

**MARCELLO OLIVEIRA BARBOSA**

**Efeito neuroprotetor da hipotermia epidural após a lesão medular  
contusa em ratos**

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

Programa de Ortopedia e Traumatologia  
Orientador: Dr. Alexandre Fogaça Cristante

**São Paulo**

**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa, Marcello Oliveira

Efeito neuroprotetor da hipotermia epidural após a lesão medular contusa em  
ratos / Marcello Oliveira Barbosa. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São  
Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Alexandre Fogaça Cristante.

Descritores: 1.Traumatismos de medula espinal 2.Hipotermia 3.Fármacos  
neuroprotetores 4.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-435/13

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dr. Francisco Valdenor Barbosa (*in memoriam*) e Zélia Oliveira Barbosa, por me darem o exemplo.

À minha querida esposa, Cleire Daliana Langkammer R. Barbosa, por não medir esforços em me ajudar.

Aos meus filhos, Marcella e Murilo, minha inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por conduzir e iluminar meus passos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante, por acreditar no meu trabalho.

Ao biólogo Gustavo Bispo dos Santos, pelo empenho e dedicação na realização do estudo.

## **Normalização adotada**

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do *International Comittee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

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

Barbosa MO. Efeito neuroprotetor da hipotermia epidural após a lesão medular contusa em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

## **Resumo**

**Introdução:** A lesão da medula espinhal é uma entidade clínica grave e extremamente incapacitante. Muitos esforços estão sendo realizados para melhorar a resposta neurológica ao trauma da medula espinhal. Dentre eles, destacamos o uso de agentes farmacológicos, a descompressão e estabilização cirúrgica precoces e a hipotermia. A hipotermia pode ser induzida de forma sistêmica ou local. Várias complicações, como arritmias cardíacas, coagulopatias e infecções, foram associadas ao uso sistêmico da hipotermia. Porém, sua aplicação local demanda a necessidade de intervenção cirúrgica de emergência e manejo pós-operatório complicado.

**Objetivo:** Avaliar o efeito neuroprotetor da hipotermia epidural em ratos.

**Material e método:** Foram arrolados 30 ratos Wistar pesando entre 320-360 g e divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo da hipotermia epidural e o grupo controle, com 15 ratos cada. Uma contusão medular produzida por queda padronizada de peso de 10 g, a 25 mm de altura, usando o New York University (NYU) Impactor, foi realizada após a laminectomia em T9-10 em todos os ratos. Os ratos do grupo da hipotermia foram submetidos ao resfriamento a 9-10 °C por um período de 20 minutos, logo após a contusão medular. Os grupos foram analisados durante seis semanas quanto à função

motora utilizando-se a escala BBB e o teste do plano inclinado. Ao final da sexta semana, foi realizado ainda o exame de potencial evocado motor dos ratos, cujos resultados foram comparados entre os dois grupos.

**Resultados:** A avaliação da função motora através da aplicação da pontuação da escala BBB ao longo das seis semanas não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. Não encontramos diferenças estatísticas na avaliação motora através da pontuação do teste do plano inclinado ao longo das seis semanas do estudo. Os valores de latência e amplitude do potencial evocado motor não mostraram diferenças estatísticas significantes entre os grupos ao final da última semana do estudo.

**Conclusão:** A hipotermia não apresentou efeito neuroprotetor quando aplicada no sítio da lesão, logo após a contusão medular, no espaço epidural de ratos Wistar.

**Descritores:** Traumatismos da medula espinal; Hipotermia; Fármacos neuroprotetores; Ratos Wistar.

Barbosa MO. Neuroprotective effect of epidural hypothermia after spinal cord lesion in rats [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

## **Abstract**

**Introduction:** Spinal cord injury (SCI) is a critical and extremely disabling clinical condition. Considerable effort has been made to improve the neurological response to the spinal cord lesion. We must highlight pharmacological agents, early surgical decompression and stabilization and hypothermia. Therapeutic hypothermia can be achieved systemically or locally. Many complications have been associated to the systemic hypothermia, such as cardiac arrhythmias, coagulopathies and infection. However, local application demands surgical intervention and difficult post-operative care. **Objective:** To evaluate the neuroprotective effect of epidural hypothermia in rats. **Methods:** Wistar rats (n = 30; weighting 320-360 g) were randomized in two groups: the hypothermia and the control group, with 15 rats in each. A spinal cord lesion was produced by the standardized drop of a 10 g-weight from a height of 2,5 cm, using the New York University Impactor, after the laminectomy at the T9-10 level. Rats of the hypothermia group underwent epidural hypothermia for 20 minutes immediately after spinal cord injury. Motor function was assessed during six weeks using the BBB motor scores and inclined plane test. At the end of the last week, neurologic status was monitored by the motor evoked potential exam and the

results were compared between the two groups. **Results:** Analysis of the BBB scores during the six-weeks period did not show any statistically significant difference between the two groups. We did not find any significant difference between the groups in the scores of the inclined plane test during the six-weeks period. Latency and amplitude values of the motor evoked potential exam did not show any statistically significant difference between the two groups at the end of the study. **Conclusion:** Hypothermia did not produce any neuroprotective effect when applied immediately after spinal cord contusion, at the injury level and in epidural space of Wistar rats.

**Descriptors:** Spinal cord injuries; Hypothermia; Neuroprotective agents; Rats, Wistar.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Exposição da medula do rato após afastamento dos músculos paravertebrais e laminectomia ao nível de T9-T10..... 25
- Figura 2.** Mensuração da temperatura da medula utilizando-se o termômetro com ponta a laser. O termômetro é apontado para a região da lesão e, ao emitir o feixe de laser, mensura a temperatura do alvo para o qual está apontado ..... 25
- Figura 3.** Sistema de gotejamento de solução salina gelada armazenada em caixa de isopor. A solução era gotejada na medula, no sítio da lesão, através de sonda utilizada para cateterismo do espaço epidural ..... 26
- Figura 4.** Posicionamento dos eletrodos na face ventral nos membros anteriores e posteriores dos ratos e na região cefálica para mensuração do potencial evocado motor ..... 30

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão dos valores da escala BBB atribuídas semanalmente aos grupos..... 32
- Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão das pontuações do plano inclinado atribuídas semanalmente aos grupos..... 34
- Tabela 3.** Média e desvio padrão das amplitudes de potencial evocado motor para membros posteriores esquerdo (MPE) e direito (MPD) ao final da última semana de estudo..... 35
- Tabela 4.** Média e desvio padrão das latências de resposta motora para membros posteriores esquerdo (MPE) e direito (MPD) ao final da última semana de estudo..... 36
- Tabela 5.** Média e desvio padrão das amplitudes de potencial e latência de resposta nos membros posteriores (MP) dos dois grupos 37

## Lista de Gráficos

- Gráfico 1.** Análise comparativa da pontuação do BBB nos dois grupos ao longo das seis semanas ..... 33
- Gráfico 2.** Análise comparativa da pontuação do teste do plano inclinado nos dois grupos ao longo das seis semanas ..... 34
- Gráfico 3.** Amplitude do potencial evocado motor estratificada por membro nos dois grupos: membro posterior esquerdo (MPE) e direito (MPD)..... 36
- Gráfico 4.** Latência do potencial evocado motor estratificada por membro nos dois grupos: membro posterior esquerdo (MPE) e direito (MPD) ..... 37

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. Objetivos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais de experimentação e cuidados .....	22
3.2. Intervenções em estudo: lesão medular e resfriamento .....	23
3.3. Avaliações realizadas .....	27
3.3.1. Avaliação da função .....	28
3.3.2. Avaliação do plano inclinado .....	28
3.3.3. Potencial evocado motor .....	29
3.4. Análise estatística .....	30
4. RESULTADOS.....	32
5. DISCUSSÃO .....	38
6. CONCLUSÃO .....	45
7. ANEXO .....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## 1. INTRODUÇÃO

A cada ano nos Estados Unidos, aproximadamente 11.000 a 12.000 indivíduos sofrem uma lesão da medula espinhal devido a acidentes com veículos automotores, lesões relacionadas aos esportes e trauma direto. Muitas das vítimas são adultos jovens do sexo masculino e em sua maioria estes indivíduos permanecem com paralisia grave e déficits funcionais para o resto da vida.<sup>1</sup> No Brasil, somente em 2012, o Sistema Único de Saúde (SUS) atendeu pelo menos 6.517 vítimas de traumatismo raquimedular ou fratura da coluna vertebral com lesão da medula espinhal.<sup>2</sup>

Muitos casos de paralisia após trauma raquimedular resultam da isquemia secundária aos efeitos do aumento da pressão venosa epidural e espasmo arterial, que podem ser reversíveis.<sup>3</sup> Técnicas usadas para maximizar a recuperação neurológica depois de um traumatismo raquimedular têm sido objeto de intensa pesquisa durante décadas.<sup>4,5</sup> Vários métodos foram postulados no intuito de melhorar a recuperação neurológica de pacientes vítimas de lesão medular, dentre eles a descompressão medular e estabilização precoces, o uso de vários agentes farmacológicos, a modificação de certos moduladores do processo inflamatório celular e a hipotermia.<sup>5,6</sup> A questão é saber se estes métodos de fato contribuem significativamente para a recuperação neurológica.

O primeiro resfriamento da medula espinhal aplicado experimentalmente com sucesso após lesão medular foi realizado por Albin

e colaboradores em 1967.<sup>7</sup> A partir desse estudo inicial, o efeito neuroprotetor da hipotermia tem sido demonstrado em diferentes modelos experimentais de lesão medular. Resultados preliminares de ensaios clínicos e estudos experimentais na década de 1970 mostram-se promissores.<sup>4,5,7</sup> Atualmente, a hipotermia vem sendo usada em estudos com modelos animais e humanos para o tratamento de lesões decorrentes de traumatismos no cérebro e na medula espinhal por alguns investigadores. Ela pode ser induzida de forma sistêmica ou local.<sup>4,5</sup> Tradicionalmente, até a década de 80, vinha sendo aplicada de forma sistêmica, uma técnica limitada no que se refere à temperatura a ser alcançada (32 °C a 33 °C) devido às complicações que podem surgir à medida que esta diminui, como a dessaturação da hemoglobina, que leva à isquemia em pacientes politraumatizados.<sup>5,6</sup>

Considerando tais riscos e a aplicabilidade clínica limitada desse método, outros pesquisadores publicaram resultados favoráveis usando a hipotermia diretamente no local da lesão, através da pele, tecido subcutâneo, músculos paravertebrais e arco neural posterior.<sup>5</sup> Por outro lado, o resfriamento local da medula espinhal ao nível da lesão requer o uso de dispositivos especiais, cirurgia de emergência e manejo pós-operatório complicado.<sup>6</sup> Devido à dificuldade da aplicação clínica de ambos, ainda existem incertezas sobre qual delas, hipotermia local ou sistêmica, apresenta vantagem no efeito neuroprotetor.

## **1.2. Objetivos**

Avaliar o efeito neuroprotetor da hipotermia aplicada ao nível da lesão medular em ratos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A primeira descrição intencional da indução de hipotermia foi, na verdade, uma tentativa de retardar a progressão de uma doença metastática em uma mulher com um carcinoma ulcerado de mama cuja doença local havia mostrado uma resposta marcante ao resfriamento da mama e do pescoço. O procedimento foi realizado pelo Dr. Temple Fay em novembro de 1938.<sup>8</sup> Em seguida, ele descreveu, com colaboração de outras equipes, o uso da hipotermia em um grande número de pacientes com câncer<sup>9</sup> e lesões cerebrais.<sup>10</sup>

Bigelow e cols. introduziram a ideia do uso da hipotermia na cirurgia cardíaca após extensos experimentos em cães, e, no final da década de 50, ela já estaria sendo publicada com várias indicações, incluindo o trabalho pioneiro de reparo do aneurisma cerebral.<sup>11</sup> Naquelas circunstâncias, o tratamento com hipotermia consistia em manter temperaturas corporais entre 24 °C e 33 °C. O entusiasmo com a indução da hipotermia foi diminuindo com o passar das décadas e abandonado na década de 80 devido, em grande parte, às complicações associadas, que incluíram as arritmias cardíacas, hipotensão, coagulopatias, infecções sistêmicas e distúrbios hidroeletrólíticos.<sup>12</sup>

Em 1987, Busto e cols. publicaram um modelo de isquemia em ratos no qual o dano neuronal poderia ser muito atenuado pela diminuição relativamente pequena da temperatura corporal comparada aos estudos

anteriores, sugerindo portanto que a hipotermia requerida para a proteção neuronal seria talvez não tão grande como inicialmente demonstrado.<sup>13</sup> Esse potencial para o benefício neurológico com reduções menores da temperatura corporal levou à renovação do interesse pela hipotermia, que pode ser genericamente categorizada em leve (33°-36 °C), moderada (28°-32 °C), intensa (16°-28°C) e profunda (< 15 °C),<sup>14</sup> embora as temperaturas que variam de 32 °C a 34 °C sejam compatíveis com hipotermia leve a moderada na literatura. Nas duas últimas décadas, o interesse pela hipotermia tem sido substancial, particularmente no traumatismo cranioencefálico agudo, no trauma raquimedular, no acidente vascular cerebral, na parada cardiorrespiratória, na cirurgia cardíaca e no reparo cirúrgico dos aneurismas cerebrais e da aorta toracoabdominal.<sup>12,15</sup>

A hipotermia sistêmica pode ser alcançada de duas formas: externa, através do resfriamento da superfície corporal, ou interna, através do resfriamento endovascular.<sup>16</sup> O resfriamento da superfície corporal com sacos de gelo aplicados ao corpo do paciente ou a lavagem gástrica usando fluidos com gelo são as técnicas mais simples de indução de hipotermia<sup>17</sup> e foram utilizadas por investigadores em importantes ensaios de trauma cranioencefálico<sup>18</sup> e parada cardiorrespiratória.<sup>19</sup> Sistemas de resfriamento da superfície corporal que usam circulação de ar ou água gelados através de dispositivos colocados na pele foram popularizados como resultado da sua facilidade de uso. Um desses dispositivos, que usa um colchão e uma manta especiais, foi usado no estudo multicêntrico: Hipotermia após Parada Cardiorrespiratória (estudo HACA — Hypothermia After Cardiac Arrest).<sup>20</sup>

O resfriamento da superfície corporal, embora relativamente simples, requer horas até alcançar a hipotermia moderada e, em indivíduos obesos, sua eficácia em reduzir a temperatura corporal é limitada.<sup>14,15</sup> Um resfriamento mais rápido pode ser alcançado através da infusão endovenosa de solução salina gelada ou utilizando uma conexão com sistemas de resfriamento extracorpóreo. Em indivíduos saudáveis, a infusão de 40 ml/kg de solução salina a 4 °C por 30 minutos reduziu a temperatura corporal em 2,5 °C.<sup>21</sup> Bernard e cols. publicaram que a infusão de 30 ml/kg de solução de ringer lactato gelado, em pacientes comatosos que sobreviveram à parada cardiorrespiratória fora do ambiente hospitalar, reduziu a temperatura corporal em 1,6 °C por mais de 25 minutos.<sup>19</sup> Essas reduções são, claramente, mais rápidas do que as alcançadas com o resfriamento da superfície corpórea. Uma comparação randomizada entre um sistema de resfriamento endovascular e um sistema de resfriamento da superfície corpórea em pacientes submetidos a cirurgia para reparo de aneurisma cerebral revelou que a temperatura alvo de 33 °C foi alcançada mais rapidamente, a sua manutenção foi mais efetiva e o reaquecimento do paciente foi mais rápido quando a abordagem com o sistema endovascular foi usada.<sup>22</sup>

O tremor é uma resposta termorregulatória natural à hipotermia sistêmica induzida pelo resfriamento e está presente usando-se ambos os sistemas, endovascular ou da superfície corpórea. Quando usamos essa abordagem terapêutica, é importante considerarmos esse fator, pois o tremor impede a redução da temperatura corpórea, além de ser muito

desconfortável para o paciente. Vários métodos têm sido desenvolvidos para o tratamento dos tremores decorrentes da indução da hipotermia, incluindo sedação e paralisia.<sup>23</sup> A meperidina, um agente particularmente eficaz na redução dos tremores, é digna de nota<sup>24</sup> e amplamente usada para permitir reduções significativas na temperatura corporal sem a necessidade de anestesia geral ou mesmo drogas paralisantes.

A hipotermia regional é interessante por evitar as complicações sistêmicas associadas a redução da temperatura do corpo como um todo. O resfriamento regional da medula espinhal pode ser alcançado, por exemplo, com a infusão de solução salina gelada no espaço epidural ou intradural ou mesmo usando dispositivo (cateter) resfriado e colocado no espaço epidural.<sup>25,26</sup> Esta é a forma usual através da qual a hipotermia da medula espinhal é clinicamente alcançada durante o reparo do aneurisma da aorta toracoabdominal, embora não seja a única.<sup>27</sup> O resfriamento regional do cérebro pode ser alcançado com um capacete ou dispositivo tipo boné,<sup>28,29</sup> embora a eficácia em atingir temperaturas significativamente baixas seja limitada com essa técnica em adultos. Técnicas endovasculares também permitem a possibilidade de resfriamento de áreas específicas do cérebro com a colocação de cateteres em artérias dentro do crânio, uma estratégia que pode ser aplicada em vítimas de acidente vascular cerebral (AVC) e traumatismo cranioencefálico (TCE).<sup>30,31</sup>

Embora a primeira investida de Fay com a hipotermia tenha sido feita objetivando a parada do crescimento tumoral, a principal razão para a indução da hipotermia nos últimos 50 anos tem sido a proteção neuronal do cérebro e

da medula espinhal em situações como lesões isquêmicas e traumáticas.<sup>15</sup> É interessante considerar o quanto esse efeito neuroprotetor é estimado, embora de um ponto de vista pragmático, os esforços e ações para alcançá-lo sejam menores do que a preocupação dos clínicos pela procura de um regime terapêutico no contexto de uma condição neurológica grave.<sup>32</sup>

Sabendo que o sistema nervoso central é muito sensível a pequenas quedas na produção energética, é razoável supor que a hipotermia age geralmente para manter as concentrações fisiológicas de adenosina-trifosfato (ATP). De uma forma geral, a frequência das reações biológicas enzimáticas é substancialmente influenciada pela temperatura, e sendo assim, a hipotermia confere proteção da integridade celular, diminuindo a atividade celular enzimática, reduzindo a demanda celular de energia e portanto mantendo as concentrações de ATP.<sup>12</sup> Tem sido divulgado que, para cada grau de temperatura corpórea que é reduzido (em Celsius), o metabolismo cerebral diminui em 5 a 7%.<sup>33</sup> Para resumir a extensa e detalhada revisão de Erecinska sobre os efeitos da hipotermia no metabolismo, a hipotermia reduz as taxas de metabolismo da glicose e oxigênio de duas para quatro vezes por cada 10 °C de redução na temperatura corpórea, reduzindo também o fluxo sanguíneo cerebral.<sup>34</sup> A subsequente manutenção de ATP por ambos, o consumo celular reduzido e a produção aumentada através da glicólise provavelmente têm papel significativo na preservação da função neurológica.

Muitos outros efeitos neuroprotetores da hipotermia têm sido demonstrados, principalmente em modelos animais de isquemia do sistema

nervoso central.<sup>35</sup> Embora a fisiopatologia da isquemia cerebral seja diferente daquela causada pelo trauma contuso à medula espinhal, a isquemia ainda é considerada um fator importante que contribui para a lesão secundária na lesão da medula espinhal,<sup>36</sup> e portanto, é provável que muitas ações referentes ao mecanismo da hipotermia documentados em ambientes de isquemia sejam relevantes para a lesão da medula espinhal. Por exemplo, na lesão cerebral isquêmica, a hipotermia tem reduzido os níveis extracelulares de glutamato e portanto atenuado a toxicidade excitatória, que também é um importante colaborador da lesão secundária após a lesão medular.<sup>37,38</sup> Quebra da barreira hematoencefálica e o edema vasogênico subsequente são diminuídos.<sup>39,40</sup> A liberação do citocromo 3 e da caspase-3, responsáveis pela morte celular é inibida.<sup>40</sup> A hipotermia também reduz o acúmulo e ativação de neutrófilos e da micróglia, importantes constituintes da resposta neuroinflamatória ao trauma.<sup>29,41</sup> O estresse oxidativo é reduzido pela inibição da produção de radicais livres.<sup>42,43</sup>

Embora não exista um grande corpo literário disponível sobre a experiência clínica com a hipotermia no trauma raquimedular em humanos, existe literatura substancial para outras condições nas quais a hipotermia é induzida para proteger o cérebro e a medula espinhal. Dentre os mais relevantes para esta discussão, destacamos o uso da hipotermia como neuroprotetor cerebral no TCE, na parada cardiorrespiratória, no acidente vascular cerebral e na lesão medular isquêmica durante a cirurgia de reparação do aneurisma toracoabdominal.

Marion e cols. publicaram, em 1997, estudo prospectivo randomizado envolvendo mais de 80 pacientes, em que obtiveram melhora significativamente maior em pacientes submetidos a hipotermia moderada (32-33 °C) após TCE grave (escala de coma de Glasgow de 5-8) após 12 meses de seguimento.<sup>44</sup> Eles constataram 62% de bons resultados contra 38% no grupo controle. Um estudo maior, que também é mais frequentemente citado quando o assunto é hipotermia no TCE, foi publicado por Clifton e cols., que randomizaram 392 pacientes vítimas de TCE para a indução da hipotermia (33 °C por 48 h).<sup>18</sup> Esse ensaio clínico não demonstrou benefício significativo para os pacientes tratados com hipotermia. Porém é importante mencionar que, nesse ensaio, a hipotermia foi instituída em média após oito horas do trauma, relativamente tarde, portanto. Os pacientes com hipóxia persistente foram excluídos e variações significativas no manejo clínico do balanço hídrico existiram entre os centros que participaram do estudo. Uma metanálise em 2002 concluiu que a hipotermia não era benéfica no TCE, embora encorajasse estudos futuros.<sup>45</sup> Uma revisão sistemática da Cochrane em 2004 concluiu que não havia evidência de que a hipotermia fosse benéfica no tratamento do TCE<sup>46</sup> e estaria associada a aumento significativo na incidência de pneumonia. Embora os estudos anteriores tenham abordado o TCE em adultos, a hipotermia vem sendo ativamente estudada em pacientes pediátricos.

O New England Journal of Medicine publicou dois ensaios clínicos randomizados em fevereiro de 2002, em que a hipotermia foi induzida em pacientes nos quais a circulação espontânea foi reestabelecida após uma

parada cardiorrespiratória devido a fibrilação ventricular ou taquicardia. Esse estudo, denominado HACA, foi um ensaio randomizado, multicêntrico que envolveu 275 pacientes divididos em dois grupos: o que foi submetido a hipotermia (32-34 °C por 24 h) e o controle. Foi utilizado um sistema de resfriamento da superfície corpórea.<sup>20</sup> Após seis meses da parada cardiorrespiratória, o grupo submetido a hipotermia apresentou taxa de resultado neurológico favorável maior (55% *versus* 39% com intervalo de confiança de 95%, IC 95%: 1.08-1.81). A taxa de mortalidade após os primeiros seis meses também foi maior no grupo da hipotermia (55% *versus* 41% IC 95%: 0.58-0.95). Havia uma tendência em direção a uma proporção aumentada de complicações nos pacientes do grupo da hipotermia somada a uma taxa mais alta de sepse e sangramento. O estudo australiano desenvolvido por Bernard e cols. randomizou 77 pacientes para normotermia e hipotermia de 33 °C por 12 horas usando resfriamento da superfície corporal com colchão de gelo.<sup>19</sup> O percentual de pacientes que sobreviveram com bom resultado (liberados para casa ou para reabilitação) foi significativamente maior no grupo da hipotermia (49% *versus* 26%). Uma revisão sistemática da literatura publicada em 2006 concluiu que a hipotermia leve diminui a mortalidade hospitalar e melhora a condição neurológica em pacientes que sobreviveram à parada cardiorrespiratória.<sup>47</sup>

Embora a hipotermia tenha demonstrado aparente benefício neuroprotetor na isquemia cerebral global secundária à parada cardiorrespiratória, o seu uso em vítimas de acidente vascular cerebral, nos quais a área isquêmica é mais localizada, não tem sido extensivamente

estudado. Uma revisão da Cochrane realizada em 1999 mostrou que, até então, não havia nenhum ensaio clínico prospectivo e randomizado relativo à hipotermia no derrame cerebral.<sup>48</sup> O grupo COOL-AID (Cooling for Acute Ischemic Brain Damage) conduziu dois estudos seguros e viáveis no acidente vascular cerebral agudo. O primeiro avaliou o resfriamento de 32 °C da superfície corpórea por 12 horas em 19 pacientes<sup>49</sup> e o segundo avaliou o resfriamento endovascular de 33 °C por 24 horas em 40 pacientes.<sup>50</sup> Ambos mostraram segurança e a viabilidade da hipotermia nesta condição, mas nenhum deles foi capaz de demonstrar benefício neurológico. Apesar do benefício clínico não comprovado, dados de um grande número de estudos em animais teriam sugerido que a hipotermia é benéfica no AVC agudo,<sup>51</sup> e ela é encarada como tendo potencial neuroprotetor promissor nesta situação clínica pela “American Stroke Association”.<sup>52</sup> Curiosamente, existem alguns dados de estudos que sugerem um melhor resultado neurológico em pacientes vítimas de AVC que já chegam ao hospital em leve estado de hipotermia.<sup>53,54</sup>

Seguindo essa linha, a hipotermia tem sido investigada como um adjuvante neuroprotetor na cirurgia para correção do aneurisma cerebral, em que o déficit neurológico pode decorrer da hemorragia intra-operatória, da oclusão vascular e da manipulação direta ou retração do parênquima cerebral. Com esse propósito, um estudo prospectivo, randomizado, foi conduzido para avaliar os benefícios da hipotermia sistêmica intra-operatória. Participaram do estudo 1.001 pacientes, submetidos ao resfriamento de 33 °C. Todd e cols. publicaram em 2005 no New England Journal of Medicine que a hipotermia não resultou em melhora dos

resultados quando comparada à normotermia.<sup>55</sup> Os autores ainda publicaram uma frequência aumentada de bacteremia nos pacientes submetidos a hipotermia (25 *versus* 13 pacientes com  $p = 0,05$ ). Por outro lado, não houve diferença significativa na incidência de efeitos adversos.

A paraplegia resultante da lesão isquêmica à medula torácica durante o reparo do aneurisma da aorta toracoabdominal ocorre em 5 a 10% dos casos e é uma das mais temidas complicações desse procedimento.<sup>56</sup> A hipotermia sistêmica ou local é reconhecida como uma das muitas intervenções com potencial neuroprotetor, e que também incluem a drenagem do líquido cefalorraquidiano e o uso do naloxeno.<sup>57</sup> O uso do resfriamento epidural no reparo do aneurisma da aorta toracoabdominal tem sido defendido na última década, em grande parte pelos cirurgiões do Hospital Geral de Massachusetts.<sup>58-60</sup> Solução salina a 4 °C é infundida através de um cateter para alcançar uma temperatura de 25 a 27 °C na região torácica da medula espinhal. Na última revisão de 445 reparos de aneurismas da aorta toracoabdominal consecutivos e analisados prospectivamente entre 1987 e 2005, os cirurgiões do Hospital Geral de Massachusetts publicaram um número significativamente menor de pacientes com aneurismas tipo I, II ou III de Crawford que sofreram paralisia isquêmica dos membros inferiores quando tratados com hipotermia regional (29/211[13,7%] *versus* 25/86 [29%]).<sup>60</sup> A hipotermia sistêmica também tem sido avaliada no reparo do aneurisma toracoabdominal e, enquanto carrega consigo os riscos das complicações associadas ao resfriamento sistêmico (isto é, coagulopatias, infecção, arritmias), também confere alguma proteção

a outros órgãos além da medula espinhal, como o cérebro e os rins. Kouchoukos e cols. publicaram uma casuística de 211 pacientes que apresentavam extensos aneurismas e foram submetidos a hipotermia profunda de 15° a 19 °C em associação com *bypass* cardiopulmonar.<sup>61</sup> A frequência de paraplegia isquêmica foi de 2,9%, que os autores sugerem que é muito menor do que aquela vista em outras intervenções, como a drenagem do líquido cefalorraquidiano. Em contraste, von Segesser e cols. publicaram estudo prospectivo não randomizado com 100 pacientes nos quais a incidência de paraplegia isquêmica não foi diferente no grupo que recebeu hipotermia e *bypass* cardiopulmonar parcial quando comparado com pacientes normotérmicos (8% em ambos os grupos).<sup>62</sup> Nenhum estudo prospectivo e randomizado da hipotermia epidural ou sistêmica nessa área foi conduzido até o momento.

Os efeitos adversos graves da hipotermia, como as arritmias ventriculares, coagulopatias e susceptibilidade a infecções, contribuíram para o abandono dessa terapia dos anos 60 aos anos 80. Deve-se notar que o uso contemporâneo da hipotermia sistêmica frequentemente almeja uma temperatura em torno de 32 a 34 °C, o que diminui mais o risco para esses efeitos do que quando são usadas temperaturas abaixo de 30 °C, muito comuns nos primeiros estudos com hipotermia. Porém, a hipotermia sistêmica apresenta efeitos fisiológicos variados e as preocupações relativas aos potenciais efeitos adversos não podem ser ignoradas.

A hipotermia pode levar a aumento da susceptibilidade a infecções pela inibição da migração e ativação dos neutrófilos<sup>41,63,64</sup> e aumento da

liberação de citocinas imunossupressoras.<sup>65</sup> No estudo HACA, os pacientes tratados com hipotermia tiveram taxa de pneumonia e sepse maiores quando comparados com os pacientes normotérmicos, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa.<sup>20</sup> Taxa significativamente maior de bacteremia foi encontrada em pacientes tratados com hipotermia comparada à taxa dos controles normotérmicos (5% *versus* 3%,  $p = 0,05$ ) em estudo prospectivo randomizado envolvendo 1001 pacientes submetidos a cirurgia para reparo de aneurisma cerebral.<sup>55</sup> A hipotermia induz a disfunção plaquetária reversível e aumenta o tempo de sangramento,<sup>66</sup> somando-se à inibição de reações enzimáticas da cascata de coagulação, levando a aumento do tempo de protrombina e tromboplastina parcial.<sup>67</sup> A hipotermia entre 32 e 34 °C diminui a frequência cardíaca e aumenta a resistência vascular periférica, embora a bradicardia usualmente não demande nenhum tratamento específico.<sup>15</sup> Arritmias cardíacas mais graves não foram observadas em grandes estudos prospectivos e randomizados de hipotermia leve (em torno dos 33 °C) na parada cardiorrespiratória.<sup>19,20</sup>

Guest e cols. estudaram essas potenciais complicações (infecção, sangramento e outras) em um trabalho retrospectivo de revisão de 70 pacientes adultos submetidos a cirurgia eletiva da coluna vertebral.<sup>68</sup> Nesses pacientes, a hipotermia não foi induzida: foi permitido que esta ocorresse ao absterem-se de reaquecer os pacientes durante o procedimento cirúrgico. Os autores publicaram que períodos curtos de hipotermia não foram associados com aumento da perda sanguínea, infecções de ferida operatória ou outras complicações relativas ao tratamento instituído. A

temperatura média observada durante a cirurgia foi de 35.8 °C e variou de 34.4 °C a 37.3 °C, enquanto a temperatura mais baixa durante a operação estava em torno de 35.2 °C e variou de 33.2 °C a 36.5 °C. Assim, o grau de hipotermia não foi tão intenso quanto o usado em ensaios de indução de hipotermia neuroprotetora para TCE ou parada cardiorrespiratória.

A maioria dos estudos experimentais envolvendo a lesão da medula espinhal foi publicada usando a hipotermia sistêmica. Ratos adultos da raça Sprague-Dawley de ambos os sexos foram usados nesses estudos, embora o peso dos animais diferissem substancialmente, de 225-275 g no estudo de Yu e cols.<sup>69</sup> para 350-500 g nos animais dos estudos de Westergren e cols.<sup>70,71</sup> e Yu e cols.<sup>72</sup> Um único experimento com 15 ratos Sprague-Dawley machos pesando  $387 \pm 37$  g submetidos a lesão compressiva torácica da medula espinhal é descrito em quatro publicações distintas que trazem diferentes resultados de medidas histológicas e bioquímicas.<sup>72-75</sup> Todos os investigadores produziram a lesão na medula torácica, com exceção do estudo de Jou e cols., no qual foi produzida lesão cervical ao nível de C6/7. Os mecanismos de lesão da medula foram o uso do New York University (NYU) Impactor,<sup>69,76</sup> cliques aneurismáticos<sup>77</sup> ou compressão dorsal contínua.<sup>70-72,78,79</sup> Muitos desses estudos avaliaram a hipotermia na lesão da medula espinhal e em controles que não foram lesionados para determinar o efeito fisiológico da hipotermia.<sup>70-72,76</sup> A indução da hipotermia começou antes da lesão,<sup>77,78</sup> imediatamente após<sup>76,79</sup> ou entre 15 e 30 minutos após a lesão.<sup>69,71</sup> Temperaturas entre 30 a 34 °C foram alcançadas e mantidas por 20 minutos<sup>72</sup> até 4 horas.<sup>69,79</sup>

Nesses estudos, a hipotermia sistêmica teve uma ampla variação de efeitos bioquímicos, histológicos e fisiológicos. Westergren e cols. citaram que, para cada grau de temperatura corpórea reduzido, o fluxo sanguíneo para a medula espinhal era significativamente reduzido em 2,8% a 3,5% nos animais não lesionados, o que não ocorreu nos lesionados.<sup>71</sup> Na hipotermia induzida antes da lesão, Jou e cols. publicaram que a seqüela neurológica da compressão aguda da medula espinhal foi amenizada nos animais hipotérmicos e o dano tecidual resultante e a paralisia das extremidades inferiores foram reduzidos.<sup>77</sup> Yu e cols.<sup>69</sup> também obtiveram redução do dano secundário no sítio da lesão medular nos animais tratados com hipotermia, somada a menor edema vasogênico local.<sup>72,73</sup> As análises bioquímica e histológica da medula espinhal dos animais hipotérmicos revelaram redução da atividade da mieloperoxidase e da reação imunológica, indicando atenuação na invasão dos neutrófilos no sítio de lesão medular.<sup>76</sup> O tratamento com hipotermia foi associado a aumento da reação imunológica MAP2 (*microtubule-associated protein 2*) no sítio da lesão quando comparado à normotermia, indicando alguma preservação desse importante componente do citoesqueleto neuronal.<sup>72</sup> Ao contrário, a hipotermia foi associada com uma reação imunológica reduzida aos marcadores da lesão axonal no sítio da lesão, incluindo b-APP, ubiquitina e PGP9.5.<sup>73</sup> Yamamoto e cols. publicaram níveis reduzidos de glutamato no líquido cefalorraquidiano (LCR) em animais tratados com hipotermia quando comparados ao controle normotérmico.<sup>80</sup> Por outro lado, uma avaliação por microdiálise do sítio de lesão medular revelou não haver diferença nas concentrações de lactato nos pacientes tratados com

hipotermia. De fato, as concentrações extracelulares de glutamato e aspartato foram realmente maiores do que nos controles normotérmicos.<sup>78</sup> Os autores propuseram que, enquanto a hipotermia reduz a liberação de aminoácidos excitatórios no modelo de lesão isquêmica, isso não deve ser tão efetivo em condições traumáticas.

Em relação à recuperação funcional, os resultados da hipotermia sistêmica são variados. Curiosamente, embora Yu e cols.<sup>72-74</sup> e Westergren e cols.<sup>75</sup> tenham publicado repetidamente os benefícios histológicos e bioquímicos da hipotermia no trauma raquimedular agudo, eles não encontraram melhora na pontuação da avaliação motora e no teste do plano inclinado dos animais tratados com hipotermia, usando o mesmo modelo de lesão medular e tratamento.<sup>70</sup> Em contrapartida, usando um modelo de contusão medular reconhecido (NYU Impactor) e um teste de locomoção padrão, Yu e cols. obtiveram melhora significativa da função motora após seis semanas da lesão medular nos animais submetidos à hipotermia quando comparados ao controles normotérmicos [pontuação de Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) de  $13,3 \pm 0,47$  versus  $10,8 \pm 0,44$ ,  $p = 0,0024$ ].<sup>69</sup> Esses autores induziram a hipotermia sistêmica 30 minutos após a lesão medular.

A hipotermia local da medula espinhal foi a estratégia terapêutica inicial usada por pesquisadores nos anos 60 e início da década de 70, pois eles procuravam determinar o potencial neuroprotetor da hipotermia após a lesão medular. Nos primeiros estudos, que frequentemente usavam animais de grande porte como modelo (cães ou macacos), a dura-máter era

usualmente aberta e uma solução salina gelada, infundida no espaço intratecal,<sup>7,81</sup> o que levantou questões sobre se o benefício observado estava relacionado à hipotermia ou simplesmente ao fato de se retirar os metabólitos deletérios pela irrigação.<sup>82,83</sup> A herniação da parte lesada da medula espinhal através do local da durotomia levou ao abandono dessa técnica, e os estudos contemporâneos usam o resfriamento do espaço epidural. Os primeiros pesquisadores não tinham à sua disposição os sistemas de pontuação da locomoção padronizados ou o formato de mensuração dos resultados histológicos que existem hoje. Assim como nas publicações da hipotermia sistêmica após a lesão da medula espinhal, esses estudos da hipotermia local utilizaram vários modelos animais, vários mecanismos de lesão, várias janelas de intervenção e parâmetros distintos de indução da hipotermia.

Os primeiros estudos envolvendo a hipotermia regional produziram análises mostrando vantagens e desvantagens sobre seus benefícios na lesão medular aguda, tornando difícil a interpretação do potencial terapêutico dessa intervenção. No final da década de 60, Albin e cols. publicaram que a infusão de solução salina muito gelada no espaço epidural em cães e no espaço intradural em macacos<sup>7,81</sup> resultou em boa recuperação neurológica em quase todos os animais tratados. De modo contrário, apenas alguns anos mais tarde, Black e Markowitz publicaram que a infusão da solução salina gelada através do espaço epidural em macacos resultou em uma recuperação levemente pior do que nos controles,<sup>84</sup> um resultado corroborado por Howitt e Turnbull, que não observaram nenhuma

recuperação motora da patas posteriores ou neuroproteção histológica em um modelo de lesão medular em coelhos.<sup>85</sup> Tator e Deecke trouxeram algum esclarecimento na questão da infusão intratecal *versus* epidural de solução salina gelada quando compararam os efeitos da solução salina em diferentes temperaturas, gelada e a 36 °C, infundidas no espaço intratecal.<sup>82,83</sup> Eles publicaram que a recuperação neurológica foi significativamente maior com a solução salina a 36 °C, sugerindo que o ato de infundir o espaço intratecal teria sido mais responsável pelos efeitos neuroprotetores do que a hipotermia exatamente. Embora isso tenha refutado o potencial benefício da hipotermia epidural, Hansebout e cols.<sup>86</sup> e Kuchner e Hansebout<sup>87</sup> em seguida publicaram que a hipotermia epidural resultou em recuperação motora significativa em um modelo de compressão medular torácica em cães.

Os estudos mais recentes que foram publicados na última década também não têm mostrado um quadro claro do papel da hipotermia local na lesão da medula espinhal. Tüzgen e cols. observaram diminuição da concentração de produtos finais da peroxidação lipídica na medula de animais tratados com hipotermia local após a lesão medular, porém não publicaram nenhum resultado funcional.<sup>88</sup> Kuchner e Hansebout, usando o seu antigo modelo de compressão da medula torácica em cães, demonstraram novamente que a hipotermia epidural e o uso de esteroides resultaram em melhor função motora dos membros posteriores quando comparados aos controles normotérmicos, porém não houve nenhum benefício funcional ou bioquímico na combinação deles.<sup>89</sup> Dimar e cols.

desenvolveram um estudo no qual o resfriamento epidural foi avaliado em três ambientes distintos: em um modelo de compressão medular com um espaçador, contusão medular com o NYU Impactor e contusão medular com o NYU Impactor seguida da compressão com o espaçador.<sup>5</sup> Esse estudo demonstrou benefício neuroprotetor da hipotermia local no modelo de compressão epidural, porém isso não foi demonstrado quando a lesão medular foi produzida pela contusão do NYU Impactor. Isto sugere que a eficácia da hipotermia é fortemente influenciada pela natureza da lesão produzida na medula espinhal e que sendo a hipotermia efetiva na lesão medular caracterizada por compressão e isquemia, ela não o deve ser quando uma contusão súbita é utilizada para produzir a lesão. Casas e cols., sustentando esta premissa, conduziram um estudo de resfriamento epidural com três diferentes temperaturas (24,1 °C, 30,5 °C e 35,3 °C) após uma contusão medular padrão na região torácica e publicaram que não houve melhora na pontuação locomotora do BBB e não houve redução no dano tecidual secundário nos animais tratados com a hipotermia.<sup>90</sup> Tais resultados sugerem que o resfriamento epidural deve ter de fato um efeito neuroprotetor na compressão isquêmica da medula espinhal, porém limitado, ou nenhum efeito quando a lesão é traumática. Infelizmente, o trauma raquimedular é reconhecido como o principal componente da maioria das lesões medulares em humanos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais de experimentação e cuidados

Neste estudo, foram seguidos protocolos éticos na experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo Institute of Laboratory Animal Resources, U. S. National Academy of Sciences. O estudo foi submetido à Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os ratos usados no presente estudo foram selecionados do Centro de Bioterismo da FMUSP. Os animais foram acondicionados em grupos de até cinco ratos de uma mesma ninhada por gaiola. As gaiolas foram mantidas em ambiente climatizado, sob condições de higiene, ração (Nuvilab CR-1) e água *ad libitum*, no biotério do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Foram arrolados 30 ratos Wistar com 12 semanas de idade, de ambos os sexos, pesando entre 320 e 360 g, para este estudo. Eles foram aleatoriamente separados em dois grupos: o grupo A, de ratos submetidos a hipotermia epidural induzida por gotejamento, e o grupo B, de ratos controle. Foram provocadas lesões na medula espinhal dos ratos de ambos os grupos.

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: óbito imediatamente após o procedimento cirúrgico, ratos com anomalias da

medula na área de lesão à avaliação macroscópica ou que apresentaram movimentação normal na primeira avaliação após a lesão.

Para as lesões experimentais na coluna e para exame de potencial evocado motor, os ratos foram anestesiados com 55 a 75 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal associado com 55 a 75 mg/kg de ketamina intramuscular.

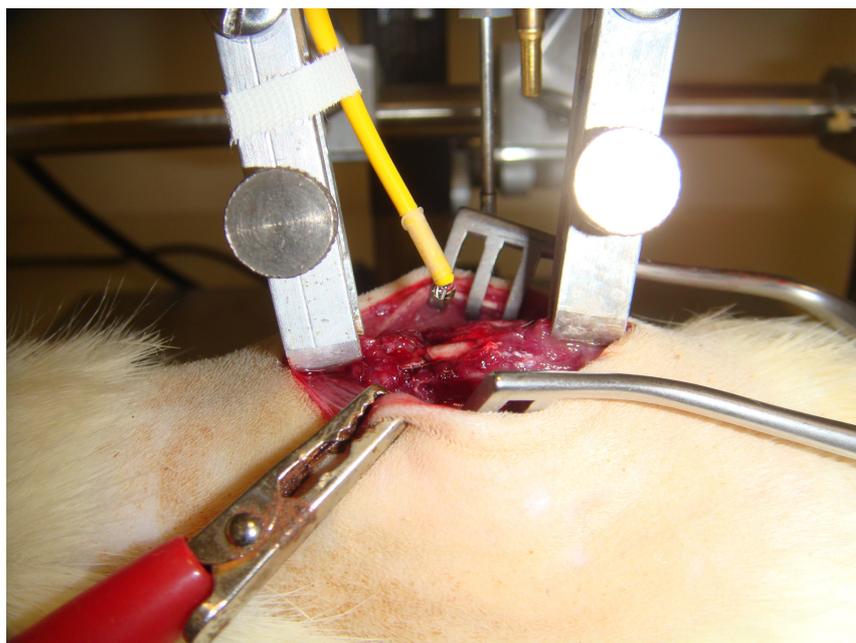
A eutanásia foi realizada induzindo-se plano anestésico com tiopental intraperitoneal. Após a confirmação deste, administrou-se cloreto de potássio por via endovenosa no 42<sup>o</sup> dia, conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA).<sup>7</sup> Após eutanásia, as carcaças foram colocadas em sacos brancos devidamente identificados e encaminhados para empresa responsável pelo descarte de materiais biológicos da Universidade de São Paulo.

### **3.2. Intervenções em estudo: lesão medular e resfriamento**

As lesões na medula em ambos os grupos foram produzidas, em ratos anestesiados, através de ensaios padronizados de impacto, por meio da queda de peso de 10 g, a partir de 25.0 mm de altura, controlada por computador, utilizando o equipamento New York University (NYU) Spinal Cord Contusion, o Impactor. Previamente à contusão, a medula foi exposta através da realização de uma laminectomia ao nível de T9-T10, realizada com o auxílio de microscópio cirúrgico (**Figura 1**). Após a cirurgia, foram

administrados 25 mg/kg de cefalotina a cada rato, do primeiro ao sétimo dia, para profilaxia de infecção de ferida operatória.

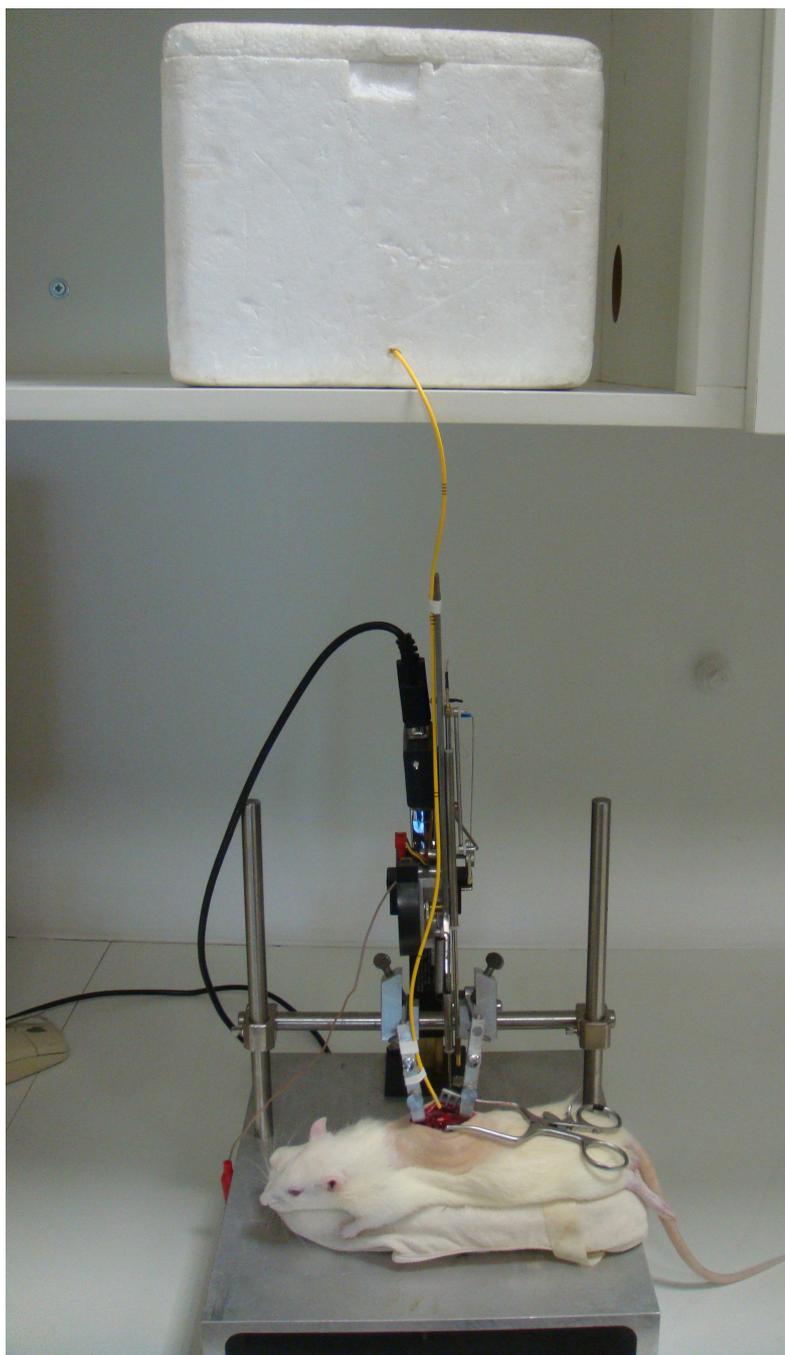
O resfriamento da medula foi realizado somente nos 15 ratos do grupo A, após a lesão medular, ao nível da laminectomia em T9-T10, por sistema de gotejamento. Foi realizado o gotejamento de água gelada retirada de um pequeno tanque de isopor, infundida na região da lesão utilizando-se uma sonda, e foi mensurada a temperatura local usando-se um termômetro com ponta a laser (InfraRed Thermometer TI-860) continuamente (**Figura 2**). A água do tanque foi resfriada e mantida à temperatura de 9-10 °C. A água saía do tanque através de uma sonda e gotejava na medula dos ratos do grupo A ao nível da lesão, por um período de 20 minutos (**Figura 3**). Para o gotejamento, o tanque de isopor foi posicionado em altura superior à do rato, de maneira que não foi necessário o uso de bomba de infusão.



**Figura 1.** Exposição da medula do rato após afastamento dos músculos paravertebrais e laminectomia ao nível de T9-T10.



**Figura 2.** Mensuração da temperatura da medula utilizando-se o termômetro com ponta a laser. O termômetro é apontado para a região da lesão e, ao emitir o feixe de laser, mensura a temperatura do alvo para o qual está apontado.



**Figura 3.** Sistema de gotejamento de solução salina gelada armazenada em caixa de isopor. A solução era gotejada na medula, no sítio da lesão, através de sonda utilizada para cateterismo do espaço epidural.

### 3.3. Avaliações realizadas

Para a análise da função motora, foram utilizados a escala BBB, o teste do plano inclinado e o exame do potencial evocado motor, conforme detalhado adiante.<sup>4,7</sup>

O estudo teve duração de seis semanas. A escala BBB foi aplicada diariamente após a lesão medular, durante as seis semanas. O teste do plano inclinado foi aplicado ao final de cada semana do estudo. O teste do potencial evocado motor foi realizado ao final da última semana do estudo.

Foram medidos o peso, o comprimento e a temperatura do animal antes da obtenção do potencial evocado motor dos ratos. A pesagem do rato foi utilizada tanto para cálculo da dose do anestésico a ser aplicada quanto para manter a uniformidade nos pesos dos animais utilizados no experimento. O comprimento craniocaudal do animal foi medido entre a região occipital e a base do início da cauda. Este dado foi usado para comparar as latências observadas nos diferentes ratos. A temperatura do rato foi medida no membro posterior com termômetro digital.

### ***3.3.1. Avaliação da função***

Os ratos foram liberados para se movimentar livremente e um observador monitorou cada rato por pelo menos um minuto ao dia, e registrou o movimento das articulações do quadril, joelho e tornozelo dos membros posteriores durante seis semanas. Para cada dia de análise, foi conferida uma pontuação aos ratos de acordo com a escala BBB (**Anexo 1**).<sup>91</sup>

### ***3.3.2. Avaliação do plano inclinado***

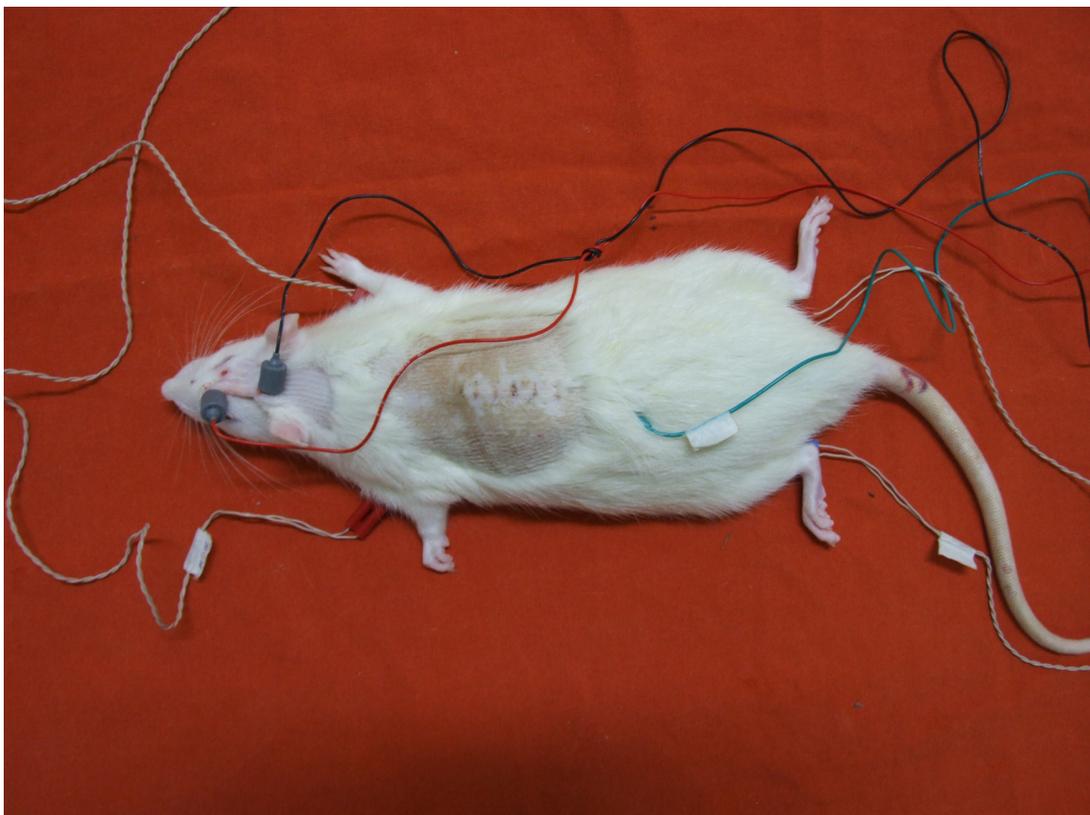
O teste do plano inclinado mediu a capacidade do animal de manter-se em cima de uma rampa que aumentava a sua inclinação a cada 15 graus. O teste também foi usado como um índice da força dos membros posteriores dos ratos. O ângulo máximo no qual o rato manteve-se sobre a rampa sem escorregar por pelo menos cinco segundos foi definido como a pontuação do plano inclinado. A pontuação foi de zero para rampa sem inclinação, um ponto para rampa com até 15 graus de inclinação, dois pontos para até 30 graus e três pontos para até 45 graus.

### **3.3.3. Potencial evocado motor**

O procedimento de obtenção do potencial evocado motor consistiu no uso de aparelho de eletromiografia de quatro canais, dois eletrodos de agulha monopolares do tipo *corkscrew* EO401 da Neuromedical Supplies para estimulação transcraniana, um eletrodo de agulha monopolar para ser utilizado como terra e quatro pares de eletrodos de agulha monopolares para serem utilizados na captação das respostas motoras nos membros anteriores e posteriores. A calibração do aparelho foi feita em dois aspectos. A estimulação elétrica transcraniana, através de estímulo único de 0,2 ms de duração, e a captação das respostas musculares com varredura, com janela de 20 ms, sensibilidade de 2 mV/div, filtro de baixa frequência de 10 Hz e filtro de alta frequência de 10 KHz. A intensidade de estímulo considerada foi supramáxima.

A captação das respostas musculares foi realizada com a colocação de pares de eletrodos de agulha monopolar (captador e referência), com distância inter-eletrodos definida e fixa, inseridos na musculatura proximal e ventral dos membros anteriores e posteriores dos ratos. O eletrodo terra foi colocado na região lombar, utilizando-se um eletrodo de agulha monopolar. A estimulação elétrica transcraniana foi realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha tipo *corkscrew*, no couro cabeludo na região frontal (anodo) e occipital (catodo) na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea (**Figura 4**). Após a colocação dos eletrodos no rato, o equipamento foi ligado e feita a verificação da impedância destes eletrodos,

para comprovar a boa adaptabilidade deles, a fim de obter respostas mais nítidas, seguras e fidedignas.



**Figura 4.** Posicionamento dos eletrodos na face ventral nos membros anteriores e posteriores dos ratos e na região cefálica para mensuração do potencial evocado motor.

### 3.4. Análise estatística

Os dados contínuos, como o peso do animal, a pontuação na escala BBB, e os potenciais evocados, tanto na sua característica de latência como de amplitude, foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e

demonstraram comportamento normal. O teste do plano inclinado, dado sua característica escalar, foi submetido diretamente ao teste de Friedman para análise dos resultados ao longo da semana e uma análise *post hoc*, Wilcoxon *signed rank*. Para verificar a diferença entre os grupos, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. Para a comparação da pontuação da escala BBB ao longo das semanas, a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a diferença entre as semanas e, dada a diferença entre as semanas de ambos os grupos, um teste *post hoc* de Bonferroni foi realizado para verificar em que semana os índices eram diferentes. Para análise da pontuação do BBB entre os grupos e dos potenciais evocados de amplitude e latência, foi utilizado o teste t de Student. Em todas as análises foi considerado como erro alfa qualquer valor menor ou igual a 5%, erro aceitável para diferenças estatisticamente significantes.

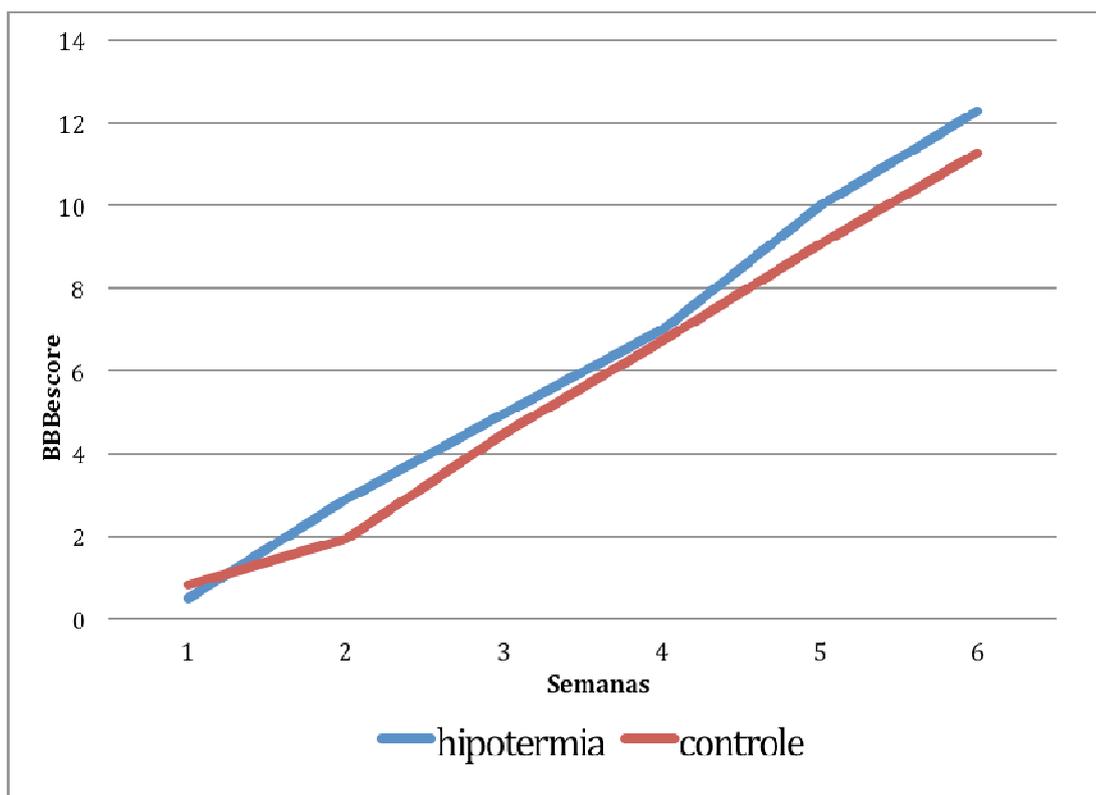
#### 4. RESULTADOS

Os pesos dos ratos dos dois grupos foram analisados e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Calculamos a média das pontuações conforme a escala BBB ao final de cada semana nos dois grupos e, quando comparados os valores de cada grupo, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre eles (**Tabela 1** e **Gráfico 1**).

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão dos valores da escala BBB atribuídas semanalmente aos grupos

<b>Resultado BBB</b>	<b>Grupo 1 (n = 15)</b>	<b>Grupo 2 (n =15)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Semana 1</b>	0,47 $\pm$ 0,834	0,8 $\pm$ 1,014	p = 0,334
<b>Semana 2</b>	2,87 $\pm$ 1,506	1,93 $\pm$ 0,961	p = 0,053
<b>Semana 3</b>	4,93 $\pm$ 1,907	4,47 $\pm$ 1,767	p = 0,493
<b>Semana 4</b>	7 $\pm$ 2	6,73 $\pm$ 1,831	p = 0,706
<b>Semana 5</b>	10 $\pm$ 2,591	9,07 $\pm$ 2,463	p = 0,321
<b>Semana 6</b>	12,27 $\pm$ 2,52	11,27 $\pm$ 3,173	p = 0,347

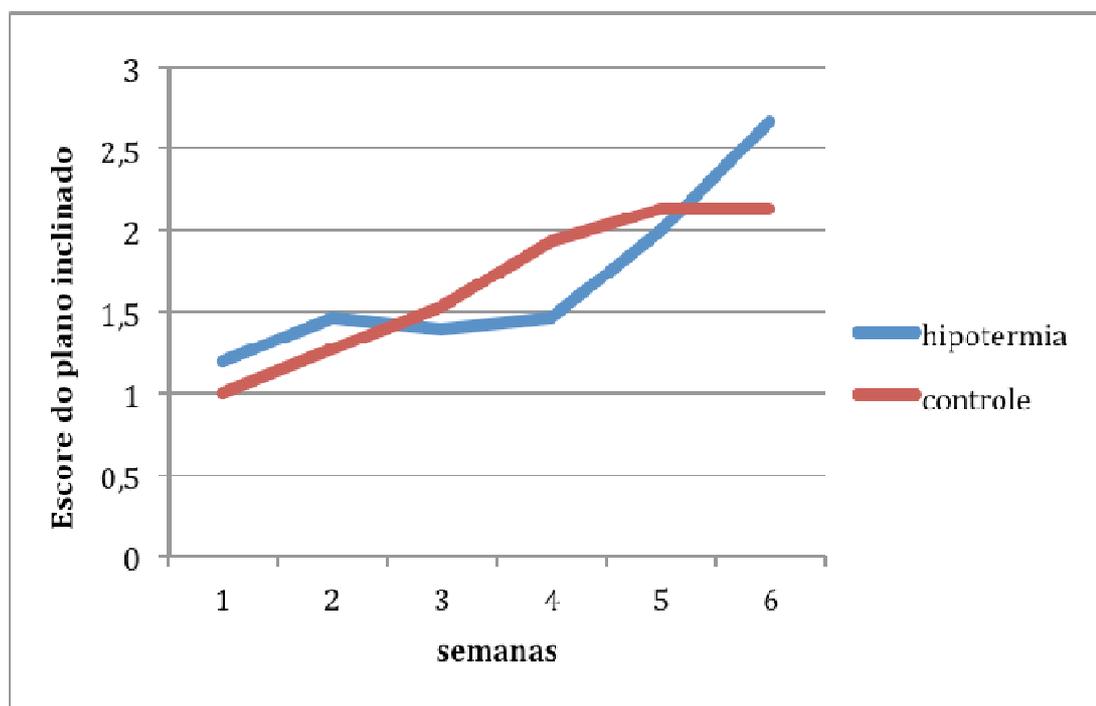


**Gráfico 1.** Análise comparativa da pontuação do BBB nos dois grupos ao longo das seis semanas.

As médias das pontuações do plano inclinado foram comparadas entre os dois grupos, semana por semana, e não foi evidenciada nenhuma diferença estatisticamente significativa durante cada semana e ao final da última semana (**Tabela 2** e **Gráfico 2**).

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão das pontuações do plano inclinado atribuídas semanalmente aos grupos

Resultado plano inclinado	Grupo 1 (n = 15)	Grupo 2 (n = 15)	Valor de p
Semana 1	1,2 $\pm$ 0,41	1 $\pm$ 0	p = 0,073
Semana 2	1,47 $\pm$ 0,51	1,27 $\pm$ 0,45	p = 0,264
Semana 3	1,4 $\pm$ 0,5	1,53 $\pm$ 0,64	p = 0,616
Semana 4	1,47 $\pm$ 0,51	1,93 $\pm$ 0,7	p = 0,062
Semana 5	2 $\pm$ 0,65	2,13 $\pm$ 0,64	p = 0,57
Semana 6	2,67 $\pm$ 1,05	2,13 $\pm$ 0,74	p = 0,101

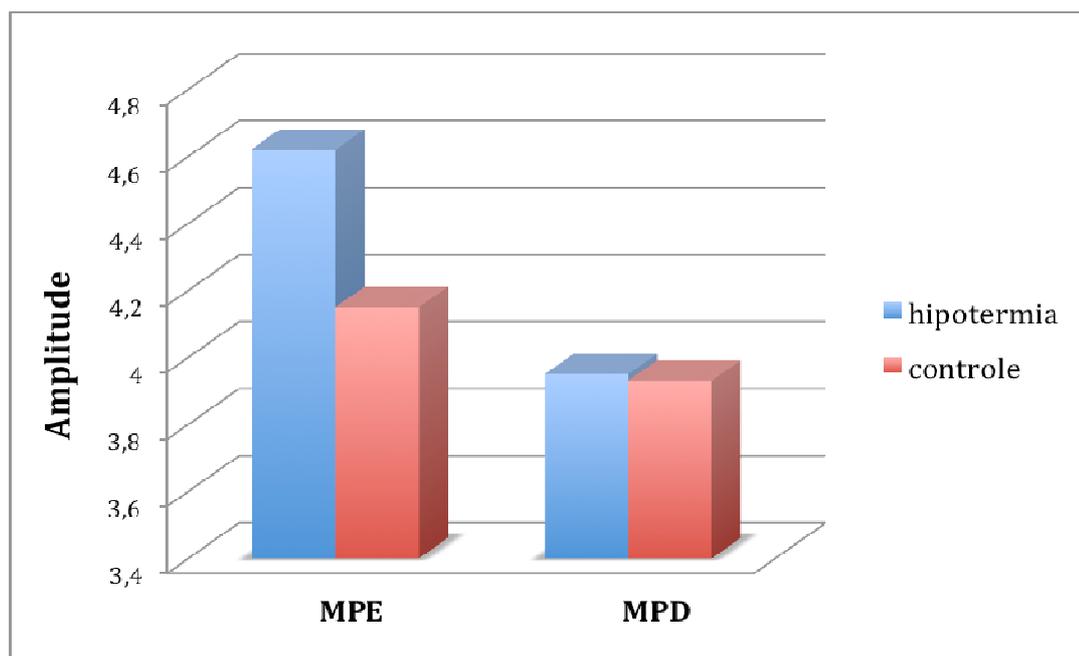


**Gráfico 2.** Análise comparativa da pontuação do teste do plano inclinado nos dois grupos ao longo das seis semanas.

Foram realizadas as médias das amplitudes dos potenciais evocados motores dos membros posteriores direito e esquerdo dos ratos de ambos os grupos ao final da última semana. Quando comparados os dois grupos, não encontramos diferenças estatisticamente significantes na amplitude do potencial dos membros posteriores (**Tabela 3** e **Gráfico 3**). A latência de resposta motora foi analisada nos membros posteriores direito e esquerdo em cada grupo. Quando comparadas as médias de latência dos membros posteriores entre os grupos, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre eles (**Tabela 4** e **Gráfico 4**).

**Tabela 3.** Média e desvio padrão das amplitudes de potencial evocado motor para membros posteriores esquerdo (MPE) e direito (MPD) ao final da última semana de estudo

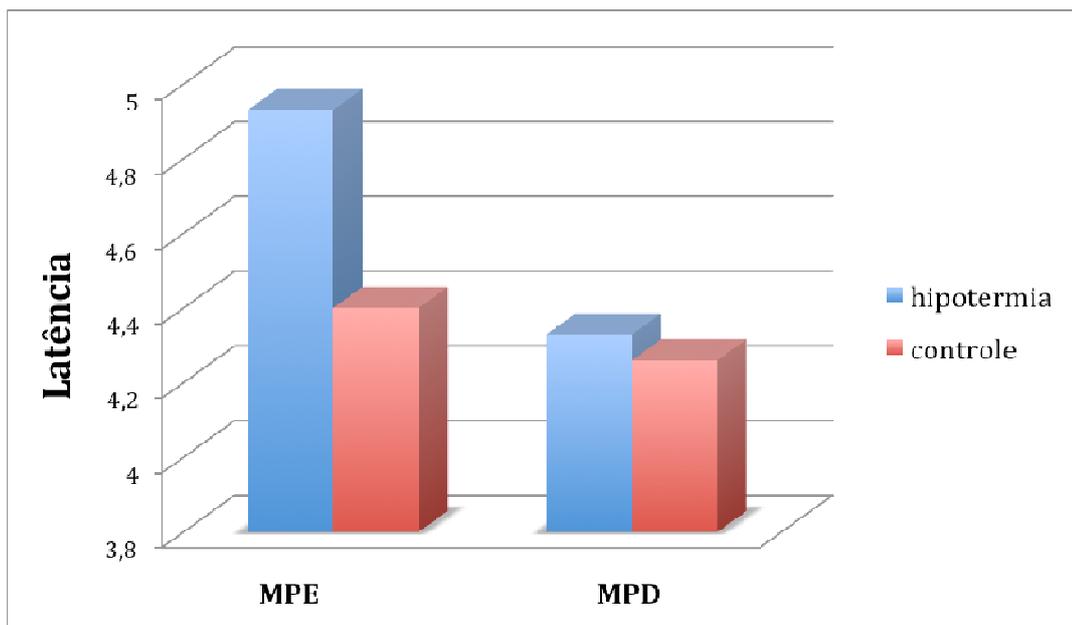
<b>Resultado potencial evocado</b>	<b>Grupo 1 (n = 15)</b>	<b>Grupo 2 (n = 15)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Amplitude (mv) MPE</b>	4,62 ± 1,37	3,95 ± 0,77	p = 0,11
<b>Amplitude (mv) MPD</b>	4,15 ± 1,36	3,93 ± 1,03	p = 0,63



**Gráfico 3.** Amplitude do potencial evocado motor estratificada por membro nos dois grupos: membro posterior esquerdo (MPE) e direito (MPD).

**Tabela 4.** Média e desvio padrão das latências de resposta motora para membros posteriores esquerdo (MPE) e direito (MPD) ao final da última semana de estudo

Resultado potencial evocado	Grupo 1 (n = 15)	Grupo 2 (n = 15)	Valor de p
Latência (ms) MPE	4,93 ± 1,58	4,33 ± 0,61	p = 0,182
Latência (ms) MPD	4,4 ± 1,24	4,26 ± 0,88	p = 0,737



**Gráfico 4.** Latência do potencial evocado motor estratificada por membro nos dois grupos: membro posterior esquerdo (MPE) e direito (MPD).

Como não foram encontradas diferenças entre as amplitudes nos membros posteriores direito e esquerdo em cada grupo, reunimos as amostras e comparamos as amplitudes e latências de membros posteriores entre os grupos. Não encontramos diferenças estatísticas na amplitude do potencial evocado motor e na latência de resposta nos membros posteriores (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Média e desvio padrão das amplitudes de potencial e latência de resposta nos membros posteriores (MP) dos dois grupos

Resultado potencial evocado	Grupo 1 (n = 30)	Grupo 2 (n = 30)	Valor de p
Amplitude MP	4,39 ± 1,36	3,94 ± 0,89	p = 0,143
Latência MP	4,66 ± 1,42	4,3 ± 0,75	p = 0,217

## 5. DISCUSSÃO

Existem numerosas pesquisas sendo conduzidas no intuito de minimizar ou prevenir a lesão secundária após o traumatismo raquimedular. Porém a viabilidade das terapias pesquisadas ainda é limitada. O conceito de indução de hipotermia sistêmica ou local surgiu há mais de 40 anos com ensaios clínicos e experimentais para lesões isquêmicas secundárias a procedimentos vasculares. Os resultados desses estudos demonstraram que, em se diminuindo a temperatura medular ou do encéfalo, diminuía-se o metabolismo e era promovida, portanto, proteção contra essas lesões. Por outro lado, as reações provocadas pela lesão isquêmica da medula são diferentes das provocadas pelo traumatismo raquimedular. Verificamos uma grande dificuldade na comparação entre os estudos científicos, pois o modelo de indução da hipotermia, sua temperatura alvo, sua duração e o método usado para provocar a lesão medular são distintos entre as pesquisas.

Adotando como critério de avaliação motora a escala BBB, utilizada neste estudo, o mesmo método para produzir a lesão medular (NYU-Impactor) e o mesmo tempo de seguimento, Casas e cols. demonstraram não haver efeito neuroprotetor da hipotermia epidural em ratos após seis semanas de avaliação.<sup>90</sup> Naquele estudo, a hipotermia foi aplicada após 30 minutos da contusão da medula dos ratos, durante um período de 3 horas. Foram utilizados quatro grupos de estudo, dos quais três foram submetidos a diferentes graus de hipotermia (leve, moderada e grave) e um grupo

controle. Tal estudo, desenvolvido pela universidade de Miami, corrobora o que foi verificado no nosso trabalho. Eles afirmaram que o resfriamento regional não foi benéfico em termos de preservação neuronal, não poupou tecidos da medula espinhal e não produziu melhora da atividade locomotora. Ao contrário, afirmaram que o método de resfriamento deve reduzir o fluxo sanguíneo na área lesada da medula, exacerbando a lesão secundária.

No presente estudo, usamos a hipotermia profunda da medula espinhal com resfriamento que variou de 9 a 14 °C, e contusão medular com o NYU Impactor utilizando o dobro da altura (25 mm) empregada no estudo de Casas e cols.<sup>90</sup> e aplicamos a hipotermia imediatamente após a realização da contusão medular durante 20 minutos. Optamos pelo resfriamento epidural profundo por entendermos que, para atingir temperaturas medulares baixas, em torno de 25 °C, seria necessário um resfriamento ainda maior do espaço epidural, considerando que a medula é banhada pelo líquido cefalorraquidiano e protegida pelas membranas duramáter, pia-máter e aracnoide. Escolhemos a altura de 25 mm por considerarmos que é a necessária para produzir uma lesão medular efetiva. Desenvolvemos o sistema de gotejamento descrito por ser de baixo custo e fácil aplicação, pois um único dispositivo foi utilizado para todos os ratos. Iniciamos a hipotermia imediatamente após a lesão, pois o nosso intuito foi interferir nos efeitos decorrentes da lesão secundária que se inicia logo após a contusão medular. Utilizamos o tempo de 20 minutos de resfriamento, pois o modelo desenvolvido não nos permitiu mantê-lo por mais tempo sem comprometer a temperatura epidural estimada.

Em outro estudo, Dimar e cols.<sup>5</sup> dividiram os ratos em três grupos distintos: o grupo submetido a colocação de espaçador no espaço epidural com compressão de 50% do canal medular, outro grupo submetido a contusão medular com o NYU Impactor a uma altura de 25 mm (a mesma utilizada no presente estudo), e um terceiro grupo no qual foi realizada a combinação dos dois modelos citados. Cada grupo foi constituído de 16 ratos. Os grupos foram subdivididos em dois pequenos grupos de oito ratos. Cada subgrupo recebeu uma temperatura distinta: normotermia a 37 °C ou hipotermia a 19 °C através de um recipiente confeccionado especificamente para ser colocado no dorso dos ratos e aquecido a 37 °C ou resfriado a 19 °C. Para avaliação da função motora, foram aplicadas a escala BBB e o potencial evocado motor. O seguimento do estudo foi de cinco semanas. Os autores publicaram que houve melhora significativa na pontuação motora dos ratos submetidos a hipotermia, nos quais foi colocado o espaçador epidural quando comparados com os controles normotérmicos. Quando foram comparadas as pontuações da escala BBB e do potencial evocado motor dos ratos submetidos a hipotermia com as pontuações dos controles normotérmicos do segundo grupo, submetido a contusão medular grave (10 g a 2,5 cm de altura), não foi verificada melhora significativa. Também não foi verificada melhora na avaliação das pontuações do terceiro grupo submetido ao modelo de compressão combinado ao modelo de contusão medular caracterizada como grave. Percebemos que os parâmetros utilizados no segundo grupo foram praticamente os mesmos usados no nosso estudo com pequenas diferenças no seguimento, de cinco para seis semanas, e na temperatura

usada, que foi de 19 °C para 9°-14 °C. Novamente verificamos que os resultados do estudo de Dimar e cols.<sup>5</sup> foram muito semelhantes aos resultados do nosso estudo. Isso sugere que a hipotermia epidural leve, moderada, intensa ou profunda não produz o efeito que é observado no modelo de isquemia da medula quando se utiliza o modelo traumático.

Por outro lado, é interessante citar o estudo de Ha e Kim<sup>4</sup> que induziu a hipotermia epidural moderada (30 °C) por 48 horas em ratos após lesão medular traumática usando o NYU Impactor a uma altura de 25 mm. Naquele estudo, os ratos foram divididos em dois grupos: o grupo controle, submetido a contusão medular apenas e o outro grupo, submetido a contusão medular e hipotermia. Para avaliação da função motora, foram utilizadas a escala de Gale e cols.<sup>92</sup> que varia de 0 a 6, e o teste do plano inclinado. O seguimento do estudo foi de sete dias. Os autores encontraram melhora significativa da função motora na avaliação da escala de Gale (1,0 *versus* 2.12 ± 0.6, p < 0,05) e no teste do plano inclinado (22.5 ± 2.6 *versus* 28.8 ± 3,5; p < 0,05). Os autores atribuíram a melhora ao fato de a lesão secundária ao trauma raquimedular se estender por pelo menos uma semana e o tempo máximo de apoptose dos oligodendrócitos ser de 48 horas. Com isso, justificaram o fato de a hipotermia ter sido aplicada por um período prolongado para produzir efeitos neuroprotetores. Esses autores justificaram ainda o uso da hipotermia moderada por ela ser mais segura e produzir menores efeitos adversos.

Esse estudo traz um dado novo que seria a necessidade de manter a hipotermia epidural por um período mais longo para se obterem os efeitos

neuroprotetores na lesão traumática da medula espinhal. Porém, o método de avaliação motora é distinto do aplicado neste e nos outros trabalhos que estudaram a hipotermia epidural na lesão traumática da medula espinhal, pois nenhum deles utiliza a escala de Gale. Além disso, o seguimento apresentado no estudo de Ha e Kim<sup>4</sup> pode ser considerado pequeno em se tratando de lesão medular por contusão. Não se pode afirmar que o efeito neuroprotetor da hipotermia foi prolongado, pois os ratos foram sacrificados no sétimo dia. Considerando que a fisiopatologia do trauma raquimedular apresenta duas fases distintas, a lesão primária e a secundária, o que a diferencia da lesão isquêmica por compressão medular, é razoável supor que a reação de ambas à hipotermia seja diferente. A atividade inflamatória é um dos mecanismos envolvidos na lesão secundária bem como a apoptose de células neuronais e da glia. A hipotermia já demonstrou uma redução da migração de células inflamatórias ao sítio da lesão e um efeito na expressão de marcadores envolvidos na apoptose celular. Porém os mecanismos que de fato produzem uma lesão medular irreversível ainda não foram esclarecidos.

O potencial evocado motor, através da estimulação elétrica transcraniana, é um método de avaliação da propagação dos impulsos elétricos medulares, com a captação nos músculos-alvo dos membros anteriores e posteriores. No nosso estudo, como a lesão medular ocorreu ao nível de T9-T10, devemos considerar a leitura do potencial dos membros posteriores apenas e desprezar as leituras encontradas em membros anteriores cuja inervação se dá por raízes que emergem bem acima do local

da contusão medular. Dois valores são determinados com esta avaliação: a latência, que expressa o tempo decorrido entre o estímulo elétrico e o aparecimento do sinal, e a amplitude, que expressa a “recuperação” ou “ganho” de fibras musculares que estão sendo testadas, sendo que, quanto maior a amplitude, melhor é a atividade motora daquele segmento ou membro. O potencial somato-sensitivo tem grande limitação quando há predominância da síndrome medular anterior, o que não ocorre com o potencial evocado motor. O potencial evocado motor tem estreita relação com os achados do exame clínico. Os valores de amplitude e latência encontrados no nosso estudo demonstraram correlação com a pontuação do BBB e do plano inclinado em ambos os grupos. Isso aumenta a confiabilidade da avaliação da função motora que foi realizada através desses três métodos, com resultados similares entre eles: não foi observada a melhora da função motora em nenhum deles.

Apesar de os resultados do presente estudo estarem em conformidade com os de outros estudos realizados, o modelo de resfriamento do presente estudo não permitiu o controle da temperatura da solução que foi infundida na medula dos ratos, gerando oscilações que foram compensadas pelo gotejamento. Assim, não foi possível manter com precisão a temperatura almejada no espaço epidural. Além disso, o estudo histopatológico da área do sítio da lesão não foi realizado. Ele permite avaliar a eficácia da contusão medular dos ratos, bem como as diferenças celulares entre os grupos. O modelo de resfriamento desenvolvido também impediu a indução da hipotermia epidural por períodos mais longos. Cientes

de que a apoptose dos oligodendrócitos tem duração de no máximo 48 horas, como já mencionado, é possível que a hipotermia epidural realizada por um período mais duradouro possa interferir na morte celular e alterar os resultados da avaliação funcional dos ratos.

Com isso, podemos esperar que novos estudos mais uniformes e com modelos de resfriamento mais sofisticados sejam realizados e novas descobertas possam esclarecer quais fatores determinam a lesão medular irreversível e qual o papel da hipotermia na lesão traumática da medula espinhal.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo não demonstrou efeito neuroprotetor da hipotermia epidural quando aplicada no sítio da lesão, imediatamente após a contusão medular.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Escala BBB de avaliação funcional de 21 pontos de Basso e cols.<sup>91</sup>

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, frequente 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 frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de piso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, 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 frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente 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 frequentemente 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.
<b>19</b>	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.
<b>20</b>	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.
<b>21</b>	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 2. Comitê de ética em pesquisa



### APROVAÇÃO

O **Coordenador da CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **20.05.2011**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **163/11** intitulado: "**Hipotermia epidural após lesão medular em ratos: existe algum efeito neuroprotetor?**" apresentado pelo Departamento de **Ortopedia e Traumatologia**.

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

**Pesquisador (a) Responsável: Alexandre Fogaça Cristante**

**Pesquisador (a) Executante: Marcello Oliveira Barbosa**

CEP-FMUSP, 20 de maio de 2011.

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

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

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Spinal Cord Injury Statistical Center. The 2010 Annual Statistical Report for the Spinal Cord Injury Model Systems. Alabama: National Spinal Cord Injury Statistical Center; 2010. Disponível em: <https://www.nscisc.uab.edu/PublicDocuments/reports/pdf/2010%20NSCISC%20Annual%20Statistical%20Report%20-%20Complete%20Public%20Version.pdf>. Acessado em 2013 (17 out).
2. Brasil. Ministério da Saúde. Datasus. Informações de Saúde. Procedimentos hospitalares do SUS – por local de internação – Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>. Acessado em 2013 (12 dez).
3. Crock HV, Yoshizawa H, Yamagishi M, Crock MC. Commentary on the prevention of paralysis after traumatic spinal cord injury in humans: the neglected factor--urgent restoration of spinal cord circulation. *Eur Spine J.* 2005;14(9):910-4.
4. Ha KY, Kim YH. Neuroprotective effect of moderate epidural hypothermia after spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33(19):2059-65.

5. Dimar JR 2nd, Shields CB, Zhang YP, Burke DA, Raque GH, Glassman SD. The role of directly applied hypothermia in spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(18):2294-302.
6. Yu CG, Jimenez O, Marcillo AE, Weider B, Bangerter K, Dietrich WD, et al. Beneficial effects of modest systemic hypothermia on locomotor function and histopathological damage following contusion-induced spinal cord injury in rats. *J Neurosurg*. 2000;93(1 Suppl):85-93.
7. Albin MS, White RJ, Locke GS, Massopust LC Jr, Kretchmer HE. Localized spinal cord hypothermia--anesthetic effects and application to spinal cord injury. *Anesth Analg*. 1967;46(1):8-16.
8. Fay T. Observations on prolonged human refrigeration. *N Y State J Med*. 1940;4:1351-4.
9. Smith LW, Fay T. Observations on human beings with cancer maintained at reduced temperature of 75–90° Fahrenheit (24–32°C). *Am J Clin Pathol*. 1940;10:1-11.
10. Fay T. Observations on generalized refrigeration in cases of severe cerebral trauma. *Res Publ Assoc Res Nerv Dis*. 1945;4:611-9.

11. Bigelow WG, Callaghan JC, Hopps JA. General hypothermia for experimental intracardiac surgery. The use of electrophrenic respirations, an artificial pacemaker for cardiac standstill and radio-frequency rewarming in general hypothermia. *Ann Surg.* 1950;132(3):531-9.
12. Arrica M, Bissonnette B. Therapeutic hypothermia. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2007;11(1):6-15.
13. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdés I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in inraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987;7(6):729-38.
14. Inamasu J, Ichikizaki K. Mild hypothermia in neurologic emergency: an update. *Ann Emerg Med.* 2002;40(2):220-30.
15. Bernard SA, Buist M. Induced hypothermia in critical care medicine: a review. *Crit Care Med.* 2003;31(7):2041-51.
16. Jordan JD, Carhuapoma JR. Hypothermia: comparing technology. *J Neurol Sci.* 2007;261(1-2):35-8.

17. Green RS, Howes DW. Stock your emergency department with ice packs: a practical guide to therapeutic hypothermia for survivors of cardiac arrest. *CMAJ*. 2007;176(6):759-62.
18. Clifton GL, Miller ER, Choi SC, Levin HS, McCauley S, Smith KR Jr, et al. Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *N Engl J Med*. 2001;344(8):556-63.
19. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*. 2002;346(8):557-63.
20. Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2002;346(8):549-56.
21. Rajek A, Greif R, Sessler DI, Baumgardner J, Laciny S, Bastanmehr H. Core cooling by central venous infusion of ice-cold (4 degrees C and 20 degrees C) fluid: isolation of core and peripheral thermal compartments. *Anesthesiology*. 2000;93(3):629-37.

22. Steinberg GK, Ogilvy CS, Shuer LM, Connolly ES Jr, Solomon RA, Lam A, et al. Comparison of endovascular and surface cooling during unruptured cerebral aneurysm repair. *Neurosurgery*. 2004;55(2):307-14; discussion 314-5.
23. Mahmood MA, Zweifler RM. Progress in shivering control. *J Neurol Sci*. 2007;261(1-2):47-54.
24. Kranke P, Eberhart LH, Roewer N, Tramèr MR. Pharmacological treatment of postoperative shivering: a quantitative systematic review of randomized controlled trials. *Anesth Analg*. 2002;94(2):453-60.
25. Green BA, Khan T, Raimondi AJ. Local hypothermia as treatment of experimentally induced spinal cord contusion: quantitative analysis of beneficent effect. *Surg Forum*. 1973;24:436-8.
26. Martinez-Arizala A, Green BA. Hypothermia in spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1992;9 Suppl 2:S497-505.
27. Motoyoshi N, Takahashi G, Sakurai M, Tabayashi K. Safety and efficacy of epidural cooling for regional spinal cord hypothermia during thoracoabdominal aneurysm repair. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25(1):139-41.

28. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005;365(9460):663-70.
29. Wang H, Olivero W, Lanzino G, Elkins W, Rose J, Honings D, et al. Rapid and selective cerebral hypothermia achieved using a cooling helmet. *J Neurosurg*. 2004;100(2):272-7.
30. Furuse M, Preul MC, Kinoshita Y, Nishihara K, Isono N, Kuroiwa T. Rapid induction of brain hypothermia by endovascular intra-arterial perfusion. *Neurol Res*. 2007;29(1):53-7.
31. Jiang JY, Xu W, Yang PF, Gao GY, Gao YG, Liang YM, et al. Marked protection by selective cerebral profound hypothermia after complete cerebral ischemia in primates. *J Neurotrauma*. 2006;23(12):1847-56.
32. Gunn AJ, Thoresen M. Hypothermic neuroprotection. *NeuroRx*. 2006;3(2):154-69.
33. Rosomoff HL, Holaday DA. Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am J Physiol*. 1954;179(1):85-8.

34. Erecinska M, Thoresen M, Silver IA. Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(5):513-30.
35. Liu L, Yenari MA. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci.* 2007;12:816-25.
36. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.* 2004;4(4):451-64.
37. Hachimi-Idrissi S, Van Hemelrijck A, Michotte A, Smolders I, Sarre S, Ebinger G, et al. Postischemic mild hypothermia reduces neurotransmitter release and astroglial cell proliferation during reperfusion after asphyxial cardiac arrest in rats. *Brain Res.* 2004;1019(1-2):217-25.
38. Zornow MH. Inhibition of glutamate release: a possible mechanism of hypothermic neuroprotection. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1995;7(2):148-51.
39. Huang ZG, Xue D, Preston E, Karbalai H, Buchan AM. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci.* 1999;26(4):298-304.

40. Ohmura A, Nakajima W, Ishida A, Yasuoka N, Kawamura M, Miura S, et al. Prolonged hypothermia protects neonatal rat brain against hypoxic-ischemia by reducing both apoptosis and necrosis. *Brain Dev.* 2005;27(7):517-26.
41. Inamasu J, Suga S, Sato S, Horiguchi T, Akaji K, Mayanagi K, et al. Post-ischemic hypothermia delayed neutrophil accumulation and microglial activation following transient focal ischemia in rats. *J Neuroimmunol.* 2000;109(2):66-74.
42. Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem.* 1995;65(4):1704-11.
43. Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, Guo Q. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke.* 1994;25(1):147-52.
44. Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, et al. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med.* 1997;336(8):540-6.

45. Harris OA, Colford JM Jr, Good MC, Matz PG. The role of hypothermia in the management of severe brain injury: a meta-analysis. *Arch Neurol.* 2002;59(7):1077-83.
46. Alderson P, Gadkary C, Signorini DF. Therapeutic hypothermia for head injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(4):CD001048.
47. Cheung KW, Green RS, Magee KD. Systematic review of randomized controlled trials of therapeutic hypothermia as a neuroprotectant in post cardiac arrest patients. *CJEM.* 2006;8(5):329-37.
48. Hemmen TM, Lyden PD. Induced hypothermia for acute stroke. *Stroke.* 2007;38(2 Suppl):794-9.
49. Krieger DW, De Georgia MA, Abou-Chebl A, Andrefsky JC, Sila CA, Katzan IL, et al. Cooling for acute ischemic brain damage (cool aid): an open pilot study of induced hypothermia in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2001;32(8):1847-54.
50. De Georgia MA, Krieger DW, Abou-Chebl A, Devlin TG, Jauss M, Davis SM, et al. Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology.* 2004;63(2):312-7.

51. van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain*. 2007;130(Pt 12):3063-74.
52. Adams H, Adams R, Del Zoppo G, Goldstein LB; Stroke\_Council of the American Heart Association; American Stroke Association. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: 2005 guidelines update a scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2005;36(4):916-23.
53. Jorgensen HS, Reith J, Nakayama H, Kammergaard LP, Raschou HO, Olsen TS. What determines good recovery in patients with the most severe strokes? The Copenhagen Stroke Study. *Stroke*. 1999;30(10):2008-12.
54. Reith J, Jørgensen HS, Pedersen PM, Nakayama H, Raaschou HO, Jeppesen LL, et al. Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality, and outcome. *Lancet*. 1996;347(8999):422-5.

55. Todd MM, Hindman BJ, Clarke WR, Torner JC; Intraoperative Hypothermia for Aneurysm Surgery Trial (IHAST) Investigators. Mild intraoperative hypothermia during surgery for intracranial aneurysm. *N Engl J Med.* 2005;352(2):135-45.
56. Cinà CS, Abouzahr L, Arena GO, Laganà A, Devereaux PJ, Farrokhyar F. Cerebrospinal fluid drainage to prevent paraplegia during thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm surgery: a systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg.* 2004;40(1):36-44.
57. Acher CW, Wynn MM, Hoch JR, Popic P, Archibald J, Turnipseed WD. Combined use of cerebral spinal fluid drainage and naloxone reduces the risk of paraplegia in thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 1994;19(2):236-46; discussion 247-8.
58. Black JH, Davison JK, Cambria RP. Regional hypothermia with epidural cooling for prevention of spinal cord ischemic complications after thoracoabdominal aortic surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;15(4):345-52.
59. Cambria RP, Davison JK. Regional hypothermia with epidural cooling for spinal cord protection during thoracoabdominal aneurysm repair. *Semin Vasc Surg.* 2000;13(4):315-24.

60. Conrad MF, Crawford RS, Davison JK, Cambria RP. Thoracoabdominal aneurysm repair: a 20-year perspective. *Ann Thorac Surg.* 2007;83(2):S856-61; discussion S890-2.
61. Kouchoukos NT, Masetti P, Murphy SF. Hypothermic cardiopulmonary bypass and circulatory arrest in the management of extensive thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysms. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;15(4):333-9.
62. von Segesser LK, Marty B, Mueller X, Ruchat P, Gersbach P, Stumpe F, et al. Active cooling during open repair of thoraco-abdominal aortic aneurysms improves outcome. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001;19(4):411-5; discussion 415-6.
63. Biggar WD, Bohn DJ, Kent G, Barker C, Hamilton G. Neutrophil migration in vitro and in vivo during hypothermia. *Infect Immun.* 1984;46(3):857-9.
64. Akriotis V, Biggar WD. The effects of hypothermia on neutrophil function in vitro. *J Leukoc Biol.* 1985;37(1):51-61.
65. Lee SL, Battistella FD, Go K. Hypothermia induces T-cell production of immunosuppressive cytokines. *J Surg Res.* 2001;100(2):150-3.

66. Valeri CR, Feingold H, Cassidy G, Ragno G, Khuri S, Altschule MD. Hypothermia-induced reversible platelet dysfunction. *Ann Surg.* 1987;205(2):175-81.
67. Rohrer MJ, Natale AM. Effect of hypothermia on the coagulation cascade. *Crit Care Med.* 1992;20(10):1402-5.
68. Guest JD, Vanni S, Silbert L. Mild hypothermia, blood loss and complications in elective spinal surgery. *Spine J.* 2004;4(2):130-7.
69. Yu CG, Jimenez O, Marcillo AE, Weider B, Bangerter K, Dietrich WD, et al. Beneficial effects of modest systemic hypothermia on locomotor function and histopathological damage following contusion-induced spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 2000;93(1 Suppl):85-93.
70. Westergren H, Farooque M, Olsson Y, Holtz A. Motor function changes in the rat following severe spinal cord injury. Does treatment with moderate systemic hypothermia improve functional outcome?. *Acta Neurochir (Wien).* 2000;142(5):567-73.
71. Westergren H, Farooque M, Olsson Y, Holtz A. Spinal cord blood flow changes following systemic hypothermia and spinal cord compression injury: an experimental study in the rat using Laser-Doppler flowmetry. *Spinal Cord.* 2001;39(2):74-84.

72. Yu WR, Westergren H, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Systemic hypothermia following spinal cord compression injury in the rat: an immunohistochemical study on MAP 2 with special reference to dendrite changes. *Acta Neuropathol.* 2000;100(5):546-52.
73. Yu WR, Westergren H, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Systemic hypothermia following compression injury of rat spinal cord: reduction of plasma protein extravasation demonstrated by immunohistochemistry. *Acta Neuropathol.* 1999;98(1):15-21.
74. Yu WR, Westergren H, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Systemic hypothermia following compression injury of rat spinal cord: an immunohistochemical study on the expression of vimentin and GFAP. *Neuropathology.* 1999;19(2):172-80. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1440-1789.1999.00227.x/abstract>. Acessado em 2013 (17 out).
75. Westergren H, Yu WR, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Systemic hypothermia following spinal cord compression injury in the rat: axonal changes studied by beta-APP, ubiquitin, and PGP 9.5 immunohistochemistry. *Spinal Cord.* 1999;37(10):696-704.

76. Chatzipanteli K, Yanagawa Y, Marcillo AE, Kraydieh S, Yeziarski RP, Dietrich WD. Posttraumatic hypothermia reduces polymorphonuclear leukocyte accumulation following spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2000;17(4):321-32.
77. Jou IM. Effects of core body temperature on changes in spinal somatosensory-evoked potential in acute spinal cord compression injury: an experimental study in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(15):1878-85.
78. Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y. Effects of moderate hypothermia on extracellular lactic acid and amino acids after severe compression injury of rat spinal cord. *J Neurotrauma*. 1997;14(1):63-9.
79. Shibuya S, Miyamoto O, Janjua NA, Itano T, Mori S, Norimatsu H. Post-traumatic moderate systemic hypothermia reduces TUNEL positive cells following spinal cord injury in rat. *Spinal Cord*. 2004;42(1):29-34.
80. Yamamoto K, Ishikawa T, Sakabe T, Taguchi T, Kawai S, Marsala M. The hydroxyl radical scavenger Nicaraven inhibits glutamate release after spinal injury in rats. *Neuroreport*. 1998;9(7):1655-9.

81. Albin MS, White RJ, Yashon D, Harris LS. Effects of localized cooling on spinal cord trauma. *J Trauma*. 1969;9(12):1000-8.
82. Tator CH, Deecke L. Studies of the treatment and pathophysiology of acute spinal cord injury in primates. *Paraplegia*. 1973;10(4):344-5.
83. Tator CH, Deecke L. Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma. *J Neurosurg*. 1973;39(1):52-64.
84. Black P, Markowitz RS. Experimental spinal cord injury in monkeys: comparison of steroids and local hypothermia. *Surg Forum*. 1971;22:409-11.
85. Howitt WM, Turnbull IM. Effects of hypothermia and methysergide on recovery from experimental paraplegia. *Can J Surg*. 1972;15(3):179-86.
86. Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg Neurol*. 1975;4(6):531-6.
87. Kuchner EF, Hansebout RR. Combined steroid and hypothermia treatment of experimental spinal cord injury. *Surg Neurol*. 1976;6(6):371-6.

88. Tüzgen S, Kaynar MY, Güner A, Gümüştaş K, Belce A, Etuş V, et al. The effect of epidural cooling on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1998;36(9):654-7.
89. Kuchner EF, Hansebout RR, Pappius HM. Effects of dexamethasone and of local hypothermia on early and late tissue electrolyte changes in experimental spinal cord injury. *J Spinal Disord*. 2000;13(5):391-8.
90. Casas CE, Herrera LP, Prusmack C, Ruenes G, Marcillo A, Guest JD. Effects of epidural hypothermic saline infusion on locomotor outcome and tissue preservation after moderate thoracic spinal cord contusion in rats. *J Neurosurg Spine*. 2005;2(3):308-18.
91. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
92. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol*. 1985;88(1):123-34.