

ROBERTO MINORU HITA

Análise funcional e histológica da ação da
neurotropina-4 sobre a lesão medular em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Dr. Reginaldo Perilo Oliveira

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Hita, Roberto Minoru

Análise funcional e histológica da ação da neurotropina-4 sobre a lesão medular em ratos / Roberto Minoru Hita. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Reginaldo Perilo Oliveira.

Descritores: 1.Fatores de crescimento neural 2.Traumatismos da medula espinal
3.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-137/08

DEDICATÓRIA



A meu avô, **Morihachi**, *in memoriam*,
pela herança de dedicação.

A minha querida avó, **Tokiko**, *in memoriam*,
pelo imenso carinho.

A meus pais, **Kanichi** e **Tamie**,
pelo esforço e incondicional incentivo.

A meu irmão, **Eduardo**,
pelo apoio e suporte.

A **Cinara**, minha esposa,
pelos anos de compreensão e felicidade

A **Bernardo**, meu filho,
seu amor e carinho
têm ampliado meus horizontes...

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Reginaldo Perilo Oliveira**, no verdadeiro sentido da acepção da palavra, meu orientador, minha eterna gratidão pelo caminho na vida acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho**, pelo impulso e incentivo no caminho da cirurgia da coluna.

À **Profa. Dra. Cláudia Regina G. C. Mendes de Oliveira**, pelo inestimável trabalho nos exames anatopatológicos.

Ao **Engenheiro Tomaz Puga Leivas**, pelo auxílio efetivo na elaboração deste trabalho.

Aos funcionários e colaboradores do LETRAN, **Sra. Jane Donini dos Santos Ferreira**, **Sr. Gustavo Bispo dos Santos**, **Sra. Veroneide de Andrade Folha** e **Sr. Carlos Fernando Saito**, pelo apoio na execução deste trabalho.

Aos **Drs. Raphael Martus Marcon** e **Douglas Narazaki**, pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

Aos **Drs. Fernando Lauda**, **José Saggin**, **Osvandré Lech**, **Paulo Bertol**, **Tercildo Knop**, meus preceptores de residência médica, pelo caminho da ortopedia.

Ao **Dr. João Manoel L. Sperry**, pela parceria e amizade desde os tempos da Faculdade.

Aos colegas de residência no Instituto de Ortopedia e Traumatologia de Passo Fundo.

Ao **Dr. José Luiz M. Bernardi**, *in memoriam*, pela auxílio e a oportunidade

Ao **Dr. Nelson Franco Filho**, colegas ortopedistas e residentes do Hospital Universitário de Taubaté, pelo incentivo e estímulo na vida acadêmica.

E a todos aqueles que indiretamente colaboraram neste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Normalização adotada

Dissertação 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 Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO



SUMÁRIO

	página
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xiii
Resumo.....	xv
<i>Summary</i>	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
3 MÉTODOS	28
4 RESULTADOS.....	48
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	76
7 ANEXOS	78
8 REFERÊNCIAS.....	83

LISTAS



FIGURAS

	página
Figura 1 - Ratos da linhagem Wistar	30
Figura 2 - NYU Impactor® (<i>New York University Spinal Cord Contusion Sistem - Impactor</i>)	34
Figura 3 - Aspectos da laminectomia	36
Figura 4 - Aspectos da laminectomia	36
Figura 5 - Contusão medular por queda livre	38
Figura 6 - Manobra de Credé	39
Figura 7 - Condição <i>ad libitum</i>	40
Figura 8 - Aspecto da avaliação da Escala BBB.....	42
Figura 9 - Aspecto da medula fixada	44

TABELAS

	página
Tabela 1 - Pontuações da escala BBB – grupo Controle	49
Tabela 2 - Pontuações da escala BBB – grupo Tratamento	49
Tabela 3 - Distribuição dos resultados da escala BBB.....	50
Tabela 4 - Distribuição dos resultados da avaliação de Necrose – Cranial.....	52
Tabela 5 - Distribuição dos resultados da avaliação de Necrose - Lesão.....	52
Tabela 6 - Distribuição dos resultados da avaliação de Necrose - Caudal.....	53
Tabela 7 - Distribuição dos resultados da avaliação de Hiperemia – Cranial	54
Tabela 8 - Distribuição dos resultados da avaliação de Hiperemia – Lesão	54
Tabela 9 - Distribuição dos resultados da avaliação de Hiperemia – Caudal	55
Tabela 10 - Distribuição dos resultados da avaliação de Degeneração da Substância Nervosa – Cranial	56
Tabela 11 - Distribuição dos resultados da avaliação de Degeneração da Substância Nervosa - Lesão	56
Tabela 12 - Distribuição dos resultados da avaliação de Degeneração da Substância Nervosa - Caudal	57
Tabela 13 - Distribuição dos resultados da avaliação de Infiltrado celular - Cranial	58

Tabela 14 -	Distribuição dos resultados da avaliação de Infiltrado celular - Lesão	58
Tabela 15 -	Distribuição dos resultados da avaliação de Infiltrado celular - Caudal	59
Tabela 16 -	Pontuações dos escores área cranial – grupo Controle	60
Tabela 17 -	Pontuações dos escores área cranial – grupo Tratamento.....	60
Tabela 18 -	Distribuição dos resultados da avaliação do Escore Final - Cranial	61
Tabela 19 -	Pontuações dos escores da área lesão – grupo Controle	62
Tabela 20 -	Pontuações dos escores área lesão – grupo Tratamento.....	62
Tabela 21 -	Distribuição dos resultados da avaliação do Escore Final - Lesão	63
Tabela 22 -	Pontuações dos escores área caudal – grupo Controle.....	64
Tabela 23 -	Pontuações dos escores área caudal – grupo Tratamento	64
Tabela 24 -	Distribuição dos resultados da avaliação do Escore Final – Caudal	65

RESUMO



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. 93p.

As pesquisas em lesão medular tiveram um avanço significativo nas últimas duas décadas. Várias substâncias têm sido testadas, dentre elas, os fatores neurotróficos que são proteínas que auxiliam na maturação e desenvolvimento do sistema nervoso. O objetivo deste estudo foi conduzir testes que propiciem a análise dos efeitos da recuperação funcional locomotora e regeneração axonal em ratos submetidos a testes experimentais com a utilização da substância neurotropina-4. O estudo consistiu de 30 ratos adultos jovens, da raça *Wistar*, que foram submetidos à lesão medular ao nível de T_x, provocado por um aparelho denominado NYU *impactor*. Os ratos foram divididos em dois grupos de 15 ratos cada, denominados de grupo controle e grupo tratamento, que receberam aplicação de água destilada e 1µg de neurotropina-4, respectivamente. Estes foram avaliados funcionalmente pela escala BBB e submetidos à análise histológica. Concluiu-se que a neurotropina-4 promove a recuperação locomotora funcional e diminui os efeitos secundários da lesão medular, comparativamente ao grupo controle.

Descritores: fatores de crescimento neural, traumatismo da medula espinal, ratos Wistar

SUMMARY

Hita RM. *Functional and histological analysis of the neurotrophin-4 on medullar injury of rats*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 93p.

Research into spinal cord injury has advanced significantly over the past two decades. Many substances have been tested, including the neurotrophics factors, which are proteins that aid in the maturation and development of the nervous system. The objective of this study was to conduct tests that provide the analysis of the effects of the locomotor functional recovery and axonal regeneration in rats subjected to experimental tests with the use of the substance neurotrophin-4. The study consisted of thirty young adult rats, Wistar race, which received T_X level of spinal cord injury through a device called NYU impactor. The rats were divided into two groups of fifteen rats each, called the control group and treatment group, which received application of distilled water and 1 µg Neurotrophin-4, respectively. They were evaluated functionally by the BBB scale and submitted to the histological analysis. It was concluded that the Nt-4 promotes the recuperation of the locomotor function and reduces the side effects of spinal cord injury, compared to the control group.

Descriptors: nerve growth factors, spinal cord trauma, rats Wistar

1 INTRODUÇÃO



A evolução e a diferenciação do ser humano em relação às demais espécies ocorreram por meio do desenvolvimento e crescimento do sistema nervoso central, ou seja, o cérebro reconhecidamente maior no *homo sapiens* em relação a seus ancestrais, e a transição da condição de quadrúpede para bípede, que proporcionaram ao homem a liberdade de utilizar os membros superiores para outras funções. No entanto, eventos externos, como o trauma raquimedular lesionando a medula espinal, podem afetar os indivíduos e impedir o uso dos membros locomotores.

As lesões medulares, além de danos no sistema nervoso, também causam impacto em diferentes sistemas e órgãos do corpo humano. As seqüelas têm impactos mais acentuados no controle voluntário motor, na sensibilidade, nos sistemas urológico, gastrointestinal e sexual, além de alterações menores dos sistemas respiratório, cardiovascular e musculoesquelético (Thuret et al., 2006; Vialle et al., 2007).

Nesta situação, o número de indivíduos é considerável. Dados estatísticos, nos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com o Centro Estatístico Nacional para Lesões da Medula Espinhal, revelam que existem onze mil novos casos de lesados medulares por ano. Destes, 80% são homens, variando em uma faixa etária de 38 anos, sendo as maiores causas os acidentes automobilísticos, perfazendo um total de 50,4%. O número de pessoas com lesão da medula espinal (LME) nos EUA é estimado em 250.000. Estes dados levaram os pesquisadores a declarar “A cada hora do dia, uma pessoa sofre lesão da medula espinal” (*Miami Project for Cure of Paralysis*).

No Brasil, dados epidemiológicos de 2004, coletados da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo e Datasus, estimaram a ocorrência de 1.950 novos casos de lesados medulares no Estado de São Paulo e de 8.950 no Brasil (Molina, 2006).

Por séculos, a lesão medular era considerada definitiva e irreversível, haja vista a descrição do famoso papiro egípcio traduzido por Edwin Smith, “- *Aquele que tenha deslocado vértebra do pescoço e não movimenta seus braços e suas pernas, com perda de urina, você pode afirmar: é uma lesão que não deve ser tratada*”, (Amar e Levy, 1999; Barros Filho, 2000). Assim, perdurou por séculos, até o começo da Segunda Grande Guerra, quando fatores, como a disponibilidade de antibióticos mais eficazes, a melhor compreensão das complicações e o surgimento de centros especializados em tratamento de lesados medulares começaram a mudar este cenário (Grady, 1999; Houle e Tessler, 2003).

Há cerca de duas décadas houve significativos avanços nas pesquisas, com resultados promissores em ensaios experimentais; entretanto, com baixa reprodutibilidade em ensaios clínicos com seres humanos (Kwon et al., 2005; Bradbury e McMahon, 2006). Atualmente, as abordagens do tratamento das lesões medulares traumáticas resumem-se na estabilização e na descompressão cirúrgica, no uso de agentes farmacoterápicos e em métodos biológicos e meios físicos (Dietz e Curt, 2006).

Após a lesão primária mecânica, uma cascata de eventos secundários endógenos ocorre finalizando com a morte neuronal. A fisiopatologia desta cascata celular está muita bem documentada e esforços para impedir esses eventos têm sido pesquisados incessantemente. Destes, as pesquisas têm se concentrado nos agentes

farmacoterápicos, em especial destaque aos agentes neurotróficos (Blesch, 2006; Reichardt, 2006).

Os fatores neurotróficos (FN) são proteínas que exercem considerável influência em um largo espectro de processos, envolvendo o desenvolvimento e a maturação do sistema nervoso, que incluem a sobrevivência neuronal, o crescimento axonal, a plasticidade sináptica e os neurotransmissores (Gillespie, 2003; Sahenk, 2006; Blesch, 2006). O primeiro neurotrófico a ser identificado foi o fator de crescimento nervoso (NGF), descoberto por Levi-Montalcini e Hamburger há cinco décadas. Após houve uma dezena de outros fatores neurotróficos.

A ação dos fatores neurotróficos nas lesões medulares sustenta-se em três teorias: (1) a lesão provoca uma diminuição na disponibilidade de FN pela conseqüente degeneração dos neurônios que respondem aos fatores, assim a administração exógena de FN poderia reverter à deficiência e melhorar a função neuronal; (2) a lesão produz uma diminuição quantitativa e qualitativa de receptores para um FN e os neurônios ativados por eles, desta forma, a administração de doses suprafisiológicas poderia produzir um incremento no número de receptores ativados e (3) a administração de FN poderia impedir um dano secundário, como a apoptose. (Moris e Vega, 2003).

A família dos FN é formada pelo fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (Nt-4/5), neurotrofina-6/7 (Nt-6/7) (Huang e Reichardt, 2001; Moris e Vega, 2003). Estas moléculas atuam sobre as células que respondem a elas por meio de dois tipos

diferentes de receptores, um de alta afinidade, a tirosinoquinase (trk) e um de baixa afinidade, o p75.

A trk tem identificado três tipos de receptores com afinidade, mas não completamente específicos. O trkA é receptor fisiológico de NGF; trkB, de BDNF e Nt4/5 e trkC, do NT-3 (Gillespie, 2003).

Assim, o objetivo deste trabalho, seguindo a linha de pesquisa do Letran é conduzir testes que propiciem a análise dos efeitos da recuperação funcional locomotora e regeneração axonal em ratos submetidos a testes experimentais com a utilização da substância neurotropina-4.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Schamaus (1890), apud Yeo et al. (1975), foi o primeiro pesquisador a realizar um estudo experimental de lesão medular em coelhos, por intermédio da aplicação de um golpe sobre uma tábua apoiada no dorso dos animais. Observou áreas de degeneração e cavitação no interior da medula espinal.

Kirchgasser (1897), Scagliosi (1898), apud Dorhmann et al. (1976), estudaram as alterações na medula espinal de coelhos submetidos a trauma na região dorsal e descrevem a degeneração na bainha de mielina e das células neurais dos cornos anteriores da medula espinal, não havendo evidências de hemorragia intramedular e fraturas da coluna cervical.

Allen (1911) foi um dos primeiros a criar um modelo experimental de lesão medular em cães, de forma reprodutível e quantificável de lesão medular direta por queda de peso sobre a dura-máter, modelo denominado de “queda de peso”, produzindo uma lesão dinâmica, quantificada, o peso em gramas (g) e altura em centímetros (cm), e os resultados dos testes expressados em g/cm.

Allen (1914) relatou que um impacto de queda de 240g/cm produz uma lesão parcial da medula com recuperação melhor em relação àquela produzida por 400g/cm. Observou a presença de edema e hemorragia na substância branca e cinzenta da medula espinal nos primeiros 15 minutos. Após quatro horas, havia evidência de edema nos axônios das colunas lateral e posterior da substância branca da medula. Descreveu que a redução da pressão intramedular por meio de mielotomia favorece a recuperação clínica dos animais, supondo que o aumento da

pressão intramedular pelo edema e pela hemorragia agrave a necrose isquêmica após a lesão traumática original.

McVeigh (1923) produziu lesão medular por compressão digital em cães ao nível T_{VII} e T_{VIII} e em cadáveres frescos com a mesma técnica. Observou edema nas colunas anterior e lateral, nas primeiras oito horas, que progride até o segundo dia. Já a hemorragia está presente na substância cinzenta, acima e abaixo da lesão. Concluiu que as lesões medulares ocorridas em cães são similares às obtidas em cadáveres, sobretudo quanto às alterações mecânicas.

Levi-Montalcini e Hamburger (1951), apud Kwon et al. (2005), foram os primeiros pesquisadores a identificar um fator neurotrófico, o fator de crescimento neural (*nerve growth factor*, NGF).

Tarlov et al. (1953) realizaram estudo experimental em 54 cães, produzindo uma lesão por compressão medular gradual por um balão, após laminectomia no nível torácico médio. Apresentaram um método de avaliação funcional locomotora em que se atribuíam valores de zero a cinco para a graduação dos movimentos dos animais e concluíram que a recuperação funcional depende da duração do tempo de compressão selecionado para produzir a lesão.

Woodward e Freemann (1956), em estudo experimental utilizando 27 cães, produziram isquemia medular por meio da secção dos vasos sanguíneos junto aos pares das raízes nervosas de T_{VI} a T_{XI}. Verificaram histologicamente que, na isquemia leve, há perda de neurônios no corno dorsal e perda da substância cinzenta

na porção posterior e, na isquemia grave, há necrose e redução significativa no número de neurônios e mielomalácia.

Em estudo experimental, Ducker e Hamit (1969) avaliaram quatro grupos de cães submetidos à lesão medular por queda de peso. No grupo um, não receberam nenhum tratamento específico; no grupo dois, receberam hipotermia local com solução salina a 0°; no grupo três, receberam dexametasona intramuscular e no grupo quatro, receberam metilprednisolona intratecal. A análise da recuperação neurológica foi realizada por meio da escala de Tarlov. Os autores concluíram que os grupos de hipotermia e dexametasona tiveram recuperação funcional melhor.

Em estudo clínico prospectivo com cerca de mil pacientes com lesão medular traumática, Holdsworth (1970) descreveu a anatomia, os mecanismos das lesões, as características radiográficas e diagnósticas das fraturas. Defendeu que a presença de sensibilidade sacral e a presença de função motora abaixo do nível da lesão são indicativas de lesão medular incompleta. Preconiza o tratamento cirúrgico das fraturas instáveis com redução aberta e fixação interna, a fim de alinhar e descomprimir a coluna e proporcionar melhores condições de recuperação neurológica.

Ducker e Kindt (1971) realizaram estudo experimental com macacos *Rhesus* submetidos à lesão medular por queda de peso de 10, 15, 20 e 25g a uma altura de 20cm. Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos de oito macacos cada. Estes, por sua vez, subdivididos em dois subgrupos de quatro animais, classificados conforme o tempo de eutanásia, os agudos, que foram sacrificados nas primeiras seis horas pós-lesão e o subgrupo dos subagudos, eutanasiados com seis

dias pós-lesão. A análise foi realizada por microscopia e avaliação locomotora funcional. Os autores concluíram que as mudanças histopatológicas são 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, o animal recupera-se e as mudanças são somente centrais. Em traumas moderados, com paresia significativa, as mudanças também envolvem a substância branca adjacente. Em traumas graves com resultante paraplegia, as mudanças envolvem toda a substância medular.

Fairholm e Turnbull (1971) realizaram estudo experimental com 34 coelhos e cinco cães submetidos à contusão medular por queda de peso. Os animais foram sacrificados em tempos variáveis, desde imediatamente até 14 dias após a lesão. A avaliação foi feita por estudo microangiográfico de sete a 14 dias. Definiram duas zonas de lesão: zona um, localizada na porção pósterocentral da medula, na qual os capilares perdem progressivamente a capacidade de condução de sangue, e na zona dois, ao redor da zona um, tinha um padrão microvascular normal. Concluíram que a recuperação dos neurônios e axônios danificados depende da preservação da microcirculação.

De la Torre et al. (1975) estudaram 32 cães submetidos à lesão medular por queda de peso, divididos em quatro grupos de oito animais. Foram testados: solução salina, manitol, dexametasona e dimetil-sulfoxido. Concluíram que a solução salina e manitol não melhoram a recuperação das lesões. Já os animais tratados com a dexametasona e a dimetil-sulfoxido, apresentaram melhora parcial.

Dohrmann et al. (1976) realizaram estudo experimental com 15 gatos submetidos à lesão medular por queda de peso ao nível de T_V a T_{VII}. Realizaram um traumatismo de 400g/cm, divididos em cinco grupos: 5g x 80 cm, 10g x 40 cm, 20g x 20 cm, 40g x 10 cm e 80g x 5 cm. Compararam os parâmetros biomecânicos e o volume de lesão entre os cinco grupos, observando que o volume de lesão é diferente entre os cinco grupos. A quantidade de energia transferida à medula é dependente de vários fatores, como a massa do impactor, velocidade e altura, sendo a energia absorvida cem vezes maior no grupo quatro em relação ao grupo um.

Yeo et al. (1977) estudaram os resultados das mudanças patológicas associadas com a necrose central pós-traumática em ovelhas submetidas à lesão medular que foram divididas em quatro grupos: controle, e outros grupos tratados com metilprednisolona, oxigênio hiperbárico e alfa metil paratirosina. No grupo controle, os resultados foram intensa necrose da substância cinzenta central, microcistos e desmielinização ao redor da substância branca com vários graus de fibrose e gliose. Apesar da intensa degeneração, havia recuperação motora significativa com todos os animais desse grupo, recuperando pelo menos os movimentos antigravitacionais. No grupo tratado com metilprednisolona intratecal, o grau de degeneração cística central e desmielinização foram semelhantes ao grupo controle. No grupo tratado com alfa metil paratirosina, houve recuperação motora significativa e menor degeneração cística central. Nos animais tratados com oxigênio hiperbárico, houve melhora significativa da recuperação motora por um período de oito semanas depois da lesão e menor degeneração cística central e menor formação de microcistos nas colunas anterior e lateral. A possível aplicação clínica da alfa metil paratirosina é descartada em razão de sua toxicidade renal em paciente lesado medular.

Balentine (1978) estudou a lesão necrótica da medula espinal em ratos adultos submetidos à lesão experimental pelo modelo de queda de peso, pela análise da mudança patológica seqüencial das alterações dos vasos sanguíneos e da necrose tecidual da medula espinal em períodos de tempo que variavam de 3 a 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 8 horas e 1 semana, após a lesão. O estudo confirmou a evolução seqüencial do desenvolvimento de necrose primeiro na substância cinzenta e depois na substância branca. A observação dos vasos sanguíneos demonstrou que a necrose é devida à ruptura dos vasos sanguíneos encontrados imediatamente após o trauma.

Rawe et al. (1978) estudaram a fisiopatologia da medula espinal danificada de gatos. Observaram o aumento da área hemorrágica intramedular quando a pressão arterial sistêmica era elevada, bem como sua diminuição em regimes de baixa pressão arterial, demonstrando, assim, a perda da auto-regulação vasomotora na medula espinal lesada, potencialmente à propagação do dano tissular.

Lohse et al. (1980) estudaram experimentalmente 24 gatos submetidos à lesão medular contusa com forças de 100 g.cm a 260g. cm ao nível de T_v, sendo o fluxo sanguíneo da medula medido pelo *clearance* de hidrogênio antes e após a lesão. Demonstraram lesões irreversíveis dentro da primeira hora após o trauma na substância cinzenta da medula espinhal. Verificaram ainda, que a substância branca poderia resistir a mais de 72 horas de isquemia, em razão de sua menor taxa metabólica.

De la Torre (1981), em artigo de revisão sobre estratégias de pesquisa básica e aplicada sobre lesão medular, analisa os modelos experimentais, as técnicas de

avaliação de lesão 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: brotamento colateral, plasticidade e regeneração axonal. O autor referiu que a regeneração pode ser conseguida por meio de transplante de tecido neural e uso de fatores de crescimento neural. Citou a existência de evidências de sobrevivência e crescimento dessas células.

Wrathall et al. (1985), em estudo experimental em 51 ratos *Sprague-Dawley* submetidos à lesão medular por queda de peso (10g), com alturas de: 2,5, 5,0, 7,5, 10 e 17,5 cm, avaliaram a área lesada quatro semanas após a lesão. Sugeriram que existe correlação entre parâmetros morfológicos, altura do peso e recuperação funcional, visto que os resultados demonstraram diferentes graus de lesão entre os grupos. Concluíram que a técnica por queda de peso pode ser usada em ratos para produzir lesões leves, moderadas e graves, sendo, portanto, uma técnica apropriada para estudos experimentais em ratos.

Bresnahan et al. (1987) apresentaram um aparelho de impacto com capacidade de produzir lesão traumática medular contusa. Concluíram que as propriedades mecânicas no momento do impacto interferem na reprodutibilidade da lesão medular.

Noble e Wrathall (1987) descreveram um aparelho para provocar lesão medular contusa em ratos, por queda de peso. Utilizaram pinças para fixar os processos espinhosos adjacentes e, com essas modificações, diminuíram as variáveis

que poderiam produzir lesões assimétricas, sendo a energia de impacto mais direcionada para a medula, com diminuição do efeito amortecedor da caixa torácica, da coluna vertebral e dos movimentos respiratórios, tornando-se este um dos modelos mais utilizados atualmente.

Behrmann et al. (1992) apresentaram um aparelho de contusão medular em ratos e compararam com outro grupo que é submetido à secção anatômica da medula. Utilizaram a escala de Tarlov para avaliar a recuperação locomotora. Observaram os animais em campo aberto, em plano inclinado e em grade, concluíram que há melhor recuperação funcional nos animais que sofreram contusão comparativamente aos que foram submetidos à transecção.

Eide et al. (1993) destacaram a família das tirosinoquinases (trk), um proto-oncogene que tem a ação de codificar os receptores dos fatores de crescimento neuronal, como fator de crescimento neural, fator neurotrófico derivado do cérebro, neurotropina 3, 4 e 5. O entendimento destas moléculas tem importantes implicações na compreensão da função normal e desenvolvimento dessas substâncias para o sistema nervoso adulto.

Schnell et al. (1994) em estudo experimental em ratos submetidos à hemiseção medular dorsal, evidenciaram crescimento axonal de fibras do trato cortico-espinal com a utilização da neurotropina-3, em contraste com os experimentos com fator de crescimento neural do cérebro e fator de crescimento neural que não apresentaram crescimento axonal significativo. Ressaltaram que o brotamento axonal é restrito a não mais que 1 mm, porém estes resultados

modificaram-se com o uso de anticorpos que neutralizaram a ação dos fatores de inibição do crescimento axonal.

Constantini e Young (1994) estudaram os efeitos da metilprednisolona (MP), do gangliosídeo GM-1 e de sua associação, em modelos experimentais de lesão medular por queda de peso em ratos. O peso utilizado foi de 10g, as alturas de 12,5, 25 e 50 cm ao nível de T_x. A MP foi administrada em dose única de 30mg/kg, cinco minutos após a lesão e teve efeito significativo em reduzir o volume da lesão e impedir a hiponatremia induzida pela lesão. O GM-1 administrado isoladamente na dose de 10 a 30mg/kg tem pouco ou nenhum efeito em qualquer das variáveis medidas. Concluíram que a GM-1 antagoniza os efeitos central e periférico da MP em ratos lesados. Recomendaram que não fossem usados concomitantemente para tratar lesão medular aguda em humanos, até que a interação seja melhor estudada.

Basso et al. (1995) verificaram o comportamento depois da lesão medular contusa em ratos, propondo uma modificação na escala locomotora desenvolvida por Tarlov et al. (1953). Os dados obtidos indicaram que a escala é válida, é uma medida preditiva da recuperação motora, capaz de distinguir resultados comportamentais em razão das diferentes lesões e prever alterações anatômicas no centro da lesão. Os testes inter-ratos indicam que examinadores com experiência conseguem aplicá-los consistentemente e obter resultados similares. Concluíram que a escala proposta oferece aos avaliadores uma medida mais discriminatória dos resultados comportamentais para avaliar o tratamento pós lesão medular.

Cheng et al. (1996) em estudo experimental com ratos adultos submetidos à lesão medular com perda de substância nervosa, realizaram pontes de enxerto com

nervos intercostais nas substâncias branca e cinzenta da medula. Utilizando fator neurotrófico, acidic fibroblastic growth factor (aFGF), evidenciaram melhora da função motora dos membros traseiros e regeneração dos tratos cortico-espinhal. A combinação da intervenção cirúrgica e farmacológica por meio de fatores neurotróficos abriu novas perspectivas nos estudos da regeneração medular, em especial nos casos crônicos.

Basso et al. (1996) padronizaram um aparelho, chamado de *New York University impactor*® (NYU), desenhado para realizar lesão medular contusa em ratos. Relataram que o aparelho reproduz uma contusão medular graduada, consistente e reprodutível. Citam a escala de avaliação locomotora funcional, descrita e preconizada por Basso, Bresnahan e Beattie, denominada escala BBB, como sendo mais sensível que as demais até então descritas para avaliar a recuperação da função locomotora. Constataram que uma quantidade significativa de tecido neural não lesado está diretamente relacionada com melhor função locomotora final. Concluíram que a escala BBB é aplicável, após a utilização do sistema NYU impactor, na análise funcional da recuperação locomotora em ratos.

Rodrigues (1999) apresentou na tese de doutorado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), um estudo experimental com 30 ratos *Wistar* submetidos à lesão medular com sistema NYU impactor®, com três diferentes quedas de peso: 12,5; 25 e 50 cm, com o objetivo de avaliar o volume da lesão pela análise quantitativa de íons de sódio e potássio no sangue dos animais. Verificou correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos de força aplicada. Concluiu que o volume de lesão por queda

de peso de 50 cm de altura, foi superior aos de 12,5 e 25 cm que, por sua vez, não diferiram entre si.

Amar e Levy (1999) revisaram a patogênese e as estratégias farmacológicas para atenuar o dano secundário na lesão medular aguda. Por meio 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. Avaliaram a ação de vários agentes farmacológicos, entre eles, os glicocorticóides, lazeróides, gangliosídeos, antagonistas dos opióides, bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas dos receptores de glutamato, agentes antioxidantes e radicais livres. Concluíram que, dentro em breve, esses agentes possam ser úteis e enfatizam que, futuramente, é provável que as terapias efetivamente sejam combinadas.

Vialle et al. (1999) sugeriram e apresentaram na literatura nacional o aparelho NYU impactor, para reprodução de lesão medular em estudos experimentais em ratos e avaliaram as alterações histológicas secundárias ao trauma após um período de 48 horas. Concluíram ser um modelo reprodutível e aplicável.

Em artigo de atualização nacional, Barros Filho (2000) relatou sobre os tratamentos medicamentosos para o trauma raquimedular e destacou que os únicos medicamentos recomendáveis para uso clínico são a metilprednisolona e os gangliosídeos, utilizados separadamente. A respeito dos fatores neurotróficos, vários foram descritos e experimentalmente mostraram-se eficazes, evitando a morte neuronal e estimulando a formação e extensão de prolongamentos neuronais.

Bamber et al. (2001), em estudo experimental com ratos submetidos à hemiseção medular cavitária ao nível de T_{VIII} e T_{IX}, enxertaram animais de um grupo com células de Schwann (CS) e administraram, em outro grupo, dois fatores neurotróficos: fator neurotrófico derivado do cérebro e a neurotropina-3. Utilizando marcadores de transporte anterógrados, PHA-L ou BDA, injetando 3mm cranialmente ao enxerto de CS, observaram um número significativo de axônios regenerados no grupo com neurotróficos. Ao contrário, no grupo com enxerto de CS e sem uso de neurotróficos, o crescimento axonal foi limitado. Demonstraram que a associação das duas técnicas potencializou a recuperação neuronal.

Hall (2001) relatou que a maioria das lesões medulares não é completa e que parte da substância branca permanece íntegra. Salientou que a recuperação neurológica depende da preservação das estruturas que permanecem íntegras após o trauma, sobretudo axônios ascendentes e descendentes da substância branca e com sua mielinização normal. Relatou que as estratégias farmacológicas enfocam o controle do processo de lesão secundária, em especial, a peroxidação lipídica e a preservação do máximo de substância branca. Afirmou que a metilprednisolona é a única droga que, em altas doses, melhora a função neurológica em animais.

Em estudo experimental prospectivo com 15 ratos *Wistar* submetidos a uma lesão parcial de 0,5mm da medula, Barros Filho et al. (2002) transplantaram no local da lesão, células do sistema nervoso fetal de ratos doadores. Os animais foram monitorados por 48 horas e, ao término desse período, foram eutanasiados e avaliados histologicamente. Demonstrou-se que, em 60% dos casos, as células fetais

transplantadas permaneceram viáveis e comparativamente observaram que a reação inflamatória foi maior no grupo controle.

Tebet (2002) apresentou, em tese de doutorado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um estudo experimental com 24 ratos *Wistar*, submetidos à lesão medular contusa com sistema NYU impactor®, que foram divididos em quatro grupos: grupo I, recebeu metilprednisolona (MP); grupo II, gangliosídeo GM-1; grupo III, associação de MP + GM-1; e o grupo IV, controle recebeu soro fisiológico. Os animais foram avaliados quanto à recuperação locomotora funcional, escala BBB e análise histológica. Concluiu que o grupo MP apresentou resultados funcionais melhores dentre todos os grupos. Os achados histológicos não tiveram correlação com a recuperação da função locomotora dos animais.

Vialle et al. (2002), em estudo experimental com 20 ratos *Wistar*, submetidos à contusão medular aguda moderada com NYU impactor, avaliaram a escala BBB de recuperação motora e concluíram não haver necessidade de uma avaliação tão extensa, evidenciando que os testes B, D e E não influenciaram na avaliação final.

Em dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, Gebrin (2003) realizou experimento com ratos *Wistar*, enxertando nervos fibulares em pequenos tubos de silicone nos segmentos toracolombares da medula espinhal lesada, implantados com técnicas microcirúrgicas. Foi utilizado um marcador neuronal retrógrado aplicado na porção média das pontes nervosas implantadas que, na análise histológica, mostrou a

presença de neurônios intramedulares (neurônios de projeção, interneurônios e motoneurônios) e de gânglios sensitivos espinhais.

Galvão (2003) apresentou, em dissertação de mestrado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um estudo experimental com ratos *Wistar*, submetidos à lesão medular leve (12,5 mm de queda de peso), com o objetivo de avaliar a recuperação funcional, por meio da Escala BBB e da análise histológica dos ratos tratados com oxigenioterapia hiperbárica (OH). Concluiu que a recuperação motora dos ratos tratados com OH em uma fase inicial foi significativamente melhor, porém, ao final, não houve significantes diferenças estatísticas entre ambos os grupos. A análise histológica foi semelhante nos dois grupos.

Moris e Vega (2003), em artigo de revisão, analisaram os aspectos fisiológicos dos fatores neurotróficos (FN) e avaliaram alguns fundamentos para sua aplicabilidade clínica. Elaboraram três teorias para explicar o possível emprego de fatores neurotróficos nas enfermidades neurológicas: 1- A enfermidade acompanha uma diminuição da disponibilidade dos FN com a conseqüente degeneração seletiva dos neurônios, assim a oferta exógena de FN poderia reverter sua deficiência e melhorar a função neuronal. 2- a diminuição quantitativa e qualitativa de FN pode diminuir seus receptores e a administração de doses suprafisiológicas produziria um incremento do número dos receptores. 3- A adição de FN pode estacionar um dano biológico nocivo, como a apoptose. Entretanto, os autores ressaltaram que, até o presente momento, não havia nenhuma evidência de uma enfermidade neurológica com déficit de FN ou de seus receptores que justificasse seu uso clínico.

Lee et al. (2004) realizaram estudo experimental com ratos, divididos em três grupos: 1- grupo controle com laminectomia isolada; 2- grupo com transecção da medula ao nível de T_{VIII} e 3 – grupo com transecção e enxerto de nervo periférico intercostal + aplicação de aFGF (*acid fibroblastic growth factor*). A avaliação funcional foi realizada por meio da escala BBB, com acompanhamento por seis meses. Técnicas de imunohistoquímica foram utilizadas para avaliar a taxa de serotonina em fibras de crescimento (5-HT), marcadores anterógrados de *biotinylated dextran amine* (BDA) e marcadores retrógrados com *fluoro-gold* foram utilizados para avaliar a presença de axônios abaixo e acima do sítio da lesão após o tratamento. Os resultados do grupo 2 comparados com o grupo 3, foram: a) aumento da capacidade locomotora e de marcha; b) presença de 5-HT em axônios abaixo do sítio da lesão, significando regeneração axonal do núcleo rafe; c) presença de marcadores BDA no trato córtico-espinhal no sítio do enxerto e abaixo dele e d) presença de *fluoro-gold* no córtex motor e no núcleo rubro, retículo espinhal, rafe, e núcleo vestibular. Os autores concluíram que o enxerto dos nervos periféricos e aFGF facilitam o crescimento de axônios e melhoram a capacidade motora dos membros inferiores em medulas transeccionadas em modelos animais.

Molina e Barros Filho (2004) compararam três escalas de avaliação funcional locomotora, afirmaram que a escala BBB é uma medida fácil e sensível de avaliação da recuperação locomotora, concebida para refletir a repercussão progressiva após a lesão medular, e forneceram uma escala expandida para mostrar os comportamentos nas fases de recuperação inicial, intermediária e avançada, podendo ser reproduzida em diferentes laboratórios.

Kwon et al. (2005), em revisão de literatura, analisaram as diversas estratégias terapêuticas atuais para promover reparação e regeneração neural após lesão medular, com enfoque nos ensaios clínicos com seres humanos tratados com medicamentos potencialmente neuroprotetores e nas estratégias de tratamento. Relataram os anseios de pacientes e familiares em participar destes ensaios clínicos, porém os autores revelam que, atualmente, as duas drogas neuroprotetoras com resultados promissores em modelos experimentais e relativamente seguros para uso em seres humanos são a eritropoietina e o minocycline. Neste artigo, concluem e alertam sobre a importância de elaborar ensaios clínicos rigorosamente bem estruturados e formulados metodologicamente, a fim de não criar falsas expectativas e falhas que possam comprometer determinado tratamento, ressaltando o papel fundamental dos pesquisadores na cura da lesão medular.

Oliveira (2005) apresentou em tese de doutorado à FMUSP, um estudo experimental com 50 ratos *Wistar*, submetidos à compressão medular com fita de cetim, nos níveis T_{IX} e T_X, que representava uma redução de 30% do canal medular, nestes níveis. Os animais foram distribuídos em cinco grupos: grupo I- controle, foi realizado somente laminectomia; grupo II, realizado compressão e descompressão em cinco minutos; grupo III e IV, realizado compressão e descompressão em 24 e 72 horas respectivamente e o grupo V, realizado compressão até o final do experimento, no 30º dia. As avaliações da recuperação neurológica foram feitas por meio do potencial evocado motor, da escala BBB e do exame anatomopatológico. Concluiu-se que existe relação direta entre o potencial de recuperação neurológica e o tempo de descompressão medular.

Bachelin et al. (2005), em estudo experimental com macacos, realizaram enxerto autólogo de células de Schwann retiradas de nervos periféricos. Utilizando técnicas de imunohistoquímica e marcadores virais, constataram largas áreas de remielinização na área transplantada com células de Schwann, em mais de 55% da área lesada.

Souza et al. (2006) em estudo experimental com 72 ratos machos *Wistar*, divididos em quatro grupos com 18 animais cada, grupo I: laminectomia; grupo II: contusão medular por queda de peso; grupo III: compressão de 35% do canal medular e grupo IV: compressão de 50%. Os autores relataram que a maioria dos trabalhos de literatura enfoca os aspectos moleculares, bioquímicos e histológicos da medula espinal traumatizada. Poucos avaliam as alterações vasculares macroscópicas. As avaliações foram realizadas em diferentes períodos de tempo (6, 24, 28, 48h e 7, 35 dias). Técnicas de microangiografia foram utilizadas, com coloração nanquin/gelatina, o tecido neural foi desidratado em soluções crescentes de álcool e diafanizado pelo método de Spalholz, tornando a medula semitransparente e fornecendo uma visão tridimensional de seus vasos sanguíneos. Neste estudo, o interessante foi a observação de oclusão completa de grandes vasos intramedulares durante o seguimento da lesão, reforçando a teoria de que, nas alterações vasculares intramedulares pós-traumáticas, ocorreriam, fundamentalmente, as da microcirculação.

Molina (2006) apresentou, em dissertação de mestrado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um estudo experimental com 30 ratos *Wistar*, submetidos à lesão medular aguda, com três diferentes intensidades de lesão:

leve, moderada e grave. Os animais foram avaliados quanto à sensibilidade e reprodutibilidade da Escala Funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (Escala BBB). Concluiu que a escala apresenta sensibilidade satisfatória e reprodutibilidade excelente para as lesões leves, mas, para as lesões graves, a sensibilidade foi insatisfatória e a reprodutibilidade baixa.

Marcon (2006) apresentou, em dissertação de mestrado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um estudo experimental com 32 ratos *Wistar*, divididos em quatro grupos: grupos 1 e 2 receberam água destilada e metilprednisolona (MP) imediatamente após a lesão, e os outros dois grupos receberam as mesmas drogas 4 horas antes das lesões. As avaliações foram realizadas conforme a recuperação funcional pela escala BBB e pelas complicações pós-lesões. Concluiu que o uso de MP 4 horas antes das lesões não modificava os resultados funcionais locomotores, porém aumentava significativamente os índices de mortalidade nos ratos, comparativamente aos pós-lesão.

Chao et al. (2006) descreveram a ação dos neurotróficos na proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular das células neuronais e não-neuronais. Destacaram que os efeitos dos neurotróficos dependem dos níveis disponíveis e da afinidade de aderência dos receptores, tirosinoquinases (trk) da membrana neuronal. Assim, alterações nos níveis dos neurotróficos implicam doenças neurovegetativas, tais como: Alzheimer e Huntington e a administração de fatores neurotróficos com moléculas pequenas, como a GPCR (G-protein coupled receptor), em estudos preliminares, tem sido promissora.

Ghasemlou et al. (2006), em estudo experimental com 39 ratos, estudaram as possíveis variáveis que poderiam influenciar no resultado dos estudos experimentais em ratos, nos modelos de contusão medular por queda de peso. No estudo, avaliaram a força de impacto e o deslocamento da medula no momento da contusão. Concluíram e sugeriram que a força limite a ser aplicada será de $\pm 5\text{kdyn}$ e a área de deslocamento da medula de $200\mu\text{m}$ reproduzirão com mais sensibilidade os resultados, indiferentemente do impactor a ser utilizado.

Kubeck et al. (2006) realizaram estudo experimental com 48 ratos *Sprague-Dawley*, divididos em dois grupos, controle e experimental, sendo cada grupo subdividido em seis subgrupos, de acordo com o tempo de lesão, 0, 4, 8, 16, 24 e 48 horas. Para a lesão medular, foi utilizada a Técnica de Allen, após laminectomia dorsal baixa. O grupo controle recebeu água destilada e o grupo experimental doses de metilprednisolona equivalentes às usadas em humanos, calculadas da seguinte forma: considerou-se o peso humano padrão de 65 kg, estimando-se uma superfície corporal de 1.710m^2 e usando a dose do protocolo NASCIS II, que foi convertida para os ratos, levando em conta que estes pesavam entre 450- 475g, perfazendo uma superfície corporal de 0,053 a $0,055\text{m}^2$, administrou-se dose proporcional a cada animal. Assim, foram analisados os efeitos histológicos de altas doses de metilprednisolona equivalentes em seres humanos sobre os sistemas pulmonar, cardiovascular, intestinal, renal, hepático e esplênico. Concluíram que altas doses de metilprednisolona, após 48 horas da lesão medular, causaram linfocitopenia, necrose intestinal e infiltrado eosinofílico pulmonar nos animais estudados e não nos controles. O órgão mais afetado foi o baço, onde a depleção linfocitária apareceu nas primeiras 4 horas após infusão de metilprednisolona e continuou até 48 horas. Os

tecidos pulmonares mostraram congestão intersticial e coleções alveolares eosinofílicas. As mucosas intestinais apresentaram edema e lise celular após 16 horas. Os sistemas cardíaco, renal e hepático não apresentaram alterações significativas sobre o grupo controle.

Hurlbert (2006) avaliou as pesquisas de 1996 a 2006 sobre as estratégias médicas para tratamento das lesões medulares agudas, limitadas a seres humanos, totalizando 346 artigos, divididos em estudos de evidência clínica e ciência básica. Concluiu que os esteróides continuam sendo utilizados na emergência por questões legais. Inibidores da proteinoquinasas e metaloproteinasas parecem ser tratamentos promissores. Técnicas de regeneração estão concentradas em transplante celular e manipulação de receptores de células gliais. Atualmente, na fase III de ensaios clínicos em seres humanos e recomendados, estão os suportes de oxigenação arterial e a manutenção da pressão perfusional na medula espinal, a fim de evitar a hipoxia e isquemia pós-traumática.

Thuret et al. (2006) afirmaram que a administração exógena de fatores neurotróficos tem sido proposta como um potencial terapêutico para lesões medulares. Estudos experimentais em ratos, com a administração de neurotropina-3, podem induzir o crescimento de axônios cortico-espinal, o fator neurotrófico derivado do cérebro induz ao crescimento axonal do feixe rubro-espinal, reticulo-espinal, vestibulo-espinal, rafe-espinal e axônios sensoriais e motores locais. Uma combinação da neurotropina-3 e o fator neurotrófico derivado do cérebro melhora a função vesical e a motricidade das patas dianteiras em contusões média torácica e o fator neurotrófico derivado da glia promove o crescimento de axônios motores e

sensitivos da coluna dorsal em lesões parciais ou completas da medula espinal. A administração isolada de fatores neurotróficos tem promovido recuperação parcial. Atualmente, pesquisadores buscam terapias combinadas, tais como: transplante de células olfatórias associado à neurotropina-3, transplante de células progenitoras e fator neurotrófico derivado do cérebro. Sugerem o uso de fatores neurotróficos em ensaios experimentais em primatas não humanos.

Baker et al. (2007) realizaram um estudo experimental com ratas adultas fêmeas *Sprague-Dawley*, que sofreram contusão medular ao nível de T_{IX}, e que receberam neurotropina-3 com intuito de verificar se o medicamento auxiliava na recuperação de axônios sensitivos no núcleo grácil da medula, utilizando toxina colérica B como marcador. Nos grupos controle e nos que receberam neurotropina-3, houve redução de aproximadamente 25% da inervação no núcleo grácil. Concluíram que a neurotropina-3 não promove neuroproteção dos efeitos secundários da lesão medular, nos axônios sensitivos. Isto acontece, provavelmente, porque a tirosinoquinase-C não está presente nos axônios da coluna dorsal ou no núcleo grácil.

Price et al. (2007), em artigo de revisão, relataram a dificuldade do uso clínico dos neurotróficos, em razão de seus efeitos colaterais e de sua farmacocinética desfavorável, embora seu potencial terapêutico esteja bem reconhecido em ensaios experimentais. Alternativas como o uso de carreadores de baixo peso molecular têm tido resultados promissores em ensaios pré-clínicos, sugerindo a realização de mais estudos nesse sentido.

3 MÉTODOS



O protocolo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Protocolo de pesquisa nº 350/05.

A pesquisa seguiu rigorosamente os seguintes princípios e manuais de ensino e pesquisa, envolvendo animais:

- *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, Genebra, 1985
- Declaração Universal dos Direitos dos Animais, UNESCO, Bruxelas, 1978.
- Princípios Éticos na Experimentação Animal – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.
- *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* – EUA.

Local do experimento

O experimento foi realizado no complexo do Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, Instituto de Ortopedia e Traumatologia, no LETRAN (Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos, 8º Andar).

3.1 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR

3.1.1 Recepção e seleção dos animais

Selecionaram-se 18 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Figura 1). No momento da recepção, todos os ratos foram avaliados quanto a seu estado de saúde e, também, suas condições de motricidade. Aprovados, eles foram marcados com listras pretas na cauda e identificados como amostras do estudo. Alojaram-se três ratos de uma mesma ninhada por gaiola.

O manuseio contínuo dos animais com a equipe de experimentadores e de apoio foi realizado, a fim de familiarizá-los e aclimatizá-los ao ambiente, antes da lesão medular.



Figura 1 - Ratos da linhagem Wistar

Adotaram-se os critérios de inclusão e exclusão, estabelecidos e padronizados por Rodrigues (1999) e Galvão (2003).

CrITÉRIOS de inclusão:

- Ratos da raça *Wistar*;
- Machos adultos jovens (~ 8 a 12 semanas de vida, inclusive);
- Peso entre 300 e 500 gramas, inclusive; e
- Condição geral e motricidade normal.

CrITÉRIOS de exclusão:

- Óbito imediatamente após lesão;
- Anomalias da medula na área lesada observada macroscopicamente;
- Autofagia ou mutilação entre os animais;
- Movimentação abaixo da lesão medular após recuperação anestésica; e
- Lesão da dura-máter no ato operatório.

3.1.2 Formação dos grupos experimentais

O estudo consistiu de dois grupos, onde os ratos foram separados aleatoriamente:

- **Grupo Controle:** consistiu de ratos submetidos à lesão medular moderada (Quadro 1) por meio de um equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso – NYU Impactor® (*New York University Spinal Cord Contusion Sistem - Impactor*). Neste, os ratos

receberam injeção de água destilada intraperitonealmente. Ocorre que o grupo foi objeto de estudo de experimentação simultânea com a substância neurotropina-3. A metodologia e o modelo empregado foram idênticos, os resultados já estavam compilados, então, foi decidido não sacrificar mais animais.

- **Grupo Tratamento** – ratos submetidos ao mesmo protocolo de lesão moderada e submetidos à injeção intraperitoneal de neurotropina-4.

Quadro I – Tipos de lesão medular por contusão

Grupo	Altura da Haste
Lesão medular leve	12,5 cm
Lesão medular moderada	25,0 cm
Lesão medular severa	50,0 cm

Dos 18 ratos incluídos inicialmente, três foram utilizados como piloto e 15 para o grupo tratamento.

3.1.3 Lesão medular por queda de peso

Descrição do NYU impactor

O equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso, NYU Impactor®, compõe-se de:

- Dispositivo de impacto (haste de 10g a 25,0 mm de altura predeterminada, 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;
- Videomonitor VGA;
- Placa de interface com saída paralela e temporizador.

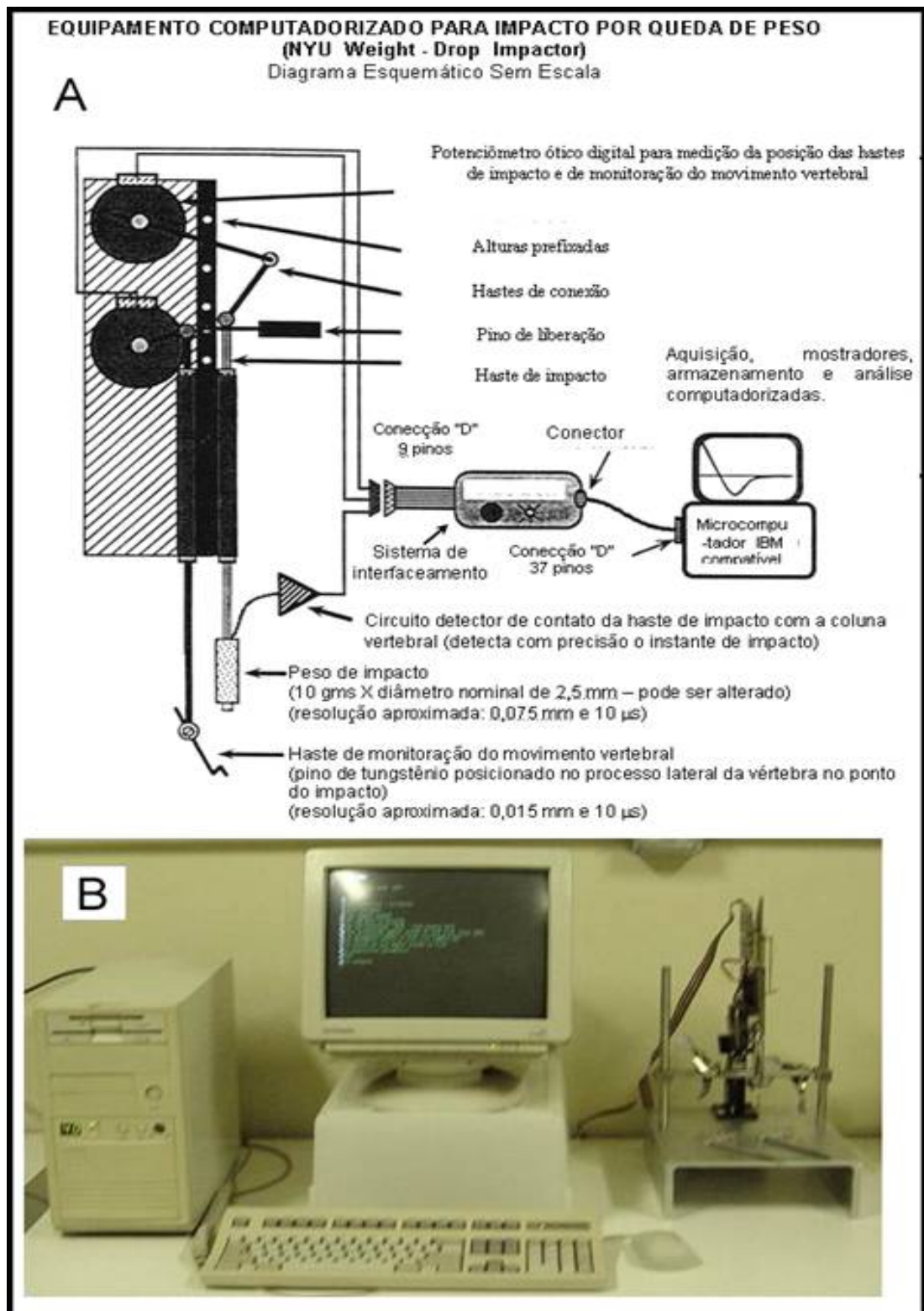


Figura 2 - NYU Impactor® (New York University Spinal Cord Contusion Sistem - Impactor)

O procedimento de anestesia

Anestesiaram-se os ratos com 55 a 75mg/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.

A laminectomia

- a - Tricotomia na região do dorso;
- b - antissepsia com povidine tópico;
- c - colocação de campo fenestrado;
- e - incisão na pele, de aproximadamente 5 cm, na linha média dorsal, para expor a coluna vertebral de T_{VIII} a T_{XII};
- f - descolamento da musculatura inserida nos processos espinhosos e lâminas com espátula delicada;
- g - identificou-se a última costela, referência anatômica de T_{XII}, assim procedeu-se à identificação dos demais níveis, sobretudo T_X e T_{XI}, local da lesão;
- h - utilizou-se coagulador bipolar para hemostasia;
- i - remoção da parte óssea, com micro saca-bocado delicado, sempre se preocupando para não lesar o saco dural. Os seguintes segmentos foram removidos:
 - metade distal do processo espinhoso de T_{IX}
 - totalidade do processo espinhoso e lâmina de T_X
- j - utilizou-se cera de osso para hemostasia, quando necessário;

k - realizou-se a laminectomia com a dimensão necessária para obter uma margem de segurança e acomodar adequadamente a extremidade da haste do equipamento computadorizado do NYU Impactor ®.

Procedimento cirúrgico - laminectomia

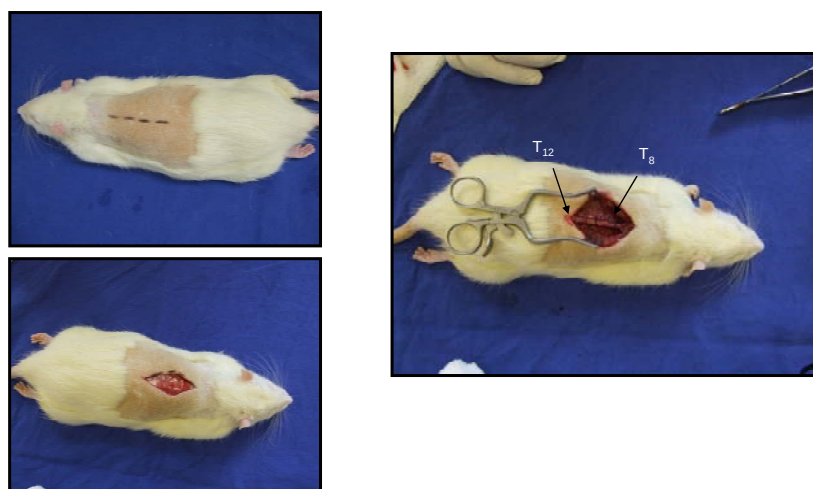


Figura 3 – Aspectos da laminectomia



Figura 4 - Aspectos da laminectomia

A contusão medular

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

A contusão medular produzida pelo NYU impactor® seguiu os passos e cuidados indicados pelo próprio manual, 1993.

- a) Posicionou-se o rato no equipamento computadorizado por impacto de queda NYU impactor®. Os processos espinhosos de T_{VIII} e T_{XI} foram fixados com presilhas e acomodou-se o rato sobre uma esponja;
- b) ajustou-se a haste do equipamento na posição zero (inicial), e prendeu-se a garra de base na margem da ferida cirúrgica;
- c) centralizou-se a extremidade da haste do equipamento entre T_{IX} e T_X, e ajustou-se para obter um impacto direto sobre a medula. Este contato foi confirmado por sinais sonoros e luminosos emitidos pelo equipamento;
- d) elevou-se a haste à distância de 25,0 cm;
- e) liberou-se a haste do equipamento para contundir a medula, aguardou-se 15 segundos, depois foi removido;
- f) colocou-se o rato sobre uma superfície aquecida para inspecionar a área contundida. Procedeu-se a hemostasia de qualquer sangramento presente; e
- g) a ferida cirúrgica foi suturada por planos com fio de poliamida (nylon®), monofilamentar número três zeros.



Figura 5 – Contusão medular por queda livre

3.1.4 Procedimentos após contusão medular

- A substância a ser testada, a neurotropina-4, foi adquirida do laboratório Sigma-Aldrich, sob o nome de *Neurotrophin 4 Human Recombinant®*, cada frasco continha 5µg, que foi diluído em 0,5ml de água destilada. A dose administrada foi de 1µg/rato (01 ml da diluição), por via intraperitoneal, imediatamente após a lesão.
- Transferiu-se o rato para uma câmara com temperatura controlada de 25° a 28°, durante 30 minutos, para controle de provável hipotermia pós-operatória.
- Esvaziaram-se a bexiga duas vezes ao dia, por compressão manual vesical (método de Credé), 6 e 24 horas após a lesão e diariamente até o momento da eutanásia. (Figura 6)

- Controlou-se a temperatura ambiente, e as gaiolas foram mantidas forradas com maravalha, para evitar úlceras de pressão.
- Verificou-se diariamente a coloração e o odor da urina e a ocorrência de feridas provocadas por autofagia.



Figura 6 – Manobra de Credé

3.1.5 Antibioticoprofilaxia

Os ratos foram submetidos à antibioticoprofilaxia para prevenir e/ou reduzir a infecção na ferida cirúrgica nas vias urinárias. Administrou-se, subcutaneamente, 25mg/kg de Cefalotina (Keflin Neutro® - Ely Lilly) imediatamente após a lesão e uma vez ao dia durante os sete dias seguintes. Naqueles que apresentassem infecção, o tratamento estenderia até o 10º dia e caso não surtisse efeito, o rato seria submetido à eutanásia.

3.1.6 Manutenção dos animais

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem, mantidos nos mesmos grupos de até três animais, nas mesmas condições ambientais (manejo, *ad libitum*, troca periódica da maravalha e limpeza da gaiola) até o final do experimento, quando foram submetidos à eutanásia. Nenhum rato foi excluído por mutilação ou infecção.



Figura 7 – Condição *ad libitum*

3.1.7 Análise funcional locomotora

A capacidade de recuperação locomotora após lesão medular foi medida pela escala BBB (Basso; Beattie; Bresnahan) de avaliação funcional, descrita por Basso et al., em 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 (dois observadores).

Todos os ratos dos grupos Controle e Tratamento foram avaliados nos 2^o, 9^o, 16^o, 23^o e 30^o dias pós-operatórios.

A avaliação consistiu-se em colocar o rato no centro de uma caixa de observação de 80x80cm e borda com 17 cm de altura forrada com um campo cirúrgico azul turquesa (escuro) para maior contraste, durante o período de observação (rato branco, fundo azul escuro). (Figura 8)



Figura 8 – Aspecto da avaliação da Escala BBB

Avaliou-se a capacidade locomotora do rato. As observações sobre o movimento das articulações da pata posterior (quadril, joelho e tornozelo), a posição do tronco, 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 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.

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

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

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

Em anexo, são apresentados o modelo traduzido do formulário e as respectivas definições operacionais das categorias e atributos da escala BBB de avaliação funcional. (Anexos I, II e III)

3.1.8 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia no 30º dia após a lesão, injetando-se a dose tóxica de 400mg/kg de pentobarbital sódico intraperitoneal.

3.1.9 Preparo do Exame Anatomopatológico

- Para a retirada da coluna vertebral, realizou-se uma nova incisão dorsal extensa, expondo-se toda a coluna, desde a região cervical até a lombar, contendo todo o estojo ósseo e os músculos paravertebrais.
- Com um micro saca-bocado, todas as estruturas ósseas e de partes moles adjacentes à medula foram retiradas com cuidado até expô-las completamente.

- Realizou-se uma avaliação visual macroscópica da medula no local da contusão para verificar-se a presença de qualquer anomalia. Não se encontrou nenhuma.
- Após a sutura dos planos cirúrgicos incisados, os ratos foram embrulhados em papel e plástico apropriados e firmemente vedados, sendo depois depositados em sacos plásticos próprios para materiais biológicos e levados ao depósito específico do IOT HCFMUSP.
- A medula retirada foi encaminhada em frascos, devidamente numerados, realizando a identificação do lado cranial e caudal da lesão. As peças foram fixadas em solução de formaldeído (10%) por cerca de cinco dias e, posteriormente, encaminhadas ao Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. (Figura 9)

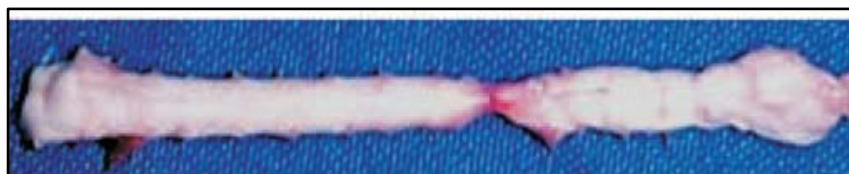


Figura 9 – Aspecto da medula fixada

- No preparo das lâminas, as peças passaram pelo processo de parafinização, seguido de cortes de 5 μ m de intervalo a partir da zona central da medula, fixados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina-eosina (HE).

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

3.1.10 Análise histológica

O Serviço de Patologia avaliou a medula fixada em três diferentes áreas:

- Área da lesão
- Área cranial a lesão
- Área caudal a lesão

Cada área analisada foi avaliada quanto a:

- Hiperemia
- Infiltrado celular
- Degeneração da substância nervosa
- Necrose

Cada parâmetro foi pontuado baseado na severidade:

- 0 = ausência,
- 1 = médio,
- 2 = moderado,
- 3 = severa

Assim, estes quatro escores foram somados e obteve-se um índice final.

Quadro 2 - Índice Anatomopatológicos

Crítérios	0	1	2	3
Hiperemia	Ausente	Médio	Moderado	Severa
Infiltrado Celular	Ausente	Médio	Moderado	Severa
Degeneração da substância Nervosa	Ausente	Médio	Moderado	Severa
Necrose	Ausente	Médio	Moderado	severa

Quadro 3 – Índice Final Anatomopatológico

Escore final	Severidade
0	Sem lesão
1 - 4	Lesão média
5 - 8	Lesão moderada
9 - 12	Lesão severa

3.1.11 Análise estatística

As variáveis necrose, hiperemia, degeneração da substância nervosa, infiltrado celular e o escore final foram resumidas por grupo e representadas por frequência absoluta e relativa (%) e média e desvio padrão (dp).

O Teste de Mann-Whitney foi aplicado para amostras independentes para comparar os resultados apresentados pelos grupos controle e tratamento.

A escala BBB foi resumida por dia de avaliação e por grupo e representada por média, desvio-padrão, mediana, valores mínimo e máximo.

Também foi aplicado o Teste de Mann-Whitney para amostras independentes para comparar os resultados apresentados pelos grupos controle e tratamento.

A presença de associação entre grupo de estudo e ocorrência de óbito foi avaliada pelo Teste Exato de Fisher.

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

RESULTADOS



RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 1 – Pontuações da escala BBB – grupo Controle

Ratos	Pós-op Dia 2	Pós-op Dia 9	Pós-op Dia 16	Pós-op Dia 23	Pós-op Dia 30
controle 1	0	0,5	3,5	3,5	6
controle 2	0	0,5	1	5	4
controle 3	0	8	10	10	11
controle 4	0	0	1	1	0,5
controle 5	0	0,5	7	9	9
controle 6	0,5	6	9	10	11
controle 7	0	0	5	3	3
controle 8	0	1	7	8	9,5
controle 9	0	7,5	8,5	10	9,5
controle 10	0	0,5	7,5	8	11

Tabela 2 – Pontuações da escala BBB – grupo Tratamento

Ratos	Pós-op Dia 2	Pós-op Dia 9	Pós-op Dia 16	Pós-op Dia 23	Pós-op Dia 30
tto 1	0	2	5	8	9
tto 2	0	3,5	5	6	6
tto 3	0	3	3	7,5	7,5
tto 4	0	6	8	12	12
tto 5	0	7	11	11	11
tto 6	0	11	12	16	21
tto 7	0	4,5	8,5	12	13
tto 8	0	8	10	13	15
tto 9	0	1	7	10	10
tto 10	0	8	10	11	12
tto 11	0	3	8	10	11
tto 12	0	4,5	10	10	13
tto 13	0	7	10	12	12
tto 14	0	4	3	6	6
tto 15	0	7,5	10	10	12

Tabela 3 – Distribuição dos resultados da escala BBB

Escala	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Pós-Op Dia 2		
média (dp)	0,05 (0,16)	0,00 (0,00)
mediana	0	0
mínimo – máximo	0 – 0,5	0 – 0
Comparação	p = 0,221	
Escala	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Pós-Op Dia 9		
média (dp)	3,06 (3,45)	5,33 (2,73)
mediana	0,75	4,5
mínimo – máximo	0,5 – 8,0	1,0 – 11,0
Comparação	p = 0,086	
Escala	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Pós-Op Dia 16		
média (dp)	5,95 (3,21)	8,00 (2,90)
mediana	7,0	8,5
mínimo – máximo	1,0 – 10,0	3,0 – 12,0
Comparação	p = 0,099	
Escala	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Pós-Op Dia 23		
média (dp)	6,75 (3,34)	10,30 (2,67)
mediana	8,0	10,0
mínimo – máximo	1,0 – 10,0	6,0 – 16,0
Comparação	p = 0,010 *	

continua

Tabela 3 – Distribuição dos resultados da escala BBB (continuação)

Escala	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Pós-Op Dia 30		
média (dp)	7,45 (3,81)	11,37 (3,72)
mediana	9,25	12,0
mínimo – máximo	0,5 – 11,0	6,0 – 21,0
Comparação	p = 0,013 *	

Na comparação entre os grupos Controle e Tratamento quanto à escala BBB, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles nas avaliações: Pós-Op. Dia 2 ($p = 0,221$), Pós-Op. Dia 9 ($p = 0,086$) e Pós-Op. Dia 16 ($p = 0,099$). Nas avaliações Pós-Op. Dia 23 e Pós-Op. Dia 29, o grupo Tratamento apresentou pontuações significativamente mais altas do que as apresentadas pelo grupo Controle ($p = 0,010$ e $p = 0,013$, respectivamente).

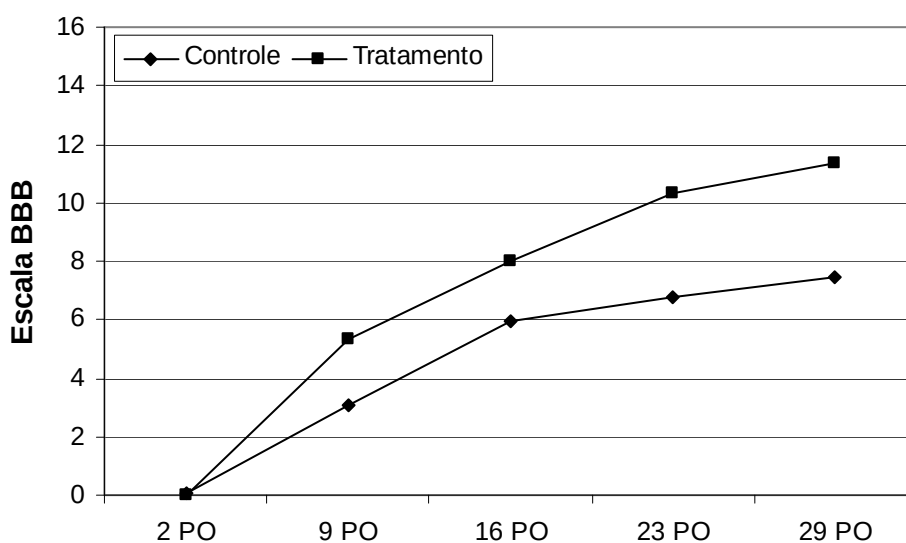


Tabela 4 – Distribuição dos resultados da avaliação de Necrose – Cranial

Necrose	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Cranial – n (%)		
0 (ausente)	7 (70,0%)	11 (73,3%)
1 (médio)	2 (20,0%)	4 (26,7%)
2 (moderado)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
3 (intenso)	1 (10,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	0,50 (0,97)	0,27 (0,46)
Comparação	p = 0,750	

Tabela 5 – Distribuição dos resultados da avaliação de Necrose - Lesão

Necrose	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Lesão – n (%)		
0 (ausente)	0 (0,0%)	3 (20,0%)
1 (médio)	0 (0,0%)	4 (26,7%)
2 (moderado)	2 (20,0%)	5 (33,3%)
3 (intenso)	8 (80,0%)	3 (20,0%)
média (dp)	2,80 (0,42)	1,53 (1,06)
Comparação	p = 0,002 *	

Tabela 6 – Distribuição dos resultados da avaliação de Necrose - Caudal

Necrose	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Caudal – n (%)		
0 (ausente)	7 (70,0%)	9 (60,0%)
1 (médio)	2 (20,0%)	4 (26,7%)
2 (moderado)	0 (0,0%)	2 (13,3%)
3 (intenso)	1 (10,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	0,50 (0,97)	0,53 (0,74)
Comparação	p = 0,672	

Na comparação entre os grupos Controle e Tratamento quanto à avaliação de necrose, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles nas áreas: cranial ($p = 0,750$) e caudal ($p = 0,672$). Na área da lesão, o grupo Tratamento apresentou pontuações significativamente mais baixas do que as do grupo Controle ($p = 0,002$).

Tabela 7 – Distribuição dos resultados da avaliação de Hiperemia – Cranial

Hiperemia	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Cranial – n (%)		
0 (ausente)	0 (0,0%)	4 (26,7%)
1 (médio)	5 (50,0%)	7 (46,7%)
2 (moderado)	2 (20,0%)	4 (26,7%)
3 (intenso)	3 (30,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	1,80 (0,92)	1,00 (0,76)
Comparação	p = 0,046 *	

Tabela 8 – Distribuição dos resultados da avaliação de Hiperemia – Lesão

Hiperemia	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Lesão – n (%)		
0 (ausente)	0 (0,0%)	3 (20,0%)
1 (médio)	0 (0,0%)	3 (20,0%)
2 (moderado)	2 (20,0%)	9 (60,0%)
3 (intenso)	8 (80,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	2,80 (0,42)	1,40 (0,83)
Comparação	p < 0,001 *	

Tabela 9 – Distribuição dos resultados da avaliação de Hiperemia – Caudal

Hiperemia	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Caudal – n (%)		
0 (ausente)	0 (0,0%)	3 (20,0%)
1 (médio)	5 (50,0%)	7 (46,7%)
2 (moderado)	2 (20,0%)	5 (33,3%)
3 (intenso)	3 (30,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	1,80 (0,92)	1,13 (0,74)
Comparação	p = 0,101	

Quanto à avaliação de hiperemia, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Tratamento na área caudal ($p = 0,101$). Nas áreas cranial e da lesão, o grupo Tratamento apresentou pontuações significativamente mais baixas do que as do grupo Controle ($p = 0,046$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Tabela 10 – Distribuição dos resultados da avaliação de Degeneração da Substância Nervosa – Cranial

Degeneração da substância nervosa	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Cranial – n (%)		
0 (ausente)	2 (20,0%)	0 (0,0%)
1 (médio)	4 (40,0%)	9 (60,0%)
2 (moderado)	2 (20,0%)	6 (40,0%)
3 (intenso)	2 (20,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	1,40 (1,08)	1,40 (0,51)
Comparação	p = 0,855	

Tabela 11 – Distribuição dos resultados da avaliação de Degeneração da Substância Nervosa - Lesão

Degeneração da substância nervosa	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Lesão – n (%)		
0 (ausente)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
1 (médio)	0 (0,0%)	3 (20,0%)
2 (moderado)	2 (20,0%)	5 (33,3%)
3 (intenso)	8 (80,0%)	7 (46,7%)
média (dp)	2,80 (0,42)	2,27 (0,80)
Comparação	p = 0,075	

Tabela 12 – Distribuição dos resultados da avaliação de Degeneração da Substância Nervosa - Caudal

Degeneração da substância nervosa	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Caudal – n (%)		
0 (ausente)	2 (20,0%)	0 (0,0%)
1 (médio)	4 (40,0%)	6 (40,0%)
2 (moderado)	2 (20,0%)	8 (53,3%)
3 (intenso)	2 (20,0%)	1 (6,7%)
média (dp)	1,40 (1,08)	1,67 (0,62)
Comparação	p = 0,405	

Na comparação entre os grupos Controle e Tratamento quanto à avaliação de degeneração da substância nervosa, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles nas áreas: cranial ($p = 0,855$), lesão ($p = 0,075$) e caudal ($p = 0,405$).

Tabela 13 – Distribuição dos resultados da avaliação de Infiltrado celular - Cranial

Infiltrado celular	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Cranial – n (%)		
0 (ausente)	7 (70,0%)	10 (66,7%)
1 (médio)	2 (20,0%)	5 (33,3%)
2 (moderado)	1 (10,0%)	0 (0,0%)
3 (severo)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	0,40 (0,70)	0,33 (0,49)
Comparação	p = 1,000	

Tabela 14 – Distribuição dos resultados da avaliação de Infiltrado celular - Lesão

Infiltrado celular	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Lesão – n (%)		
0 (ausente)	0 (0,0%)	4 (26,7%)
1 (médio)	0 (0,0%)	5 (33,3%)
2 (moderado)	5 (50,0%)	2 (13,3%)
3 (intenso)	5 (50,0%)	4 (26,7%)
média (dp)	2,50 (0,53)	1,40 (1,18)
Comparação	p = 0,021 *	

Tabela 15 – Distribuição dos resultados da avaliação de Infiltrado celular - Caudal

Infiltrado celular	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Caudal – n (%)		
0 (ausente)	7 (70,0%)	8 (53,3%)
1 (médio)	2 (20,0%)	5 (33,3%)
2 (moderado)	1 (10,0%)	2 (13,3%)
3 (severo)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	0,40 (0,70)	0,60 (0,74)
Comparação	p = 0,446	

Na avaliação de infiltrado celular não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle e Tratamento nas áreas: cranial ($p = 1,000$) e caudal ($p = 0,446$). Na área da lesão, o grupo Tratamento apresentou pontuações significativamente mais baixas do que as do grupo Controle ($p = 0,021$).

Tabela 16 – Pontuações dos escores área cranial – grupo Controle

Ratos	Necrose Cranial	Hiperemia Cranial	Degeneração Cranial	Infiltrado Cranial	escore
controle1	1	2	2	2	7
controle2	3	3	3	1	10
controle3	0	1	1	0	2
controle4	0	3	1	1	5
controle5	0	1	1	0	2
controle6	0	1	0	0	1
controle7	1	1	1	0	3
controle8	0	2	0	0	2
controle9	0	1	2	0	3
controle10	0	3	3	0	6

Tabela 17 – Pontuações dos escores área cranial – grupo Tratamento

Ratos	Necrose Cranial	Hiperemia Cranial	Degeneração Cranial	Infiltrado Cranial	escore
tto 1	1	0	2	0	3
tto 2	0	1	2	0	3
tto 3	1	1	2	1	5
tto 4	0	2	2	1	5
tto 5	0	1	1	1	3
tto 6	0	1	1	0	2
tto 7	1	0	1	0	2
tto 8	0	1	2	0	3
tto 9	1	0	2	1	4
tto 10	0	0	1	0	1
tto 11	0	2	1	0	3
tto 12	0	2	1	0	3
tto 13	0	1	1	0	2
tto 14	0	2	1	1	4
tto 15	0	1	1	0	2

Tabela 18 – Distribuição dos resultados da avaliação do Escore Final - Cranial

Escore	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Cranial		
0 (ausente)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
1-4 (médio)	6 (60,0%)	13 (86,7%)
5-8 (moderado)	3 (30,0%)	2 (13,3%)
9-12 (intenso)	1 (10,0%)	0 (0,0%)
média (dp)	4,1 (2,8)	3,0 (1,1)
Comparação	p = 0,588	

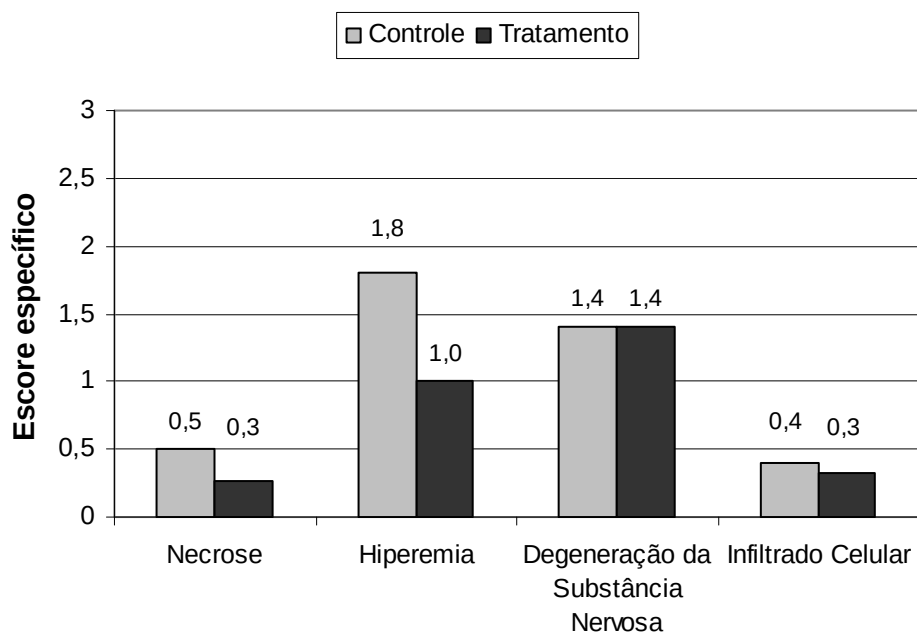


Tabela 19 – Pontuações dos escores da área lesão – grupo Controle

Ratos	Necrose Lesão	Hiperemia Lesão	Degeneração Lesão	Infiltrado Lesão	escore
controle1	3	3	3	3	12
controle2	3	3	3	3	12
controle3	3	3	3	3	12
controle4	3	3	3	3	12
controle5	3	3	3	3	12
controle6	2	2	2	2	8
controle7	3	3	2	2	10
controle8	3	3	3	2	11
controle9	3	2	3	2	10
controle10	2	3	3	2	10

Tabela 20 - Pontuações dos escores área lesão – grupo Tratamento

Ratos	Necrose Lesão	Hiperemia Lesão	Degeneração Lesão	Infiltrado Lesão	escore
tto 1	0	0	2	0	2
tto 2	2	2	2	1	7
tto 3	1	1	2	1	5
tto 4	1	2	3	1	7
tto 5	2	2	3	1	8
tto 6	3	2	3	3	11
tto 7	1	0	1	0	2
tto 8	2	2	3	3	10
tto 9	1	0	2	1	4
tto 10	2	2	3	2	9
tto 11	0	2	1	0	3
tto 12	3	2	3	3	11
tto 13	2	1	2	2	7
tto 14	3	2	3	3	11
tto 15	0	1	1	0	2

Tabela 21– Distribuição dos resultados da avaliação do Escore Final - Lesão

Escore	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Lesão		
0 (ausente)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
1-4 (médio)	0 (0,0%)	5 (33,3%)
5-8 (moderado)	1 (10,0%)	5 (33,3%)
9-12 (intenso)	9 (90,0%)	5 (33,3%)
média (dp)	10,9 (1,4)	6,6 (3,4)
Comparação	p = 0,001 *	

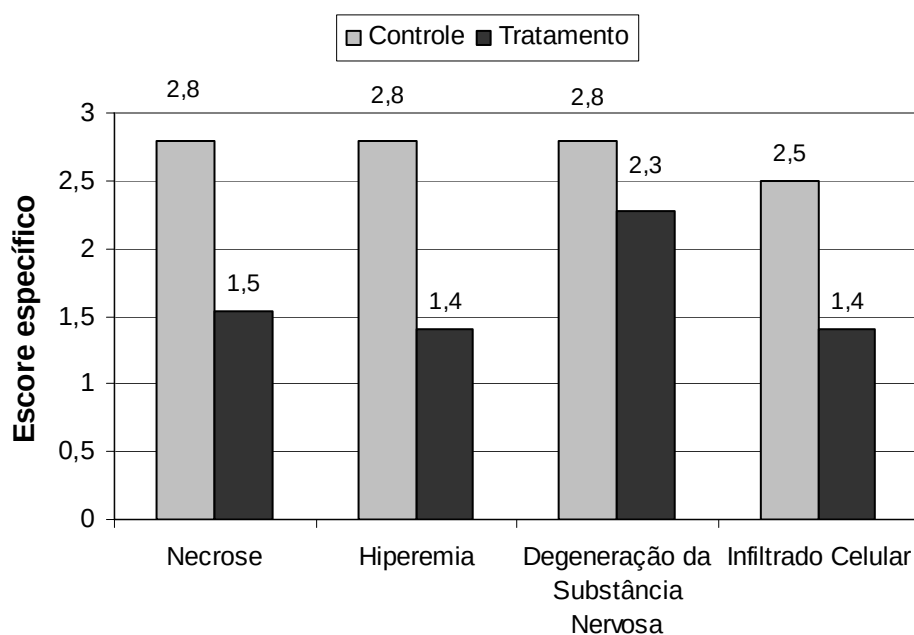


Tabela 22 – Pontuações dos escores área caudal – grupo Controle

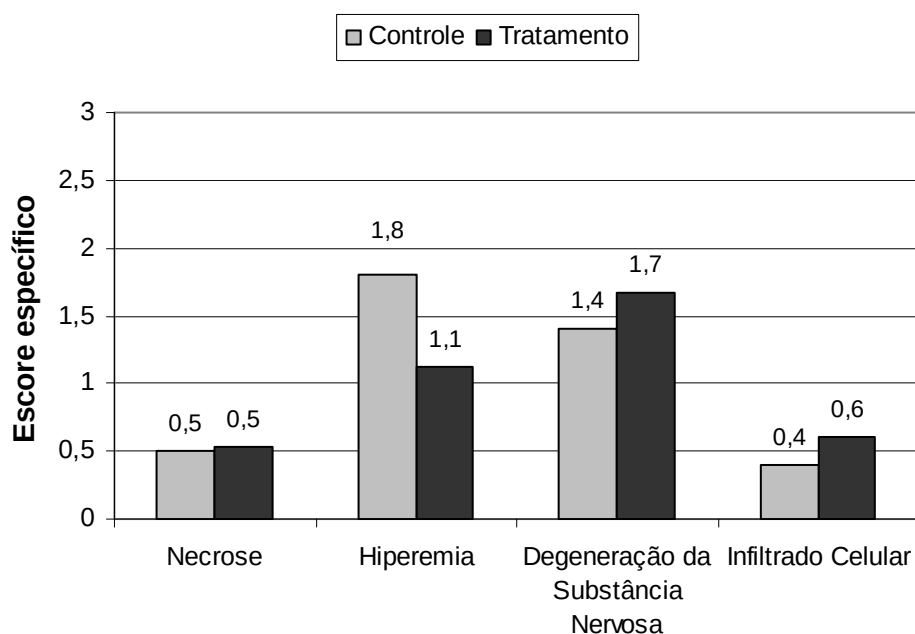
Ratos	Necrose Caudal	Hiperemia Caudal	Degeneração Caudal	Infiltrado Caudal	escore
controle1	1	2	2	2	7
controle2	3	3	3	1	10
controle3	0	1	1	0	2
controle4	0	3	1	1	5
controle5	0	1	1	0	2
controle6	0	1	0	0	1
controle7	1	1	1	0	3
controle8	0	2	0	0	2
controle9	0	1	2	0	3
controle10	0	3	3	0	6

Tabela 23 – Pontuações dos escores área caudal – grupo Tratamento

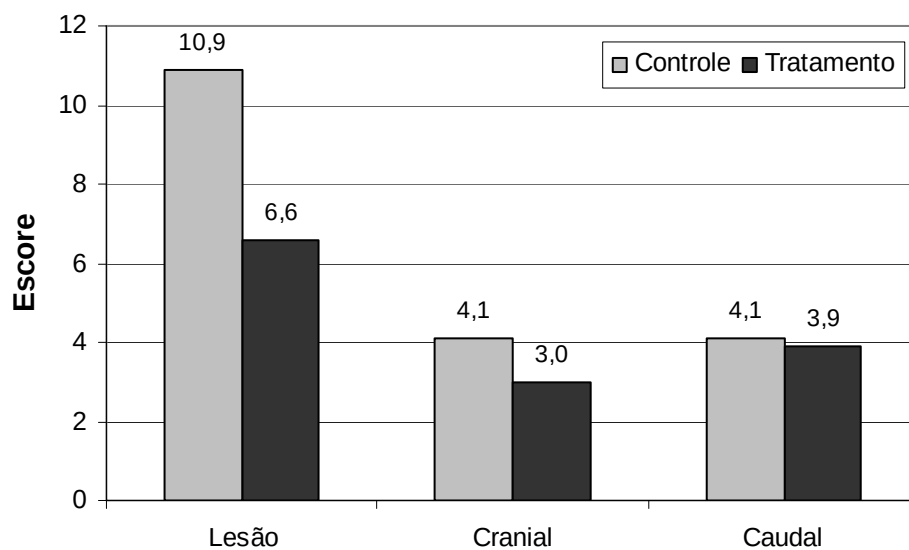
Ratos	Necrose Caudal	Hiperemia Caudal	Degeneração Caudal	Infiltrado Caudal	escore
tto 1	0	0	2	0	2
tto 2	0	1	2	0	3
tto 3	1	1	2	1	5
tto 4	0	2	2	1	5
tto 5	0	1	1	1	3
tto 6	0	1	1	0	2
tto 7	1	0	1	0	2
tto 8	0	1	2	0	3
tto 9	1	0	2	1	4
tto 10	2	2	3	2	9
tto 11	0	2	1	0	3
tto 12	0	2	1	0	3
tto 13	2	1	2	2	7
tto 14	0	2	1	1	4
tto 15	1	1	2	0	4

Tabela 24 – Distribuição dos resultados da avaliação do Escore Final – Caudal

Escore	Controle (n = 10)	Tratamento (n = 15)
Caudal		
0 (ausente)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
1-4 (médio)	6 (60,0%)	11 (73,3%)
5-8 (moderado)	3 (30,0%)	3 (20,0%)
9-12 (intenso)	1 (10,0%)	1 (6,7%)
média (dp)	4,1 (2,8)	3,9 (1,9)
Comparação	p = 0,734	



Na comparação entre os grupos Controle e Tratamento quanto ao escore final, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles nas áreas: cranial ($p = 0,588$) e caudal ($p = 0,734$). Na área da lesão, o grupo Tratamento apresentou pontuações significativamente mais baixas do que as do grupo Controle ($p = 0,001$).



DISCUSSÃO



Nas últimas três décadas, foram desenvolvidos diversos estudos e ensaios experimentais na área de traumatismo raquimedular (Bradbury e McMahon, 2004, Thuret et al., 2006). Uma simples consulta em um sítio de Internet, especializado em publicações científicas (Medline) na área médica, recuperou cerca de vinte mil artigos relacionados ao tema. Isto evidencia um certo entusiasmo por parte dos pesquisadores, pois cada vez mais surgem experimentos sobre regeneração medular e crescimento neuronal, os quais, na sua maioria apresentam resultados promissores..

Estes trabalhos têm se apoiado em animais de laboratório para o desenvolvimento de conhecimento sobre os mecanismos de processos vitais na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças em seres humanos (Bassit, 2005). No entanto, uma questão discrepante são os resultados promissores em regeneração medular em animais de laboratório e a pouca reprodutibilidade em seres humanos.

Acredita-se que a fisiologia, anatomia e a desproporcionalidade entre os animais de experimentos e o homem influenciem nos resultados, é como comparar quilômetros com centímetros do sistema nervoso. Muitos pesquisadores estão trabalhando no mapeamento das diferenças entre espécies de animais e na definição de seus mecanismos, com intuito de diminuir o impacto nos resultados experimentais (Thuret et al., 2006), entre eles, Courtine et al. (2007) que defende a experimentação com primatas não-humanos geneticamente semelhantes ao homem, porém o custo elevado e a dificuldade de cuidados com primatas lesados medulares têm inviabilizado a experimentação.

Além disto, o bem-estar do animal é uma questão importante de debate ético e preocupação da sociedade, tornando-se até uma área de estudo, pois o completo bem-estar do animal influencia diretamente no resultado do estudo. (Frajblat et al., 2006). Dentro deste contexto, este trabalho foi conduzido obedecendo a normas e princípios internacionais para pesquisas biomédicas, entre elas, da *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, a Declaração universal dos direitos dos animais, além das leis que estabelecem os critérios para a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa em território nacional, tais como: COBEA e a Lei de nº 6.638 (Normas para prática didático-científica da vivisseção de animais). Dentro dessas diretrizes e em consonância com os critérios dos três “Rs”, que preconiza a redução, a substituição e o aperfeiçoamento nos estudos com experimentação animal, propostos por William Russell e Rex Burch no livro *Principles of Humane Experimental Technique* (Russell e Burch, 1959).

Assim, este estudo também buscou reduzir o número de amostras. Baseado em trabalhos experimentais com número de amostras de animais semelhantes aos grupos de estudos e com resultados estatísticos satisfatórios, entre eles, Narazaki (n=15), Vialle (n=10) e Sayer (n=8). Outra forma de reduzir foi à utilização do grupo Controle do estudo realizado com a neurotropina-3, com execução e metodologia idêntica a este estudo, com resultados previamente compilados. Quanto à substituição e aperfeiçoamento foram pesquisadas outras formas de modelos e ensaios em consulta no periódico ATLA (*Alternative to Laboratory Animal*), mas para este tipo de experimento não foi encontrado outro método alternativo, que não seja em animais *in vivo*.

A espécie de animal de experimentação foi escolhida levando em consideração alguns critérios como a facilidade no manejo, a prolificidade, a docilidade, o pequeno porte, o baixo consumo alimentar, a fisiologia conhecida e o ciclo reprodutivo curto (Bassit, 2005). Os roedores, ratos (*rattus norvegicus*), são os animais mais utilizados em todos os laboratórios do mundo, pois atendem perfeitamente às características mencionadas, além disso, a linhagem de ratos Wistar também, exibe a característica do albinismo, ou seja, homogeneidade da espécie, atendendo satisfatoriamente aos propósitos da pesquisa (Andrade et al., 2002).

Os ratos foram provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, local que obedece aos padrões da ICLAS (*International Council for Laboratory Animal Science*) e da AAALAC (*Association for Assentament and Accreditation of Laboratory Animal Care*), duas entidades que regulam esse tipo de centros no mundo. Outra característica das cobaias foi à certificação SPF (*Specific Pathogen Free*), ou seja, espécime livre de qualquer tipo de agente patogênico que poderia mascarar os resultados da pesquisa. Esta qualificação habilita o experimento para a publicação em revistas internacionais e também assegura que qualquer contaminação patogênica possa ser creditada a falhas metodológicas na execução do estudo.

As condições ambientais do Letran seguiram as normas e princípios dos organismos reguladores em experimentação animal, com temperatura da sala oscilando entre 25 e 28 graus de temperatura Celsius, com ciclo claro/escuro de 12 horas, a oferta de água e ração *ad libitum* e, o confinamento de três animais de uma mesma ninhada, pois ratos Wistar não familiarizados tendem a ser agressivos entre

si, acomodados em gaiolas com manta valha, para evitar úlceras de pressão. O manuseio e a manipulação foram realizados por técnicos já treinados e familiarizados com ratos de laboratório (COBEA).

A via de administração dos fármacos escolhida foi a intraperitoneal, pois é a mais utilizada em estudos experimentais, por ser de fácil administração e oferecer menor risco de acidentes ao pesquisador, além de possuir uma melhor da substância (Bassit, 2005).

A laminectomia para exposição cirúrgica da medula espinal do rato para provocar a lesão medular, também, foi um procedimento executável e reprodutível pelo treinamento prévio e experiência adquirida no Letran.

A respeito dos modelos de lesão medular, desde as clássicas publicações de Allen, em 1911 e 1914, várias técnicas para reproduzir lesões foram idealizadas, sendo as principais, a contusão, a maceração, a secção, a compressão e a penetração (Dellamarter et al., 1990). Nesta pesquisa, optou-se pelo modelo de contusão por ser o que mais se assemelha à contusão medular em seres humanos (Constantine e Young, 1994).

O sistema empregado para realizar a contusão medular nos ratos foi o *NYU impactor*, desenvolvido por Gruner (1992) e difundido por Constantini e Young (1994) e Basso et al. (1996). A opção pelo *NYU impactor* foi devido a este permitir uma monitorização precisa da altura da queda, do peso, da velocidade do impacto e do índice de compressão em todos os animais, o que propicia uma lesão graduada e controlada (Basso et al., 1996). Outro fator é que aparelho *NYU impactor* é o equipamento-padrão dos principais centros de pesquisa com animais de

experimentação, que integram o *Mascis (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study)*, o que permite a comparação de resultados interinstitucionais.

As graduações por queda de peso foram classificadas em leve, média e severa, com a queda da haste de uma altura de 12,5, 25 e 50 cm. Neste estudo, foi utilizada a lesão moderada com altura de 25 cm, pois as severas apresentavam alta mortalidade (Molina, 2006; Vialle et al., 1999) e, as leves os animais mostravam recuperação locomotora completa em dez dias (Basso et al., 1996; Rodrigues, 1999).

Os estudos realizados na década passada, com fatores neurotróficos, trouxeram resultados finais alentadores (Sahenk, 2006), entre eles, podem ser citados os experimentos conduzidos por Schnell et al. (1994) e Cheng et al. (1996). Embora a droga utilizada por estes autores tenha sido a neurotropina-3. No entanto, segundo Moris e Vega (2003), os fatores neurotróficos têm ações semelhantes no sistema nervoso, diferindo somente nos receptores ativados. Cabe destacar que, assim como em outros ensaios com roedores, os fatores neurotróficos não apresentaram toxicidade aos animais, até porque fazem parte normal dos diversos sistemas orgânicos, mas, neste estudo em especial, a neurotropina-4 reduziu a mortalidade no grupo tratamento, pois não houve nenhum óbito na execução da lesão medular contusa. Supõe-se que a neurotropina-4 diminua os efeitos imediatos do choque neurogênico instalado imediatamente após a lesão medular, ocasião esta em que ocorre a maioria dos óbitos (Molina, 2006).

Outra questão é se a dose administrada da neurotropina-4 seria adequada para o experimento. Schnell et al. (1994) utilizaram a mesma dosagem de 1µg de neurotropina-3, com descrição de bons resultados em regeneração axonal. Mas sua

via de administração foi *in loco*, assim neste experimento poderia ter sido incluso mais um grupo, com administração de neurotropina-4 localmente na lesão, permitindo o confronto dos resultados com o grupo que teve administração intraperitoneal. Deste modo, as duas vias de administração poderiam ser avaliadas. Na literatura consultada, nenhum ensaio utilizou a administração intraperitoneal. Nesta mesma linha de raciocínio, poderia ser testada uma supradosagem de Nt-4 e observar seu efeito, criando-se um quarto grupo.

Segundo Basso et al. (1996), o método de avaliação da função locomotora ideal, deve ser de fácil utilização, sensível e ter a capacidade de rapidamente mostrar mudanças, mesmo em número limitado de amostras. A escala BBB, que é uma escala qualitativa, atualmente é a que mais se aproxima desses requisitos. Em virtude desta escala ter sido objeto de avaliação de outras dissertações e teses no Letran, os examinadores estavam treinados e familiarizados com o método de avaliação locomotora. Assim a execução e o acompanhamento dos dias de avaliação foram 2, , 9, 14, 23 e 30 foram realizados, de forma rápida e com sensibilidade conforme as vantagens já citadas por Basso et al.

No presente estudo, a avaliação funcional realizada entre os grupos Controle *versus* Tratamento nos dias 2, 9 e 16, não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos; porém nos dias 23 e 30, o grupo Tratamento apresentou pontuações significativamente mais altas do que as do grupo Controle ($p = 0,010$ e $p = 0,013$, respectivamente), levando a concluir que houve recuperação motora com a utilização da neurotropina-4.

A avaliação histológica seguiu a metodologia estabelecida nos estudos de Tebet (2002) e Galvão (2003). Após o 30º dia, já com os dados da análise funcional locomotora concluído, os ratos foram eutanasiados e as peças submetidas à análise histológica pelo Serviço de Anatomia Patológica, na busca de correlação entre os dados. Nas peças analisadas, observavam-se áreas de necrose mais intensas na região dorsal da medula, mais na área submetida à contusão com o *impactor*, demonstrando que a lesão fora efetiva.

Estatisticamente, os dados histológicos obtidos do escore final, nas áreas cranial e caudal, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos Controle e Tratamento, porém na área da lesão o escore final evidenciou pontuações significativamente mais baixas do que as apresentadas pelo grupo Controle ($p = 0,001$). Pode-se crer que a neurotropina-4 tenha de alguma forma minimizado os efeitos secundários da cascata de eventos da lesão medular. Mas não há como afirmar o efeito regenerador do fator neurotrófico, uma vez que atualmente os estudos experimentais que possibilitam avaliar a capacidade do fármaco seriam realizados por meio de técnicas de imunohistoquímica com marcadores axonais, como 5ht, marcador de serotonina para fibras de crescimento axonal e traçadores de feixes e tratos neurais, como BDA (*biotinylated dextran amine*).

Bunge (2001) afirma que, em virtude da lesão medular envolver diferentes reações moleculares, celulares e teciduais, as estratégias de tratamento devem ser combinadas, de tal forma que uma potencialize a outra. Como exemplo, destaca os estudos com transplante e enxertos de células de Schwann em medulas transeccionadas, associados com fatores neurotróficos: há um incremento de axônios

regenerados por sobre a ponte de enxerto e além do coto da lesão. De tal forma que, atualmente, os fatores neurotróficos são largamente testados, na maioria dos experimentos em conjunto com outras estratégias.

A aplicação do uso clínico dos fatores neurotróficos associados a carreadores de baixo peso molecular tem tido resultados promissores em ensaios pré-clínicos, tais como as doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Prince, 2007).

Assim, concluiu-se que o NT-4 promoveu recuperação motora funcional nos animais de experimento e histologicamente proporcionou diminuição dos efeitos secundários da lesão medular. Como sugestão, fica a proposta de utilização de técnicas de imunohistoquímica e marcadores axonais para análise histológica e, também, o emprego de estratégias de tratamento combinado.

CONCLUSÕES



Com relação ao uso da neurotropina-4 em ratos lesados medulares, concluiu-se que:

- ✓ Promove a recuperação locomotora funcional;
- ✓ Diminui os efeitos secundários da lesão medular.

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				C o o r d e n a ç ã o	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata				I n s t a b i l i d a d e	Cauda			
Quadril		Joelho		Tornozelo					Balanço	Apoio da Pata		Dorsal		Plantar		Contato Inicial				Elevação								
E	D	E	D	E	D	Lado	Apoio								E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
0	0	0	0	0	0	E	D	E	D	Arrastando	E	D	E	D	0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I	Para Cima (elevada)		
S	S	S	S	S	S	Central	Paralelo								O	O	O	O	O	O	O	O	E	E	E		E	Para Baixo (abaixada)
E	E	E	E	E	E										Alto	F	F	F ⁺	F ⁺	F	F**	F**	P	P	P		P	
														C	C	C	C	C	C	C								

Comentários: _____

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

ANEXO II

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

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 <u>ou</u> 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) <u>ou</u> 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 <u>ou</u> passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.

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.

ANEXO III

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 estendidas, 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, $\leq 50\%$
Frequente	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

REFERÊNCIAS

Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord due to impact. An experimental study. JAMA. 1911; 57: 878-80.

Allen AR. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact: an experimental study. J Nerv Ment Dis. 1914; 41:141-7.

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

Andrade A, Pinto SC, Oliveira SC. Animais de laboratório: criação e experimentação. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002; 376-83.

Bachelin C, Lachapelle F, Girard C, Moissonnier P, Lagache CS, Mallet J, Fontaine D, Chojnowski A, Guern EL, Oumesmar BN, Evercooren ABV. Efficient myelin repair in the macaque spinal cord by autologous grafts of Schwann cells. Brain. 2005; 128: 540–549.

Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma I. Ultrastructure of axons and myelin. Lab. Invest. 1978a; 39: 236-53.

Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma II. The necrotic lesion as function of vascular injury. Lab. Invest. 1978b; 39: 254-66.

Baker AK, Nakashima S, Hagg T. Dorsal column sensory axons lack TrkC and are not rescued by local neurotrophin-3 infusions following spinal cord contusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2007; 205: 82–91.

Bamber NI, Huaying Li, Xiaobin Lu, Oudega M, Aebischer P. European Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cellseeded mini-channels. *Journal of Neuroscience*. 2001; 13: 257-268.

Barros Filho TEP. Tratamento medicamentoso no trauma raquimedular. *Rev Bras Ortop*. 2000; 35(5): 143-46.

Barros Filho TEP, Oliveira RP, Tsanaclis AM, Barros EMKP, Cristante AF, Palma RM, Santos CV, Marcon RM. An experimental model for the transplantation of fetal central nervous system cells to the injured spinal cord in rats. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo*. 2002; 57(6): 257-264

Bassit ACF. Utilização de animais de experimentação em laboratório de microcirurgia. In: Bijos P, Zumioti AV, Rocha JR. *Microcirurgia reconstrutiva*. 1ª edição. Rio de Janeiro. Atheneu. 2005; 253-61.

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

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996; 139: 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: 197-217.

Blesch A. Neurotrophic factors in neurodegeneration. *Brain Pathol*. 2006; 16:295–303.

Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nature Reviews - Neuroscience*. 2004; 7: 644 – 53.

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

Bunge MB. Bridging areas of injury in the spinal cord. *Neuroscientist*. 2001; 7(4): 325-39.

Cheng H, Yihai C, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*. 1996; 273: 510 – 13.

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

Courtine G, Bunge MB, Fawcett J, Grossman RG, Kaas JH. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nature Medicine*. 2007; 13: 561-66.

Delamarter RB, Bohlman HH, Dodge L, Biro C. Experimental lumbar spinal stenosis: Analysis of the cortical evoked potential, microvasculature, and histopathology. *J Bone Joint Surg (Am)*. 1990; 22: 289-344.

De la Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evolution of permanent experimental spinal cord trauma. *Neurology*. 1975; 25:508-11.

De La Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine*. 1981; 6:315-35.

Dietz V, Curt A. Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. *Lancet Neurol*. 2006; 5: 688-94.

Dohrmann GJ, Panjabi MM, Wagner FC. An apparatus for quantitating experimental spinal cord trauma. *Surg Neurol*. 1976; 315-18.

Ducker TB, Hamit F. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurgery*. 1969; 30:603-7.

Ducker TB, Kindt GW. Pathological finding in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurgery*. 1971; 35:700-8.

Eide FF, Lowenstein DH, Reichardt LF. Neurotrophins and their receptors—current concepts and implications for neurologic disease. *Exp Neurol*. 1993; 121(2):200-214.

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

Frajblat M, Amaral VLL, Rivera EAB. Bem estar em animais de laboratório. In: Christofolletti R, Beck AAH. (Org.). *Ética, Ciência e Desenvolvimento*. Itajaí: Editora da Universidade do Vale do Itajaí; 2006. 117-128.

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

Gebrin AS. Enxertos extradurais de nervos periféricos como via regenerativa na medula espinhal [dissertação]. São Paulo: Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo; 2003.

Ghasemlou N, Kerr JB, David S. Tissue displacement and impact force are important contributors to outcome after spinal cord contusion injury. *Exp Neurol*. 2006; 196: 9.

Gillespie LN. Regulation of axonal growth and guidance by the neurotrophin family of neurotrophic factors. *Clin Exp Pharma Phys*. 2003; 30: 724-33.

Grady MS. Physiopathology and experimental treatment of spinal cord injury. In: Levine AM (ed): *Orthopaedic knowledge update, trauma*. Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999.

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

Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg Neur.* 1975; 4: 531-36.

Holdsworth F. Fractures, dislocations and fracture-dislocations of the spine: a review paper. *J Joint Bone Surg Am.* 1970; 52: 1534.

Houle JD, Tessler A. Repair of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2003;182: 247-60.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677–736.

Hurlbert JR. Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury. *Spine.* 2006; 31(11S):16–21.

Kubeck JP, Merola A, Mathur S, Brkanic M, Majid K, Shanti N, Caruso S, Yuan S, Lowe T, Dwyer A, Maher T, O'Brian M. End organ effects of high-dose human equivalent methylprednisolone in a spinal cord injury rat model. *Spine.* 2006;31(3): 257–261.

Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine.* 2002; 27 (14): 1504–10.

Kwon BK, Fisher CG, Dvorak MF, Tetzlaff W. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*. 2005; 30(17S): 3-13.

Lee YS, Lin CY, Robertson RT, Hsiao I, Lin VW. Motor recovery and anatomical evidence of axonal regrowth in spinal cord-repaired adult rats. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004; 63: 233-45.

Levi-Montalcini L. Seletive growth-stimulating effects of mouse sarcomas on the sensory and sympathetic nervos sensory chick embryos. *J Exp Zool*. 1951; 116: 321-.

Lohse DC, Senter HJ, Kauer IS. Spinal cord blood flow in experimental transient paraplegia. *J Neurosurg*. 1980; 52: 335-45.

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

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.

Molina AEIS, Barros Filho TEP. Análise comparativa da avaliação funcional realizada na lesão medular em animais. *Acta Orto. Bras*. 2004; 2:35-46.

Molina AES. Análise da sensibilidade e reprodutibilidade da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Moris G, Vega JA. Factores neurotróficos: fundamentos para su aplicación clínica. *Neurologia*. 2003; 18(1): 18-28.

Narazaki DK, Barros Filho TEP, Oliveira CRGCM, Cristante AF, Iutaka AS, Marcon R, Oliveira RP. Spinal cord regeneration: the action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. *Clinics*. 2006; 61(5):453-60.

Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol*. 1987; 95: 530-33.

Oliveira AR. Efeito do tempo da descompressão medular no traumatismo raquimedular: estudo experimental em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Price RD, Milne SA, Sharkey J, Matsuoka N. Advances in small molecules promoting neurotrophic function. *Pharmacol Ther*. 2007; 115(2):292-306.

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Phil Trans R Soc B*. 2006; 361: 1545-64.

Rawe SE, Lee WA, Perot PL. The histopathology of experimental spinal cord trauma: the effect of systemic blood pressure. *J Neurosurg*. 1978; 48:1002-7.

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

Sahenk Z. Neurotrophins and peripheral neuropathies. *Brain Pathol.* 2006; 16:311–319.

Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab M. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature.* 1994; 367: 170-73.

Souza AS, Nascimento LN, Silva CA, Delfino HLA, Del Bel EA. Estudo experimental das alterações vasculares da medula espinhal induzidas por traumatismo mecânico e compressão do canal vertebral. *Rev Bras Ortop.* 2006; 41(6): 221-6.

Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies: experimental techniques to produce acute and gradual compression. *Arch Neurol Psychial.* 1953; 70: 813-9.

Tebet MA. Efeito da metilprednisolona e do gangliosídeo GM-1 na lesão medular em ratos. Análise funcional e histológica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Thuret S, Moon LDF, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosc.* 2006; 7: 628-43.

Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle EN, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop.* 1999; 34: 85-89.

Vialle E, Vialle LRG, Rasera E, Cechinel C, Leonel I, Seyboth C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos à lesão medular experimental. Rev Bras Ortop. 2002; 37(3): 83-88.

Vialle EN, Vialle LR, Bleggi-Torres LF, Sakamoto KS. Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos. Rev Bras Ortop. 2007; 42(4):101-13.

Yeo JD, Payne W, Hinwood B, Kidman AD. The experimental contusion injury of the spinal cord in sheep. Paraplegia. 1975; 12: 275-96.

Yeo JD, Stabback S, Mckenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep's spinal cord. Paraplegia. 1977; 14: 276- 85.

Woodward JS, Freeman LW. Ischemia of the spinal cord. An experimental study. J Neurosurgery. 1956; 13: 63-72.

Wrathall JR, Pettegrw RK, Harvey. Spinal cord contusion in the rat: production o graded, reproducible, injury groups. Exp Neurol. 1985; 88:108-22.