisadas estatísticamente para a detecção de possíveis complicações estatisticamente significantes.

**Formação dos grupos experimentais**

Os ratos foram separados aleatoriamente (por sorteio) e formaram quatro grupos de oito animais cada:

- Grupo 1 – ratos submetidos à lesão medular moderada através de um equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso – NYU Impactor® ("New York University Spinal Cord Contusion Sistem - Impactor"), a 12,5 mm de altura, submetidos a tratamento monossialogangliosídeo (GM1) na dose de 30mg/kg durante sete dias, com início 24 horas após o trauma;
- Grupo 2 – ratos submetidos ao mesmo protocolo de lesão moderada com o NYU Impactor, os quais foram submetidos a sessões de oxigenoterapia hiperbárica com 2 atmosferas e duração de uma hora, durante sete dias, com início 24 horas após o trauma;

- Grupo 3 – ratos submetidos ao mesmo protocolo de lesão moderada com o NYU Impactor, submetidos a terapia combinada com GM1 e oxigenoterapia hiperbárica, conforme o protocolo aplicado nos grupos 1 e 2;
- Grupo 4 – ratos submetidos ao mesmo protocolo de lesão moderada com o NYU Impactor, os quais não foram submetidos a nenhum tratamento, servindo de grupo controle.

No grupo 1 ocorreram 2 óbitos (na primeira e na segunda semana de estudo), ficando o grupo 1 com 6 ratos ao final; no grupo 2 ocorreu 1 óbito (na segunda semana de estudo), ficando o grupo 2 com 7 ratos ao final; no grupo 3 ocorreram 2 óbitos (ambos na primeira semana de estudo), ficando o grupo 3 com 6 ratos ao final; no grupo 4 ocorreram 2 óbitos (na primeira e na segunda semana de estudo), ficando o grupo 4 com 6 ratos ao final.

Dos óbitos do grupo 1, um estava relacionado a infecção do trato urinário (ITU) e o outro não teve motivo identificável; o óbito do grupo 2 estava relacionado a infecção urinária; dos óbitos do grupo 3, um estava relacionado a infecção do trato urinário (ITU) e o outro não teve motivo identificável; dos óbitos do grupo 4, um estava relacinado a infecção do trato urinário (ITU) e o outro foi relacionado a autofagia.

**Protocolo de Anestesia**

Previamente à lesão, anestesiaram-se os ratos com 55 a 75 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal. O efeito anestésico iniciou-se em 5 minutos e durou no mínimo 2 horas, tempo suficiente para a lesão. O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda.

**Laminectomia**

A exposição da medula para contusão controlada foi realizada com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Após tricotomia, realizou-se uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral, de TVIII a TXII. Descolaram-se os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas de TIX à TXI. Expuseram-se os processos articulares destas vértebras. A hemostasia, quando necessária, foi realizada com um coagulador bipolar. Removeram-se, com um micro sacabocados, o processo espinhoso e a lâmina da vértebra TX e a metade distal do processo espinhoso da TIX até expor a medula e permitir o posicionamento da ponta da haste (punção) do NYU Impactor (New York University (1993)).

Respeitaram-se todos os demais cuidados relacionados por Rodrigues (1999) (Figura 1).

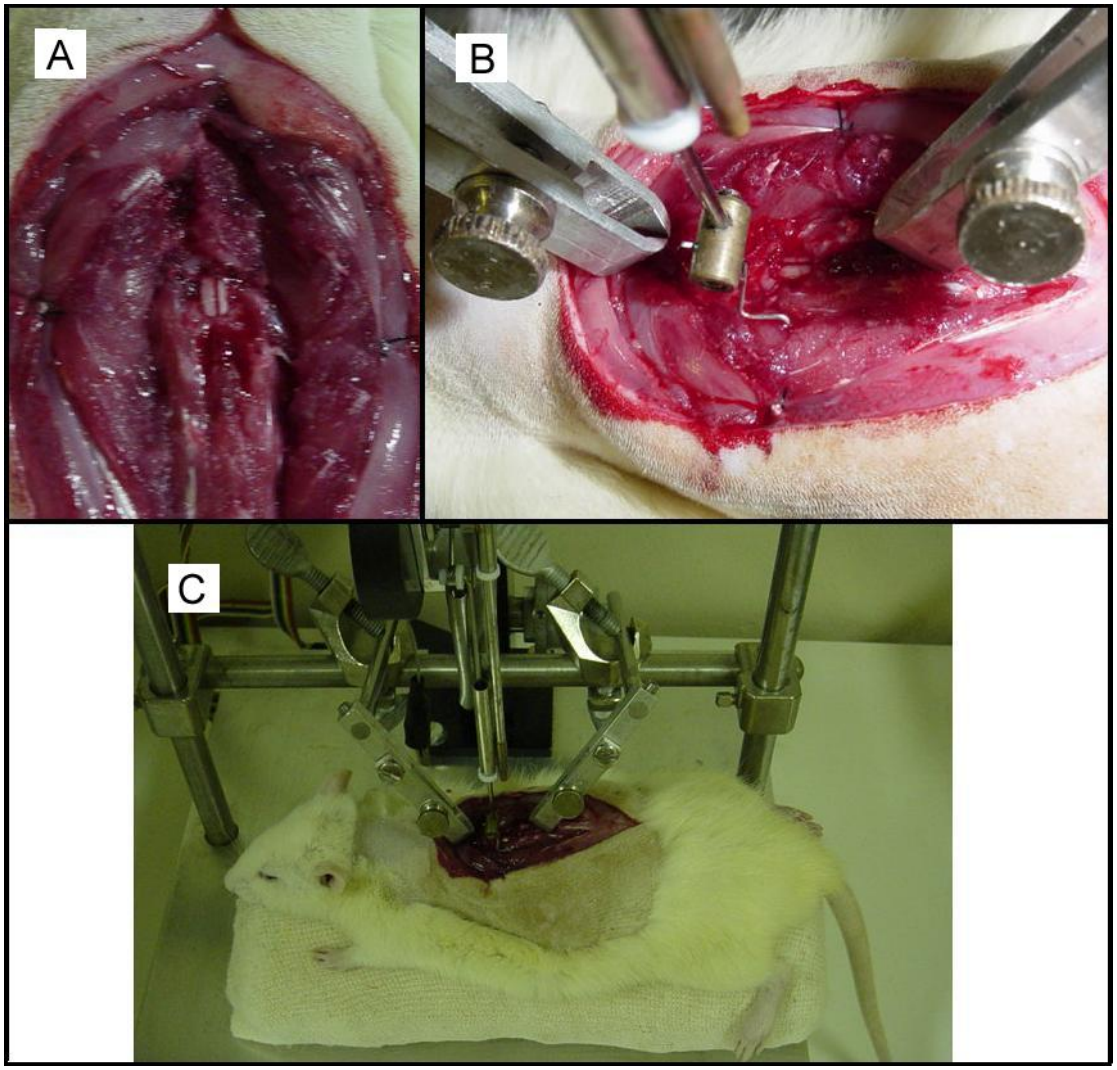


FIGURA 1 Procedimentos para a realização da lesão medular através de equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso - NYU Impactor. A – detalhe da laminectomia, com exposição da medula espinal; B – detalhe das garras de fixação nos processos espinhosos e C – vista geral do posicionamento do animal no dispositivo de impacto.

**Lesão Medular (contusão moderada controlada pelo NYU Impactor)**

Adotou-se o modelo experimental de lesão medular do MASCIS ("Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study") padronizado para ratos *Wistar* (RODRIGUES, 1999).

Decidiu-se pela produção de lesões moderadas através do equipamento computadorizado para impacto por queda de peso NYU Impactor. O teste de impacto consistiu na queda de uma haste de impacto de 10 g de peso de uma altura pré-determinada de 12,5 mm entre a ponta da haste (punção) e a superfície da medula espinal, em queda livre, através de um tubo guia, monitorado por computador (velocidade da haste, deformação absoluta e relativa da medula, instante de contato efetivo e tempo de contato), de maneira a reduzir os fatores de imprecisão.

O equipamento foi construído de maneira a produzir um impacto direto de alto rendimento, reduzir atritos e a resistência do ar e a permitir uma contusão reproduzível (Figura 2).

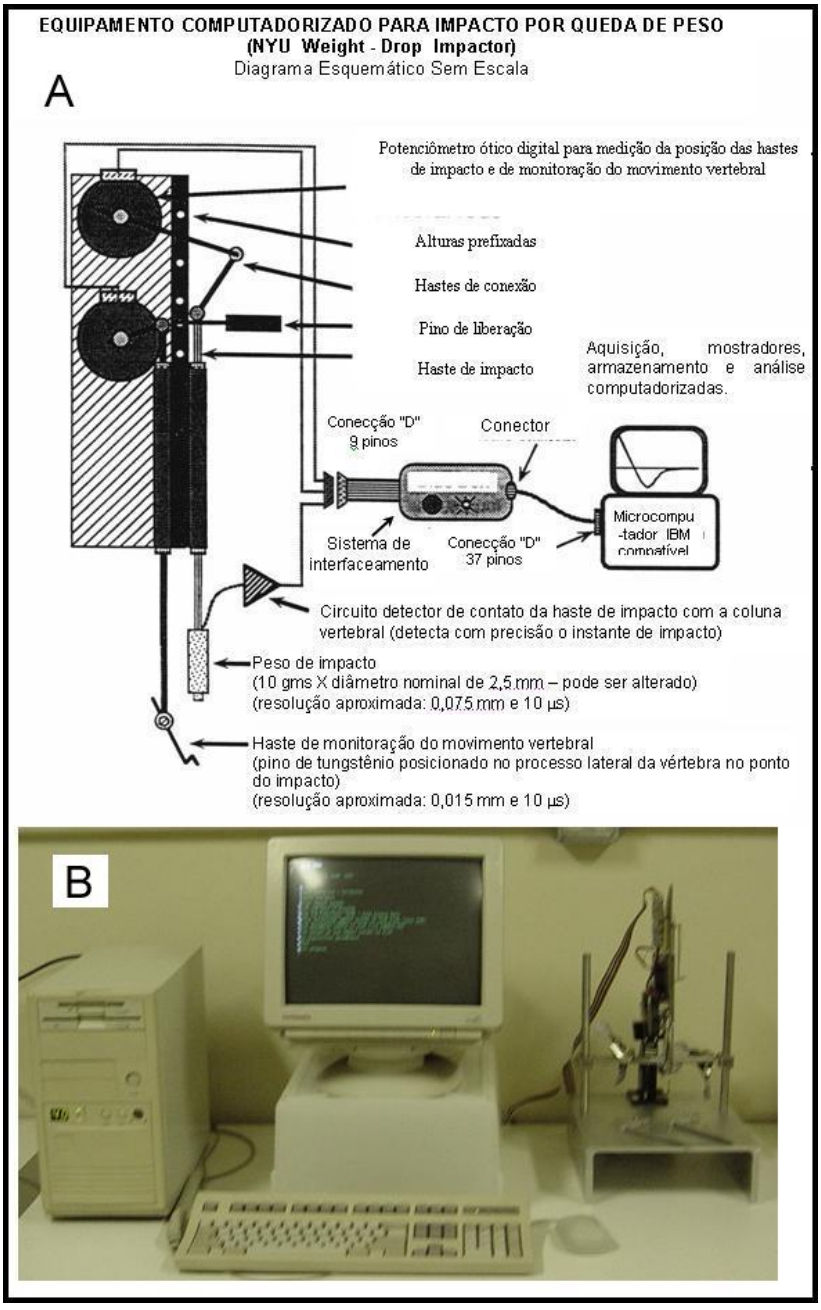


FIGURA 2 Equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso - NYU Impactor. A – diagrama esquemático sem escala e B – vista geral, CPU, vídeo monitor, teclado, dispositivo de interfaceamento, "mouse" e dispositivo de impacto.

Os ratos foram posicionados no NYU Impactor de maneira a permitir o contato pleno da ponta da haste (punção) na superfície exposta da medula (folga de 0,2 mm de cada lado), na altura de TX. Ajustaram-se as duas garras reguláveis, para a fixação da coluna vertebral, presas aos processos espinhosos das vértebras TVIII e TXI, respectivamente. As garras diminuíram as deformações do corpo do rato (baixa rigidez) e, conseqüentemente, o movimento da coluna, quando ocorre a queda do peso, reduzindo-se os fatores de erros. Assim, produziram-se lesões homogêneas e repetíveis.

A contusão medular moderada foi produzida pelo NYU Impactor (haste com 10g de peso e a 12,5mm de altura) seguindo os procedimentos, cuidados, regulagens, controles, monitoração, limpeza e esterilização da haste constantes em seu manual e os recomendados por Constantini; Young (1994) e Rodrigues (1999).

O equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso monitorada NYU Impactor (Figura 2) compõe-se de:

- Dispositivo de impacto (haste de 10 g a 12,5 mm de altura pré-determinada para contusão moderada, tubo guia e sistema de monitoração de posição, velocidade de queda, instante de contato, período de contato, deformação da coluna e deformação absoluta e relativa da medula);
- Dispositivos de interfaceamento (instrumentação);

- Microcomputador IBM-PC compatível;
- Vídeo monitor VGA;
- Placa de interface com saída paralela e temporizador.

**Procedimento após lesão**

Após a lesão, o rato foi colocado em uma superfície aquecida, não excedendo a temperatura de 38 °C. Inspecionou-se o sítio da lesão da contusão. Na presença de hemorragia, realizava-se a hemostasia. Em seguida, lavou-se o sítio da contusão com solução fisiológica de cloreto de sódio a temperatura ambiente. Realizou-se a aproximação dos planos teciduais musculares e fasciais e da pele com sutura de pontos simples com fio nylon monofilamentado 2.0.

Transferiram-se os ratos para câmaras com temperatura controlada de 25 a 28°C, durante 30 minutos, para controle de provável hipotermia pós-operatória.

Espremeu-se a bexiga dos ratos, para esvaziamento vesical.

**Antibioticoterapia**

Os ratos foram submetidos a antibioticoterapia para prevenir e/ou reduzir a infecção na ferida cirúrgica a nas vias urinárias. Administrou-se, subcutaneamente, 25

mg/kg de cefalotina (Keflin Neutro® - Ely Lilly) imediatamente após a lesão e uma vez ao dia durante os 7 dias seguintes. Naqueles que apresentassem infecção, estender-se-ia o tratamento até o 10º dia e esta era então considerada como uma complicação, sendo a mesma então utilizada para fins estatísticos.

**Manutenção**

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem (40 x 60 cm), mantidos nos mesmos grupos de até 5 animais, nas mesmas condições ambientais (manejo sob as mesmas condições, com água e ração *ad libitum*, com troca da maravalha e limpeza das gaiolas periódicas) até o final do experimento, quando foram submetidos à eutanásia.

Durante o período de avaliação pela escala BBB, os ratos foram observados quanto a mutilações, infecções ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações).

## 3.2 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO E OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA

Os grupos utilizados no estudo foram denominados Grupo 1, 2, 3 e 4. Foi utilizado como tratamento medicamentoso o monossialogangliosídio (GM1) na dose de 30 mg/kg/dia e como tratamento com oxigenoterapia hiperbárica uma câmara hiperbárica a 2 atmosferas por 1 hora/dia. A forma, o tempo de tratamento e a divisão dos grupos encontram-se descritos anteriormente, no item **3.1 - Formação dos grupos experimentais**.

Utilizou-se uma câmara hiperbárica tubular com 770 mm de comprimento, 180 mm de diâmetro interno e altura útil de 150 mm (entre a plataforma e a parede superior), especialmente dimensionada para ratos, com paredes de acrílico transparente de 10mm de espessura. A câmara hiperbárica dispunha de uma válvula de controle na entrada, de um manômetro diferencial ($kgf/cm^2$) (barômetro aneróide) para controle da pressão interna, de um fluxímetro na saída (l/min calibrado a 3,5 $kgf/cm^2$ ou 345 kPa e 21°C) e de termômetro (°C). O fluxo de oxigênio ($O_2$) provinha de um cilindro através de tubulação flexível (plástico) (Figura 3).

Adotaram-se as seguintes regulagens:

- Capacidade - até 10 ratos simultâneos;
- Fluxo de oxigênio - 14 l/min de $O_2$;
- Pressão interna - 2 atmosferas (atmosfera absoluta, manômetro = + 1,0 atmosfera de diferança); (SHIOKAWA et al. 1986)
- Temperatura - ambiente;
- Tempo - 1 hora/dia (contínua) após equalização da pressão (excluindo o tempo de pressurização e de despressurização);
- Descompressão - contínua, de 2 atmosferas (atmosferas absolutas) a 1 atmosfera (atmosfera absoluta), em 5 minutos.

(1 atmosfera = 1,033 kgf/cm$^2$ = 101,3 kPa)

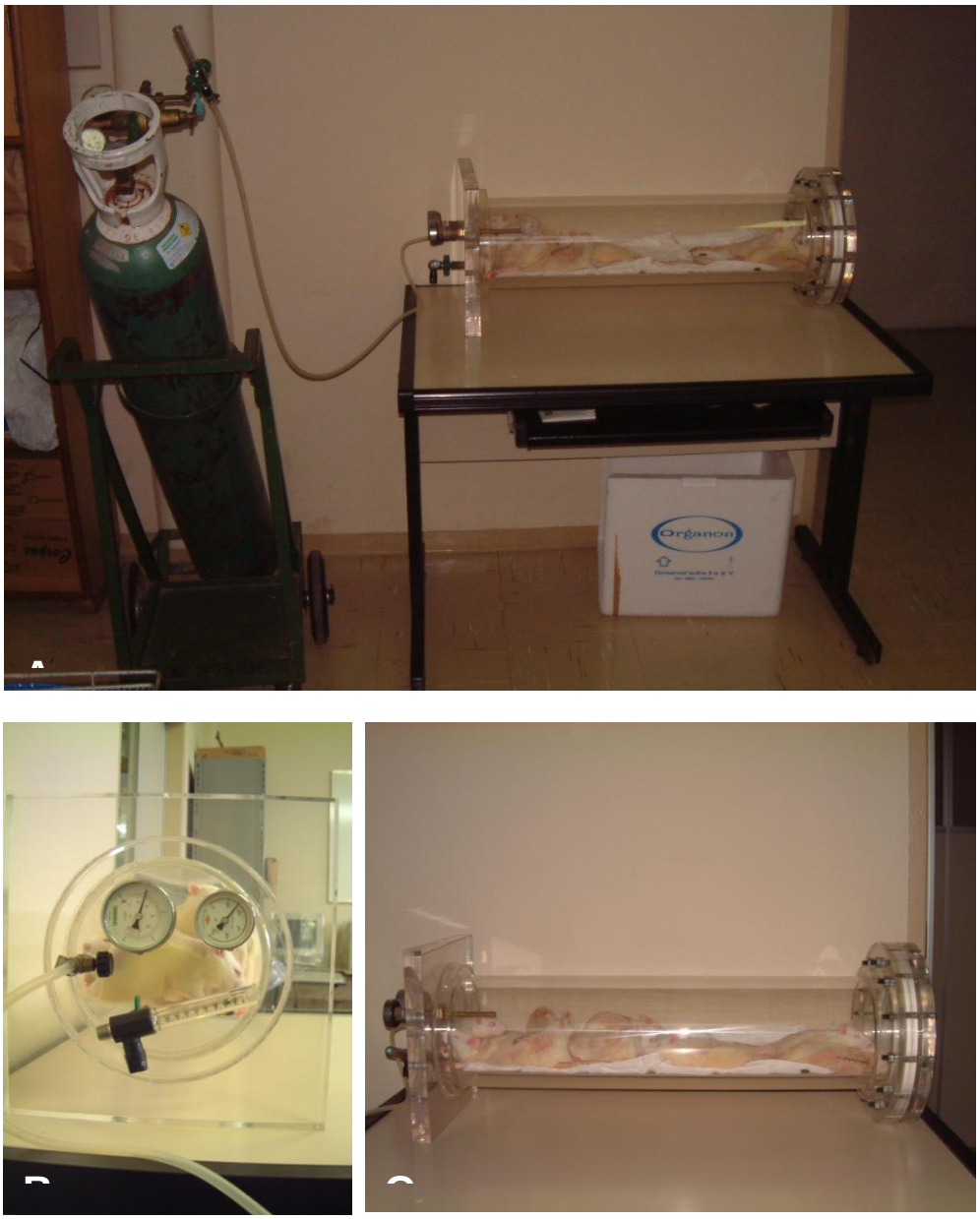


FIGURA 3 Câmara de oxigenoterapia hiperbárica. A – vista geral do tubo de oxigênio circuito e câmara hiperbárica; B – lateral direita da câmara, válvula de entrada, manômetro diferencial, termômetro e fluxímetro de coluna e C – manutenção de até 8 ratos simultâneos (1h/dia)

## 3.3 PROTOCOLO DA CAPACIDADE LOCOMOTORA PELA ESCALA BBB DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

A recuperação da capacidade locomotora após lesão medular foi medida pela escala BBB (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN) de avaliação funcional (BASSO et al., 1995).

A escala BBB de avaliação funcional baseia-se em critérios observacionais específicos, definições simples e não ambíguas dos termos e permite uma rápida e precisa descrição do desempenho locomotor.

Esta escala foi adotada pelas instituições que integram o MASCIS e pelo LETRAN. Decidiu-se pela avaliação visual por time treinado (2 observadores), às cegas e pela menor avaliação.

Todos os ratos dos grupos Droga A T-0, Droga A T-4, Droga B T-0 e Droga B T-4 foram avaliados no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias de pós-operatório.

A avaliação consistiu em colocar o rato no centro de uma caixa de observação de 80x80 cm e borda com 17 cm de altura forrada com um campo cirúrgico azul

turquesa (escuro) para maior contraste durante o período de observação (ratos brancos, fundo azul escuro) (Figura 4).

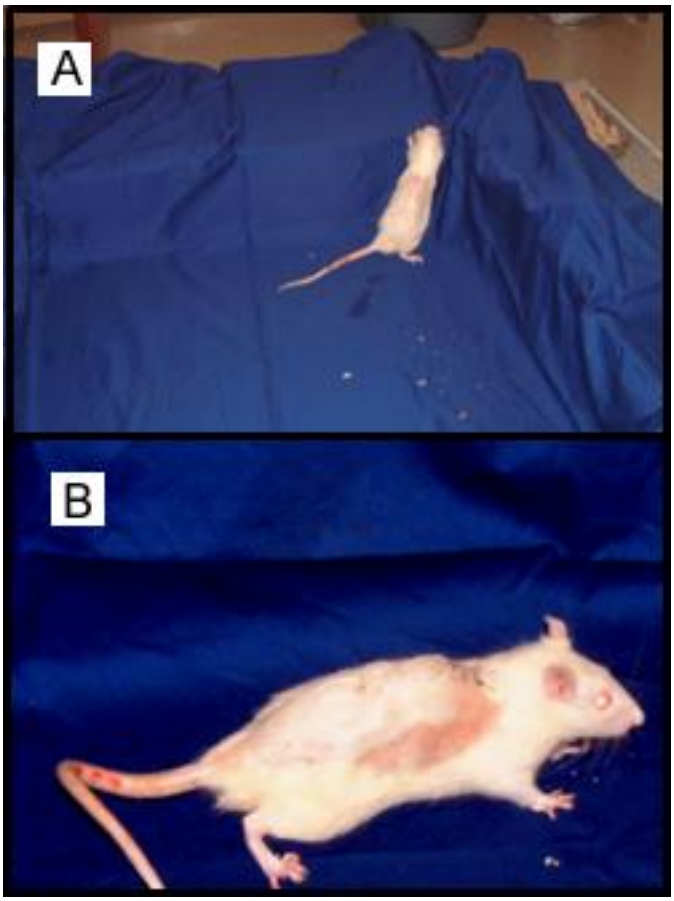


FIGURA 4 Determinação da capacidade locomotora após lesão pela escala BBB de avaliação funcional (Basso et al. 1995). A – rato posicionado na caixa forrada com campo azul para facilitar observação e B – rato em vista lateral, avaliação da movimentação do quadril, joelho e tornozelo da pata posterior direita e posição da cauda.

Avaliou-se a capacidade locomotora do rato. As observações sobre o movimento das articulações da pata posterior (quadril, joelho e tornozelo), a posições do tronco e do abdome, o deslocamento da pata (balanço) e o modo de contato da pata com o solo, a coordenação, os dedos, o contato e a liberação da pata com o solo, a instabilidade do tronco e a posição relativa da cauda, em relação aos lados direito e esquerdo, foram anotadas em formulário próprio.

O formulário permitiu o registro da identidade, do número de dias pós-operatório e dos comentários (Anexo I) e facilitou a descrição do movimento e a definição da pontuação. A escala BBB varia de 0 a 21 pontos para cada lado, esquerdo e direito.

A avaliação de cada rato foi realizada por dois observadores simultâneos, adequadamente treinados, neutros, sem conhecimento do grupo de origem do rato, de maneira a não interferir nos resultados.

Caso o rato, posicionado no centro da caixa, permanecesse imóvel por 15 a 20 s, era estimulado a movimentar-se através de toques com um lápis.

A avaliação da capacidade locomotora do rato demorou de 4 a 5 minutos, durante os quais anotaram-se, no respectivo formulário, as características do movimento executado.

Anotaram-se as características de consenso entre os observadores. Caso houvesse discordância, decidiu-se pela anotação da pior característica (menor pontuação).

Apresentam-se, em anexo, o modelo traduzido do formulário e as pontuações possíveis com as respectivas definições operacionais das categorias e atributos da escala BBB de avaliação funcional (Anexo I e II). Têm-se, nos anexos III e IV, as pontuações dos ratos em estudo, obtidas na escala BBB de avaliação funcional e as listas de complicações e achados relevantes de necropsia.

## 3.4 EUTANÁSIA

Ao final do período de experimentação todos os ratos foram submetidos à eutanásia conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (1999).

Utilizou-se dose letal de pentobarbital (140 mg/Kg) por via intraperitoneal.

## 3.5 EXAME NECROSCÓPICO E ANATOMOPATOLÓGICO

O exame necroscópico dos ratos foi realizado de modo a permitir a identificação macroscópica de possíveis alterações em relação ao padrão normal.

Na inspeção inicial, observou-se externamente a presença de possíveis lesões associadas à autofagia ou multilação.

Quanto à inspeção interna, iniciou-se a mesma com a retirada da coluna vertebral, realizando-se uma nova incisão dorsal extensa, onde se expôs a coluna e cortou-se, com uma tesoura, um segmento desde TVIII a TXII.

Com um micro-sacabocados, retiraram-se, cuidadosamente, todas as estruturas ósseas e de partes moles adjacentes à medula até expô-la completamente.

Realizou-se uma avaliação visual macroscópica da medula no local da contusão para se verificar qualquer anomalia (critério de exclusão).

Realizou-se incisão ventral, com toracotomia e laparotomia associadas. Os pulmões foram inspecionados para a identificação de possíveis alterações, como a presença de empiema ou condensação. No abdômen, focalizou-se a inspeção da

bexiga, para a identificação de bexiga neurogênica flácida (com aumento importante do volume da mesma) ou de alterações sugestivas de infecção (hiperemia e hematúria). Os dados assim coletados foram listados para posterior análise estatística de complicações associadas.

A seguir, a medula retirada foi encaminhada individualmente em frasco, devidamente identificado, com solução de formaldeído (10%) para o Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O estudo anatomopatológico consistiu de uma análise microscópica (óptica) de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE).

Realizaram-se cortes histológicos no plano axial, no segmento medular, com intervalos de dois milímetros, representando toda a área lesada, numa extensão de um centímetro a partir do centro da lesão. Este material foi processado e desidratado em bateria de álcoois, depois sofreu processo de diafanização em xilol e, posteriormente, foi incluído em parafina. Uma vez contido no bloco de parafina, foram feitos cortes histológicos de cinco micra em micrótomo. Estes cortes foram realizados meio centímetro acima e meio centímetro abaixo da área central da lesão. Este material foi então fixado em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina -eosina.

Assim, foram preparadas 3 lâminas para cada medula, denominadas A, B e C. Os lâminas A e C corresponderam, respectivamente, às regiões proximal e distal ao sitio de lesão e foram colhidas como forma de controle individual, em cada rato. Já o fragmento B corresponde ao sitio de lesão propriamente dito, sendo diferente dos fragmentos A e C.

O Serviço de Patologia avaliou e graduou (ausente - 0, discreto - 1, moderado - 2 e acentuado - 3) todos os fragmentos quanto a:

- Necrose
- Hemorragia
- Hiperemia
- Degeneração da Substância Nervosa (degeneração cística)
- Infiltrado Celular

Os patologistas não foram informados quanto ao grupo de origem a que pertenciam as medulas dos ratos (avaliação cega).

## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram resumidas e representadas pelas estatísticas descritivas pertinentes: freqüência absoluta (n) e relativa (%) ou média, desvio padrão (dp), mediana, valores mínimo e máximo.

Foram utilizados testes não paramétricos devido à natureza das variáveis.

Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis na comparação entre os grupos de estudo quanto ao escore BBB em cada momento de avaliação. As diferenças entre os grupos, quando significantes, foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

As distribuições dos escores da análise anátomo-patológica foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os grupos foram comparados quanto à mortalidade pelo teste do qui-quadrado da razão de verossimilhança.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($\alpha$ = 5%) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes e representados por *.

# 4. RESULTADOS

# 4 RESULTADOS

A amostra foi composta por 32 animais com média de idade de 20,5 semanas e variação entre 20 e 21 semanas. Os animais apresentavam média de peso de 355,8 g e variação entre 302 e 419 g.

Os 4 grupos foram comparados quanto ao peso, idade e às medidas pós-operatórias. As medidas descritivas desses parâmetros por grupo de estudo se encontram nas tabelas abaixo.

**Tabela 1** – Peso e Idade dos animais segundo o grupo de estudo

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 8) | **Grupo 2** (n = 8) | **Grupo 3** (n = 8) | **Grupo 4** (n = 8) |
|---|---|---|---|---|
| **Peso** (g) | | | | |
| média (dp) | 373,9 (27,3) | 364,1 (32,3) | 335,6 (27,8) | 349,9 (30,3) |
| mediana | 375,0 | 375,0 | 323,5 | 346,0 |
| mínimo – máximo | 321 – 419 | 312 – 398 | 302 – 375 | 309 – 392 |
| comparação | p = 0,075 | | | |
| **Idade** (semanas) | | | | |
| média (dp) | 20,5 (0,5) | 20,6 (0,5) | 20,4 (0,5) | 20,5 (0,5) |
| mediana | 20,5 | 21,0 | 20,0 | 20,5 |
| mínimo – máximo | 20 – 21 | 20 – 21 | 20 – 21 | 20 – 21 |
| comparação | p = 0,809 | | | |

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto às médias de peso e de idade dos animais (p > 0,05 em ambas as comparações).

Os 4 grupos foram comparados quanto aos índices BBB e anatomopatológicos pós-operatórios. As medidas descritivas desses parâmetros por grupo de estudo se encontram nas tabelas abaixo.

**Tabela 2** – Escore BBB segundo o grupo de estudo e lado

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 8) | **Grupo 2** (n = 8) | **Grupo 3** (n = 8) | **Grupo 4** (n = 8) |
|---|---|---|---|---|
| **Escore BBB – E – 2 dias** | | | | |
| média (dp) | 0,00 (0,00) | 0,50 (1,07) | 0,13 (0,35) | 0,25 (0,46) |
| mediana | 0 | 0 | 0 | 0 |
| mínimo – máximo | 0 – 0 | 0 – 3 | 0 – 1 | 0 – 1 |
| comparação | p = 0,460 | | | |
| **Escore BBB – D – 2 dias** | | | | |
| média (dp) | 0,13 (0,35) | 0,63 (1,06) | 0,13 (0,35) | 0,13 (0,35) |
| mediana | 0 | 0 | 0 | 0 |
| mínimo – máximo | 0 – 1 | 0 – 3 | 0 – 1 | 0 – 1 |
| comparação | p = 0,444 | | | |
| **Escore BBB – E – 1 semana** | n = 7 | | n = 6 | n = 7 |
| média (dp) | 2,71 (1,80) | 2,50 (2,56) | 5,67 (3,67) | 2,43 (0,79) |
| mediana | 3 | 1,5 | 6 | 3 |
| mínimo – máximo | 0 – 5 | 0 – 7 | 0 – 11 | 1 – 3 |
| comparação | p = 0,189 | | | |
| **Escore BBB – D – 1 semana** | n = 7 | | n = 6 | n = 7 |
| média (dp) | 2,43 (2,07) | 2,50 (2,00) | 4,83 (3,19) | 3,86 (2,55) |
| mediana | 2 | 3 | 4,5 | 4 |
| mínimo – máximo | 0 – 5 | 0 – 5 | 1 – 9 | 0 – 7 |
| comparação | p = 0,333 | | | |

(continua)

**Tabela 2** – Escore BBB segundo o grupo de estudo e lado (continuação)

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 8) | **Grupo 2** (n = 8) | **Grupo 3** (n = 8) | **Grupo 4** (n = 8) |
|---|---|---|---|---|
| **Escore BBB – E – 2 semanas** | n = 6 | n = 7 | n = 6 | n = 6 |
| média (dp) | 4,83 (2,86) | 5,86 (3,63) | 10,17 (4,17) | 5,17 (4,02) |
| mediana | 4,5 | 7 | 10,5 | 3,5 |
| mínimo – máximo | 1 – 9 | 1 – 10 | 3 – 14 | 2 – 12 |
| comparação | p = 0,130 | | | |
| **Escore BBB – D – 2 semanas** | n = 6 | n = 7 | n = 6 | n = 6 |
| média (dp) | 4,83 (4,07) | 5,71 (4,15) | 9,83 (3,66) | 6,50 (4,55) |
| mediana | 4,5 | 4 | 10 | 6 |
| mínimo – máximo | 1 – 12 | 1 – 13 | 5 – 14 | 2 – 14 |
| comparação | p = 0,177 | | | |
| **Escore BBB – E – 3 semanas** | n = 6 | n = 7 | n = 6 | n = 6 |
| média (dp) | 9,17 (4,12) | 9,71 (4,11) | 13,33 (4,18) | 9,67 (4,84) |
| mediana | 11 | 12 | 14,5 | 12 |
| mínimo – máximo | 4 – 13 | 3 – 14 | 5 – 16 | 3 – 14 |
| comparação | p = 0,068 | | | |
| **Escore BBB – D – 3 semanas** | n = 6 | n = 7 | n = 6 | n = 6 |
| média (dp) | 10,17 (3,31) | 11,71 (3,90) | 13,00 (3,35) | 10,83 (5,38) |
| mediana | 9,5 | 13 | 13,5 | 11,5 |
| mínimo – máximo | 7 – 14 | 6 – 17 | 7 – 16 | 2 – 16 |
| comparação | p = 0,669 | | | |
| **Escore BBB – E – 4 semanas** | n = 6 | n = 7 | n = 6 | n = 6 |
| média (dp) | 14,67 (3,08) | 12,29 (4,35) | 15,67 (2,81) | 12,17 (3,19) |
| mediana | 15,5 | 14 | 16,5 | 13 |
| mínimo – máximo | 10 – 18 | 4 – 16 | 11 – 19 | 6 – 15 |
| comparação | p = 0,165 | | | |
| **Escore BBB – E – 4 semanas** | n = 6 | n = 7 | n = 6 | n = 6 |
| média (dp) | 15,50 (2,07) | 13,71 (4,19) | 15,17 (2,56) | 12,33 (4,76) |
| mediana | 16,5 | 15 | 16 | 13,5 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| mínimo – máximo | 12 – 17 | 5 – 17 | 12 – 18 | 4 – 16 |
| comparação | | p = 0,340 | | |

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma das avaliações nos lados esquerdos e direitos dos animais (p > 0,05 em todos os testes aplicados).

**Tabela 3** – Escore BBB segundo o grupo de estudo

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 16) | **Grupo 2** (n = 16) | **Grupo 3** (n = 16) | **Grupo 4** (n = 16) |
|---|---|---|---|---|
| **Escore BBB – 2 dias** | | | | |
| média (dp) | 0,06 (0,25) | 0,56 (1,03) | 0,13 (0,34) | 0,19 (0,40) |
| mediana | 0 | 0 | 0 | 0 |
| mínimo – máximo | 0 – 1 | 0 – 3 | 0 – 1 | 0 – 1 |
| comparação | | p = 0,239 | | |
| **Escore BBB – 1 semana** | n = 14 | | n = 12 | n = 14 |
| média (dp) | 2,57 (1,87) | 2,50 (2,22) | 5,25 (3,31) | 3,14 (1,96) |
| mediana | 2,5 | 2 | 5 | 3 |
| mínimo – máximo | 0 – 5 | 0 – 7 | 0 – 11 | 0 – 7 |
| comparação | | p = 0,074 | | |
| **Escore BBB – 2 semanas** | n = 12 | n = 14 | n = 12 | n = 12 |
| média (dp) | 4,83 (3,35) | 5,79 (3,75) | 10,00 (3,74) | 5,83 (4,15) |
| mediana | 4,5 | 5,5 | 10,5 | 5 |
| mínimo – máximo | 1 – 12 | 1 – 13 | 3 – 14 | 2 – 14 |
| comparação | | p = 0,015 * | | |
| **Escore BBB – 3 semanas** | n = 12 | n = 14 | n = 12 | n = 12 |
| média (dp) | 9,67 (3,60) | 10,71 (3,99) | 13,17 (3,61) | 10,25 (4,92) |
| mediana | 10,5 | 12 | 14 | 12 |
| mínimo – máximo | 4 – 14 | 3 – 17 | 5 – 16 | 2 – 16 |
| comparação | | p = 0,077 | | |

| **Escore BBB – 4 semanas** | n = 12 | n = 14 | n = 12 | n = 12 |
|---|---|---|---|---|
| média (dp) | 15,08 (2,54) | 13,00 (4,17) | 15,42 (2,58) | 12,25 (3,86) |
| mediana | 16 | 14,5 | 16 | 13 |
| mínimo – mázimo | 10 – 18 | 4 – 17 | 11 – 19 | 4 – 16 |
| comparação | p = 0,057 | | | |

Na comparação entre os grupos quanto ao Escore BBB foram encontrados os seguintes resultados:

- Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos na avaliação de 2 dias (p = 0,239);
- Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos na avaliação de 1 semana (p = 0,074);
- Foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos na avaliação de 2 semanas (p = 0,015), onde o Grupo 3 apresentou escores significantemente maiores do que os dos demais grupos;
- Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos na avaliação de 3 semanas (p = 0,077);
- Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos na avaliação de 4 semanas (p = 0,057), onde o resultado é marginalmente significante indicando tendência a diferença. O grupo 4 apresentou escores menores do que os dos grupos 1 e 3, porém sem significância estatística nessas diferenças.

Os gráficos abaixo representam os resultados apresentados na tabela 3.

**Gráfico 1** – Boxplot do escore BBB na avaliação de 2 dias segundo o grupo de estudo

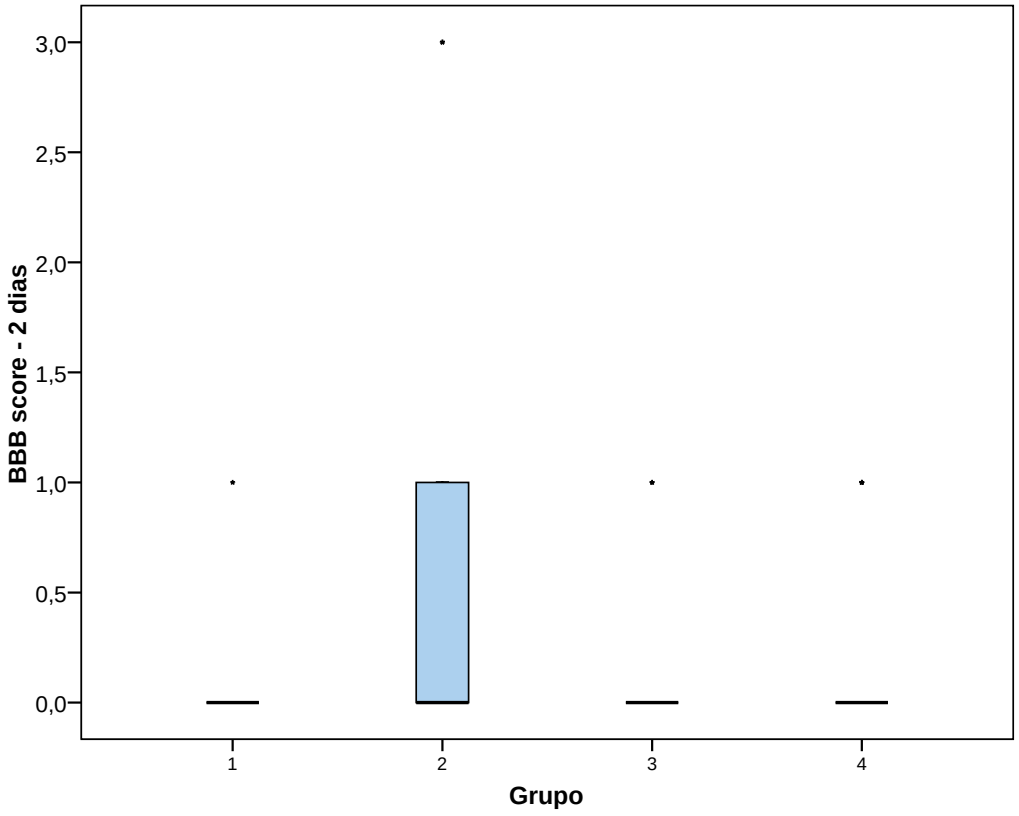

**Gráfico 2** – Boxplot do escore BBB na avaliação de 1 semana segundo o grupo de estudo

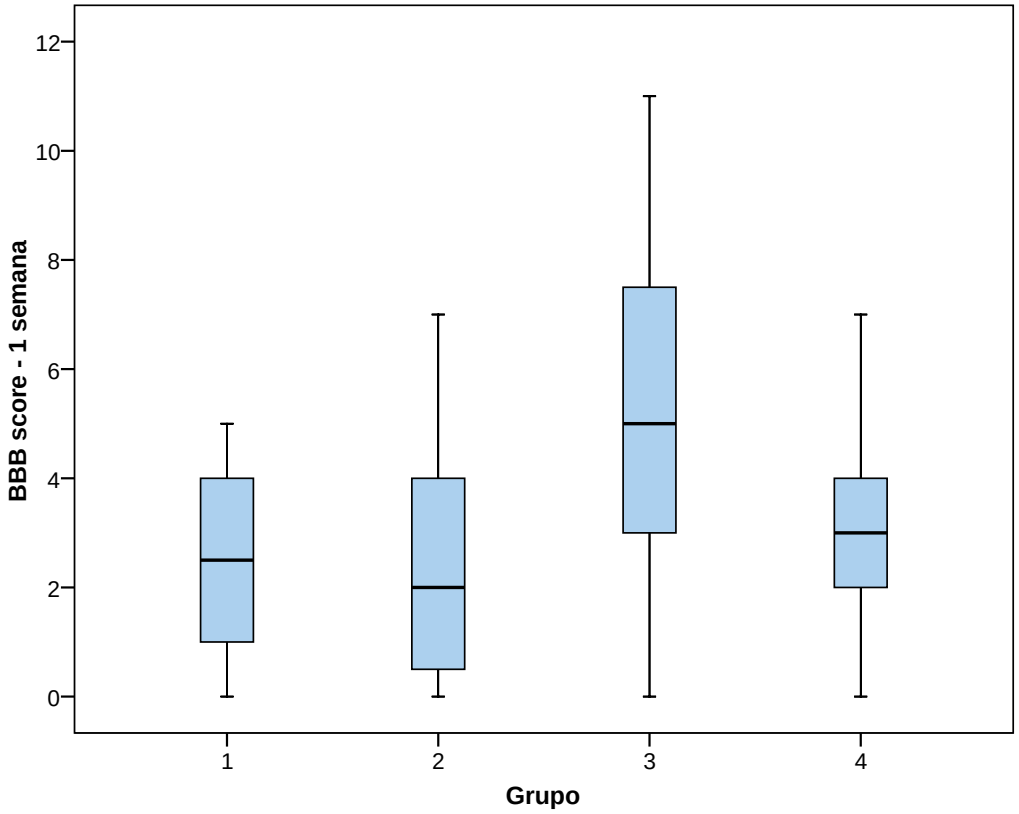

**Gráfico 3** – Boxplot do escore BBB na avaliação de 2 semanas segundo o grupo de estudo

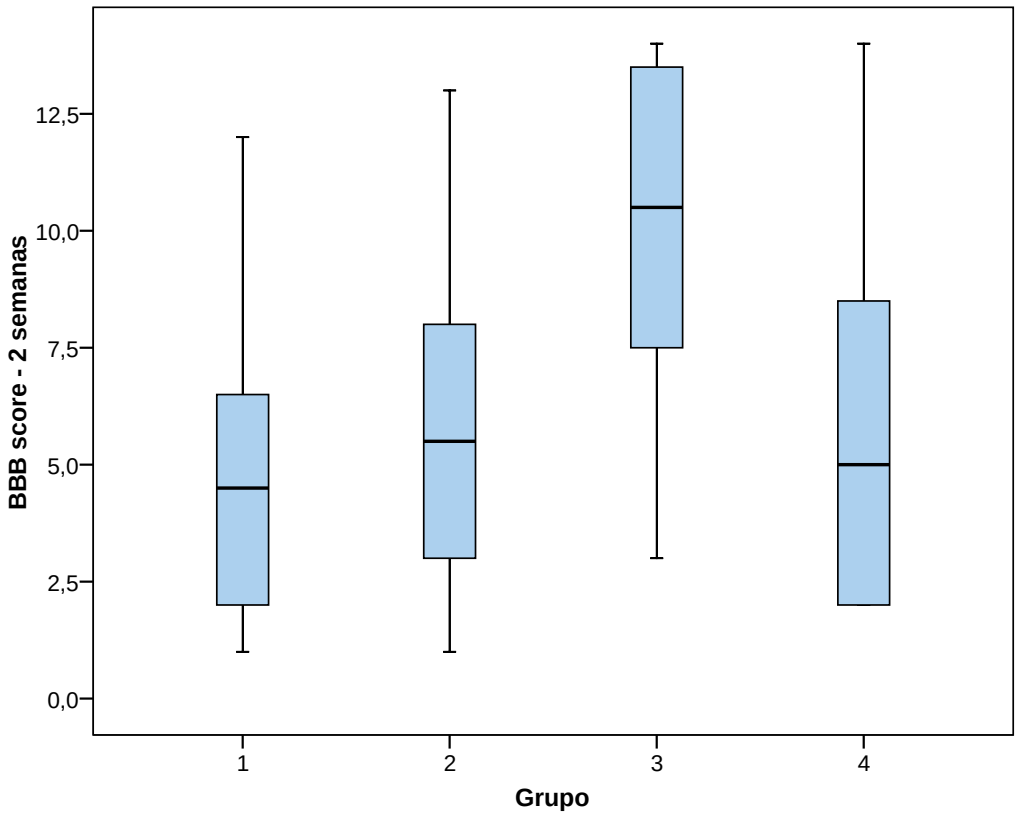

**Gráfico 4** – Boxplot do escore BBB na avaliação de 3 semanas segundo o grupo de estudo

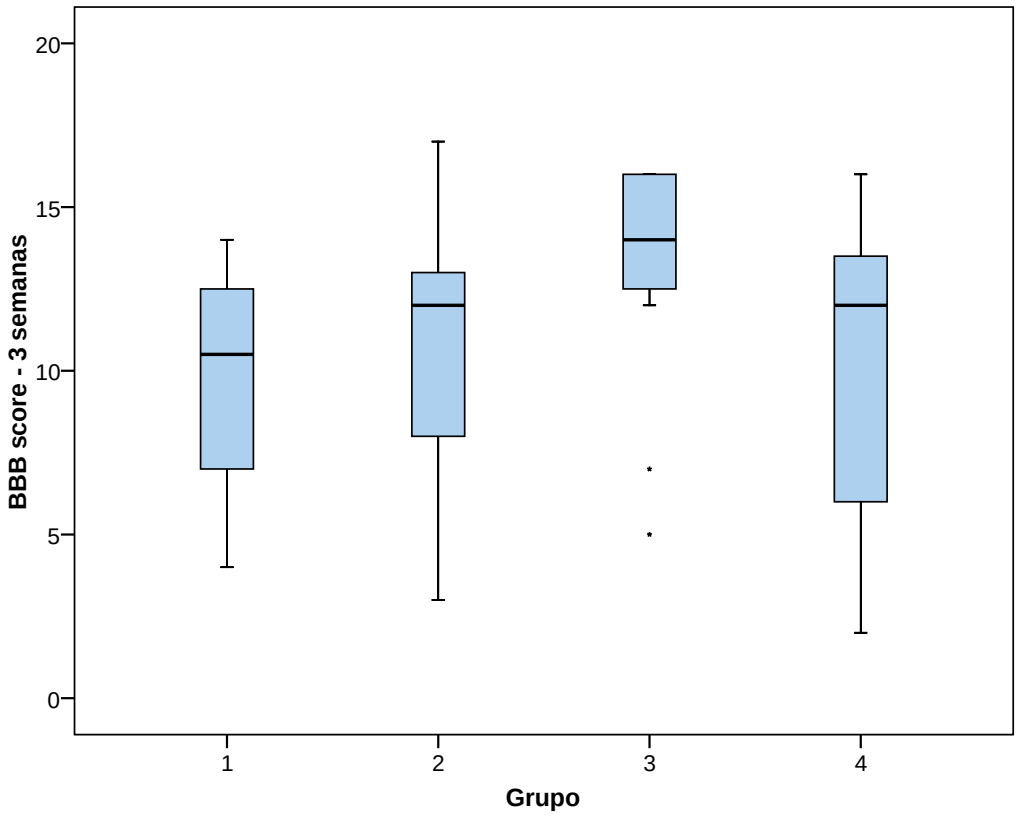

**Gráfico 5** – Boxplot do escore BBB na avaliação de 4 semanas segundo o grupo de estudo

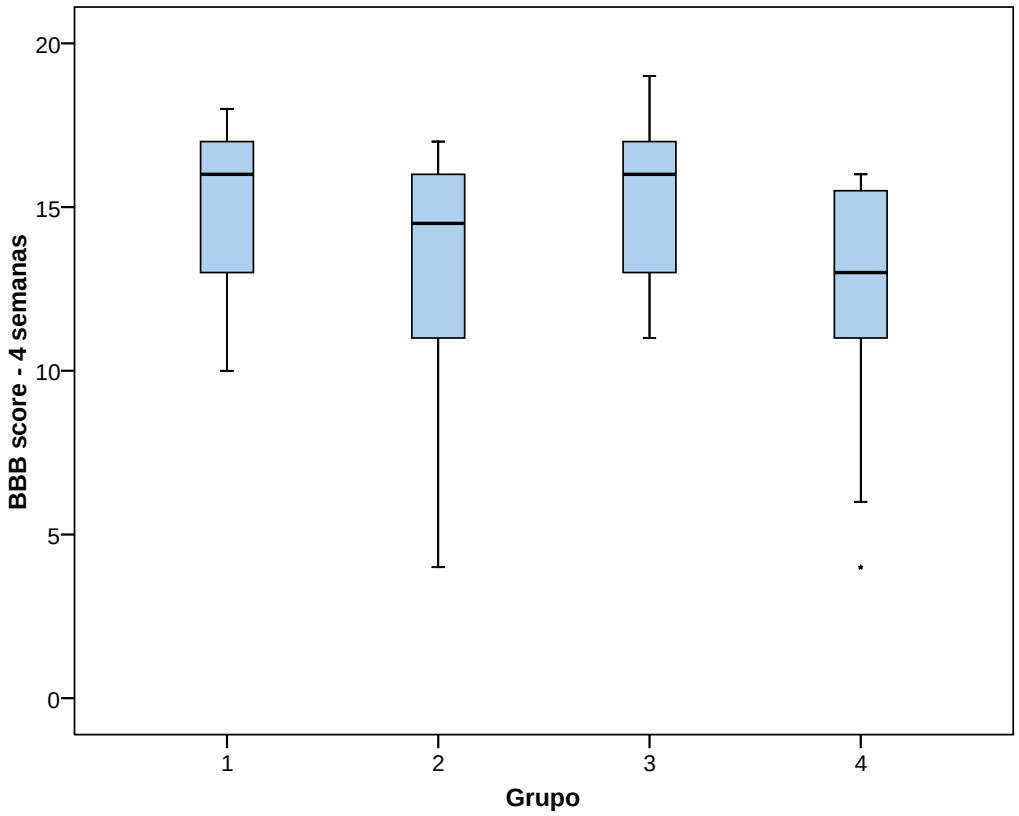


**Tabela 4** – Óbitos segundo o grupo de estudo

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 8) | **Grupo 2** (n = 8) | **Grupo 3** (n = 8) | **Grupo 4** (n = 8) |
|---|---|---|---|---|
| **Óbito** – n (%) | | | | |
| Não | 6 (75,0) | 7 (87,5) | 6 (75,0) | 6 (75,0) |
| Sim | 2 (25,0) | 1 (12,5) | 2 (25,0) | 2 (25,0) |
| comparação | p = 0,908 | | | |

Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos quanto à ocorrência de óbitos dos animais (p = 0,908).

**Tabela 5** – Análise anátomo-patológica da medula espinal dos ratos – região A: proximal ao sítio de lesão

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 6) | **Grupo 2** (n = 7) | **Grupo 3** (n = 6) | **Grupo 4** (n = 6) |
|---|---|---|---|---|
| **Necrose** – n (%) | | | | |
| 0 | 5 ( 83,3) | 6 ( 85,7) | 3 ( 50,0) | 5 ( 83,3) |
| 1 | 1 ( 16,7) | 1 ( 14,3) | 3 ( 50,0) | 1 ( 16,7) |
| comparação | p = 0,420 | | | |
| **Hemorragia** – n (%) | | | | |
| 0 | 6 (100,0) | 7 (100,0) | 6 (100,0) | 6 (100,0) |
| comparação | p = --- | | | |
| **Hiperemia** – n (%) | | | | |
| 0 | 0 ( 0,0) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) |
| 1 | 4 ( 66,7) | 2 ( 28,6) | 5 ( 83,3) | 4 ( 66,7) |
| 2 | 1 ( 16,7) | 2 ( 28,6) | 0 ( 0,0) | 2 ( 33,3) |
| 3 | 1 ( 16,7) | 2 ( 28,6) | 1 ( 16,7) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,801 | | | |
| **Degeneração cística** – n (%) | | | | |
| 1 | 2 ( 33,3) | 3 ( 42,9) | 3 ( 50,0) | 3 ( 50,0) |
| 2 | 4 ( 66,7) | 3 ( 42,9) | 3 ( 50,0) | 3 ( 50,0) |
| 3 | 0 ( 0,0) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,908 | | | |
| **Infiltrado celular** – n (%) | | | | |
| 0 | 3 ( 50,0) | 7 (100,0) | 6 (100,0) | 5 ( 83,3) |
| 1 | 3 ( 50,0) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) | 1 ( 16,7) |
| comparação | p = 0,062 | | | |

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos fatores na região A ($p > 0,05$ em todos os testes aplicados).

**Tabela 6** – Análise anátomo-patológica da medula espinal dos ratos – região B: no sítio de lesão

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 6) | **Grupo 2** (n = 7) | **Grupo 3** (n = 6) | **Grupo 4** (n = 6) |
|---|---|---|---|---|
| **Necrose** – n (%) | | | | |
| 0 | 1 ( 16,7) | 5 ( 71,4) | 2 ( 33,3) | 2 ( 33,3) |
| 1 | 3 ( 50,0) | 1 ( 14,3) | 2 ( 33,3) | 2 ( 33,3) |
| 2 | 1 ( 16,7) | 0 ( 0,0) | 2 ( 33,3) | 2 ( 33,3) |
| 3 | 1 ( 16,7) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,412 | | | |
| **Hemorragia** – n (%) | | | | |
| 0 | 6 (100,0) | 7 (100,0) | 6 (100,0) | 6 (100,0) |
| comparação | p = --- | | | |
| **Hiperemia** – n (%) | | | | |
| 0 | 0 ( 0,0) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) |
| 1 | 2 ( 33,3) | 1 ( 14,3) | 2 ( 33,3) | 3 ( 50,0) |
| 2 | 2 ( 33,3) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 3 ( 50,0) |
| 3 | 2 ( 33,3) | 4 ( 57,1) | 4 ( 66,7) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,382 | | | |
| **Degeneração cística** – n (%) | | | | |
| 1 | 0 ( 0,0) | 3 ( 42,9) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) |
| 2 | 3 ( 50,0) | 2 ( 28,6) | 5 ( 83,3) | 6 (100,0) |
| 3 | 3 ( 50,0) | 2 ( 28,6) | 1 ( 16,7) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,276 | | | |
| **Infiltrado celular** – n (%) | | | | |
| 0 | 1 ( 16,7) | 5 ( 71,4) | 5 ( 71,4) | 3 ( 50,0) |
| 1 | 4 ( 66,7) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 3 ( 50,0) |
| 2 | 1 ( 16,7) | 1 ( 14,3) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,221 | | | |

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos fatores na região B ($p > 0,05$ em todos os testes aplicados).

**Tabela 7** – Análise anátomo-patológica da medula espinal dos ratos – região C: distal ao sítio de lesão

| Variáveis | **Grupo 1** (n = 6) | **Grupo 2** (n = 7) | **Grupo 3** (n = 6) | **Grupo 4** (n = 6) |
|---|---|---|---|---|
| **Necrose** – n (%) | | | | |
| 0 | 2 ( 33,3) | 5 ( 71,4) | 3 ( 50,0) | 2 ( 33,3) |
| 1 | 3 ( 50,0) | 0 ( 0,0) | 2 ( 33,3) | 1 ( 16,7) |
| 2 | 0 ( 0,0) | 1 ( 14,3) | 1 ( 16,7) | 3 ( 50,0) |
| 3 | 1 ( 16,7) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,697 | | | |
| **Hemorragia** – n (%) | | | | |
| 0 | 6 (100,0) | 7 (100,0) | 6 (100,0) | 6 (100,0) |
| comparação | p = --- | | | |
| **Hiperemia** – n (%) | | | | |
| 0 | 0 ( 0,0) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) |
| 1 | 2 ( 33,3) | 2 ( 28,6) | 2 ( 33,3) | 4 ( 66,7) |
| 2 | 1 ( 16,7) | 2 ( 28,6) | 2 ( 33,3) | 2 ( 33,3) |
| 3 | 3 ( 50,0) | 2 ( 28,6) | 2 ( 33,3) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,415 | | | |
| **Degeneração cística** – n (%) | | | | |
| 0 | 0 ( 0,0) | 1 ( 14,3) | 1 ( 16,7) | 0 ( 0,0) |
| 1 | 1 ( 16,7) | 2 ( 28,6) | 1 ( 16,7) | 0 ( 0,0) |
| 2 | 2 ( 33,3) | 2 ( 28,6) | 3 ( 50,0) | 6 (100,0) |
| 3 | 3 ( 50,0) | 2 ( 28,6) | 1 ( 16,7) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,543 | | | |
| **Infiltrado celular** – n (%) | | | | |
| 0 | 1 ( 16,7) | 5 ( 71,4) | 5 ( 71,4) | 3 ( 50,0) |
| 1 | 5 ( 83,3) | 2 ( 28,6) | 0 ( 0,0) | 3 ( 50,0) |
| 2 | 0 ( 0,0) | 0 ( 0,0) | 1 ( 14,3) | 0 ( 0,0) |
| comparação | p = 0,197 | | | |

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos fatores na região C ($p > 0,05$ em todos os testes aplicados).

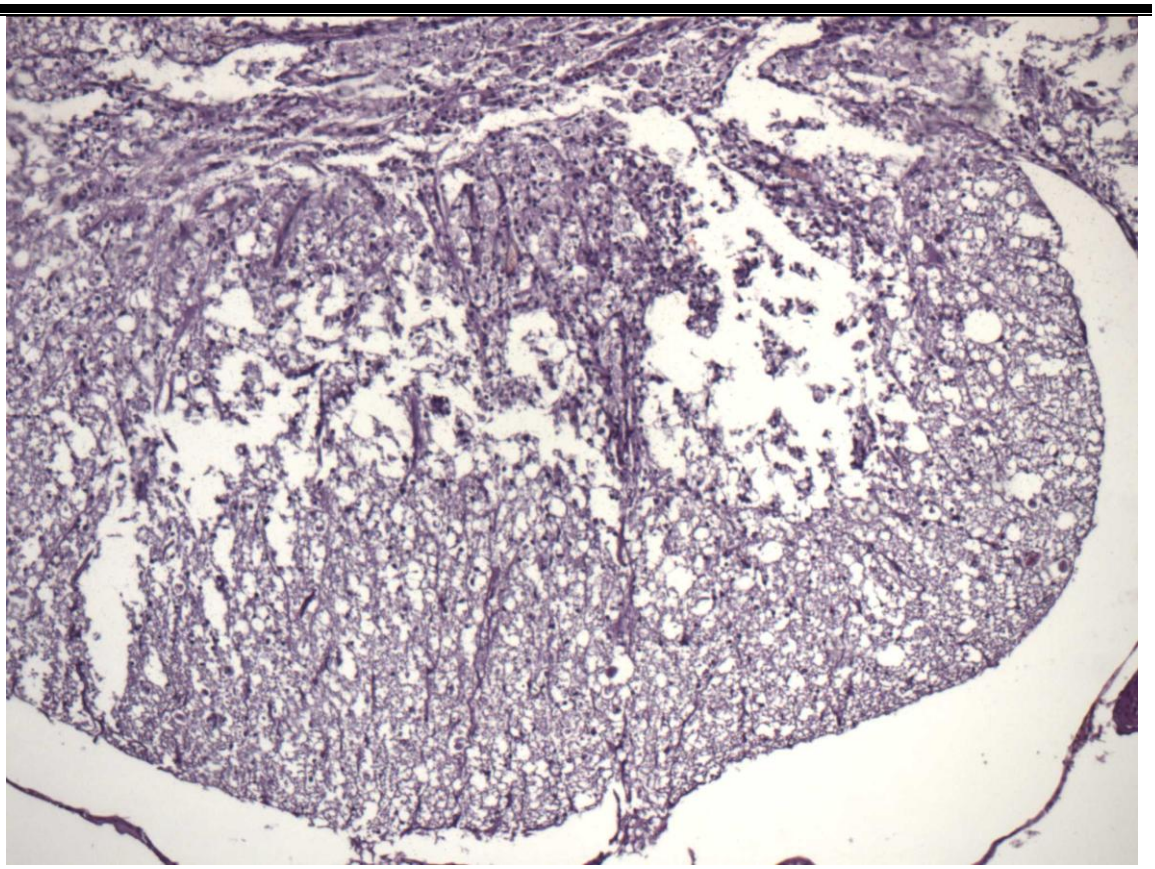

FIGURA 5 Análise anatomopatológica do grau de degeneração da substância nervosa (ausente, discreto, moderado e acentuado) do tecido medular lesado dos ratos. Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 100 vezes de um resultado acentuado. Lâmina 4B do grupo 2 Coloração por HE

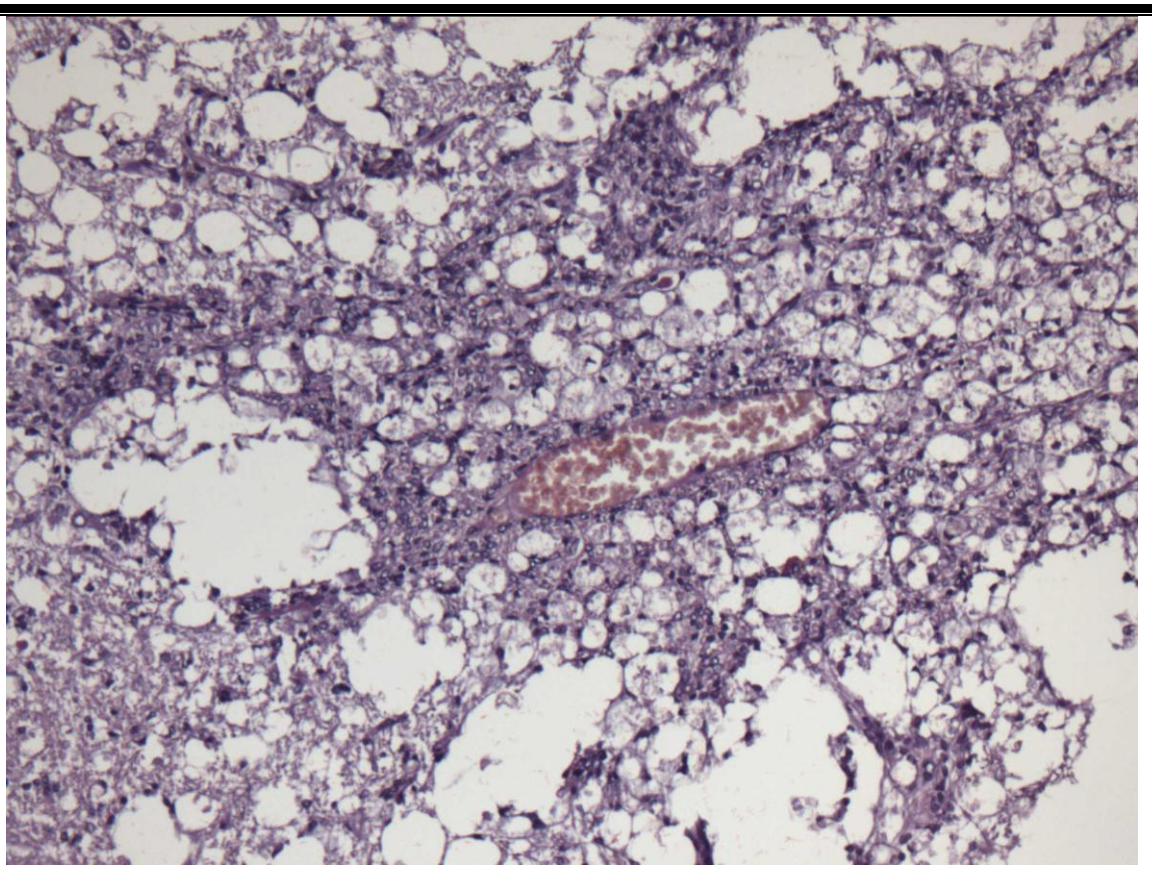

FIGURA 6 Análise anatomopatológica do grau de hiperemia (ausente, discreto, moderado e acentuado) do tecido medular lesado dos ratos. Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 200 vezes de um resultado acentuado. Lâmina 3B do grupo 1. Coloração por HE

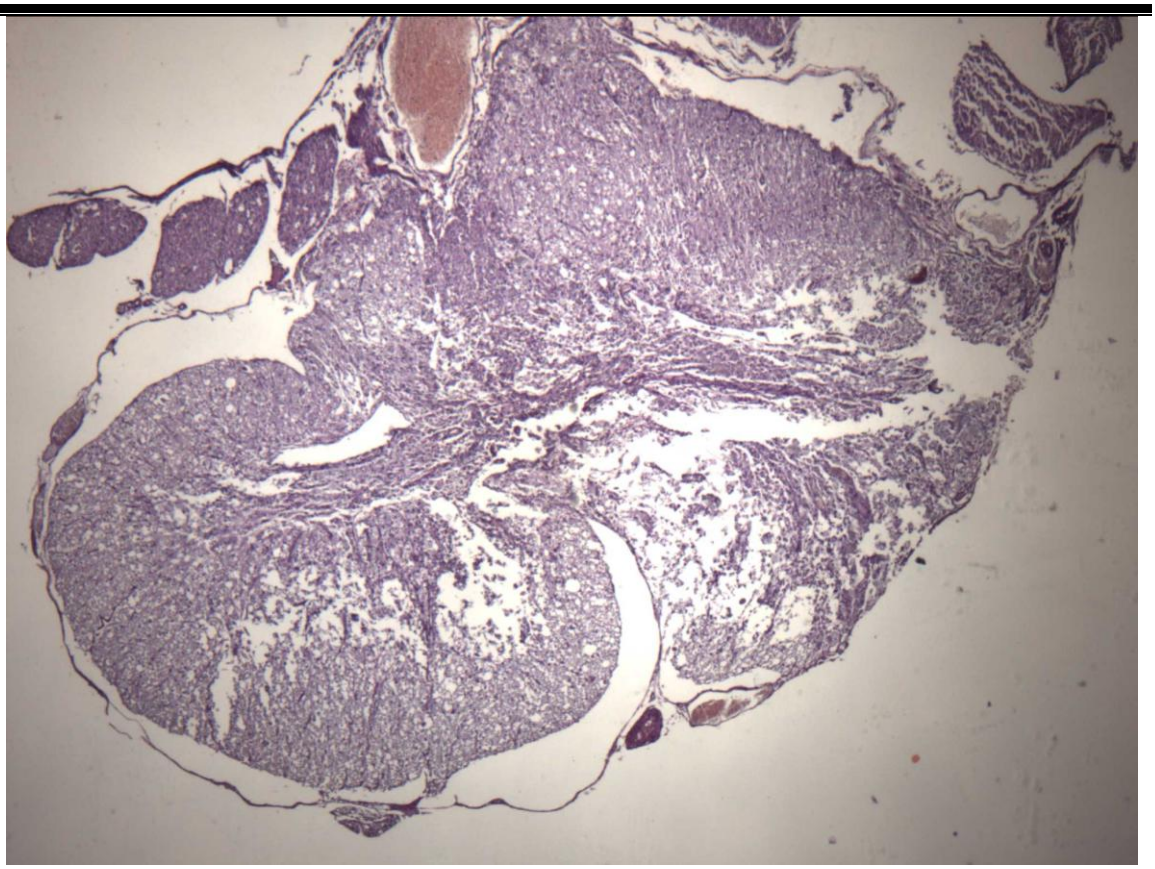

FIGURA 7 Análise anatomopatológica do grau de infiltrado celular e degeneração cística (ausente, discreto, moderado e acentuado) do tecido medular lesado dos ratos. Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 50 vezes de um resultado moderado e acentuado, respectivamente. Lâmina 4B do grupo 2. Coloração por HE

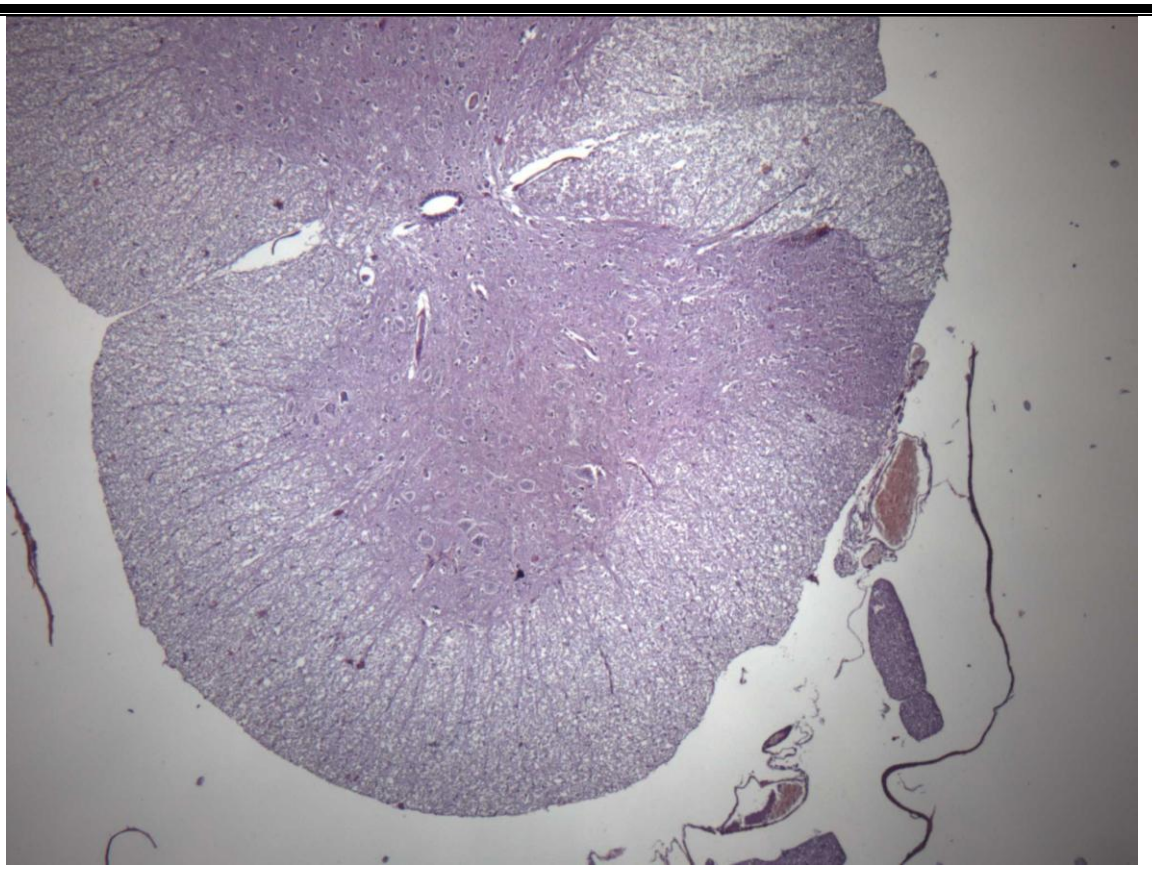

FIGURA 8 Análise anatomopatológica de uma região sem alterações (controle). Imagem típica de microscopia óptica com aumento de 50 vezes. Lâmina 2C do grupo 2. Coloração por HE

# 5. DISCUSSÃO

# 5 DISCUSSÃO

Desde as clássicas publicações de Allen (1911) e Allen (1914), vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para simular a lesão medular produzida por peso em queda livre sobre a medula de animais (Ford, 1983, Noble; Wrathall, 1985, Bresnahan et al., 1987, Noble; Wrathall, 1987 e Behrmann et al., 1992).

O modelo experimental através de queda de peso, em ratos Wistar, para a produção de lesão medular mediana foi o selecionado porque permite a padronização e a uniformização da amostra. A escolha de ratos Wistar deveu-se à maior disponibilidade e utilização em laboratórios brasileiros, à sua disponibilidade pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, principalmente, devido à padronização realizada e adotada pelo Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos – LETRAN do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – IOT-HC-FMUSP (Rodrigues (1999)).

A obtenção de uma lesão medular mediana sistematizada e homogeneizada, desejada, foi feita através de um equipamento de impacto controlado por

microcomputador, liberando uma haste com um peso de 10 gramas a uma altura de 12,5 mm ("New York University Impactor System"), desenvolvido por Gruner (1992) e avaliado e utilizado inicialmente por Constantini; Young (1994) e Basso et al. (1996).

Outro método de contusão medular controlado possível de ser comparado seria o "Ohio State University Impactor System – OSU Impactor". BASSO et al. (1995) demonstram que ambos os sistemas são eficazes e equivalentes na produção da lesão medular. Os dois métodos apresentam desenvolvimento e evolução similares. Nesse experimento, o desenvolvimento, a progressão e a estabilização da capacidade funcional atingiram seu patamar definitivo no período de quatro semanas. Esta foi uma experiência pioneira e sua metodologia ficou consagrada, referida em diversos outros estudos e aqui, também.

A avaliação dos ratos nos $2^{o}$, $7^{o}$, $14^{o}$, $21^{o}$ e $28^{o}$ dias do período pós-operatório contempla todos os aspectos da seqüência de eventos ocorridos após o traumatismo raquimedular. Dessa maneira, pôde-se observar e comparar a progressão dos resultados até a sua estabilização (patamar definitivo).

O equipamento computadorizado "NYU Impactor", disponível no LETRAN, assim como nos principais centros de pesquisa que integram o "Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study – MASCIS", permite a comparação interinstitucional dos resultados.

A regulagem, os cuidados e a operação seguiram o método preconizado por Rodrigues (1999) e os que constam no manual de operação do equipamento.

O número de ratos por grupo (n) baseou-se nas experiências anteriormente descritas, que utilizaram o mesmo modelo experimental (Basso et al. 1996, Constantini; Young 1994, Rodrigues 1999, Vialle et al. 1999, Marcon 2006, Narazaki 2006, Cristante 2009).

Um critério de inclusão rígido é necessário para se eliminarem fatores de interferência, que são: ratos de raça e sexo únicos, idades entre 20 a 21 semanas, peso variando de 302 a 419 gramas, e sem alteração de motricidade ou do estado geral, avaliado pela pelagem. A homogeneização da amostra é essencial para se obter confiabilidade e reprodutibilidade.

A escolha do nível de lesão em TX e com intensidade média (12,5 mm) é baseada ainda na técnica proposta por Rodrigues (1999). As justificativas para esta opção baseiam-se na obtenção de ratos paraplégicos após a contusão medular, porém com capacidade locomotora suficiente para garantir sua subsistência (alimentação e hidratação) e facilitar a avaliação da capacidade funcional residual. O sistema pode ser graduado com a queda da haste de altura de 6,25, 12,5, 25 e 50 mm. Escolhemos a altura de 12,5 mm (intensidade média), porque a altura de 50mm causa lesão medular completa com mortalidade alta na primeira semana, e os ratos lesados a 6,25 mm

apresentavam recuperação quase completa em 10 dias, independente de qualquer intervenção (Basso et al. 1996, Constantini; Young 1994, Rodrigues 1999 e Vialle et al. 1999, Marcon 2006, Narazaki 2006, Cristante 2009). Ainda em relação à altura utilizada, nestes trabalhos anteriores, utilizou-se a altura de 25 mm; mas, em trabalhos recentes, observou-se que a lesão obtida com a altura de 12,5 mm, além de também promover a paraplegia nos ratos, possibilitava a observação mais rápida de possível melhora dos mesmos, sem que os mesmos obtivessem melhora completa ao final do estudo (Narazaki 2006).

O protocolo de oxigenoterapia hiperbárica escolhido levou em consideração a manutenção de uma pressão suficientemente elevada para produzir o efeito desejado (elevação da pressão parcial de oxigênio no sangue), estabelecida entre duas e três atmosferas absolutas. Porém, mínima o suficiente para reduzir a ocorrência de lesões ou efeitos colaterais (Balantine (1978)). Adotou-se, assim, da mesma maneira que Shiokawa et al. (1986), a pressão de duas atmosferas absolutas, a mínima admitida para terapia por oxigênio hiperbárico.

O fluxo de oxigênio foi fixado em 14 litros por hora, volume suficiente para manter pelo menos 10 ratos na câmara utilizada.

A escolha do período de uma hora diária, a partir do primeiro dia pós-operatório e durante 7 dias consecutivos, é baseada nos trabalhos de Shiokawa et al. (1986) em ratos e posteriormente no de Murakami et al. (2001) em coelhos. Tanto em

animais, quanto em humanos, empregam-se protocolos entre 30 minutos e três horas de duração diária (Shiokawa et al. (1986)). A duração da sessão e o tempo de tratamento ideais são controversos, portanto a adoção de uma hora por sete dias encontra-se dentro destes limites.

Utilizamos o GM1 porque alguns estudos clínicos documentam as ações benéficas do uso desses gangliosídeos, melhorando a função neurológica de pacientes com trauma raquimedular nas fases aguda e crônica (Geisler et al. 1991, Geisler 1993, Walker JB, Harris M, 1993). Outros autores descrevem os efeitos benéficos na recuperação neurológica, atribuídos ao aumento dopaminérgico axonal, associado à remoção de fatores que inibem a regeneração de fibras nervosas (Toffano et al. 1983) e à capacidade do GM1 em reduzir a degeneração retrógrada dos axônios (Sabel et al. 1988). Borzeix et al. (1989) observam ainda aumento do fluxo sangüíneo na medula lesada, após o uso de GM1.

Tentou-se ainda, num terceiro grupo, a combinação destes dois tratamentos anteriores. A utilização de um meio físico (oxigenioterapia hiperbárica) associada a um método farmacológico (GM1) foi feita na tentativa de potencialização destes tratamentos. Tal combinação não encontra similar na literatura, o que torna o experimento inédito.

A ferramenta de avaliação ideal da função locomotora deve ser de fácil utilização, sensível e ter a capacidade de, rapidamente, mostrar mudanças, mesmo em um limitado número de animais experimentais.

Embora sabedores de que toda avaliação de resultado funcional apresenta aspectos discutíveis e controvertidos (Rivlin; Tator (1977)), resolveu-se adotar o critério mais aceito e difundido dentre os centros de pesquisa que utilizam modelos de experimentação em ratos, ou seja, a escala BBB.

A escala BBB é adotada pelos centros de pesquisa que integram o MASCIS e permitem, da mesma maneira que a utilização do "NYU Impactor", a padronização dos métodos e a comparação dos resultados, além disso, a vantagem é a rápida e objetiva avaliação visual, que permite a aferição por uma equipe de dois examinadores simultâneos. De acordo com Basso et al. (1995), o pior resultado em caso de discordância é o adotado. Ainda a favor da escala BBB, que é uma evolução daquela desenvolvida por Tarlov; Klinger (1954) apud Basso et al. (1995), constatam-se níveis superiores de reprodutibilidade e definições formais precisas que facilitam a observação com maior poder discriminatório.

Para a avaliação da recuperação locomotora dos membros posteriores, procederam-se mensurações dos lados direito e esquerdo, dos grupos 1, 2, 3 e 4, no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias do período pós-operatório. Compararam-se, assim, as diferenças

entre os resultados motores dos diversos grupos, bem como a presença de intercorrências ao longo do estudo.

Após a eutanásia, o exame necroscópico dos ratos foi realizado de modo a permitir a identificação macroscópica de possíveis alterações em relação ao padrão normal. Vários estudos realizados no LETRAN mostram que a metodologia atualmente disponível neste laboratório (coloração de hematoxilina-eosina) para o exame anatomopatológico de amostras do sítio de lesão medular não tem se mostrado suficientemente sensível para a visualização de diferenças significativas (Rodrigues (1999)). Mesmo assim, após a eutanásia, amostras dos tecidos medulares foram retirados do sítio da lesão e submetidos ao exame anatomopatológico, pelo método de coloração de hematoxilina e eosina, com a finalidade de comprovar estigmas da lesão tecidual. Este estudo se fez necessário para certificação de que o traumatismo fora efetivo na produção da contusão medular.

Como esperado, não houve diferença estatisticamente significativa em todas as análises anatomopatológicas. Não houve diferença comparando-se os grupos nos fragmentos A, C e destacadamente o B (sítio de lesão), em todos os itens analisados (necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa (degeneração cística) e infiltrado celular). Este fato já era previsto, como dito anteriormente, pelo fato do método de análise disponível ser pouco sensível para a detecção de possíveis diferenças entre os grupos. Além disso, a utilização da graduação de lesão provocada por queda do peso de altura de 12,5mm de altura, menor inclusive que a utilizada pela

maioria dos trabalhos, priorizou as possíveis alterações funcionais em detrimento das alterações anatomopatológicas.

Os resultados da capacidade locomotora, obtidos pela escala BBB, do grupo 3 (oxigênio hiperbárico e GM1) foi significativamente superior aos demais grupos na segunda semana de análise. Na terceira semana esta diferença não foi observada. Na quarta semana, novamente não houve diferença estatisticamente detectável mas existiu uma diferença marginalmente significativa dos grupos 1 (GM1) e 3 (oxigênio hiperbárico e GM1) quando comparados ao grupo controle (grupo 4).

A observação destes resultados demonstra que existe um efeito benéfico na recuperação funcional dos ratos com a utilização de GM1 e que o mesmo parece ter sido potencializado pela utilização do oxigênio hiperbárico. Este efeito benéfico do GM1 aparece novamente na quarta semana de evolução, através da diferença marginalmente significativa dos grupos que o utilizaram (grupos 1 e 3). Esta diferença aparece como marginalmente significativa devido provavelmente a um tamanho pequeno da amostra para o estudo em questão ou a um tempo de segmento não suficiente para que estas diferenças se estabelecessem definitivamente. Como dito anteriormente, o tamanho da amostra e o tempo de estudo basearam-se nas experiências anteriormente descritas com este modelo, não sendo possível prever que, neste estudo, os mesmos pudessem não ser suficientes.

Ainda, em relação à recuperação funcional, o que o oxigênio hiperbárico parece ter feito foi acelerar momentaneamente  a recuperação motora que o GM1

ocasionaria (grupo 3 – GM1 e oxigênio hiperbárico, na segunda semana), aceleração esta que não se manteve nas semanas subseqüentes. Pode-se, inclusive, entender que a evolução, no grupo 3, alcançou antes um estágio final (ou quase) e que, nas semanas seguintes, a evolução no outro grupo (grupo 1 – somente GM1) chegaria a um estágio equivalente.

Já o oxigênio hiperbárico utilizado isoladamente (grupo 2) parece não promover nenhum benefício. Mostrou-se, como dito anteriormente, eficaz num possível efeito acelerador na recuperação no grupo 3, o qual utilizou GM1 associado ao mesmo. Mesmo este efeito acelerador não se manteve na análise das semanas subseqüentes. Cabe, neste momento, a discussão se o tempo de utilização da oxigênio terapia hiperbárica não deveria ter sido maior.

Em experimentos com modelos animais, foram utilizados diversos tempos de aplicação da terapia com oxigênio hiperbárico. A variação foi desde 15 minutos após a lesão, como sugerido por Murakami et al. (2001), de 15 minutos a duas horas por Higgins et al. (1981) e de uma a quatro horas (Kelly Jr. et al. (1972)). Em humanos, Gamache et al. (1980) recomendam iniciar a terapia hiperbárica dentro das quatro horas sucessivas à lesão medular espinal. A opção pelo início da terapia em câmara hiperbárica, 24 horas após a lesão medular espinal, nos animais, deveu-se ao fato que, em nosso meio, a maioria dos pacientes lesados medulares (72%) chega aos hospitais de referência muito depois de encerrada a fase aguda da lesão primária (BARROS FILHO et al. (1990)), isto é, até oito horas após o traumatismo, e, portanto, após a

janela de tempo ideal para aplicação da terapia com oxigênio hiperbárico nas primeiras horas após a lesão.

Com relação à quantidade administrada de oxigênio sob pressão, em animais submetidos à lesão medular provocada, Higgins et al. (1981), Kelly Jr. et al. (1972) e Balentine (1975) utilizaram 2 a 5 atmosferas, da mesma forma que Murakami et al (2001). Acima destes limites, os efeitos colaterais, como a necrose das células do corno anterior da medula espinal de ratos ou ainda a degradação enzimática por oxidação no cérebro, podem ocorrer. Embora não haja dados precisos e definitivos sobre a pressão ideal para a experimentação em ratos, optou-se pela pressão de 2 atmosferas, à semelhança de Kelly Jr. et al. (1972) e Shiokawa et al. (1986).

Entre as alternativas hoje disponíveis para o tratamento da lesão medular, destacam-se as que atuam reduzindo o dano neural, aqui incluídos todos os aspectos de prevenção do dano medular secundário. As principais opções são a operatória e a farmacológica, que têm sido aplicadas nos tratamentos clínicos atuais. A farmacologia tem empregado preferencialmente a metilprednisolona, por seus efeitos neuroprotetores. Citam-se a inibição da lesão oxidativa da célula pela formação de radicais livres, a inibição da peroxidação lipídica, a diminuição da liberação de aminoácidos excitatórios, a diminuição do influxo de cálcio intracelular e o aumento do fluxo sangüíneo para a medula lesada (Anderson et al. (1982)). O protocolo do "National Acute Spinal Cord Injury Studies" (NASCIS-2 e NASCIS-3), amplamente utilizado, resulta em melhora da função neurológica na lesão medular aguda. Os

gangliosídeos (GM1) têm demonstrado um efeito neurotrófico, mas parecem inibir os efeitos neuroprotetores da metilprednisolona e seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado, estando esta droga ainda em caráter experimental (Geisler et al. (1991), Constantini; Young (1994)). Percebe-se que, na prática clínica, o emprego dos fármacos se restringe a uma ação coadjuvante na lesão medular aguda, necessitando de maiores evidências quanto ao mecanismo de ação e eficácia.

As técnicas cirúrgicas têm tido um grande avanço. O uso de materiais de implante aperfeiçoados tem propiciado a realização de cirurgias de reconstrução com fixação de colunas instáveis. A prevenção de danos adicionais e facilitação da reabilitação precoce é vantagem consagrada. Entretanto, isoladamente, ela não conduz à melhora do estado neurológico, necessitando de terapias complementares.

As duas linhas de pesquisa dirigidas para a regeneração do dano medular são a modificação do ambiente do sítio de lesão e a ativação da capacidade neuronal intrínseca. A primeira se faz através do implante de pontes acelulares semeadas com células de tecido fetal, células gliais e neutralização das moléculas de inibição do crescimento neuronal. O segundo ramo de pesquisa diz respeito à utilização de genes estimuladores da regeneração neuronal intrínseca (GAP-43, Bcl-2, c-Jun), ou através do implante de fatores neurotróficos (NGF, BDNF, NT-3, NT-4, fatores de crescimento derivados das plaquetas e fatores de crescimento dos fibroblastos). Sabemos que a regeneração ocorre mais facilmente no sistema nervoso periférico do que no sistema nervoso central e esta diferença está em parte relacionada a proteínas

associadas à mielina. A neutralização dessas proteínas por anticorpos monoclonais (IN-1) pode levar à regeneração em ratos adultos (Bregman et al. (1997)).

Muitos estudos encontram-se em andamento em relação à regeneração do sistema nervoso central, com o uso de fatores neurotróficos, do enxerto de nervos periféricos associados ou não a fatores neurotróficos (Bregman et al. (1997)), de anticorpos bloqueadores dos fatores inibitórios da regeneração, do enxerto de células do sistema nervoso central (Ramón-Cueto et al. (1998)), e de células tronco (Nockels; Young (1992), Schwab; Bartholdi (1996), Amar; Levy (1999) e Cristante et al. (2002)).

Estes novos recursos terapêuticos proporcionam, pela primeira vez, uma perspectiva de cura, ainda que controversa pelas suas implicações éticas (Debrovner (2000)). Devido aos pequenos resultados práticos do uso de medicamentos e ainda do longo caminho a ser percorrido com estes novos estudos sobre a regeneração neuronal, não há presunção da terapia única.

A contribuição dessa pesquisa experimental foi a comprovação de que parece haver efeito benéfico na utilização do GM1 na recuperação funcional na lesão medular, efeito este que parece ser potencializado através da combinação do GM1 com a oxigênio terapia hiperbárica.

# 6. CONCLUSÕES

# 6 CONCLUSÕES

1. Quanto aos índices motores, a utilização do GM1 tem efeito benéfico, embora sem significância estatística.

2. O efeito benéfico do GM1 é antecipado através da utilização concomitante da oxigênio terapia hiperbárica.

# 7. ANEXOS

# ANEXO I

## ESCALA BBB DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL
## "BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S. E BRESNAHAN, J.C., 1995"

Rato: _____ Data ___/___/ 200___ Dias Pós-Operatório _____ Pontuação Esquerdo: _____ Direito _____

| Movimento do Membro Posterior | | | | | | Posição do Tronco | | Abdome | Movimento da Pata Dianteira | | | Pisada | | | | Coordenação | Liberação dos Dedos | | Posição Predominante da Pata | | | | Instabilidade do Tronco | Cauda |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Quadril | | Joelho | | Tornozelo | | | | | Balanço | Apoio da Pata | | Dorsal | | Plantar | | | | | Contato Inicial | | Elevação | | | |
| E | D | E | D | E | D | Lado | Apoio | | | Sem Suporte de Peso | Com Suporte de Peso | E | D | E | D | | E | D | E | D | E | D | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | E | D | Arrastando | E | D | E | D | E | D | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0* | 0* | I | I | I | I | | Para Cima (elevada) |
| S | S | S | S | S | S | | | | | | | | | | O | O | O | O | O | O | O | E | E | E | E | | |
| E | E | E | E | E | E | Central | | Paralelo | | | | | | | F | F | F+ | F+ | F | F** | F** | P | P | P | P | | Para Baixo (abaixada) |
| | | | | | | | | Alto | | | | | | | C | C | C | C | C | C | C | | | | | | |

Comentários: _____

| Movimento | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | Nenhum | + | Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior | 0 | Nunca (0%) | I | Rotação Interna |
| S | Suave (discreto) | * | Liberação < 50% | O | Ocasional (< 50%) | E | Rotação Externa |
| E | Extenso | ** | Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior | F | Freqüente (51-94%) | P | Paralelo |
| | | | | C | Consistente (95-100%) | | |

# ANEXO II

QUADRO 1 ESCALA BBB DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE 21 PONTOS DE BASSO ET AL. (1995)[6]

| **PONTUAÇÃO** | **DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS** |
|---|---|
| 0 | Nenhum movimento observável do membro posterior. |
| 1 | Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho. |
| 2 | Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra. |
| 3 | Movimento extenso de duas articulações. |
| 4 | Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior. |
| 5 | Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira. |
| 6 | Movimento extenso de duas articulações e movimento 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 em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, freqüente ou consistente com 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 freqüente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior |
| 12 | Passo plantar com suporte de piso freqüente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior. |
| 13 | Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior. |
| 14 | Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional. |

(continuação)

| PONTUAÇÃO | DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS |
|---|---|
| 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 dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação. |
| 17 | Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos. |
| 18 | Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos. |
| 19 | Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo. |
| 20 | Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco. |
| 21 | Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada. |

| **DEFINIÇÕES** | |
|---|---|
| - Discreta | Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação |
| - Extensa | Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação |
| - Pedalada | Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente extendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior |
| - Sem suporte de peso | Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa |
| - Com suporte de peso | Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou elevação da coxa |
| - Passada plantar | A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para a frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso |
| - Passada dorsal | O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo |
| - Coordenação dos membros anterior e posterior | Para todo passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam |
| - Ocasional | Menos do que ou igual à metade das vezes, $\leq$ 50% |
| - Freqüente | Mais do que a metade, mas não sempre, 51- 94% |
| - Consistente | Quase sempre ou sempre, 95 – 100% |
| - Instabilidade do tronco | Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco |

# ANEXO III
# CAPACIDADE LOCOMOTORA PELA
## ESCALA BBB DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

| | 2 Dias | | 1 Semana | | 2 Semanas | | 3 Semanas | | 4 Semanas | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Grupo 1 | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D |
| RATO 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 10 | 8 | 17 | 16 |
| RATO 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 5 | 4 | 7 | 10 | 12 |
| RATO 3 | 0 | 0 | 5 | 0 | 4 | 1 | 4 | 7 | 12 | 14 |
| RATO 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | ++++ | ++++ | - | - | - | - |
| RATO 5 | 0 | 0 | ++++ | ++++ | - | - | - | - | - | - |
| RATO 6 | 0 | 0 | 4 | 2 | 5 | 4 | 12 | 11 | 18 | 17 |
| RATO 7 | 0 | 0 | 3 | 5 | 7 | 6 | 12 | 14 | 15 | 17 |
| RATO 8 | 0 | 1 | 2 | 5 | 9 | 12 | 13 | 14 | 16 | 17 |
| Grupo 2 | | | | | | | | | | |
| RATO 1 | 0 | 0 | 4 | 4 | 7 | 4 | 12 | 13 | 16 | 17 |
| RATO 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 8 | 10 | 16 | 17 |
| RATO 3 | 1 | 1 | 1 | 4 | 7 | 8 | 14 | 15 | 15 | 15 |
| RATO 4 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 | 6 | 4 | 5 |
| RATO 5 | 0 | 1 | 5 | 4 | 10 | 8 | 12 | 13 | 11 | 13 |
| RATO 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | ++++ | ++++ | - | - | - | - |
| RATO 7 | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 | 3 | 6 | 8 | 10 | 13 |
| RATO 8 | 3 | 3 | 7 | 5 | 10 | 13 | 13 | 17 | 14 | 16 |
| Grupo 3 | | | | | | | | | | |
| RATO 1 | 1 | 0 | 4 | 2 | 9 | 7 | 14 | 12 | 17 | 16 |
| RATO 2 | 0 | 0 | ++++ | ++++ | - | - | - | - | - | - |
| RATO 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 | 5 | 7 | 11 | 12 |
| RATO 4 | 0 | 0 | 5 | 4 | 9 | 8 | 14 | 13 | 14 | 12 |
| RATO 5 | 0 | 0 | 7 | 5 | 14 | 12 | 16 | 14 | 16 | 17 |
| RATO 6 | 0 | 0 | 7 | 8 | 12 | 14 | 16 | 16 | 17 | 16 |
| RATO 7 | 0 | 1 | 11 | 9 | 14 | 13 | 15 | 16 | 19 | 18 |
| RATO 8 | 0 | 0 | ++++ | ++++ | - | - | - | - | - | - |
| Grupo 4 | | | | | | | | | | |
| RATO 1 | 0 | 1 | 3 | 6 | 2 | 6 | 12 | 13 | 15 | 16 |
| RATO 2 | 0 | 0 | ++++ | ++++ | - | - | - | - | - | - |
| RATO 3 | 0 | 0 | 3 | 5 | 3 | 6 | 4 | 8 | 12 | 11 |
| RATO 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 3 | 2 | 6 | 4 |
| RATO 5 | 1 | 0 | 3 | 7 | ++++ | ++++ | - | - | - | - |
| RATO 6 | 0 | 0 | 2 | 4 | 12 | 14 | 13 | 16 | 14 | 16 |
| RATO 7 | 0 | 0 | 3 | 4 | 8 | 9 | 14 | 16 | 13 | 16 |
| RATO 8 | 1 | 0 | 2 | 1 | 4 | 2 | 12 | 10 | 13 | 11 |
| | | | | | | | | | | |

Legenda
Grupo 1 – GM1
Grupo 2 – Câmara Hiperbárica
Grupo 3 – GM1 + Câmara Hiperbárica
Grupo 4 - Controle

++++ Óbito

# ANEXO IV

## COMPLICAÇÕES E
### ACHADOS RELEVANTES DE NECROPSIA

ÓBITOS:

GRUPO 1: 2 (1 INFECCÃO URINÁRIA, 1 SEM MOTIVO APARENTE)
GRUPO 2: 1 (INFECÇÃO URINÁRIA)
GRUPO 3: 2 (1 INFECÇÃO URINÁRIA, 1 SEM MOTIVO APARENTE)
GRUPO 4: 2 (1 INFECÇÃO URINÁRIA, 1 AUTOFAGIA)

TODOS APRESENTARAM URINA TURVA NAS PRIMEIRAS SEMANAS.

# ANEXO V

## ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

REGIÃO A: PROXIMAL AO SÍTIO DE LESÃO
REGIÃO B: NO SÍTIO DE LESÃO
REGIÃO C: DISTAL AO SÍTIO DE LESÃO

FATORES ESTUDADOS:
Necrose
Hemorragia
Hiperemia
Degeneração substância Nervosa (Degeneração Cística)
Infiltrado Celular

ÓBITOS

| | Necrose | Hemorragia | Hiperemia | Degeneração | Inf. Celular |
|---|---|---|---|---|---|
| GRUPO 1 | | | | | |
| 1A | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 1B | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 1C | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 2A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 2B | 1 | 0 | 2 | 3 | 1 |
| 2C | 1 | 0 | 3 | 3 | 1 |
| 3A | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 3B | 2 | 0 | 3 | 2 | 2 |
| 3C | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 4A | | | | | |
| 4B | | | | | |
| 4C | | | | | |
| 5A | | | | | |
| 5B | | | | | |
| 5C | | | | | |
| 6A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 6B | 1 | 0 | 2 | 3 | 1 |
| 6C | 1 | 0 | 2 | 3 | 1 |
| 7A | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 7B | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 7C | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| 8A | 1 | 0 | 3 | 2 | 1 |
| 8B | 3 | 0 | 3 | 3 | 1 |
| 8C | 3 | 0 | 3 | 3 | 1 |
| | | | | | |
| GRUPO 2 | | | | | |
| 1A | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 1B | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 1C | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | | | | | |
| 2A | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 2B | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| 2C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| 3A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 3B | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 3C | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | | | | | |
| 4A | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| 4B | 3 | 0 | 3 | 3 | 2 |
| 4C | 3 | 0 | 3 | 3 | 1 |
| | | | | | |
| 5A | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| 5B | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| 5C | 2 | 0 | 3 | 3 | 1 |
| | | | | | |
| 6A | | | | | |
| 6B | | | | | |
| 6C | | | | | |
| | | | | | |
| 7A | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 7B | 0 | 0 | 3 | 2 | 1 |
| 7C | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| 8A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 8B | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 8C | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| GRUPO 3 | | | | | |
| 1A | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 1B | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 1C | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| 2A | | | | | |
| 2B | | | | | |
| 2C | | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 3A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 3B | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| 3C | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| 4A | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| 4B | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| 4C | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| 5A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 5B | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 5C | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| 6A | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 6B | 2 | 0 | 3 | 3 | 2 |
| 6C | 2 | 0 | 3 | 3 | 2 |
| | | | | | |
| 7A | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 7B | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| 7C | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | | | | | |
| 8A | | | | | |
| 8B | | | | | |
| 8C | | | | | |
| | | | | | |
| GRUPO 4 | | | | | |
| 1A | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 1B | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 1C | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| | | | | | |
| 2A | | | | | |
| 2B | | | | | |
| 2C | | | | | |
| | | | | | |
| 3A | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 3B | 1 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| 3C | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| | | | | | |
| 4A | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 4B | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| 4C | 2 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| | | | | | |
| 5A | | | | | |
| 5B | | | | | |
| 5C | | | | | |
| | | | | | |
| 6A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 6B | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 6C | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| 7A | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 7B | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 7C | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| | | | | | |
| 8A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 8B | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 8C | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |

# ANEXO VI

## PESO E IDADE DOS ANIMAIS

| Rato | Peso (g) | Idade (semanas) | |
|---|---|---|---|
| 1 | 381 | 21 | |
| 2 | 321 | 20 | |
| 3 | 372 | 21 | |
| 4 | 368 | 20 | Grupo 1 |
| 5 | 364 | 20 | |
| 6 | 378 | 20 | |
| 7 | 419 | 21 | |
| 8 | 388 | 21 | |
| 9 | 398 | 21 | |
| 10 | 374 | 21 | |
| 11 | 312 | 20 | |
| 12 | 390 | 21 | Grupo 2 |
| 13 | 388 | 21 | |
| 14 | 321 | 20 | |
| 15 | 376 | 21 | |
| 16 | 354 | 20 | |
| 17 | 324 | 20 | |
| 18 | 367 | 21 | |
| 19 | 323 | 20 | |
| 20 | 310 | 20 | |
| 21 | 302 | 20 | Grupo 3 |
| 22 | 361 | 21 | |
| 23 | 375 | 21 | |
| 24 | 323 | 20 | |
| 25 | 314 | 20 | |
| 26 | 309 | 20 | |
| 27 | 348 | 20 | |
| 28 | 344 | 21 | Grupo 4 |
| 29 | 341 | 21 | |
| 30 | 392 | 21 | |
| 31 | 387 | 21 | |
| 32 | 364 | 20 | |

# 8. REFERÊNCIAS

# 8 REFERÊNCIAS

Albin MS, White RJ. Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *Crit Care Clin.* 1987;3(3):441-52.

Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *JAMA.* 1911;57(11):878-80.

Allen AR. Remarkes on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *J Nerv Ment Dis.* 1914;41(3):141-7.

Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1999;44(5):1027-40.

Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg.* 1982;56(1):106-13.

Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1985;2(4):257-67.

Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma: I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest.* 1978;39(3):236-53.

Barros Filho TEP, Taricco MA, Oliveira RP, Greve JM, Santos LCR, Napoli MMM. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo da coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1990;45(3):123-6.

Basso DM, Bresnahan JC, Beattie MS. Incomplete recovery after spinal cord contusion is associeted with a nearly complete loss of vestibulospinal system (VSS) and long descending propriospinal neurons (LDPN) in rats. *Soc Neurosci.* 1993;19:541.

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

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weigth-drop device versus transection. *Exp Neurol.* 1996;139(2):244-56.

Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma.* 1992;9(3):197-217.

Blight AR, Zimber MP. Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001;2(6):801-8.

Borzeix MG, Cahn R Cahn J. Effect of brain gangliosides on early and late consequences of a transient incomplete forebrain ischemia in the rat. Pharmacology. 1989;38(3):167-76.

Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, et al. Rifkinson N. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury–Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1985;63(5):704-13.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, et al. Methylprednisolone or naloxene treatment after acute spinal cord injury: 1- year

follow-up data. Results of the second National Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1992;76(1):23-31.

Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg.* 1993;79(4):500-7.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. 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. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA.* 1997;277(20):1597-604.

Bracken MB, Sheopard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow-up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg.* 1998;89(5):699-706.

Bracken MB. Pharmacological interventions for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;2:CD001046.

Bracken MB. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S47-54.

Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1983;59(2):256-61.

Breasted JH. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. Chicago: University of Chicago Press. 1972;468-73.

Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol.* 1997;148(2):475-94.

Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD 3rd, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol.* 1987;95(3):548-70.

Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details in from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol.* 1993;59:75-89.

Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB. Methilprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol.* 1996;138(2):261-76.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. COBEA. Legislação e ética, 1999 [online]. Disponível em: http://www.meusite.com.br/COBEA/etica.htm.

Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97-111.

Covarrubias LG, Rodríguez ECS. Terapia com oxigenación hiperbárica: conceptos básicos.2002.
http://www.galenico.com/publicaciones/avances/vol2nº6/terapia_oxigenacion.shtml

Cristante AF, Tsanaclis AM, Santos CV, Barros EMKP, Marcon RM, Oliveira RP, et al. Estudo do implante e viabilidade de células do sistema nervoso central fetal no tratamento da lesão de medula espinal em ratos. Folha Ortop Traumatol. 2002;11(34).

Cristante AF, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR, et al. Daci K. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. Spinal Cord. 2009;47(6):458-63.

Cristante A F, Barros Filho TEP, Tetsui N, Mendroni A, Caldas JG, Camargo AJS, et al. Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. Spinal Cord. 2009; 47(10): 733-8.

Cuello AC, Garofalo L, Kenigsberg RL, Maysinger D. Ganglioside potentiate in vivo and in vitro effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(6):2056-60

Debrovner CH. Stem cells, the miraculous cells rooted in controversy [online]. New York: Society for Ethical Culture; 2000. Avaliable from: http://www.nysec.org/addresses/stem_cells.html.

Delamarter RB, Coyle J. Acute management of spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg.* 1999;7(3):166-75.

De La Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evaluation of permanent experimental spinal cord trauma. *Neurology*.1975;25(6):508-14.

De La Torre JC, Boggan JE. Neurophysiological recording in rat spinal cord trauma *Exp Neurol.* 1980;70(2):356-70.

De La Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine (Phila Pa 1976).* 1981;6(4):315-35.

De La Torre JC. Spinal cord injuries models. *Prog Neurobiol.* 1984;22(4):289-344.

Desola J, Crespo A, Garcia A, Salinas A, Sala J, Sánchez U. Indicaciones y contraindicaciones de la oxigenoterapia hiperbárica. JANO Medicina, v LIV, n1260, 1998.

Dohrmann GJ. Experimental spinal cord trauma. A historical review. *Arch Neurol.* 1972;27(6):468-73.

Dohrmann GJ, Panjabi MM, Wagner FC Jr. An apparatus for quantitating experimental spinal cord trauma. *Surg Neurol.* 1976;5(5):315-8.

Dohrmann GJ, Panjabi MM. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg Neurol.* 1976;6(5):263-7.

Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1969;30(6):693-7.

Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma.. *J Neurosurg.* 1971;35(6):700-8.

Ducker TB, Salcman M, Perot PL Jr, Ballantine D. Experimental spinal cord trauma, I. Correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg Neurol.* 1978;10(1):60-3.

Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, et al. Acute spinal cord injury, part II: contemporary pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol.* 2001;24(5):265-79.

Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. *J Neurosurg.* 1971;35(3):277-86.

Ford RWJ. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J Neurosurg.*1983; 59(2):268-75.

Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol.* 1985;88(1):123-34.

Galvão PEC. Avaliação funcional e histológica do efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular contusa [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Gamache FW, Myers RAM, Ducker TB, Cowley RA. The clinical application of hyperbaric oxygen therapy in spinal cord injury: a preliminary report. Surg Neurol. 1981;15(2):85-7

Gebrin AS, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TEP. Intervenções farmacológicas no trauma raquimedular: uma nova terapêutica. *Acta Ortop Bras.* 1997;5(3):123-36.

Gebrin AS, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TEP, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. Rev Bras Ortop. 1997;32(2):103-8.

Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal-cord injury: a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med.* 1991;324(26):1829-38.

Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D. The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. Spine (Phila Pa 1976). 2001;26(24 Suppl): S87-98.

Goldberger ME, Bregman BS, Vierck CJ Jr., Brown M. Criteria for assessing recovery of function after spinal cord injury: behavioral methods. *Exp Neurol.* 1990;107(2):113-7.

Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose response and time-action analysis. *J Neurosurg.* 1984; 61(1):124-30.

Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1992;76(1):13-22.

Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *J Spinal Cord Med.* 2001;24(3):142-6.

Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg Neurol.* 1975;4(6):531-6.

Hita RM. Análise funcional e histológica da ação da neurotropina-4 sobre a lesão medular em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Histórico da Câmara Hiperbárica no PSC-HCFMUSP. Jornal do Trauma, ano 5, março de 1993.

Histórico do Hiperbarismo. Http://www.hiperbárica.com.br/bibliogra/bibliogr.htm

Holbach KH, Wassmann H, Linke D. The use of hyperbaric oxygenation in the treatment of spinal cord lesions. Eur Neurol. 1977; 16(1-6): 213-21

Holdsworth F. Fractures, dislocations and fracture-dislocations of the spine. *J Bone Joint Surg* Am. 1970;52(8):1534-51.

Hughes JT. The Edwin Smith Surgical Papyrus: an analysis of the first case reports of spinal cord injuries. *Paraplegia.* 1988;26(2):71-82.

Hurlbert RJ. The role steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S39-46.

Janssen L, Hansebout RR. Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatments. A review. Spine (Phila Pa 1976). 1989;14(1):23-32.

Jeffery ND, Blakemore WF. Spinal cord injury in small animals 2. Current and future options for therapy. *Vet Rec.* 1999;145(7):183-90.

Jones RF, Unsworth IP, Marossezeky JE. Hyperbaric oxygen and acute spinal cord injuries in humans. Med J Aust. 1978;2(12):573-5.

Kakulas BA. Pathology of spinal injuries. *Cent Nerv Sys Trauma.* 1984;1(2):117-29.

Kelly DL Jr, Lassiter KRL, Calogero JA, Alexander E Jr. Effects of local hypothermia and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. *J Neurosurg.* 1970;33(5):554-63.

Kelly DL Jr, Lassiter KRL, Vongsvivut A, Smith JM. Effects of hyperbaric oxygenation and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. *J Neurosurg.* 1972;36(4):425-9.

Kuchner EF, Hansebout RR. Combined steroid and hypothermia treatment of experimental spinal cord injury. *Surg Neurol.* 1976;6(6):371-6.

Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol.* 1992;116(1):40-51.

Legos JJ, Gritman KR, Tuma RF, Young WF. Coadministration of methylprednisolone with hypertonic saline solution improves overall neurological function and survival rates in a chronic model of spinal cord injury. *Neurosurgery*. 2001;49(6):1427-33.

Lohse DC, Senter HJ, Kauer JS, Wohns R. Spinal cord blood flow in experimental transient paraplegia. *J Neurosurg.* 1980;52(3):335-45.

Marcon RM. *Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

McVeigh JF. Experimental cord crushes with special reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cords affected. *Arch Surg.* 1923;7:573-600.

Means ED, Anderson DK, Waters TR, Kalaf L. Effect of methylprednisolone in compression trauma the feline spinal cord. *J Neurosurg.* 1981;55(2):200-8.

Merola A, O'Brien MF, Castro BA, Smith DA, Eule JM, Lowe TG, et al. Histologic characterization of acute spinal cord injury treated with intravenous methylprednisolone. *J Orthop Trauma.* 2002;16(3):155-61.

Morrison DS, Kirkby RD. Medicina hiperbárica: uma breve história. http://www.geocities.com/quackwatch/hm01.hmtl

Murakami N, Horinouchi T, Sakurai M, Ejima Y, Matsukawa S, Kato M, et al. Hyperbaric oxygen therapy given 30 minutes after spinal cord ischemia attenuates selective motor neuron death in rabbits. Crit. Care Med. 2001;29(4):814-8.

Narazaki D, Barros Filho TEP, Oliveira CRGC, Cristante AF, Iutaka AS, Marcon RM, et al. Spinal cord regeneration: the action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. Clinics (São Paulo). 2006;61(5):453-60.

New York University Medical Center. Impactor. NYU Spinal cord contusion system. Operation manual. Impactor software version 7.0. New York; 1993.

Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol.* 1985;88(1):135-49.

Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. *Exp Neurol.* 1987;95(2):530-3.

Nockels R, Young W. Pharmacologic strategies in the treatment of experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1992**;**9(Suppl 1):211-7.

Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci.* 1998;18(10):3803-15.

Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assesment of motor experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg.* 1977;47(4):577-81.

Rivlin AS, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J. Neurosurg.* 1978;49(6):844-53.

Rodrigues NR. *Padronização da lesão medular espinal em ratos Wistar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.

Sabel BA, Gottlieb J, Schneider GE. Exogenous GM-1 gangliosides protect against retrograde degeneration following posterior neocortex lesions in developing hamsters. Brain Res. 1988;459(2):373-80.

Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 1996;76(2):319-70.

Shiokawa O, Fujishima M, Yanai T, Ibayashi S, Ueda K, Yagi H. Hyperbaric oxygen therapy in experimentally induced acute cerebral ischemia. Undersea Biomed Res. 1986;13(3):337:44.

Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury: a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord* . 2000;38(5):273-86.

Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma. 2001;*18(5):533-43.

Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1953;70(6):813-9.

Tator CH, Deecke L. Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma. *J Neurosurg.* 1973;39(1):52-64.

Tator CH, Rowed IW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453-64.

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

Toffano S, Savoini O, Moroni F, Lombardi GO, Calza L, Agnati LF. GM-1 ganglioside stimulates the regeneration of dopaminergic neurons in the central nervous system. Brain Res. 1983;261(1):163-6.

Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop.* 1999;34(2):85-9.

Wagner FC Jr, Dohrmann GJ, Bucy PC. Histopathology of transistory traumatic paraplegia in the monkey. *J Neurosurg.* 1971;35(3):272-6.

Walker JB, Harris M. GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. Neurosci Lett. 1993;161(2):174-8.

Woodard JS, Freeman LW. Ischemia of the spinal cord; an experimental study. *J Neurosurg.* 1956;13(1):63-72.

Yeo JD, Payne W, Hinwood B, Kidman AD. The experimental contusion injury of the spinal cord in sheep. *Paraplegia.* 1975;12(4):279-98.

Yeo, JD, McKenzie B, Hindwood B, Kidman, A. Treatment of paraplegic sheep with hyperbaric oxygen. Med J Aust. 1976;1(15):538-40.

Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep´s spinal cord. *Paraplegia.* 1977;14(4):276-85.

Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J*. 1999;40(4):313-20.

Young W, Flamm ES, Demopoulos HB, Tomasula JJ, DeCrescito V. Effect of naloxone on posttraumatic ischemia in experimental spinal contusion. *J Neurosurg.* 1981;55(2):209-19.

Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potencials and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg.* 1982;57(5):667-73.