

PAULO ALVIM BORGES

**Padronização do modelo experimental de lesão da medula
espinal e avaliação da lesão neurológica em camundongos**

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

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Raphael Martus Marcon

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borges, Paulo Alvim

Padronização do modelo experimental de lesão da medula espinal e avaliação da lesão neurológica em camundongos / Paulo Alvim Borges -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Raphael Martus Marcon.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal 2.Camundongos 3.Modelos animais

USP/FM/DBD-305/17

DEDICATÓRIA

A **Ludmila**, minha esposa e motivação verdadeira.

A meus pais **Carmem Silvia** e **José Luiz**, e a meu irmão **Pedro**, pelo eterno apoio e carinho.

A meu filho **Augusto**, com votos por um futuro próspero.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da pós-graduação.

Ao Professor Doutor **Olavo Pires de Camargo**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos na pós-graduação.

Ao Professor Doutor **Gilberto Luis Camanho**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos na residência médica.

Ao Professor Doutor **Raphael Martus Marcon**, Chefe do Grupo de Deformidades e Coluna Lombar do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela orientação deste trabalho.

Ao Professor Doutor **Alexandre Fogaça Cristante**, Chefe do Grupo de Coluna Cervical e Trauma Raquimedular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela paciência com meu aprendizado.

A **Camilo Helito Neto**, pela chance de engrandecimento profissional, conselhos de vida e oportunidades sem as quais meu cotidiano não permitiria a realização deste trabalho.

A **William Gemio Jacobsen Teixeira** e **Douglas Kenji Narazaki**, pela confiança no meu futuro, pelo apoio profissional e pelos ensinamentos.

Ao biólogo e veterinário **Gustavo Bispo dos Santos**, pelo apoio à realização deste trabalho e por sua ética e respeito aos animais de laboratório.

Ao Fisioterapeuta e estaticista **Henry Dan Kiyomoto**, pela competência e amizade.

A todos que indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

Nomes das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica: Terminologia Anatômica Internacional, Editora Manole, 1a ed. São Paulo, 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5a edição, 2009, elaborada pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº 6583/2008.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos, Abreviaturas e Siglas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivo.....	6
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1	Modelos experimentais históricos em lesão da medula espinal, trabalhos clássicos e diversas intervenções testadas.....	7
2.2	Estudos mais recentes com animais maiores, estudos com camundongos e literatura atual.....	23
3	MÉTODOS.....	46
3.1	Ética e medidas de proteção e suspensão da pesquisa.....	46
3.2	Dos animais e critérios de inclusão e exclusão.....	47
3.3	Da acomodação e manejo dos animais.....	48
3.4	Dos grupos experimentais, randomização e cegamento.....	49
3.5	Do modelo experimental de lesão medular.....	49
3.5.1	Protocolo de anestesia (Gargiulo et al., 2012).....	50
3.5.2	Procedimento cirúrgico.....	50
3.5.3	Contusão medular	52
3.5.4	Pós-operatório.....	54
3.5.5	Analgesia.....	54
3.5.6	Antibioticoprofilaxia.....	54
3.5.7	Protocolo de eutanásia (CONCEA, 2015)	55
3.5.8	Necropsia e avaliação macroscópica.....	56

3.5.9	Descarte das carcaças.....	58
3.6	Dos desfechos analisados.....	58
3.6.1	Desfechos primários: avaliação motora funcional.....	58
3.6.1.1	Escalas de motricidade.....	58
3.6.1.2	Avaliação de movimentação na Escada Horizontal (CUMMINGS et al, 2007).....	61
3.6.2	Desfechos secundários: avaliação da lesão medular.....	62
3.6.2.1	Avaliação histológica.....	62
3.6.2.2	Avaliação entre escalas funcionais.....	64
3.7	Da análise estatística.....	64
4	RESULTADOS	66
4.1	Escalas funcionais.....	68
4.1.1	Escala BBB.....	68
4.1.2	Escala BMS.....	73
4.1.3	Escala MFS.....	78
4.2	Avaliação de movimentação na Escada Horizontal.....	82
4.3	Avaliação histopatológica.....	86
5	DISCUSSÃO.....	93
6	CONCLUSÃO.....	103
7	ANEXOS.....	104
8	REFERÊNCIAS	111

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sequência de eventos do procedimento cirúrgico: 1- Tricotomia e incisão dorsal. 2- Dissecção dos planos musculares. 3- Exposição da coluna vertebral. 4- Laminectomia e exposição da medula espinal..... 51
- Figura 2 - Série de imagens da contusão medular. 1- Camundongo posicionado para a contusão da medula espinal, com as vértebras adjacentes fixadas por meios de pinças travadas nos processos espinhosos. 2 e 3 - Camundongo posicionado no NYU Impactor para contusão da medula espinal. 4- Camundongo pós lesão da medula espinal após fechamento da ferida operatória..... 53
- Figura 3 - Imagens da eutanásia. 1 - Perfuração cardíaca para exsanguinação sob anestesia e irrigação do ventrículo esquerdo com soro fisiológico. 2 - Bomba de infusão contínua..... 55
- Figura 4 - Ressecção da coluna vertebral. 1 - Exérese da peça histológica (coluna vertebral). 2 - Peça histológica ressecada, recipiente para acondicionamento do material e escala de tamanho..... 57
- Figura 5 - Diferentes ângulos de observação de camundongo paraplégico em campo aberto para avaliação das escalas motoras..... 60
- Figura 6 - Diferentes ângulos de observação de camundongo paraplégico na Escada Horizontal..... 62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Variação da pesagem dos animais nos grupos experimentais.....	67
Gráfico 2 - Resultado da escala BBB de cada grupo por semana de acompanhamento.....	72
Gráfico 3 - Resultado da escala BMS de cada grupo por semana de acompanhamento.....	77
Gráfico 4 - Resultado da escala MFS de cada grupo por semana de acompanhamento.....	81
Gráfico 5 - Resultado da Escala Horizontal de cada grupo por semana de acompanhamento.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estatística descritiva da massa (em gramas) dos animais e Teste T de Student.....	67
Tabela 2 - Estatística descritiva - Escala BBB.....	69
Tabela 3 - Teste de Friedman - Escala BBB.....	70
Tabela 4 - Teste de Kruskal-Wallis - Escala BBB.....	70
Tabela 5 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos (escala BBB) por semana.....	71
Tabela 6 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escala BBB.....	72
Tabela 7 - Estatística descritiva da Escala BMS.....	74
Tabela 8 - Teste de Friedman - Escala BMS.....	74
Tabela 9 - Teste de Kruskal-Wallis - Escala BMS.....	75
Tabela 10 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos por semana - Escala BMS.....	76
Tabela 11 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escala BMS.....	77
Tabela 12 - Estatística descritiva da Escala MFS.....	78
Tabela 13 - Teste de Friedman - Escala MFS.....	79
Tabela 14 - Teste de Kruskal-Wallis - Escala MFS.....	79
Tabela 15 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos por semana - Escala MFS.....	80

Tabela 16 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escala MFS.....	81
Tabela 17 - Estatística descritiva - Escada Horizontal.....	82
Tabela 18 - Teste de Friedman - Escada Horizontal.....	83
Tabela 19 - Teste de Kruskal-Wallis - Escada Horizontal.....	83
Tabela 20 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos (Escada Horizontal) por semana.....	84
Tabela 21 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escada Horizontal.....	85
Tabela 22 - Resultados da avaliação histopatológica (graduação).....	87
Tabela 23 - Estatística descritiva da Avaliação Histológica.....	88
Tabela 24 - Distribuição dos parâmetros histológicos entre os Grupos e correlação.....	89
Tabela 25 - Teste de Mann Whitney para os parâmetros histológicos.....	90
Tabela 26 - Teste de correlação de Spearman entre parâmetros histológicos e escalas (rô de Spearman).....	91

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
BDA	Biotinylated dextran amine
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMS	Basso Mouse Scale
CAPPesq	– Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
HC-FMUSP	do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CGRP	Calcitonin Gene-related Protein
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Ani- mal
CSPG	Chondroitin Sulfate Proteoglycan
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
g.cm	Gramas-centímetros
G-CSF	Granulocyte-colony Stimulating Factor
HE	Hematoxilina-eosina
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
IOTHCFMUSP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das

Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo

Kg	Quilograma
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos
MAC	Macintosh
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
MFS	Mouse Function Scale
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MSF	Hindlimb Motor Function Scale
NA	Não se aplica
NF	Neurofilament Protein
NYU-Impactor	New York University Impactor
°	Grau
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTIBS	Porcine Thoracic Injury Behavior Scale
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TCS	Trato Corticoespinal
USP	Universidade de São Paulo

RESUMO

Borges PA. *Padronização do modelo experimental de lesão da medula espinal e avaliação da lesão neurológica em camundongos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A lesão da medula espinal é um dos grandes desafios da medicina. Apesar de décadas de pesquisa sobre o assunto, seu tratamento ainda não é satisfatório. A padronização de modelos de lesão da medula espinal permite a reprodutibilidade e a análise dos resultados sendo importante para a pesquisa sobre o tema. **OBJETIVO:** Validar a padronização de um modelo de lesão da medula espinal e avaliação da lesão neurológica em camundongos. **MÉTODOS:** Submetemos 30 camundongos BalbC divididos em 4 grupos experimentais e um grupo controle à lesão da medula espinal torácica por queda de peso de diferentes alturas (gerando lesões de graus variados). O grupo controle (SHAM) foi submetido apenas à laminectomia. Os camundongos foram avaliados por seis semanas durante as quais foram aplicadas escalas de avaliação funcional motora. Após seis semanas os animais foram sacrificados para avaliação histológica das medulas espinais lesadas. Os achados foram correlacionados entre si para validar se a lesão foi efetiva e se os grupos diferenciaram-se entre os diferentes graus de lesão. Adicionalmente avaliamos se as escalas utilizadas são aplicáveis e se são fiéis aos achados histológicos. **RESULTADOS:** Seis dos trinta camundongos do experimentos evoluíram para óbito sendo um do Grupo 3, um do Grupo 4 e quatro do Grupo 5. Um camundongo do Grupo 4 apresentou autofagia. O Grupo 5 foi excluído do experimento por alta mortalidade e perda de dados. Todas as escalas funcionais estudadas foram estatisticamente diferentes entre si e demonstraram evolução durante o experimento. Os achados foram confirmados por histologia e apresentaram uma correlação forte com as escalas BBB e BMS e moderada a forte com a escala MFS. A Escada Horizontal apresentou forte correlação com a degeneração neurológica porém não apresentou correlação com os demais parâmetros histológicos estudados. **CONCLUSÃO:** O modelo de lesão da medula espinal em camundongos apresentado neste estudo é efetivo, confiável e reprodutível, com exceção da lesão causada por queda de peso (10g) de 50mm de altura, que traz mortalidade inaceitável. Das escalas estudadas, BBB e BMS são as mais confiáveis, enquanto que a Escada Horizontal tem seu uso discutível.

Descritores: Traumatismos da Medula Espinal; Camundongos; Modelos Animais.

ABSTRACT

Borges PA. *Standardization of a spinal cord lesion model and neurologic evaluation using mice* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

INTRODUCTION: Spinal cord lesion is a great medical challenge. Even with many decades of research, no satisfactory treatment is available yet. The standardization of animal experimentation models makes the spinal cord lesion reproducible allowing a reliable analysis of the results. Hence, standardization is a major concern in spinal cord lesion research. **OBJECTIVE:** To validate the standardization of a spinal cord lesion model with neurologic evaluation using mice. **METHODS:** Thirty BalbC mice were divided in four experimental groups and one control group and submitted to spinal cord lesion produced by weight drop from different heights (producing different severity lesions). The control group (SHAM) was submitted to laminectomy only. Every mice was followed up for six weeks during which functional motor scales were applied. After six weeks the animals were sacrificed for histological examination. Findings were correlated to confirm if the spinal cord lesion was effective and if the groups were different between themselves. Additionally all functional motor scales were correlated with the histological findings to confirm if the scales are reliable and truly represented the spinal cord lesion. **RESULTS:** Six mice died during the experimentation period (one mouse from the Group 3, one mouse from the Group 4 and four mice from Group 5). One mouse from Group 4 presented autophagia and was excluded from the experiment. Group 5 was excluded from the experiment for high mortality rates and data loss. All functional motor scales applied demonstrated significant results with moderate or strong correlation with the histological findings. The Horizontal Ladder scale had strong correlation with neurologic degeneration but had weak or worse correlation with the rest of the histological parameters studied. **CONCLUSION:** The spinal cord lesion model using mice presented in this study is reliable and reproducible, excluding the lesion produced by a weight drop (10g) from 50mm, which brings unacceptable mortality rate. Of all functional motor scales studied, BBB and BMS scales are the most reliable. The use of the Horizontal Ladder scale, however, must be carefully evaluated.

Descriptors: Spinal Cord Injuries; Mice; Models, Animal.

1 INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal traumática é um dos grandes desafios da medicina. Essa patologia traz um dano grave para os pacientes acometidos **(Singh et al., 2008; Pearcey et al., 2007)** e nenhuma medida até o presente momento demonstrou-se francamente eficaz para o tratamento, que permanece um desafio **(Fouad et al., 2011; Rahimi-Movaghar et al., 2013)**.

O conhecimento sobre as consequências desastrosas deste tipo de trauma tem um longo histórico de registros. Papiros egípcios datados de 1700 a.C. já descreviam as fraturas da coluna vertebral como enfermidades de mau prognóstico e desencorajavam investir em tratamento **(Breasted¹, 1930 apud Dohrmann, 1972; Hughes, 1988)**. Estudos focados na busca do tratamento datam desde o início do século XX **(Allen, 1911)**.

Dados da última década demonstram que a incidência de trauma raquimedular nos EUA varia de 42,4 a 51,4 por milhão de habitantes ao ano, com prevalência entre 220 e 285.000 casos **(Wyndaele e Wyndaele, 2006; Singh et al., 2014)**, e apresenta alta mortalidade em comparação com a média populacional **(Hagen et al, 2010)**. O custo social desses pacientes é elevado, seu tratamento é dispendioso e a sua produtividade após a lesão é baixa **(Lidal et al., 2007)**. Dentre os gastos elevados citamos, entre outros: as despesas

¹ Breasted JH. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. Chicago: University of Chicago Press; 1930. 2v

com a internação inicial, as modificações da casa e do carro, cuidados diários e encargos trabalhistas **(Priebe et al., 2007)**.

As alterações decorrentes da lesão raquimedular são divididas em agudas (lesão primária), subagudas (lesão secundária) e crônicas. As primeiras ocorrem imediatamente após o impacto traumático, cujo dano tecidual leva a edema, isquemia e morte celular local, incluindo neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais. As alterações teciduais permanecem evoluindo com a ativação da cascata inflamatória, que ocasiona intensa migração de neutrófilos e levando à peroxidação lipídica e à formação de radicais livres, contribuindo para o dano neural. A concentração intracelular de cálcio e sódio e a extracelular de potássio aumentam, causando um desequilíbrio físico-químico importante **(Amar e Levy, 1999; Hagg e Oudega, 2006; Akthar et al., 2008)**.

A fase subaguda ocorre dentro da primeira semana pós-trauma e é marcada pela continuidade da morte celular, estimulada pela invasão de monócitos, macrófagos e linfócitos-T e pelo início da formação de tecido cicatricial por fibroblastos. A desmielinização distal acentua a morte dos oligodendrócitos **(Fawcett e Asher, 1999; Hagg e Oudega, 2006; Akthar et al., 2008)**.

Já a fase crônica, que ocorre dentro do período de uma a quatro semanas, é marcada pela formação de uma cicatriz glial e pela proliferação de astrócitos **(Kakulas, 1984; Akthar et al., 2008)**.

O estudo contínuo da fisiopatologia da lesão do sistema nervoso central trouxe evidência para embasar diferentes estratégias de tratamento e alguns resultados positivos foram demonstrados na melhora da função neurológica em pacientes com lesão da medula espinal. Grande parte do conhecimento dos processos fisiopatológicos primários e secundários advém de pesquisas experimentais com modelos de lesão da medula espinal provocada. Diversos são os modelos possíveis com animais de experimentação. Os modelos que utilizam gatos, cães, macacos e ratos foram amplamente estudados, sendo os modelos murinos os mais utilizados **(De La Torre, 1984; Kunkel-Bagden et al., 1992)**.

No período entre 2004 e 2014 observa-se um volume grande de experimentos com animais. Em um montante de 407 trabalhos levantados, 71% (289) foram de modelos com ratos; 16,9% (69) com camundongos; 4,6% (19) com cães; 4,4% (18) com coelhos; 2,2% (9) com porcos; 0,49% (2) com primatas e 0,24% (1) com porquinhos da Índia *Cavia porcellus* **(Zhang et al., 2014)**. Outros modelos ainda podem ser encontrados como a utilização de ovelhas **(Yeo et al., 1975)**.

Nos estudos com primatas, discute-se o custo benefício em se usar animais mais semelhantes a humanos para experimentação. Em teoria, as similaridades anatômicas e fisiológicas entre homens e outros primatas trariam uma melhor correlação entre os resultados dos estudos e os possíveis resultados em humanos. Na mesma discussão, pesam contra a utilização de roedores as diferenças da neuroanatomia entre primatas e camundongos e as

dificuldades de avaliação adequada das sequelas neurológicas dos camundongos após a lesão nesses modelos. No balanço final, a recomendação ainda é para se manter o uso de roedores como principal modelo de experimentação animal para lesão da medula espinal (**Courtine et al., 2007; Nout et al., 2012**). A conclusão é embasada no alto custo financeiro de se manter os modelos com primatas, o manejo difícil de animais de porte maior que os de roedores e, por fim, a extrapolação duvidosa dos resultados de modelos animais para humanos, mesmo que com primatas. Sugere-se que os primatas sejam utilizados apenas em casos de evidência forte com tratamentos altamente promissores, previamente demonstrados em modelos com roedores (**Courtine et al., 2007; Nout et al., 2012**).

À semelhança dos estudos animais com primatas, ensaios clínicos em humanos também são objeto de discussão. Tais estudos são onerosos e trabalhosos, de difícil planejamento e envolvem questões éticas mais profundas do que os estudos experimentais com animais de laboratório. A literatura sugere que ensaios clínicos em humanos sejam feitos com planejamento rigoroso e apenas com intervenções que apresentem evidência concreta de eficácia e segurança, necessariamente comprovadas por experimentação em modelos animais. Os modelos com roedores sempre são sugeridos como alternativa (**Blight e Tuszynski, 2006; Forgione et al., 2017**).

A utilização de camundongos nos modelos experimentais traz vantagens claras com relação a outros modelos com animais maiores, e também em comparação com modelos que utilizam roedores em geral. Camundongos

custam menos aos laboratórios por serem de fácil criação, apresentarem alta taxa de reprodução, demandarem menos cuidados e serem de fácil manipulação **(Rosenthal e Brown, 2007; Bryda, 2013)**. Adicionalmente camundongos trazem um leque maior de possibilidades em experimentação, dada a maior facilidade na criação de linhagens isogênicas, transgênicas e a possibilidade da utilização de terapias genéticas *knockin* e *knockout* **(Kuhn e Wrathall, 1998; Joshi e Fehlings, 2002; Seki et al., 2003; Kouyoumdjian et al., 2009; Pitzer et al., 2010; Sato et al., 2012; Kubota et al., 2012)**. Apesar de a engenharia genética também ser viável em ratos, é mais fácil de ser feita em camundongos **(Rosenthal e Brown, 2007)**.

Tendo em vista o exposto, buscando-se atenuar ao máximo o grande impacto na qualidade de vida de vítimas de lesão da medula espinal; concluímos que a pesquisa sobre o tema deve ser mantida. Sabemos que a padronização de modelos de lesão da medula espinal permite a reprodutibilidade e a análise dos resultados **(Rodrigues, 1999; Basso et al., 1996)**. Com a crescente dificuldade, em tempos modernos, em utilizar animais para experimentação científica, o camundongo pode ser a chave para um modelo mais simples, prático e barato, permitindo que a pesquisa sobre um tema tão importante continue. Para tanto, a padronização de modelos se faz necessária.

1.1 Objetivo

O objetivo deste projeto é validar a padronização de um modelo de lesão da medula espinal e avaliação da lesão neurológica em camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Modelos experimentais históricos em lesão da medula espinal, trabalhos clássicos e diversas intervenções testadas

Schmaus² (1890), apud **Yeo (1976)**, realiza um dos primeiros estudos experimentais em animais. Utiliza coelhos submetidos à lesão da medula espinal produzida através de golpes nas costas dos animais (trauma contuso em tecido fechado). Observa a lesão do tecido nervoso em análise macroscópica evidenciando aparecimento de áreas de cavitação.

Watson³ (1891), apud **Yeo (1976)**, tenta reproduzir os achados de **Schmaus (1890)** jogando cães de diferentes alturas para produzir lesão da medula espinal. Não conseguiu, contudo, reproduzir o método de **Schmaus, 1890**.

Kirchgässer⁴ (1897), apud **Dohrmann (1972)**, e **Scagliosi⁵ (1898)**, apud **Dohrmann (1972)**, em estudos separados, reproduzem o método de

² Schmaus H. Beiträge zur pathologischen anatomie der Rückenmarkerschütterung. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1890;122(3):470-95.

³ Watson BA. An experimental study of lesions arising from severe concussions. *Zent.bl. Allg. Pathol.* 1891;2:74.

⁴ Kirchgässer G. Experimentelle unteruchugen über rückenmarkserchütterung. *Deustsche Z Nervneh.* 1897; 11:406-19.

Schmaus, 1890 para lesão de medula espinal em coelhos. Observam microscopicamente as células neuronais dos cornos anteriores da medula espinal, porém não encontram evidência de hemorragia intramedular ou fratura da coluna vertebral.

Allen (1911) descreve pela primeira vez um modelo experimental reprodutível de lesão da medula espinal. Seu modelo consiste na queda de um peso diretamente sobre o saco dural exposto em cães. O sistema demonstra-se eficaz para produzir uma lesão controlada e padronizada na medula, através do controle da massa e da altura da queda do peso, com o resultado expresso em gramas-centímetros (g.cm).

Allen (1914) documenta uma relação direta entre o pior prognóstico da lesão medular e o aumento do impacto produzido pela queda do peso em seu modelo (medido em g.cm). Relata a formação de edema e hemorragia na medula espinal nos primeiros 15 minutos após o trauma, e edema dos axônios quatro horas após o trauma. Observa que a mielotomia melhora a recuperação clínica dos animais no estudo e sugere que a possibilidade de que o aumento da pressão intramedular causado pelo edema e hemorragia agrava a necrose isquêmica após a lesão traumática inicial.

⁵ Scagliosi G. Ueber die Gehirnerschütterung und die daraus im Gehirn und Rückenmark hervorgerufenen histologischen Veränderungen. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1898; 152(3):487-525.

Ayer (1919) descreve um modelo de lesão da medula espinal em gatos através da injeção de parafina no espaço extradural. Produz com sucesso paraplegia completa nos animais experimentais, porém observa que a medula espinal apresentava-se histologicamente normal, mas as meninges tinham aspecto inflamatório. Não causa, portanto, lesão da medula espinal propriamente dita.

Mcveigh⁶ (1923), apud **Yeo (1976)** experimenta um novo modelo de lesão da medula espinal em cães. Os animais eram submetidos à laminectomia no nível T7-T8 e posteriormente tinham suas medulas comprimidas com os dedos do cirurgião. Em análise histopatológica, observa edema medular dentro de oito horas da lesão experimental que piora até o segundo dia após lesão. Também observa hemorragia da substância branca nas regiões anterior e lateral e na substância cinzenta acima e abaixo do nível da lesão.

Thompson (1923) realiza experimento semelhante ao de **McVeigh (1923)**. Produz lesão da medula espinal em cães por laminectomia seguida de compressão digital ou com o cabo do bisturi. Descreve um padrão cônico de hemorragia medular que se estende cranial e caudalmente ao nível da lesão, assim como **McVeigh (1923)**. Comenta que esse padrão de lesão é semelhante a lesões previamente observadas em humanos vítimas de lesão traumática da medula espinal.

⁶ McVeigh JF. Experimental cord crushes with especial reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cord affected. *Arch Surg.* 1923; 7(3):573-600.

Ferraro⁷ (1927), apud **Yeo (1976)**, analisa a evolução temporal dos achados histopatológicos da lesão da medula espinal em coelhos submetidos à lesão experimental. A lesão foi produzida por golpes nas costas dos animais com uma barra de ferro. Descreve, dentro de uma hora após a lesão, a formação de edema dos axônios e desmielinização progressiva nas 12 horas subsequentes. Quatro dias após a lesão, observa a formação de cicatriz glial, degeneração da substância branca e alterações no corno anterior da substância cinzenta.

Craig⁸ (1932), apud **Dohrmann (1972)**, em um modelo experimental com gatos submetidos à laminectomia, introduz pedaços de cera óssea no espaço extradural para produzir lesão da medula espinal. Observa a degeneração do tecido nervoso da região posterior da medula espinal no nível da compressão. Descreve vacuolização e degeneração cística no tecido lesado.

Amako⁹ (1936), apud **Yeo (1976)**, confirma os achados de **Allen (1911)**. Utiliza método semelhante de lesão da medula espinal por queda de peso e descreve hemorragia na substância cinzenta e cavitação da medula espinal de cães submetidos à experimentação.

⁷ Ferraro A. Experimental medullary concussion of the spinal cord in rabbits: histologic study of the early stages. *Arch Neurol Psychiatr.* 1927; 18(3):357-73.

⁸ Craig WM. Pathology of experimental compression of the spinal cord. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1932; 7:680-2.

⁹ Amako T. Surgical treatment of spinal cord injury by blunt forces: experimental study. *J Jpn Surg Soc.* 1936; 37:1843-74.

Groat et al.¹⁰ (1945), apud **Yeo (1976)** produzem lesão da medula espinal em gatos através de golpes na região dorsal. Avaliam alterações histopatológicas e descrevem que estas variam diretamente com a força empregada no golpe.

Tarlov e Klinger (1953) e (1954) estudam cães submetidos à lesão da medula espinal. O modelo apresentado é padronizado através da laminectomia de T12 pela qual era introduzido um balão inflável, produzindo compressão gradual no espaço extradural. Estudam a deterioração e a recuperação da função sensitiva e motora nos animais submetidos à experimentação. Classificam a função neurológica com uma escala apresentada pelos próprios autores. Concluem que a recuperação funcional depende do tempo de compressão ao qual a medula espinal foi exposta para produzir a paralisia.

Woodward e Freeman (1956) apresentam um modelo de lesão isquêmica da medula espinal em cães. Os pesquisadores realizam a secção dos vasos sanguíneos e das raízes nervosas dentre os níveis T6 a T9 e sacrificam os animais entre uma e quatro semanas após a lesão. Estudam mudanças na avaliação histológica entre quadros de isquemia leve ou grave. Encontram em ambos os quadros a formação de cavitação e perda de neurônios, com a diferença de que na isquemia grave houve presença de necrose e a perda de neurônios mais significativa.

¹⁰ Groat RA, Rambach WA Jr, Windle WF. Concussion of spinal cord: an experimental study and a critique of the use of the term. *Surg Gynecol Obstet.* 1945; 81:63-74.

Ducker et al. (1971) estudam 32 macacos *Rhesus* de maneira prospectiva e randomizada. Os macacos são submetidos a diferentes graus de lesão da medula espinal por queda de peso (resultante do impacto sobre a medula de 200 g.cm, 300 g.cm, 400 g.cm e 500 g.cm). Após a lesão experimental, os animais são divididos em quatro grupos de oito espécimes cada. Posteriormente, cada animal é randomizado novamente dentro dos grupos em categorias aguda e subaguda, sendo sacrificados seis horas após a lesão e outra parte cinco a seis dias após a lesão, respectivamente. As medulas espinais lesadas são analisadas sob microscopia por pesquisador cego ao estudo e os achados patológicos foram graduados em leve, moderado e grave. Os animais da categoria subaguda também são submetidos a um teste neurológico motor e classificados por escala padronizada apresentada pelo autor. Os autores observam que os graus lesão da medula espinal têm relação direta com gravidade do trauma, porém concluem que a gravidade das mudanças histopatológicas não corresponde aos achados clínicos. Mesmo com achados patológicos progressivos em gravidade por uma semana, pode haver melhora nos achados clínicos. Por fim, adicionam que nos traumas leves, houve alterações medulares centrais e recuperação funcional; nos moderados, ocorreu comprometimento da substância branca, enquanto a lesão grave envolveu toda a medula.

Fairholm e Turnbull (1971) estudam a microcirculação da medula espinal pós-lesão. Avaliam prospectivamente 34 coelhos e 5 cães submetidos à lesão da medula espinal por queda de peso. Os animais foram sacrificados em tempos variáveis (10 minutos a 14 dias após a lesão). Durante a eutanásia

foi administrada solução coloidal de bário para contraste. Descrevem com maior importância os achados das microangiografias realizadas entre 7 a 14 dias pós-trauma. Nestas, os autores definem duas zonas de lesão na medula espinal: A porção posterocentral da medula espinal (zona 1), na qual capilares perdem progressivamente a capacidade de condução de sangue, e a área adjacente ao redor da zona 1 (correspondente a zona 2), em que o padrão microvascular é normal. Concluem que a preservação da microcirculação está relacionada à boa recuperação dos neurônios e axônios danificados pelo trauma.

Eidelberg et al. (1976) descrevem um modelo de lesão da medula espinal por compressão direta da medula torácica em furões. Os animais são submetidos à laminectomia torácica (T6-T8) e um objeto de 100 g é colocado diretamente sobre a medula por 3 minutos. Os processos espinhosos adjacentes à laminectomia são presos por pinças e distraídos. Os autores avaliam a função motora dos animais por observação da marcha em plano inclinado de até 25° e avaliam achados histológicos dos tecidos lesados. Concluem que o modelo é eficaz para produzir lesão da medula espinal e sugerem que esse modelo poderia simular a compressão da medula de maneira similar a uma luxação ou fratura-luxação não reduzida.

Dohrmann et al. (1976a) descrevem um aparelho para produzir uma lesão experimental da medula espinal através do modelo de queda de peso. O equipamento descrito trazia novo horizonte à experimentação com esse

modelo por permitir a monitoração do grau do trauma em relação à velocidade de deformação da medula espinal, ao impulso e à energia.

Dohrmann e Panjabi (1976b) estudam a influência da quantidade de energia absorvida pela medula e o grau de lesão funcional. Realizam estudo experimental utilizando seu aparelho de queda de peso com 15 gatos submetidos à lesão da medula espinal em nível T5-6. Todos os cinco grupos foram submetidos a traumas de 400 g.cm porém com parâmetros biomecânicos diferentes. Os cinco grupos (numerados de 1 a 5, respectivamente) receberam a seguinte carga de lesão: 5 g x 80 cm; 10 g x 40 cm; 20 g x 20 cm; 40 g x 10 cm e 80 g x 5 cm. Os autores observam que o volume de lesão é diferente entre os grupos, embora todos tenham recebido a mesma carga para a lesão, de 400 g.cm. Por fim, documentam, como exemplo, que a energia absorvida pela medula é 100 vezes maior no Grupo 4 que no Grupo 1.

Rivlin e Tator (1977) descrevem um novo método para avaliar a função motora em ratos. O rato é colocado em um plano com ângulo de inclinação variável e mensurável. O método consiste em avaliar qual o ângulo máximo em que o animal pode manter-se na posição sem cair. Esse método foi testado em dois grupos: ratos normais (controle) e ratos sujeitos à mielectomia. Demonstram diferença consistente entre os dois grupos.

Rawe et al. (1978), em estudo com gatos submetidos à lesão da medula espinal, observam que a hemorragia medular pós-trauma varia de maneira

diretamente proporcional à pressão arterial do animal em experimentação. Concluem que a medula espinal perde sua capacidade de regulação vasomotora após o trauma e sugerem que o edema medular poderia ser reduzido com a diminuição da pressão arterial sistêmica. Comentam, entretanto, que a manutenção da pressão arterial sistêmica após a lesão é provavelmente a melhor conduta, dado que o aumento rápido da pressão arterial após um período de hipotensão pode ser deletério ao causar novos danos ao tecido medular.

Balentine (1978) estuda a lesão necrótica da medula espinal em ratos adultos, submetidos à lesão experimental pelo modelo de queda de peso. Analisa a histopatologia da lesão em períodos de tempo que variam de três a cinco minutos após a lesão, 30 minutos, uma hora, duas horas, quatro horas, oito horas, e uma semana. Confirma a evolução sequencial do desenvolvimento de necrose primeiro na substância cinzenta e depois na substância branca. Demonstra por meio observacional que a necrose é devida à ruptura dos vasos sanguíneos, tanto artérias quanto veias principais, lesadas imediatamente após o trauma.

Rivlin e Tator (1978) utilizam a técnica radiográfica com ^{14}C -antypirina para avaliação do fluxo sanguíneo regional na lesão em 12 ratos Wistar submetidos à lesão da medula espinal através da utilização de cliques de aneurisma modificados para compressão, colocados ao redor da medula extradural (novo modelo descrito). O fluxo sanguíneo regional foi medido em 5 minutos, 2 horas e 24 horas após a lesão. Concluem que lesões por

compressão medular grave produzem grave isquemia pós-traumática na medula espinal, por pelo menos 24 horas. Sugerem que o método utilizado é válido para o estudo da perfusão da medula espinal.

De La Torre (1981) e (1984) revisa os modelos e estratégias da pesquisa sobre lesão da medula espinal. Discute sobre os modelos de lesão; animais para experimentação; achados eletrofisiológicos, morfológicos e histopatológicos; fisiopatologia vascular da lesão; mudanças bioquímicas; metabolismo; e fases da lesão da medula espinal. Argumenta que na fase crônica a regeneração axonal dos primatas é pouco abundante e se faz apenas por brotamento. Sugere que o transplante de tecido neural fetal e uso de fatores de crescimento poderiam promover regeneração da medula espinal lesada.

Khan e Griebel (1983), em revisão dos modelos mais utilizados de lesão da medula espinal, concluem que enquanto o modelo por queda de peso causa lesão quase que exclusivamente por fatores mecânicos, tanto o modelo de compressão por clipe vascular quanto o modelo de compressão por insuflação de balão no espaço extradural causam lesão tanto por fatores mecânicos como por fatores vasculares.

Gale et al. (1985) descrevem uma versão modificada da escala referida por Tarlov e Klinger (1954). Cinquenta ratos submetidos a lesão da medula espinal em T8 por queda de peso são observados em campo aberto por pessoas treinadas, sendo cada membro traseiro observado individualmente e

graduado em: 0 - nenhum movimento das patas traseiras e nem suporte de peso; 1 - movimento perceptível dos membros traseiros, sem suporte de peso; 2 - movimentos frequentes e/ou vigorosos nos membros traseiros mas sem suporte de peso; 3 - suporte de peso nos membros traseiros, podendo trocar um ou dois passos; 4 - caminhar com déficit leve; 5 - caminhar normal. Testam ainda a sensibilidade dos animais após a lesão da medula espinal porém constatam baixa concordância dos testes com o grau de lesão dos grupos experimentais. Dentro os dois testes utilizados, o teste da placa quente (animal retira pata quando entra em contato com placa metálica aquecida) foi mais confiável que o teste “tail flick” (retirada da cauda quando exposta a um feixe luminoso de alta potência).

Noble e Wrathall (1987) analisam a lesão experimental da medula espinal em ratos e concluem que a fixação dos processos espinhosos adjacentes à área da laminectomia diminui a complacência da coluna vertebral de forma que o impacto do peso sobre a medula não é amortecido pelos movimentos da coluna e da caixa torácica.

Fujita e Yamamoto (1989) descrevem um modelo novo de lesão da medula espinal em cães. Os animais são submetidos à tração longitudinal da medula espinal por distração gradual da coluna lombossacra. Registram os achados eletrofisiológicos por potencial evocado. Observam que a medula espinal é sensível à tração e comprovam os achados pela queda do potencial evocado, diretamente proporcional ao grau de distração administrado.

Sugerem que a síndrome da medula espinal presa é causada pela lesão da medula espinal e as raízes nervosas por tração.

Barros Filho et al. (1990), em estudo retrospectivo, descrevem a epidemiologia de 428 casos de trauma raquimedular em pacientes internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo no período entre 1982 e 1987. Dentre as etiologias mais frequentes destacam-se: os ferimentos por arma de fogo (36,7%), mergulho em água rasa (7,7%) e queda de peso sobre o paciente (4,2%). O estudo demonstra que o atraso para o atendimento desse tipo de pacientes é comum, sendo que apenas 28% dos pacientes são atendidos nas primeiras 6 horas, 33,3% são atendidos no hospital um dia após o acidente e 3,3% são atendidos no hospital em 15 dias ou mais depois do acidente.

Behrmann et al. (1992) em mais uma padronização de modelo da literatura, estudam a recuperação neurológica espontânea em diferentes tipos de lesão da medula espinal. Comparam dois grupos de ratos, um submetido à lesão contusional contra outro submetido à lesão por secção anatômica da medula espinal. Realizam análise histológica do tecido medular lesado e comportamental da recuperação locomotora dos animais por uma modificação da escala de Tarlov e Klinger (1954) porposta pelos autores. Observam a marcha dos animais em campo aberto, em plano inclinado e em gaiola com grade. Demonstram superioridade da recuperação funcional no grupo com lesão contusional (lesão parcial) em comparação ao grupo que foi submetido à secção anatômica (lesão total).

Basso et al. (1995) descrevem uma modificação da escala de **Tarlov e Klinger (1954)**: a escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan). Nesse estudo, ressaltam que a escala utilizada pode trazer uma medida preditiva da recuperação motora, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais devidos às diferentes lesões e de prever alterações anatômicas no centro da lesão. Também demonstram que a avaliação pela escala é reprodutível em testes interexaminadores.

Basso et al. (1996) descrevem a padronização de um modelo experimental completo com método de lesão da medula espinal utilizando um New York University Impactor (NYU-Impactor) e escala para avaliação padronizada (BBB). Demonstram que o sistema NYU permite produzir uma contusão medular graduada, consistente e reprodutível em todos os ratos. Citam o teste BBB como sendo mais sensível que os demais até então descritos para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram lesão medular contusa. No modelo padronizado do estudo (utilizando a lesão pelo sistema NYU e a aferição pela escala BBB), confirmam que o método é aplicável demonstrando que uma maior quantidade de tecido poupado está diretamente relacionada com uma melhor função locomotora final.

Basso et al. (1996), em estudo conhecido como MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*), padronizam o modelo de lesão da medula espinal em ratos com o uso do aparelho New York Impactor. Testam a confiabilidade da escala de sua autoria (BBB) comparando três grupos de

observadores: um grupo já experiente e treinado para utilizar a escala conforme a padronização proposta neste estudo e dois grupos controle sem experiência prévia para a utilização da escala. Também compararam dentro dos grupos a confiabilidade dos examinadores quando testados individualmente ou em conjunto. Observam que a escala pode ser facilmente aplicada por examinadores não experientes porém sua confiabilidade é significativamente maior quando utilizada em grupo de examinadores treinados e quando as avaliações não são realizadas individualmente. Esse estudo revela evidência robusta de que a padronização de modelos animais para a pesquisa sobre lesão da medula espinal traz maior confiabilidade dos resultados.

Haghighi et al. (1996) testam um novo modelo de lesão experimental na medula espinal em gatos. Quatro animais são submetidos à lesão por radiofrequência. Avaliam achados radiológicos por ressonância magnética e cortes histológicos. Comprovam que a radiofrequência causa lesão medular e propõem a viabilidade do modelo em novos estudos sobre lesão da medula espinal.

Amar e Levy (1999), em artigo de revisão, discutem a utilização de vários agentes farmacológicos, entre eles os glicocorticoides, lazeroides, gangliosídeos, antagonistas dos opioides, bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas dos receptores do glutamato, agentes antioxidantes, radicais livres e outros agentes farmacológicos em experimentos em modelos animais e humanos. Verificam que os conceitos de lesão primária e secundária estão

bem estabelecidos e têm amplas implicações no tratamento da lesão medular aguda. Reforçam que os principais alvos para terapia farmacológica são os eventos patogênicos da lesão medular aguda e incluem o acúmulo de glutamato, fluxos de cálcio aberrantes, formação de radicais livre, peroxidação lipídica e a geração de metabólitos do ácido araquidônico. Enfatizam que até o final do século XX, dentre todas as terapias farmacológicas estudadas, apenas a metilprednisolona demonstrou de forma concreta eficácia e segurança em estudos com alto nível de evidência. Sugerem que a terapia futura será provavelmente uma combinação das muitas terapias farmacológicas estudadas e que outras opções viáveis de tratamento incluem o aumento da regeneração axonal e da plasticidade neural.

Rodrigues (1999), em tese acadêmica para a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, padroniza um modelo de lesão aguda da medula espinal em ratos Wistar, utilizando o modelo da queda de peso de acordo com parâmetros determinados pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS). Utiliza o auxílio de impactor controlado por computador e verifica a existência de correlação entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos utilizados. Conclui que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos.

Ferreira et al. (2005) padronizam uma técnica para obtenção do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana. No modelo experimental foram utilizados 50 ratos Wistar. É demonstrado que a técnica para captação do potencial evocado motor em ratos apresentada nesse

estudo é eficaz e facilmente reproduzível para a análise da evolução eletrofisiológica da lesão medular.

Santos et al. (2011) padronizam o modelo de lesão da medula espinal em ratos e a avaliação dos animais utilizada no mesmo laboratório usado para o presente estudo - Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP). Para a padronização, utilizam 20 ratos Wistar divididos em quatro grupos, diferenciando o nível de gravidade da lesão raquimedular; realizam lesões intermediárias padronizadas, através do sistema MASCIS: Grupo 1 - 12,5 mm (lesão leve); Grupo 2 - 25 mm (lesão moderada); Grupo 3 - 50 mm (lesão grave); Grupo 4 - animais que não sofrem lesão (grupo controle). Avaliam como desfecho a função motora, segundo escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), 48 horas após a lesão. Concluem que o modelo utilizado é reproduzível no laboratório em questão.

Fouad et al. (2011), em revisão de literatura, concluem que não há até o momento do estudo terapia efetiva no tratamento da lesão da medula espinal. Comentam sobre o enfoque em novas oportunidades de tratamento promissoras envolvendo a plasticidade neural.

2.2 Estudos mais recentes com animais maiores, estudos com camundongos e literatura atual

Borgens et al. (1990) estudam terapia com eletroestimulação intraperitoneal em 216 porquinhos da Índia submetidos à lesão da medula espinal. Os animais são todos submetidos à hemisseção transversa direita da medula espinal no nível torácico baixo. Posteriormente são implantados eletrodos intraperitonealmente e os animais são divididos em três grupos: um grupo controle (n=62), sem estimulação no eletrodo implantado; um grupo (n=67) com estimulação 1cm cranialmente ao nível da lesão e; um grupo (n=33) com estimulação 1cm caudalmente ao nível lesado. As estimulações foram entre 35 e 50 microA. Desfechos analisados foram a estimulação de reflexos para avaliação funcional. Nenhum animal do grupo controle ou do grupo que recebeu estimulação caudal à lesão recuperou os reflexos perdidos pela lesão da medula espinal. Nove animais do grupo que receberam estimulação cranial à lesão recuperaram o reflexo do M. Cutaneus trunci, deflagrado pela estimulação da pele dorsal do animal. Os autores sugerem que a recuperação desse reflexo pode ser devido à recuperação parcial de vias ascendentes do funículo lateral da medula espinal no sítio da lesão.

Blight (1991) descreve um modelo de lesão espinal em porquinhos da Índia. A lesão se faz por compressão lateral da medula espinal com uma pinça. O modelo foi testado em 12 cobaias adultas acompanhadas por até três meses e foi desenvolvido para causar lesão moderada, permitindo uma recuperação

funcional significativa dos animais. Os desfechos avaliados foram a análise histológica do centro da lesão e a avaliação funcional por estimulação de reflexos dos membros traseiros. Os achados histológicos foram muito semelhantes aos achados em outros modelos de lesão da medula espinal em gatos, segundo a interpretação do autor. Os resultados da avaliação funcional demonstraram correção significativa com o número de axônios poupados de lesão.

Kuhn e Wrathall (1998) defendem a utilização de camundongos para ensaios experimentais para lesão da medula espinal. Salientam a vantagem da possibilidade de utilizar animais transgênicos. Descrevem um modelo com camundongos C57BL6. A lesão da medula espinal é causada por queda de peso em medula exposta por laminectomia de T8. Testam os impactos produzidos por queda de objeto com alturas e massas diferentes (1 g x 2.5 cm, 2 g x 2.5 cm, 3 g x 2.5 cm, e 3 g x 5.0 cm). Registram a função motora dos animais utilizando uma modificação da escala de Tarlov e Klinger (1954) por 28 dias e após esse período avaliam os espécimes sacrificados pela histologia da lesão. Observam que todos os grupos apresentavam déficits motores após a lesão experimental e a área de tecido medular lesado é maior quanto maior o trauma transferido. Concluem que o modelo é reproduzível e pode ser utilizado, com intuito de experimentação, em animais geneticamente modificados.

Farooque (2000) descreve uma escala de avaliação funcional para camundongos - "MSF" (*Hindlimb Motor Function Scale*). Avalia camundongos submetidos à lesão da medula espinal por compressão extradural leve,

moderada e grave. A escala é dividida em 10 pontos sendo “0” sem nenhuma movimentação das patas traseiras e “5” movimentação quase normal. Os animais que receberam pontuação “5” foram então avaliados pela capacidade de deambular sobre uma barra com diferentes larguras, ganhando pontos adicionais até um máximo de 10 pontos na escala, conforme a largura da barra vai diminuindo (destreza do camundongo aumentando). Os autores observam correlação entre a gravidade da lesão experimental e os resultados da análise funcional pela escala MFS e da quantidade de lesão tecidual observada em análise histológica. Concluem que o modelo é reprodutível, que a força do impacto influencia o desfecho do dano neurológico e e que a escala de avaliação proposta é eficaz para a experimentação. Ainda no ano 2000, **Isaksson et al.** com participação de Farooque modificam a escala adicionando duas pontuações intermediárias.

Jakeman et al. (2000) descrevem a adaptação de um modelo de lesão da medula espinal com ratos para a experimentação em camundongos. A lesão medular é produzida por trauma contusional na medula espinal de camundongos exposta por laminectomia em T9. O trauma é realizado pelo impacto de uma haste movida por força eletromagnética em um aparelho com transdutores que permitem o registro e interpretação de força de impacto e deslocamento da haste. Diversas combinações de amplitude de deslocamento da haste e força de impacto são testadas para produzir diferentes graus de lesão. Uma lesão moderada é produzida por um deslocamento de 0,5mm por 25ms, resultando em paraplegia completa inicial e recuperação parcial gradual deixando um déficit motor crônico nas patas traseiras. O desfecho funcional

(avaliado pela escala de Tarlov e Klinger (1954)) no primeiro dia pós-lesão apresentou correlação com o pico de força de impacto, impulsos, potência e energia gerada no impacto. Para o 28º dia após a lesão, por sua vez, impulso e pico de deslocamento da haste foram os melhores preditores do desfecho funcional. Os autores comentam que as mensurações dos parâmetros citados se provaram altamente sensíveis. Concluem que a utilização desse modelo em camundongos traz vantagens por poder proporcionar estudo em animais geneticamente modificados e por registrar minuciosamente os parâmetros biomecânicos do trauma na medula espinal.

Joshi e Fehlings (2002) descrevem modelo de lesão da medula espinal em camundongos. Os animais são submetidos à laminectomia de T3 e T4 e têm a medula espinal lesada por compressão com um clipe vascular adaptado. Três diferentes tipos de clipe são utilizados, com molas que aplicam forças compressivas constantes de 3, 8 ou 24 gramas por um minuto e comparadas a um grupo submetido à passagem de dissector no espaço extradural após laminectomia - grupo "SHAM" (procedimento cirúrgico "placebo"). Todos os grupos têm 12 animais. Os resultados demonstram que todos os animais apresentaram melhora funcional na escala BBB com ápice da melhora no 14º dia após a lesão. A melhora funcional foi inversamente proporcional à magnitude da lesão e estatisticamente significativa. A área de tecido lesado também apresentou resultado estatisticamente significativo, porém diretamente proporcional à magnitude do trauma imposto pela compressão medular. Concluem que o modelo é válido para estudos sobre lesão da medula espinal em camundongos.

Seki et al. (2002) avaliam a os efeitos de diferentes magnitudes de lesão da medula espinal por impacto controlado. Formam três grupos de cinco camundongos C57BL/6 submetidos à laminectomia de T10 e lesão da medula espinal por impacto, todos com energia para produzir deformações de 0,25 mm da medula espinal. O grupo 1 é testado com velocidade do impacto de 1m/s, o grupo 2 de 2m/s e o grupo 3 de 3m/s. Os animais são avaliados funcionalmente por 28 dias e depois de eutanasiados é realizada uma avaliação histológica com mensuração da área lesionada. Os autores observam que a magnitude do impacto apresentou correlação com os desfechos avaliados. Quanto maior a magnitude do impacto, maior a área de tecido lesado e menor é a recuperação funcional dos espécimes testados. Os achados são altamente reprodutíveis. Concluem que o modelo apresentado é adequado para experimentação.

Seki et al. (2003) estudam camundongos transgênicos que expressam o gene bcl-2, um gene que previne apoptose de diversos tipos de células. Comparam os camundongos transgênicos (n=6) submetidos à lesão traumática experimental da medula espinal por contusão (nível T10) com camundongos selvagens (n=6) submetidos à mesma lesão. Observam que os camundongos transgênicos apresentam melhor recuperação motora e menor dano tecidual na análise histopatológica. Concluem que a expressão aumentada do gene bcl-2 pode ter espaço no tratamento da lesão da medula espinal. Esse trabalho é mais um exemplo de utilização de camundongos transgênicos na pesquisa da lesão da medula espinal.

Sroga et al. (2003) estudam a reação inflamatória na medula espinal de ratos e camundongos submetidos à lesão aguda por trauma contusional em nível T8-9. Comparativamente verificam que existem diferenças entre ratos e camundongos. Enquanto ratos reagem formando cavidades císticas na medula espinal lesada, em camundongos observaram a formação de um tecido conectivo denso. Em análise imuno-histoquímica observaram que a resposta da micróglia e de macrófagos era muito semelhante entre as duas espécies avaliadas. A resposta linfocítica e de células dendríticas, contudo, era francamente diferente. Em ratos, o influxo de linfócitos T é muito mais precoce (3-7 dias, contra 14 dias em camundongos). Em camundongos não há influxo de células dendríticas, ao contrário dos ratos. Há, porém, influxo de células semelhantes a fibrócitos, o que não ocorre nos ratos. Os autores concluem que as diferenças de inflamação do tecido neural contribuem para a cicatrização distinta entre ratos e camundongos.

Kesslak e Keirstead (2003), em artigo de revisão, salientam a importância da avaliação minuciosa do comportamento como desfecho mensurável na lesão da medula espinal em modelos animais. Reforçam que o uso e interpretação adequados desses métodos são críticos para o bom desenho do estudo experimental e para a extrapolação dos achados frente a sua possível relevância clínica.

Purdy et al. (2003) descrevem um modelo de lesão da medula espinal em cães. O modelo dispensa a realização da laminectomia para a lesão, valendo-se do uso de um método percutâneo para lesão. Nove cães sem raça

definida foram submetidos à lesão da medula espinal por compressão. A lesão é produzida inflando-se um balão de angioplastia introduzido no espaço subaracnóideo por acesso percutâneo por 30 minutos. Utilizam balões de 4mm e 7mm. Três animais são usados para desenvolvimento da técnica de passagem do balão. Quatro animais são submetidos à lesão com balões de 7mm e dois animais à lesão com balões de 4mm. Os desfechos analisados são imagens por ressonância magnética pré e pós-lesão e análise histopatológica das medulas lesadas. Observa-se que dos animais submetidos à lesão com balões de 7 mm, todos apresentavam hemorragia da medula espinal e três mostravam lesão axonal. Dos animais submetidos à lesão com balões de 4mm, um não apresentou qualquer tipo de lesão e o outro apresentou lesão axonal sem hemorragia. Os autores concluem que o modelo pode ser promissor dado que se verificou que a medula dos cães pode ser bem avaliada com ressonância magnética e que tamanhos diferentes de balões aparentemente causam lesões graduais na medula espinal. Saliendam, contudo, a necessidade de novos testes com balões de tamanho diferente e tempos de insuflação diferentes.

Norenberg et al. (2004) revisam a patologia da lesão da medula espinal em humanos. Discutem diferenças entre humanos e animais de experimentação. Sugerem que um melhor entendimento das respostas patológicas em humanos seria útil para a continuidade dos estudos experimentais sobre a patogênese e terapêutica da lesão da medula espinal.

Sheng et al. (2004) descrevem um modelo de lesão da medula espinal em camundongos sem a necessidade de laminectomia. Os autores realizam o estudo experimental em 4 grupos de cinco a oito camundongos C57Bl/6J submetidos à lesão da medula espinal. A lesão é feita através da passagem de um microtúbulo de silicone com 1,5mm diretamente no espaço epidural. A exposição do espaço é realizada pela excisão do ligamento interespinhoso entre T10 e T11. O tubo é deixado por diferentes períodos entre os grupos (1, 30, 60 ou 120 minutos) e retirados percutâneamente através de um fio de sutura guia deixado pela ferida. Avaliam a função motora através da escala BBB, o teste com "rotarod" e apreensão na tela de metal. Adicionalmente, avaliam a área de lesão da medula em análise histológica. Observam que a compressão na medula espinal causa piora funcional e aumento da área de tecido medular lesado proporcional à duração da compressão. Concluem que o modelo é factível e pode ser usado com vantagens da utilização de animais geneticamente modificados e sem o viés da instabilidade causada pela laminectomia.

Fukuda et al. (2005) descrevem um modelo de lesão medular em cães por compressão com uso de balões infláveis percutâneamente, sem necessidade de laminectomia. Estudam catorze cães submetidos à lesão da medula espinal. Os balões são introduzidos no espaço extradural pelo forâmen intervertebral e inflados no nível de L1. Os balões foram inflados por 10 minutos com 1,5 ml de solução salina em seis cães e com 1,0 ml da mesma solução em três cães. Os cinco cães restantes não foram submetidos a qualquer lesão e foram utilizados como controles. Os autores utilizam a escala

BBB (Basso, Beattie, and Bresnahan), outrora desenvolvida para uso em ratos, para a análise funcional dos animais em experimentação. Também utilizam um teste eletrofisiológico para confirmação dos achados e uma análise histopatológica das medulas espinais lesadas. Animais submetidos à lesão com insuflação no balão de 1,5ml desenvolveram paraplegia completa durante seis meses de seguimento (BBB = zero ou 1 e sem movimentação dos membros inferiores com a estimulação eletrofisiológica.) Já animais submetidos à lesão com insuflação de 1,0ml apresentaram paraplegia incompleta. Os autores concluem que no modelo utilizado a insuflação do balão com 1,5ml por 10 minutos causa paraplegia irreversível.

Ghasemlou et al. (2005) estudam modelo de lesão da medula espinal em 45 camundongos submetidos a contusão da medula espinal por diferentes pesos. Avaliam o desfecho funcional por uma escala de Tarlov e Klinger (1954) modificada. Fazem análise histológica utilizando coloração de hematoxilina-eosina. Constatam que o dano ao tecido neural está diretamente relacionado à força do golpe e ao deslocamento do tecido medular gerado pelo impacto. Sugerem também limites para esses dados de modo a padronizar os achados em diferentes aparelhos de lesão experimental por impacto.

Courtine et al. (2005) realizam estudo em seis primatas (*Macaca mulatta*) submetidos à lesão unilateral do trato corticoespinal, (TCS) em nível torácico. Os macacos estudados são previamente treinados a realizar marcha em esteira sobre os quatro membros. Os autores registram a cinemática da marcha dos macacos por completo com avaliação eletromiográfica antes e

após a lesão, em intervalos regulares, ao longo de 12 semanas. Durante o seguimento os autores observam que os macacos conseguiam realizar a marcha quadrúpede na esteira uma semana após a lesão experimental, porém inicialmente demonstravam alterações na fase de balanço da pata traseira ipsilateral à lesão e descoordenação entre os quatro membros. Também perdiam completamente a capacidade de pegar objetos com os dedos dos pés. Em evolução de doze semanas os animais apresentam melhora da coordenação dos quatro membros e adquirem a capacidade de compensar a marcha deficitária da pata traseira ipsilateral porém, ainda que demonstrem melhoras no controle dos dedos, não ganham a capacidade de apreensão de objetos com os dedos da pata afetada. Os autores concluem que primatas têm alta capacidade de acomodação locomotora da marcha, e em menor grau, movimentos finos dos dedos dos pés. Sugerem que a identificação precisa das vias neurais ativas no ganhos funcionais em primatas submetidos à lesão da medula espinal pode trazer informações para a o desenvolvimento de estratégias a fim de aumentar a recuperação funcional em déficits neurológicos motores.

Blight e Tuszynski (2006) discutem, em artigo de revisão, diversos aspectos a serem considerados para realização de ensaios clínicos em humanos, como ética, custos e riscos da terapia experimental. Salientam a importância da pesquisa translacional e a necessidade de evidência concreta de eficácia e segurança nas intervenções realizadas em estudos animais antes de serem reproduzidas em humanos.

Farooque et al. (2006) avaliam a influência do sexo na lesão da medula espinal em um modelo de lesão por compressão em nível torácico com camundongos C57Bl/6. Todos os animais foram divididos por sexo (masculino e feminino) e tinham idade semelhante. Após 14 dias da lesão experimental os camundongos eram avaliados funcionalmente e com análise histológica após sacrifício. Os autores observam que animais do sexo feminino apresentam escores significativamente melhores na escala BBB e menor lesão tecidual (hemorragia e inflamação) nos tecidos lesados. Concluem que o sexo influencia significativamente no desfecho da lesão da medula espinal. Sugerem que os efeitos neuroprotetores, que são desconhecidos, podem estar associados aos efeitos do estrógeno na fisiopatologia da lesão (fluxo sanguíneo, migração de células inflamatórias, mediadores de apoptose, cascatas antioxidantes).

Basso et al. (2006) desenvolvem uma escala de avaliação funcional para camundongos, a BMS (*Basso Mouse Scale*). A escala avalia coordenação motora, posição das patas e estabilidade do tronco. Testam a escala em camundongos de diferentes linhagens (C57BL/6, C57BL/10, B10.PL, BALB/c, e C57BL/6x129S6 F1) submetidos à lesão da medula espinal de diversos graus (leve, moderada e grave) por trauma contusional ou transsecção da medula em nível torácico médio. Comparam a confiabilidade da escala intra e entre avaliadores contra a escala BBB. Observam que a escala BMS apresenta menor variabilidade intra e entre observadores em comparação com a escala BBB e demonstra correlação correta entre a gravidade da lesão e a gravidade das avaliações da escala.

Li et al. (2006) descrevem um modelo de lesão da medula espinal em camundongos por compressão. Os animais são submetidos à laminectomia de T12 e um objeto é colocado sobre a medula exposta de 5 a 15 minutos. Os autores avaliam os animais pela escala BBB, por uma escala modificada mBBB específica para camundongos, pela *Basso Mouse Scale* (BMS) e por marcha no plano inclinado. Observam que o modelo é reprodutível e causa efetivamente lesão da medula espinal. A escala mBBB se mostra com menor variabilidade interobservadores e demonstra boa correlação com a quantidade de substância branca poupada de lesão em análise histológica.

Akhtar et al. (2008) analisam as discrepâncias entre achados promissores de terapias testadas em experimentos com animais e os resultados desencorajadores de ensaios clínicos análogos feitos em humanos. Discutem a capacidade de extrapolação de resultados entre experimentos com animais e terapias em humanos. Citam três barreiras principais: 1- diferenças intrínsecas no tipo de lesão da medula espinal analisada (lesão controlada em laboratório contra lesão não controlada em humanos); 2- dificuldades na interpretação dos resultados em animais (principalmente achados táteis, dolorosos e sensitivos); e 3- diferenças intrínsecas da fisiopatologia entre diferentes espécies. Sugerem que essas barreiras podem interferir significativamente na eficácia da predição de resultados em humanos extrapolados de modelos animais e acreditam que apenas parte dessas barreiras podem ser contornadas.

Kouyoumdjian et al. (2009) defendem o uso de camundongos para a pesquisa da lesão da medula espinal por permitir a transcrição de modelos de rato para animais isogênicos e transgênicos. Descrevem um modelo testado em 76 camundongos submetidos à lesão da medula espinal por compressão por um aparelho com uma superfície olivada. O aparelho é constituído por um fio maleável com uma oliva em uma das extremidades. O fio é passado pelo espaço extradural entre laminectomias feitas em dois níveis torácicos distintos (T8 e T11). Três tamanhos distintos de oliva são testados e os desfechos analisados são uma análise funcional pós-lesão e histológica dos camundongos após o sacrifício. Os autores concluem que o modelo é reprodutível, controlável, preditível e ainda permite análise radiológica por ressonância magnética dado que o aparelho é todo não magnetizável e remotamente controlado.

Marques et al. (2009) estudam modelo de lesão da medula espinal em camundongos por compressão com clipe vascular. Dividem os camundongos C57BL/6 em dois grupos. Um grupo com lesão medular (n=30) e um grupo controle apenas com laminectomia (n=15). Avaliam funcionalmente os animais com escalas BBB e BMS, semanalmente. Após a cirurgia, o grupo experimental demonstra paraplegia flácida e baixo score nas escalas funcionais, que melhorou gradualmente com o tempo. Também, quando sacrificados apresentam edema, hemorragia, cavilações, morte celular e desmielinização na fase aguda. Na fase crônica, apresentam cicatriz glial, morte neuronal e remielinização de axônios. O grupo controle não apresenta alteração funcional visível após a cirurgia e obteve constantemente os melhores scores das

escalas funcionais. Os autores concluem que o modelo é simples, barato e confiável e com boa reprodutibilidade dos desfechos analisados.

Hoschouer et al. (2010) estudam a resposta de estímulos dolorosos mecânicos e térmicos no comportamento de 71 camundongos C57BL/6 após lesão da medula espinal em T9. Testam diversos graus de lesão da medula espinal. Os animais são submetidos à laminectomia e posteriormente a traumas contusionais de energia crescente e/ou transsecção completa da medula espinal. A hipótese é de que os padrões de resposta avaliados dependem do grau de lesão tecidual da medula espinal. Na pata traseira, os autores observaram que a hiperresponsividade ao calor independe do grau de lesão, já em estímulos mecânicos, quanto maior a lesão da medula espinal, menor a sensibilidade do camundongo testado até o limite em que menos de 2% da substância branca é poupada de lesão (lesões muito graves), situação na qual o camundongo começa a apresentar aumento da sensibilidade. No tronco, estímulos mecânicos produzem respostas de sensibilidade normal em regiões craniais à área lesionada e sensibilidade diminuída em regiões no nível correspondente à lesão e em regiões caudais à lesão. Os autores concluem que os mecanismos de resposta dolorosa a estímulos mecânicos e térmicos são distintos.

Pitzer et al. (2010) discorrem sobre o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF ou Granulocyte-colony stimulating factor). O G-CSF atua como fator de crescimento neural e neuroprotetor in vitro e in vivo. Os autores estudam camundongos submetidos à lesão experimental da medula espinal

por hemitranssecção em nível T8-9. Camundongos selvagens são tratados com o G-CSF e comparados com camundongos transgênicos que superexpressam G-CSF no sistema nervoso central. Há um grupo controle submetido apenas a laminectomia. Os autores observam que o receptor de G-CSF sofre *upregulation* após a lesão da medula espinal e que o G-CSF diminui significativamente a apoptose celular no modelo experimental. Adicionalmente, verificaram uma melhora funcional nos dois grupos experimentais avaliados pela escala BBB. Concluem que o G-CSF é eficaz no controle contra a apoptose celular na lesão da medula espinal e representa uma possibilidade terapêutica promissora e viável.

Kim et al. (2010) estudam 5 grupos (N=8 por grupo) de camundongos C57BL/6 fêmeas; quatro grupos submetidos à lesão da medula espinal por contusão e um grupo "SHAM" apenas submetido à laminectomia, todos no nível T9. Realizam ressonância magnética nos animais após 3 horas da lesão. Avaliam por 14 dias a função motora dos camundongos pela escala BMS e os achados histológicos da medula espinal lesada após esse período. Os autores observam que a técnica radiológica utilizada apresenta correlação muito forte ($r=0,95$) com os achados histológicos e com o grau de recuperação motora dos camundongos no modelo, com aumento das chances de até 18% para cada 1% de área medular (substância branca ventrolateral) poupada na janela utilizada. Concluem que, apesar da transcrição do modelo para seres humanos não estar ainda definida, a capacidade de diagnóstico subclínico não invasivo na lesão da medula espinal pode aumentar o horizonte de entendimento fisiopatológico e terapêutico da lesão.

Marques et al. (2010) testam a utilização de células-tronco pré-diferenciadas para o tratamento da lesão da medula espinal. Formam quatro grupos experimentais de camundongos (n=17, cada), todos são submetidos à lesão medular por compressão com clipe vascular durante um minuto, no nível T9 previamente submetido à laminectomia. Um grupo controle (1) foi submetido apenas à lesão medular, outro grupo foi tratado com o veículo de aplicação das células-tronco (2), outro grupo foi tratado com células-tronco previamente diferenciadas com ácido retinóico (3) e o último grupo "SHAM" (0) foi submetido apenas à laminectomia, sem lesão medular. Os autores utilizam 8×10^5 células/2 microlitros) no epicentro da lesão, 10 minutos após a lesão experimental. Avaliam os animais pelas escalas de função motora *Basso Mouse Scale* (BMS) e *Global motility test* (GMT) semanalmente, por 8 semanas. Observam, pelas duas escalas utilizadas, um desfecho funcional melhor dos camundongos do grupo 3 quando comparados aos grupos 1 e 2, porém pior avaliação motora quando comparados ao Grupo "SHAM". Em análise imuno-histoquímica, as células-tronco se diferenciam em astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann, indicando integração com o tecido hospedeiro. No grupo 3, observa-se maior preservação de tecido neural e mielinização celular quando comparados com os grupos 1 e 2. Os autores concluem que no modelo estudado o transplante de células-tronco diferenciadas aumentou a preservação da substância branca e do número de fibras nervosas viáveis, promovendo melhora da função motora.

Zurita et al. (2012) descrevem um modelo de experimentação animal em 20 porcos submetidos a lesão da medula espinal com clipe vascular e

avaliados por uma modificação da escala de Tarlov e Klinger (1954). Avaliam todos os aspectos a serem considerados: alimentação, moradia, reabilitação, complicações e custos para a manutenção de porcos adultos submetidos à lesão traumática da medula espinal acompanhados por um ano. Salientam que os cuidados com os porcos paraplégicos são muito semelhantes aos oferecidos a pacientes com a mesma condição e que a manutenção de tais cuidados é primordial para diminuir a mortalidade dos animais. Consideram que apesar dos custos altos, o modelo é factível e útil para testar novas modalidades de tratamento de lesão da medula espinal em paraplégicos.

Nout et al. (2012) descrevem e avaliam um modelo de lesão da medula espinal em primatas por hemissecção da medula no nível C7 e avaliação comportamental, eletrofisiológica e anatômica subsequente. Discutem diferenças neuroanatômicas e funcionais entre primatas e roedores. Defendem a utilização de modelos em primatas como intermediária entre experimentos em roedores e ensaios clínicos em humanos. Advertem, porém, quanto às dificuldades do modelo com relação a cuidados com os animais e custos. Acreditam que o modelo pode trazer maior capacidade de predição e extrapolação de achados em experimentos animais para humanos e proporcionar descobertas básicas que podem não ser identificadas em roedores dadas as diferenças entre modelos e espécies. Sugerem a utilização de primatas para experimentação em terapias promissoras ou com alto grau de credibilidade conferidas por experimentos prévios em roedores.

Sato et al. (2012), em estudo com 40 camundongos transgênicos, comparam dois grupos de camundongos submetidos à lesão da medula espinal por transeção da medula em nível T9 e T10. Os grupos comparados são de camundongos selvagens contra camundongos sem expressão de Interleucina-1 (“Knock-Out”). Os autores acompanham os camundongos por 14 dias. Observam que os camundongos transgênicos demonstram ganho funcional significativo após a lesão quando comparados aos camundongos selvagens. Concluem que a supressão da interleucina-1 traz a redução da resposta inflamatória da lesão da medula espinal.

Kubota et al. (2012) em outro exemplo de utilização de camundongos transgênicos, estudam a influência da mieloperoxidase na lesão da medula espinal. Descrevem que a mieloperoxidase gera um agente oxidativo neurotóxico importante, o ácido hipocloroso. Comparam dois grupos de camundongos submetidos à lesão da medula espinal por contusão em nível T9. Os grupos testados são de camundongos selvagens contra camundongos sem a expressão de mieloperoxidase (“Knock-Out”). Os autores calculam a produção de ácido hipocloroso no sítio da lesão, avaliam o dano tecidual por imuno-histoquímica e a função motora por escala de locomoção em campo aberto (“open field locomotor score”). Observam que o grupo de camundongos selvagens apresenta produção significativamente mais alta de ácido hipocloroso no sítio da lesão, uma maior área de lesão tecidual e piores resultados na escala funcional motora em comparação ao grupo transgênico. Concluem que a mieloperoxidase exacerba o dano secundário a medula espinal após lesão, mediada pela produção de ácido hipocloroso.

Lee et al. (2013) propõem um modelo animal novo com a utilização de “porcos Yucatan” (20-25kg) como um intermediário entre a experimentação de terapias em roedores e ensaios clínicos em humanos. Os 12 animais são submetidos à lesão da medula espinal em nível torácico por queda de peso com diferentes alturas e avaliados funcionalmente durante 12 semanas por uma escala recentemente desenvolvida “PTIBS” (Porcine Thoracic Injury Behavior Scale). Os autores salientam uma boa acurácia inter e intraobservador na utilização da escala “PTIBS”. Observam, em análise histológica, que animais submetidos às lesões mais graves apresentavam maiores danos à substância branca e cinzenta da medula espinal e que existe correlação forte entre os achados histológicos e os resultados da análise funcional com a escala “PTIBS”. Sugerem que a utilização de um modelo com animais maiores pode ser útil como intermediário para a experimentação de terapias antes da realização de ensaios clínicos demorados e custosos.

Kuypers et al. (2013) citam a importância da transcrição de modelos em ratos para camundongos, dado ao potencial de experimentação genética. Descrevem a utilização do brometo de etídio como agente desmielinizante da medula espinal em modelo com camundongos transcrito de um modelo semelhante em ratos. Estudam o desfecho funcional motor, a reação inflamatória, estado de mielinização dos axônios e dano à substância branca ventral em 116 camundongos C57Bl/6 submetidos à injeção bilateral de solução salina ou brometo de etídio (0,2 mg/mL) na medula espinal. Observam que o grupo experimental apresenta redução significativa dos escores funcionais medidos pela escala BMS e aumento significativo de lesão permanente à parte ventral

da substância branca da medula espinal, ambos achados persistindo por até dois meses após a lesão. A paraplegia é acompanhada por reação inflamatória persistente e morte axonal. Os achados diferem dos encontrados em ratos, cuja reação inflamatória geralmente se resolve em até quatro semanas e a morte axonal é baixa após a lesão por brometo de etídio. Os autores ainda testam se o treino de marcha em roda de treino traria melhoras na recuperação funcional, porém não encontram evidência que suporte essa terapia. Concluem que a lesão por brometo de etídio traz uma lesão não remielinizante da medula espinal e que o estudo demonstra a importância dos tratos descendentes motores ventrais da medula na função motora do camundongo.

Tysseling et al. (2013) descrevem o padrão de registro eletromiográfico em camundongos normais e camundongos submetidos à lesão da medula espinal em nível T13 por clipe vascular. Antes da lesão da medula espinal os camundongos são submetidos a procedimento cirúrgico para a implantação de um transdutor com eletrodos subcutâneos que fazem os registros eletromiográficos. O transdutor fica implantado por um período longo e pode ser ligado e desligado ao monitor, de forma que os camundongos passam semanas com os implantes e podem ser submetidos a diversos registros. As avaliações são feitas em teste dinâmico. Os animais são colocados para se locomover na roda de exercícios, tanto antes como após a lesão da medula espinal. Salientam a importância do uso de modelos com camundongos pela possibilidade de aproveitar a variabilidade genética dos animais e sugerem a importância do estudo eletromiográfico na avaliação funcional dos camundongos.

Zhang et al. (2014) revisam os diferentes modelos experimentais de lesão da medula espinal em animais, suas vantagens, desvantagens e custos. Relatam que os modelos em ratos ainda são os mais utilizados. Salientam que dada a falta de terapias efetivas para o tratamento da lesão da medula espinal a experimentação animal ainda se faz necessária e a padronização do modelo animal ideal é importante para o estudo adequado de terapias para essa patologia.

Jin et al. (2015) estudam um modelo de concussão da medula espinal por lesão em nível cervical. Justificam o novo modelo de estudo para uso em lesões esportivas que produzem lesões cervicais semelhantes como futebol americano e hockey. Os animais são ratos Sprague-Dawley submetidos à lesão da medula espinal no nível C5. Os grupos foram submetidos à lesão parcial por queda de peso de 50 kilodyne e observados até recuperação completa em três semanas após a lesão primária (21 pontos na escala Basso-Beattie-Bresnahan) e então divididos em dois grupos. Um grupo (n=10) era submetido a uma segunda lesão de mesma magnitude e o outro não (n=9). Os desfechos analisados foram a avaliação funcional pela escala BBB (Basso-Beattie-Bresnahan), o teste de marcha CatWalk, a avaliação sensitiva por microfilamentos de VonFrey e a análise histológica. Os autores demonstram diferenças entre os grupos e concluem que o modelo é válido e pode ser usado para o estudo da concussão medular.

Moonen et al. (2016) descrevem um modelo de lesão da medula espinal em ratos em nível lombar (L1-2). A lesão foi produzida por cliques vasculares de

diferentes forças. Os autores demarcam o nível da lesão utilizando tomografia computadorizada para marcar o nível T11-12. A lesão posteriormente é avaliada utilizando ressonância magnética, histologia, escala de avaliação funcional e potencial evocado. Os autores concluem que o modelo é válido e reprodutível.

Zhang et al. (2016) comparam o desfecho funcional de 84 ratos Sprague-Dawley submetidos à lesão da medula espinal por queda de peso em nível T9 pela escala Basso-Beattie-Bresnahan (BBB). Os grupos submetidos à lesão medular foram posteriormente submetidos à descompressão epidural (via laminectomia - grupo C) e descompressão intratecal (via laminectomia e durotomia longitudinal - grupo D); e foram comparados ao grupo S (submetidos a laminectomia sem lesão medular - SHAM). Os autores observam que o grupo de durotomia apresenta resultados superiores aos demais grupos na análise histológica (maior quantidade de substância branca poupada e menor quantidade de vacuolização). A mortalidade no grupo submetido à durotomia foi maior que do grupo submetido à laminectomia isolada (13,9% contra 5,5%), porém não estatisticamente significativa ($p=0,214$). Os autores concluem que a durotomia é benéfica para a recuperação neurológica pós-lesão da medula espinal.

Forgione et al. (2017) defendem que o desenvolvimento de modelos de experimentação animal em lesão da medula espinal auxilia no entendimento básico de mecanismos fisiopatológicos e na avaliação de terapias antes dos estudos clínicos. Descrevem um modelo de lesão da medula espinal cervical

(nível C6-7) em camundongos utilizando um clipe vascular tentando mimetizar a lesão por contusão e compressão que ocorrem em humanos. Um grupo experimental de 11 animais foi controlado por um grupo SHAM de 5 animais (submetidos apenas à laminectomia) e os desfechos foram a avaliação funcional pela "Basso Mouse Scale" (BMS) e pelo teste de marcha CatWalk. Os autores observam uma recuperação significativa entre 7 a 14 dias pós-lesão das funções motoras perdidas, contudo não há recuperação completa. O teste de marcha de CatWalk demonstrou que a coordenação de marcha e propriocepção perdidas têm recuperação mínima. Também foi realizada análise histológica que demonstrou que o epicentro da lesão se formou em sete dias. Por fim, em testes de PCR demonstram que os genes ligados à inflamação e à formação da cicatriz glial sofrem *upregulation* após a lesão. Os autores concluem que o estudo demonstra um modelo viável de lesão da medula espinal cervical em camundongos.

Sharif-Alhoseini et al. (2017) em revisão sistemática de 2209 artigos publicados entre 1946 e janeiro de 2016 encontram que 43,4% dos experimentos com animais são com modelos contusionais. Ratos foram utilizados em 72,4% dos modelos e camundongos em 16%. A maioria dos estudos utiliza avaliação histológica (63,2%) e a coloração hematoxilina-eosina foi utilizada em 46,9% dos protocolos. A avaliação comportamental como desfecho foi utilizada em 62,6% dos 2209 estudos, sendo que dentro dessa parcela 89,2% realizaram testes de função motora e apenas 16,3% fizeram testes sensitivos. Os achados condizem com a filosofia de nosso laboratório a apontam que aparentemente estamos no caminho correto.

3 Métodos

3.1 Ética e medidas de proteção e suspensão da pesquisa

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP (protocolo 1178, **Anexo A**) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – HC-FMUSP), por meio da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo 012/16, **Anexo B**).

Os pesquisadores deste estudo seguiram de forma estrita a ética segundo os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).”

Os animais deste estudo foram provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Todos os animais foram acondicionados em ambiente sob controle sanitário rígido para minimizar a prevalência de doenças. Toda manipulação dos animais foi realizada por técnico experiente, devidamente treinado, integrante do Laboratório de Lesão Medular do IOTHCFMUSP.

Foi previamente determinado que qualquer experimentação fosse encerrada em animais acometidos por processo infeccioso, reação imunológica, autofagia ou outro sofrimento qualquer.

3.2 Dos animais e critérios de inclusão e exclusão

Foram utilizados 30 camundongos Balb C com idade média entre 7 e 9 semanas, machos, pesando em torno de 20 a 40 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram previamente avaliados quanto às condições gerais (pelagem e estado clínico normais) e quanto à motricidade (motricidade normal), para inclusão no estudo.

Foram excluídos os casos de:

- Óbito após lesão medular experimental;
- Autofagia ou mutilação entre os animais;
- Movimentação normal na primeira avaliação após lesão (pontuação máxima em qualquer escala de avaliação funcional), salvo o grupo "SHAM".

Todas as complicações foram registradas para análise estatística. O número de animais para o estudo embasou-se em literatura com camundongos

previamente publicada (Sheng et al., 2004; Marques et al., 2009; Kim et al., 2010).

3.3 Da acomodação e manejo dos animais

Utilizamos uma gaiola (300x198x133 mm) para cada três camundongos de uma mesma ninhada. O acondicionamento das gaiolas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (IOTHCFMUSP) foi feita com boas condições de higiene, climatização do ambiente e alimentação e hidratação adequadas para os camundongos.

Antes do experimento, os camundongos utilizados foram acomodados no laboratório e por alguns dias foram manuseados frequentemente pelos experimentadores, de forma a acostumá-los ao manejo e estimulá-los a movimentarem-se, facilitando a avaliação dos desfechos de capacidade motora após a lesão.

Todos os animais foram pesados antes e após o experimento para registrar quaisquer variações negativas de massa corporal, de forma a demonstrar os bons cuidados com os animais.

3.4 Dos grupos experimentais, randomização e cegamento

Cinco grupos foram formados com 06 animais cada:

Grupo 1: grupo controle ("SHAM") - submetido apenas à laminectomia;

Grupo 2: contusão medular por queda de peso (10g) de 6,25 mm de altura;

Grupo 3: contusão medular por queda de peso (10g) de 12,5 mm de altura;

Grupo 4: contusão medular por queda de peso (10g) de 25 mm de altura;

Grupo 5: contusão medular por queda de peso (10g) de 50 mm de altura.

Para evitar viés de seleção, os animais foram aleatoriamente distribuídos em gaiolas enumeradas por um técnico de laboratório cego ao estudo, apenas orientado a distribuir trinta camundongos nas gaiolas oferecidas. A demarcação das gaiolas foi coberta por cartolina de modo a cegar o técnico de laboratório que distribuiu os animais, garantindo a randomização. Essa técnica também garantiu o cegamento do pesquisador que realizou as análises dos desfechos avaliados.

3.5 Do modelo experimental de lesão medular

Todos os procedimentos foram realizados no LETRAN do IOTHCFMUSP. Os animais foram mantidos no biotério do IOTHCFMUSP.

3.5.1 Protocolo de anestesia (Gargiulo et al., 2012)

Para todos os procedimentos experimentais, os animais foram submetidos à medicação pré-anestésica utilizando a associação de Diazepam na dose de 0,5mg/Kg, Atropina na dose de 0,04mg/Kg e Clorpromazina na dose de 25 a 40mg/Kg por via intraperitoneal e acepromazina na dose de 0,25 mg/100 gramas por via intramuscular.

Para o procedimento anestésico utilizamos por via intraperitoneal uma associação de Ketamina na dose de 90mg/Kg com Xilazina na dose de 5mg/Kg.

3.5.2 Procedimento cirúrgico

Para iniciar o ato cirúrgico confirmamos o plano anestésico por pinçamento digital da pata traseira. Realizamos tricotomia na região dorsal, antissepsia com clorexidine e incisão longitudinal na topografia de T7 a T11. Os planos musculares foram cautelosamente dissecados até a exposição do aspecto posterior da coluna dorso-lombar. Finalmente, procedemos com laminectomia de T9 e exposição medular. O nível correto é encontrado a partir da contagem cranial a partir da última costela (T13). Todas as etapas dos procedimentos foram realizadas com auxílio de microscópio para a visualização

precisa da anatomia, diminuindo assim a chance de erros e danos iatrogênicos.

As etapas dos procedimento cirúrgico estão resumidas na **Figura 1**.

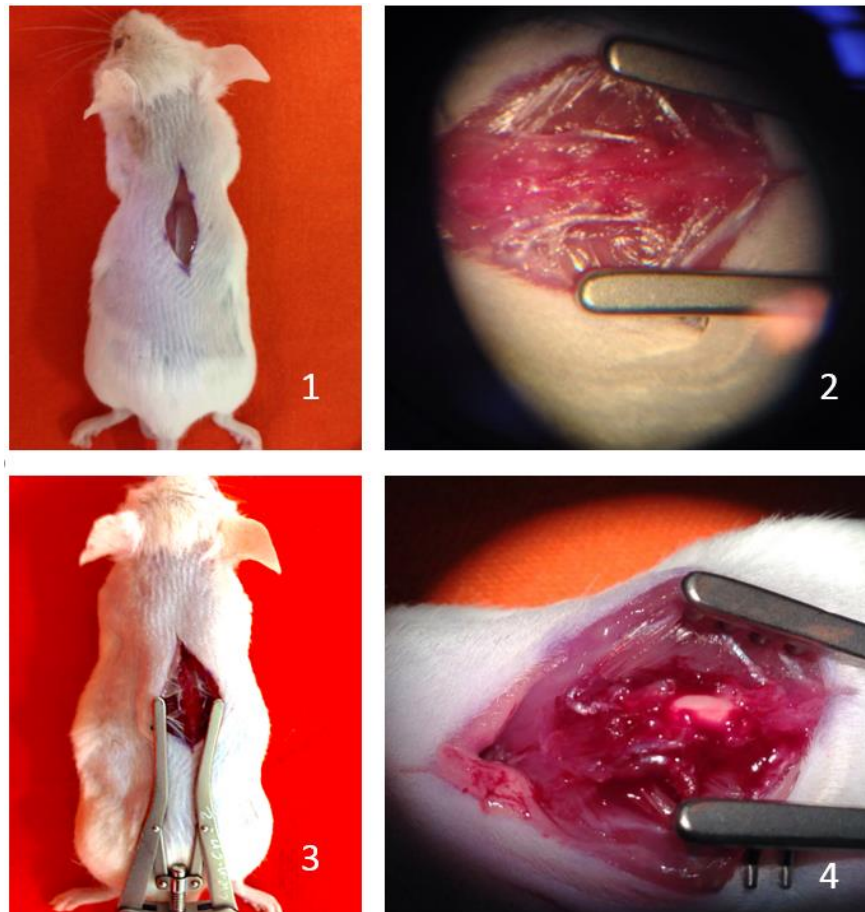


Figura 1 - Sequência de eventos do procedimento cirúrgico: 1-Tricotomia e incisão dorsal. 2- Dissecção dos planos musculares. 3- Exposição da coluna vertebral. 4- Laminectomia e exposição da medula es-pinal

3.5.3 Contusão medular

Obedecemos o protocolo internacional MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) - (Basso et al., 1996); as lesões foram produzidas pelo sistema *NYU Impactor* (Rodrigues,1999; Santos et al., 2011).

Para a lesão experimental da medula espinal, o camundongo foi posicionado de forma que a medula espinal exposta estivesse alinhada com a haste do aparelho de impacção (*NYU Impactor* para camundongos). A haste tem 10 gramas. O posicionamento inclui a fixação dos processos espinhosos adjacentes ao nível da laminectomia com pinças para diminuir a variabilidade da complacência da coluna durante o impacto. Essa cautela impede que a complacência dos tecidos crie um viés na padronização da lesão (Noble e Wrathall, 1987).

Uma vez alinhada à medula espinal com a haste, foi ligado ao plano muscular do camundongo um clipe vascular ligado a um eletrodo do aparelho. Posteriormente a haste é posicionada delicadamente o mais próximo a medula espinal até tocá-la, porém sem produzir golpe. Ao tocar a medula com a haste, o eletrodo fecha um circuito e emite um sinal sonoro. Dessa forma o examinador determina o nível zero da medula espinal, permitindo que a distância de queda da haste seja medida de forma uniforme em camundongos de diferentes tamanhos.

A haste foi posicionada nas alturas predeterminadas conforme os grupos experimentais e assim que se confirmou o bom posicionamento de todo o sistema, a haste foi liberada em queda livre para que produzisse o choque contra a medula espinal. Após a lesão, irrigamos a ferida cirúrgica com soro fisiológico à temperatura ambiente, seguindo-se à inspeção, hemostasia, aproximação dos tecidos e sutura da pele. O posicionamento para a contusão medular é demonstrado na **Figura 2**.

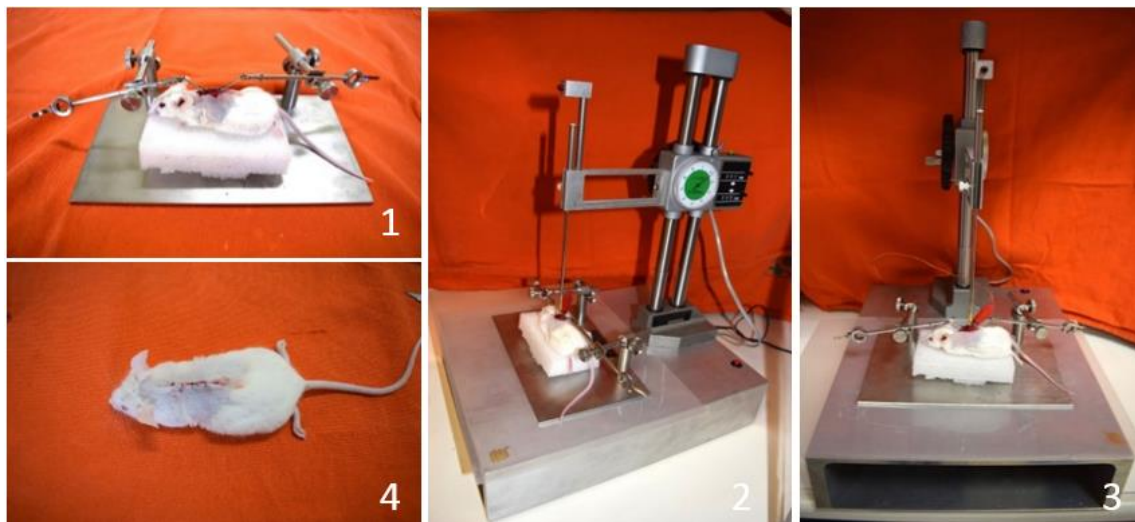


Figura 2 - Série de imagens da contusão medular. 1- Camundongo posicionado para a contusão da medula espinal, com as vértebras adjacentes fixadas por meios de pinças travadas nos processos espinhosos. 2 e 3 - Camundongo posicionado no NYU Impactor para contusão da medula espinal. 4- Camundongo pós lesão da medula espinal após fechamento da ferida operatória

3.5.4 Pós-operatório

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos nas suas respectivas gaiolas com ração e água *ad libitum*. Dado a possibilidade de bexiga neurogênica, realizamos diariamente massagem para esvaziamento vesical. Observamos todos os dias a ocorrência de possíveis complicações como infecção urinária, mutilação entre os camundongos e infecção da ferida operatória.

3.5.5 Analgesia

Nos cinco dias subsequentes à cirurgia, administramos aos camundongos buprenorfina na dose de 0,01 a 0,05mg/Kg por via subcutânea.

3.5.6 Antibiticoprofilaxia

Durante sete dias após o ato cirúrgico, administramos Amoxicilina 15 mg/100 gramas a cada 12 horas por via intraperitoneal.

3.5.7 Protocolo de eutanásia (CONCEA, 2015)

Todos os animais foram sacrificados no 42º dia de experimento por protocolo de eutanásia seguindo rigorosamente a ética em experimentação animal. O protocolo utilizado foi publicado em “Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA” em 2015 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015). O método utilizado foi a exsanguinação dos camundongos por perfuração cardíaca via toracotomia. Para tal os camundongos encontram-se inconscientes sob anestesia. Durante a exsanguinação, o ventrículo esquerdo é irrigado com soro fisiológico bombeado por bomba de infusão contínua controlada a 1ml/s, de modo a garantir a lavagem da medula espinal. Esse método melhora a qualidade dos cortes histológicos a serem estudados (Scouten et al., 2006). A Figura 3 mostra a irrigação do ventrículo esquerdo na eutanásia.

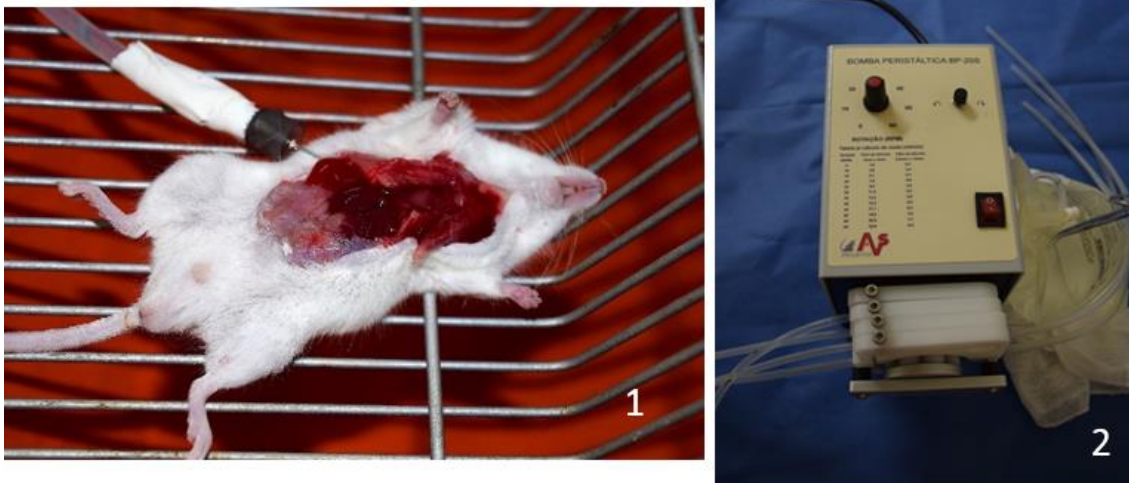


Figura 3 - Imagens da eutanásia. 1 - Perfuração cardíaca para exsanguinação sob anestesia e irrigação do ventrículo esquerdo com soro fisiológico. 2 - Bomba de infusão contínua

3.5.8 Necropsia e avaliação macroscópica

Após a eutanásia, todos os animais foram submetidos a exame necroscópico dos camundongos para identificar possíveis alterações em relação ao padrão normal.

Na inspeção inicial, observamos externamente a presença de possíveis lesões associadas à autofagia ou mutilação.

Em seguida, ressecamos a coluna vertebral através de uma via de acesso dorsal extensa (**Figura 4**). A coluna vertebral foi seccionada nos níveis T6 e T12 e retirada em bloco. Posteriormente, realizamos a exposição da medula espinal pela ressecção das estruturas ósseas e partes moles com uma pinça goiva em miniatura (material cirúrgico de exérese). As medulas ressecadas foram acondicionadas em frascos devidamente identificados e com solução de formaldeído (10%). Posteriormente, os frascos foram encaminhados para o Serviço de Anatomia Patológica do IOTHCFMUSP.

Na face ventral, na qual já fora realizada toracotomia para a eutanásia, ampliamos a exposição das vísceras com laparotomia. Inspeccionamos os pulmões para a identificação de empiema ou condensação, alterações sugestivas de sepse. No abdômen, inspeccionamos a bexiga para a identificação de bexiga neurogênica flácida (com aumento importante do volume da mesma) ou de alterações sugestivas de infecção (hiperemia e

hematúria). A presença de achados patológicos exclui o camundongo do estudo.

Todos os achados foram registrados para a descrição de complicações associadas ao estudo. Na **Figura 4**, observamos a ressecção da peça para histologia.

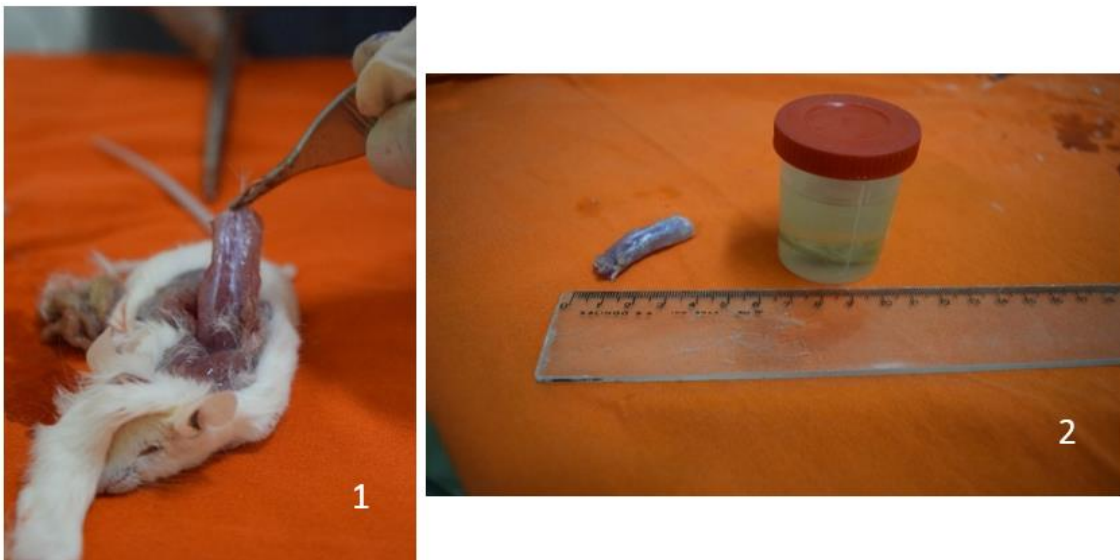


Figura 4 - Ressecção da coluna vertebral. 1 - Exérese da peça histológica (coluna vertebral). 2 - Peça histológica ressecada, recipiente para acondicionamento do material e escala de tamanho

3.5.9 Descarte das carcaças

Após a eutanásia e exame necroscópico, os camundongos foram acondicionados em sacos plásticos brancos, devidamente identificados e encaminhados para o descarte seguindo a apostila de descarte de carcaças da FMUSP.

3.6 Dos desfechos analisados

3.6.1 Desfechos primários: avaliação motora funcional

3.6.1.1 Escalas de motricidade

Para a avaliação motora, observamos os camundongos submetidos à lesão experimental em uma superfície plana em campo aberto de 52 x 87 x 66 cm de modo a analisar a livre deambulação dos animais (**Figura 5**). A movimentação dos animais experimentais foi observada por um pesquisador cego ao estudo previamente treinado e classificada segundo escalas já previamente validadas em literatura nos dias 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o após a lesão. Três escalas foram aplicadas neste estudo:

1-) **A escala BBB** (*Basso, Beattie e Bresnahan - Basso et al., 1995; Barros Filho et al., 2008*) apresenta pontuação que varia de 0 a 21, sendo que zero corresponde à ausência total de movimentos dos membros posteriores e 21 é a pontuação dada ao animal sem anormalidades de locomoção. Apesar de ter sido desenvolvida para ratos, a escala foi amplamente utilizada na literatura para a avaliação de camundongos (**Basso et al., 2006; Li et al., 2006**). Para a avaliação, o examinador observa diversos segmentos corporais, incluindo tronco, abdômen, cauda e membros posteriores. A escala leva em consideração os movimentos das articulações dos membros posteriores (quadril, joelho e tornozelo), a estabilidade do tronco, a disposição da musculatura do abdômen, a coordenação entre membros anteriores e posteriores, a posição da cauda, o tipo e frequência da passada com patas traseiras e a presença de rotação ou desvio dos membros posteriores. Cada membro posterior é avaliado separadamente e o resultado da escala é a média de achados entre um membro posterior e outro (**Anexo C**).

2-) **A escala BMS** (*Basso Mouse Scale - Basso et al., 2006*) é uma modificação da escala BBB específica para utilização em camundongos. Os autores do método descreveram a escala comparando-a com sua escala BBB. Observaram que a escala BMS tem mais confiabilidade interobservador e intraobservador que a escala BBB quando utilizada em camundongos. A escala apresenta pontuação de 0 a 9, sendo zero a pior performance motora e 9 a melhor performance motora. A escala leva em consideração a movimentação das articulações dos membros posteriores e seu posicionamento, a estabilidade do tronco, a coordenação entre os membros anteriores e

posteriores e o posicionamento da cauda. À semelhança da escala BBB, na escala BMS cada membro posterior é avaliado separadamente e o resultado da escala é a média de achados entre um membro posterior e outro. **(Anexo D)**

3-) **A escala MFS** (*Mouse Function Scale* - **Farooque, 2000; Isaksson et al., 2000**) é uma outra variação de escala motora para avaliação funcional específica para camundongos. A escala MFS leva em consideração a presença de movimentação dos membros inferiores e a característica da movimentação, além de analisar a capacidade do camundongo de deambular sobre superfícies de diferentes larguras. Se apresentar deambulação normal, o camundongo é colocado sobre barras de diferentes larguras sobre as quais este deve se equilibrar, deambulando sem cair (quanto menor a largura da barra, maior a destreza do camundongo e conseqüentemente melhor a avaliação funcional motora do camundongo). A escala MFS tem pontuação de 0 a 13, sendo zero a ausência completa de movimentação dos membros posteriores e 13 a movimentação normal dos mesmos. **(Anexo E)**

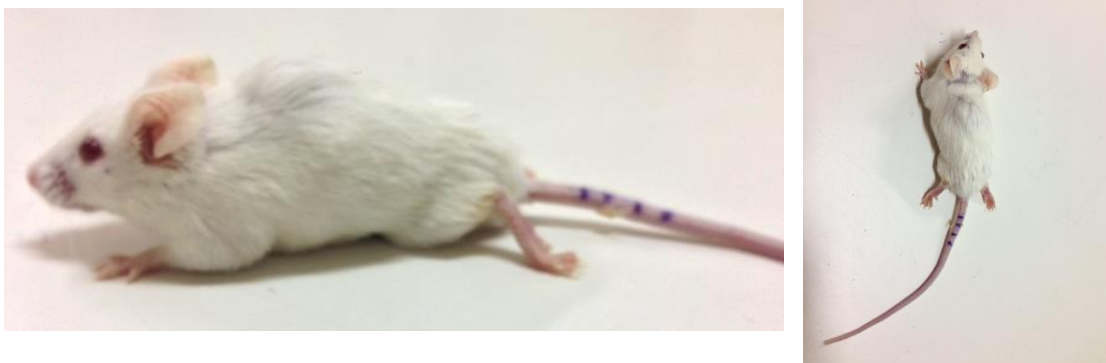


Figura 5 - Diferentes ângulos de observação de camundongo paraplégico em campo aberto para avaliação das escalas motoras

3.6.1.2 Avaliação de movimentação na Escada Horizontal (Cummings et al, 2007)

O método de avaliação funcional por meio da Escada Horizontal consiste na observação da movimentação do animal experimental em um plano horizontal formado por filetes de ferro de 0,4 cm de diâmetro dispostos a uma distância de 1,5 cm (**Figura 6**). A plataforma apresenta 100 cm de comprimento, 35 cm de largura e é suspensa a 46 cm. Os animais foram previamente treinados a caminhar pela plataforma sendo que necessariamente devem apoiar-se nos filetes de ferro para não cair. O teste tem por intuito analisar a função proprioceptiva dos animais. Para o treino pré-experimental, os camundongos foram estimulados a cruzar a plataforma para alcançar água com açúcar disposta no lado oposto ao lado em que o camundongo inicia a marcha. O mesmo estímulo foi mantido no teste pós-lesão da medula espinal.

Os desfecho analisado foi o número de acertos (passada com boa apreensão da pata traseira do camundongo ao filete de ferro). Os camundongos percorreram a Escada Horizontal três vezes e a média de acertos foi calculada para a análise estatística final.

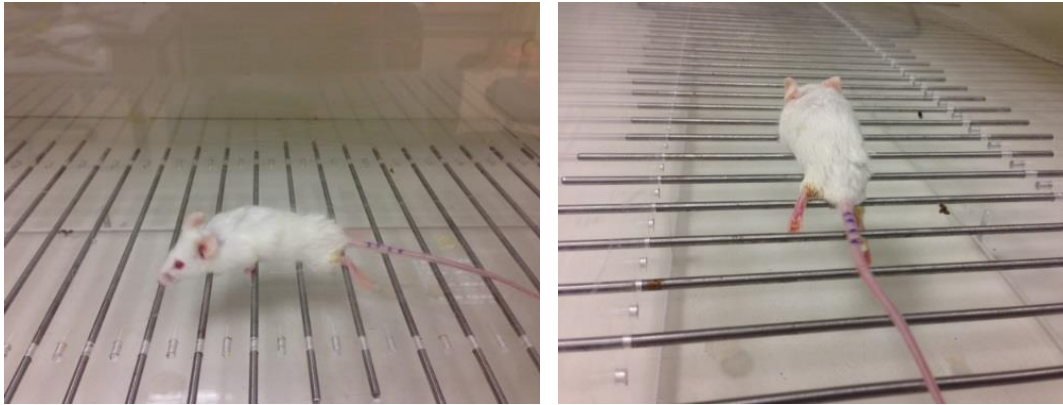


Figura 6 - Diferentes ângulos de observação de camundongo paraplégico na Escada Horizontal

3.6.2 Desfechos secundários: avaliação da lesão medular

3.6.2.1 Avaliação histológica

A avaliação pelos patologistas foi feita de forma cega, os patologistas não foram informados a que grupo pertencia cada espécime estudado.

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

Foram feitos cortes histológicos no plano sagital no segmento medular lesado com intervalos de dois milímetros, representando toda a área lesada, numa extensão de um centímetro proximal e distal a partir do centro da lesão. Toda extensão anteroposterior da medula foi incluída nos cortes. O material foi

processado e desidratado em banho de álcool, depois foi submetido a processo de diafanização com xilol e posteriormente incluído em parafina.

Os blocos parafinados foram encaminhados para o processo de microtomia (cortes histológicos). Seccionamos os blocos em cortes de cinco micra de espessura. Utilizamos um micrótomo elétrico (Leica RM 2055) e lâminas descartáveis (Erviagas). Todos os cortes foram fixados em lâminas de vidro banhadas em silano e corados pela técnica de hematoxilina-eosina. O silano aumenta a aderência entre as superfícies de vidro. Assim, foram preparados dois cortes para cada medula, em regiões imediatamente adjacentes à lesão.

Foram avaliados nos cortes histológicos a presença de hiperemia (neovascularização), degeneração da substância nervosa (degeneração cística) e infiltrado celular inflamatório. Graduamos os achados em quatro tipos: 0-ausente; 1-discreto (quando até um terço do corte histológico (na extensão anteroposterior) está acometido pelo quesito avaliado); 2-moderado (quando uma porção entre um terço e dois terços do corte histológico está acometida); 3-acentuado (quando uma porção maior que dois terços do corte histológico está acometida). A média das graduações nos dois cortes histológicos representa a nota final para estatística.

3.6.2.2 Avaliação entre escalas funcionais

Avaliamos as escalas funcionais entre si utilizando como base de comparação a correlação dos resultados funcionais com os resultados da histologia. Os achados histológicos, nesse caso, são utilizados como parâmetro de controle para o grau de lesão da medula espinal com cada escala funcional, de forma a avaliar qual escala melhor se adapta ao modelo.

3.7 Da análise estatística

A análise estatística do estudo foi realizada conforme prevista por estatístico cego ao estudo. Todos os dados foram tabelados e analisados pelo programa de computador *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) v23.0 para sistema MAC (*Macintosh*).

A estatística descritiva foi apresentada pela média e desvio padrão, variância e intervalos de confiança.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Após estudo de normalidade utilizamos testes não paramétricos para avaliação dos dados, sempre que adequados à distribuição. Utilizamos o teste de Friedman para a análise das semanas por grupo, o teste de Wilcoxon para a

comparação dos grupos por semana, o teste de Kruskal-Wallis para a análise entre múltiplos grupos e o teste de Mann-Whitney para a comparação entre grupos específicos. O teste T de Student foi utilizado para a comparação do peso inicial e final dado o padrão de normalidade da amostra. O teste de Spearman foi utilizado para avaliar as correlações entre os parâmetros histológicos, os grupos experimentais e as escalas funcionais.

Partimos da hipótese nula de equidade, considerando a probabilidade de erro do tipo I de 5% e do tipo II de 20%.

4 RESULTADOS

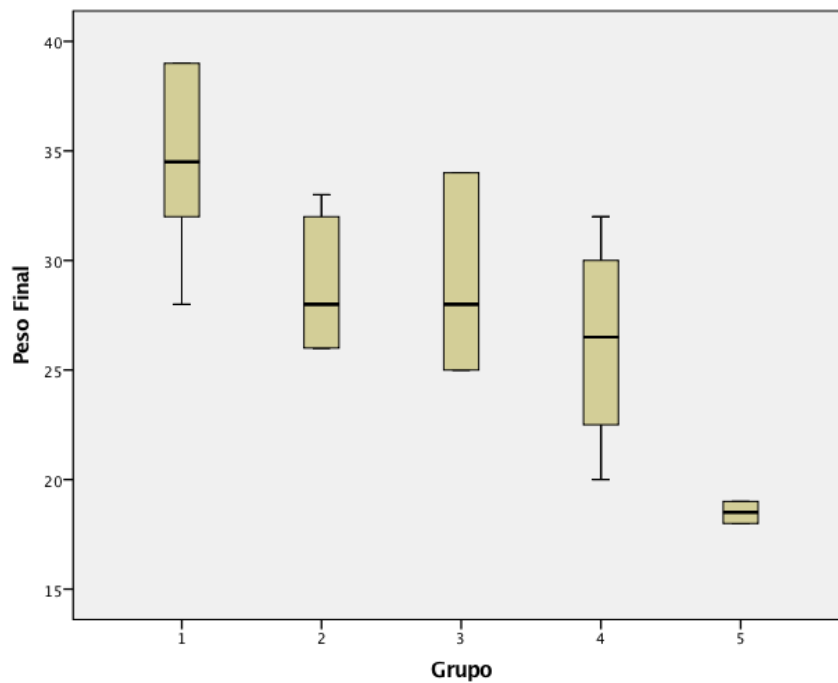
Trinta camundongos foram submetidos à experimentação, seis camundongos por grupo. Do montante, seis camundongos evoluíram para óbito. Os óbitos foram excluídos da análise estatística conforme previamente planejado. Dos óbitos, um camundongo pertencia ao grupo 3 e evoluiu a óbito por infecção urinária no 9º dia de experimento. Outro camundongo pertencia ao Grupo 4 e veio a óbito por infecção urinária no 6º dia de experimento. Os quatro óbitos restantes foram no Grupo 5, sendo que 2 camundongos não sobreviveram ao experimento, um camundongo teve óbito dentro de seis horas após o experimento e um camundongo veio a óbito por infecção urinária no 6º dia de experimento. Dado a alta taxa de mortalidade do Grupo 5, evocamos a suspensão da pesquisa nesse grupo de modo a manter a ética e respeito aos animais. Excluimos o grupo da análise estatística comparativa por perda de dados, porém relatamos aqui a estatística descritiva dos espécimes sobreviventes (dois sobreviveram até a Semana 6). Um camundongo do Grupo 4 apresentou autofagia e foi excluído do experimento no 13º dia.

Dos camundongos sobreviventes, quando considerada a diferença entre o peso inicial e final, não foi observado perda de peso estatisticamente significativa em nenhum grupo, com exceção do Grupo 1. O grupo "SHAM" apresentou diferença de peso estatisticamente significativa com variância negativa de peso entre o peso inicial e final, ou seja, os camundongos desse grupo ganharam peso (**Tabela 1 e Gráfico 1**).

Tabela 1 - Estatística descritiva da massa (em gramas) dos animais e Teste T de Student

Grupo	Diferenças emparelhadas (massa inicial - massa final)				P-value
	Média	Desvio Padrão	95% Intervalo de Confiança da Diferença		
1	-5,667	3,011	-8,827	-2,507	0,006
2	0,5	4,231	-3,94	4,94	0,784
3	0,6	5,639	-6,402	7,602	0,824
4	3,5	7,371	-8,229	15,229	0,412
5	11	1,414	-1,706	23,706	0,058

Gráfico 1 - Variação da pesagem dos animais nos grupos experimentais



4.1 Escalas funcionais

4.1.1 Escala BBB

Os resultados do BBB apresentaram notas máximas constantes na escala (21) para todos os camundongos do grupo 1 ("SHAM"), e notas mínimas constantes (0) para o Grupo 5 até a Semana 3. Dessa forma nesses Grupos e períodos, como não há desvio padrão, o grupo não apresentou estatística descritiva. Como já citado, o grupo 5 foi excluído da análise intra e entre grupos pois apenas dois espécimes do grupo sobreviveram, portanto apresentaremos apenas a estatística descritiva. A exclusão segue para todas as análises comparativas. Os resultados da distribuição são demonstrados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Estatística descritiva - Escala BBB

Tempo	Grupo	Média	95% Intervalo de Confiança para Média		Variância	Desvio Padrão	Mín. *	Máx. **
			Limite inferior	Limite superior				
Semana 1	2	14,33	13,6	15,07	1,333	1,155	12	15
	3	0,2	-0,1	0,5	0,178	0,422	0	1
	4	0,25	-0,14	0,64	0,214	0,463	0	1
Semana 2	2	14,92	13,66	16,17	3,902	1,975	12	18
	3	2,2	0,9	3,5	3,289	1,814	0	5
	4	0,25	-0,14	0,64	0,214	0,463	0	1
Semana 3	2	15,92	14,47	17,36	5,174	2,275	12	19
	3	5,2	3,59	6,81	5,067	2,251	2	8
	4	0,75	0,16	1,34	0,5	0,707	0	2
	5	0,5	-0,42	1,42	0,333	0,577	0	1
Semana 4	2	16,25	15,43	17,07	1,659	1,288	14	18
	3	5,8	4,74	6,86	2,178	1,476	4	8
	4	2,13	0,99	3,26	1,839	1,356	1	4
	5	0,5	-0,42	1,42	0,333	0,577	0	1
Semana 5	2	16,58	15,71	17,46	1,902	1,379	14	18
	3	6,3	5,47	7,13	1,344	1,16	5	8
	4	2,88	1,83	3,92	1,554	1,246	1	4
	5	1	-0,84	2,84	1,333	1,155	0	2
Semana 6	2	17	15,79	18,21	3,636	1,907	14	19
	3	6,9	6,19	7,61	0,989	0,994	5	8
	4	3,25	2,18	4,32	1,643	1,282	1	5
	5	1	-0,84	2,84	1,333	1,155	0	2

*Mínimo

**Máximo

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e posteriormente analisados por testes não paramétricos.

No teste de Friedman, observou-se diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupos entre todas as semanas ($p < 0,05$), conforme a Tabela 3. O grupo 1 demonstrou-se constante entre as semanas e o grupo 5 foi excluído da análise.

Tabela 3 - Teste de Friedman - Escala BBB

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
P-value	NA	<0,001	<0,001	<0,001

NA= Não se aplica

No teste de Kruskal-Wallis observou-se diferença estatisticamente significativa entre múltiplos grupos em todas as semanas ($p < 0,05$), conforme a

Tabela 4.

Tabela 4 - Teste de Kruskal-Wallis - Escala BBB

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Havendo diferença entre os grupos demonstrada pelo teste de Friedman e de Kruskal-Wallis, os dados foram submetidos ao teste da soma de postos de Wilcoxon para a análise intragrupos por tempo. O Grupo 1 se manteve constante durante toda a evolução do experimento. Avaliando a tabela, conseguimos observar um padrão de melhora funcional dentro dos grupos. O Grupo 2 começou a apresentar melhora estatisticamente significativa na Semana 3, o Grupo 3 na Semana 2 e o Grupo 4 apenas na Semana 4. Os Grupos 2 e 3 estacionaram a melhora funcional em um patamar a partir da Semana 4, enquanto o Grupo 4 atingiu seu patamar na Semana 5 (**Tabela 5 - em destaque momento em que os grupos iniciaram a melhora funcional**).

Tabela 5 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos (escala BBB) por semana

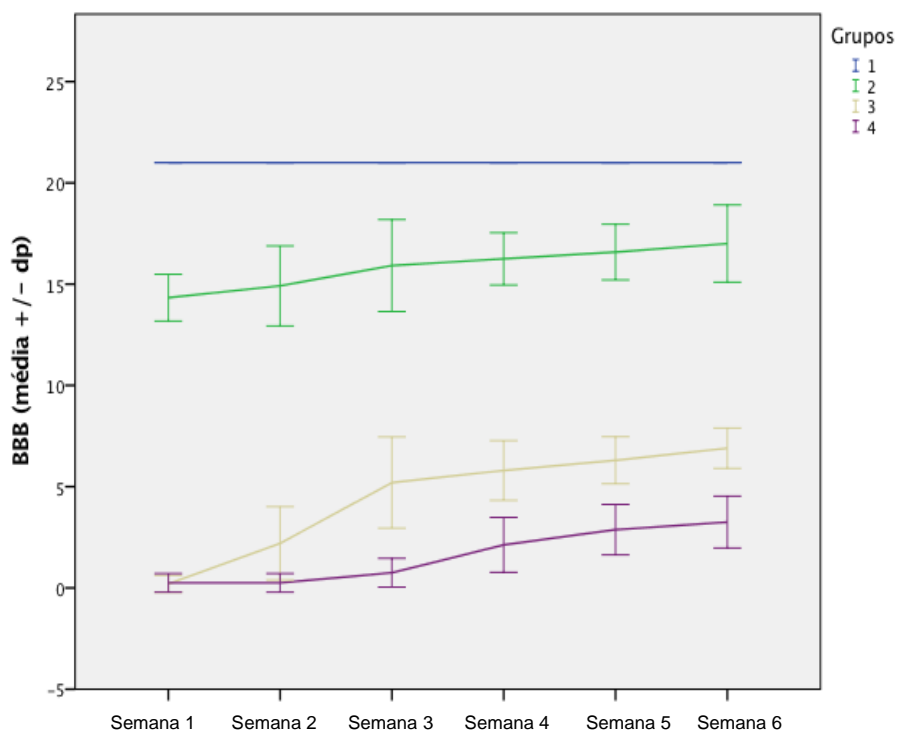
Tempo / Grupo	1	2	3	4
	P-value			
Semana 2 - Semana 1	1	0,272	0,011	1
Semana 3 - Semana 1	1	0,006	0,005	0,102
Semana 4 - Semana 1	1	0,004	0,005	0,027
Semana 5 - Semana 1	1	0,005	0,005	0,011
Semana 6 - Semana 1	1	0,006	0,005	0,011
Semana 3 - Semana 2	1	0,01	0,011	0,102
Semana 4 - Semana 2	1	0,026	0,004	0,027
Semana 5 - Semana 2	1	0,024	0,005	0,011
Semana 6 - Semana 2	1	0,051	0,005	0,011
Semana 4 - Semana 3	1	0,477	0,332	0,066
Semana 5 - Semana 3	1	0,541	0,065	0,026
Semana 6 - Semana 3	1	0,501	0,027	0,017
Semana 5 - Semana 4	1	0,234	0,129	0,063
Semana 6 - Semana 4	1	0,196	0,026	0,024
Semana 6 - Semana 5	1	0,163	0,058	0,083

Ainda em análise entre grupos específicos, os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os momentos do experimento, com exceção dos períodos de comparação entre os Grupos 3 e 4 na primeira semana do estudo. Os Grupos 3 e 4 só apresentaram diferença entre si ($p < 0,05$) a partir da segunda semana de avaliação (**Tabela 6** - em destaque momento em que os grupos iniciaram a melhora funcional).

Tabela 6 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escala BBB

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-value	,805	,009	<0,001	,001	<0,001	<0,001

Os achados supracitados podem ser sintetizados no gráfico 2, em que podemos observar a flutuação dos escores da escala BBB por tempo.

Gráfico 2 - Resultado da escala BBB de cada grupo por semana de acompanhamento

4.1.2 Escala BMS

A metodologia utilizada para a análise estatística dos dados da escala BMS foi a mesma utilizada nas escalas BBB e MFS. Os dados analisados foram todos submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e calculados com testes compatíveis *a posteriori*. À semelhança dos resultados da escala BBB, alguns Grupos de camundongos foram omitidos da estatística descritiva por apresentarem escores constantes e portanto não apresentarem desvio padrão. Todos os dados calculáveis estão dispostos na **Tabela 7**. Os camundongos do Grupo 1 apresentaram nota máxima constante para a escala BMS durante todo o experimento e por isso foi omitida. O restante dos Grupos omitidos em todos os períodos apresentaram escores constantes iguais a zero (pior nota).

Tabela 7 - Estatística descritiva da Escala BMS

Tempo	Grupo	Média	95% Intervalo de Confiança para Média		Variância	Desvio Padrão	Mín.*	Máx.*
			Limite inferior	Limite superior				
Semana 1	2	5,833	4,802	6,865	0,967	0,983	5	7
Semana 2	2	6,167	5,377	6,957	0,567	0,752	5	7
Semana 3	2	5,5	4,62	6,38	0,7	0,837	5	7
	3	0,3	-0,255	0,855	0,2	0,447	0	1
Semana 4	4	1,67	0,23	3,1	0,333	0,577	1	2
	2	7,167	6,377	7,957	0,567	0,752	6	8
	3	0,9	-0,211	2,011	0,8	0,894	0	2
Semana 5	4	1,667	-1,202	4,535	1,333	1,154	1	3
	2	7	6,336	7,664	0,4	0,632	6	8
	3	1,8	0,672	2,928	0,825	0,908	1	3
Semana 6	4	2,667	1,232	4,101	0,333	0,577	2	3
	5	0,75	-8,78	10,28	1,125	1,060	0	1,5
	2	7,167	6,738	7,595	0,167	0,408	7	8
Semana 6	3	2,6	1,92	3,28	0,3	0,547	2	3
	4	2,333	0,436	4,231	0,583	0,763	1,5	3
	5	0,75	-8,78	10,28	1,125	1,060	0	1,5

*Mínimo

**Máximo

Também submetemos a amostra ao teste de Friedman que demonstrou diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupos entre todas as semanas ($p < 0,05$), conforme a **Tabela 8**.

Tabela 8 - Teste de Friedman - Escala BMS

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
P-value	NA	0,003	0,001	0,002

NA= Não se aplica

Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis que demonstrou haver diferença entre múltiplos grupos ($p < 0,05$) em todos os momentos avaliados do experimento (**Tabela 8**).

Tabela 9 - Teste de Kruskal-Wallis - Escala BMS

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Demonstrada a diferença entre os grupos, avaliamos os achados intragrupos por semanas com o teste de Wilcoxon. Nessa escala (BMS), o Grupo 1 ("SHAM") se manteve constante com nota máxima durante todo o experimento. O Grupo 2 apresentou melhora funcional estatisticamente significativa apenas durante a Semana 3. O Grupo 3 apresentou melhora funcional durante todas as semanas do experimento até estacionar em um patamar a partir da Semana 4. O Grupo 4 não apresentou melhora funcional estatisticamente significativa durante o experimento. Os achados são resumidos na **Tabela 10** (em destaque momentos que os grupos apresentaram melhora funcional estatisticamente significativa).

Tabela 10 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos por semana - Escala BMS

Tempo / Grupo	1	2	3	4
	P-Value			
Semana 2 - Semana 1	1	0,414	0,18	1
Semana 3 - Semana 1	1	0,577	1	0,063
Semana 4 - Semana 1	1	0,023	0,109	0,063
Semana 5 - Semana 1	1	0,066	0,042	0,059
Semana 6 - Semana 1	1	0,066	0,038	0,066
Semana 3 - Semana 2	1	0,102	0,18	0,102
Semana 4 - Semana 2	1	0,063	0,109	0,102
Semana 5 - Semana 2	1	0,102	0,042	0,102
Semana 6 - Semana 2	1	0,059	0,039	0,109
Semana 4 - Semana 3	1	0,039	0,109	0,414
Semana 5 - Semana 3	1	0,041	0,042	0,102
Semana 6 - Semana 3	1	0,039	0,038	0,066
Semana 5 - Semana 4	1	0,564	0,066	0,18
Semana 6 - Semana 4	1	1	0,066	0,18
Semana 6 - Semana 5	1	0,317	0,144	0,655

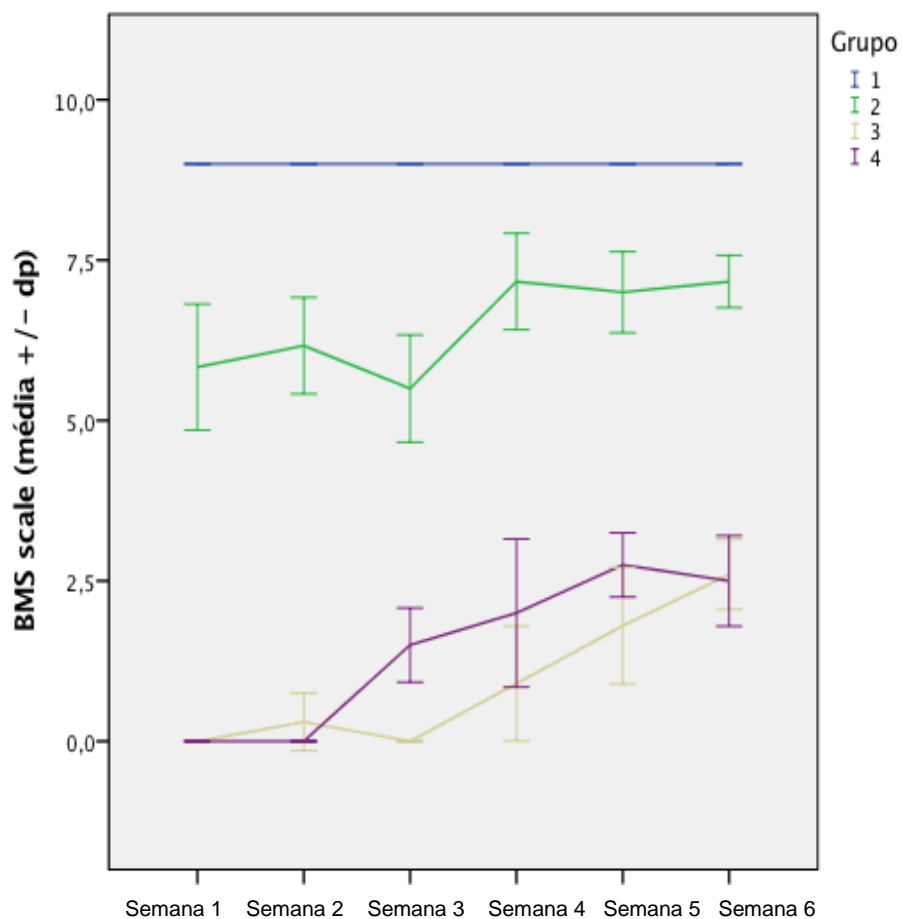
Na análise entre grupos, pelo teste de Mann-Whitney, todos os grupos apresentaram-se diferentes entre si, com exceção dos Grupos 3 e 4. Quando comparados entre si, os Grupos 3 e 4 só apresentaram diferenças na escala BMS na Semana 3, mantendo-se sem diferenças estatisticamente significantes nos outros períodos do estudo (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escala BMS

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-value	1	0,18	0,007	0,209	0,095	0,787

Os achados supracitados da escala BMS podem ser sintetizados no gráfico 3, em que podemos observar a flutuação dos escores por tempo.

Gráfico 3 - Resultado da escala BMS de cada grupo por semana de acompanhamento



4.1.3 Escala MFS

Novamente, à semelhança das análises prévias, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov antes das análises comparativas. A estatística descritiva dos dados calculáveis estão resumidas na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Estatística descritiva da Escala MFS

Tempo	Grupo	Média	95% Intervalo de Confiança para Média		Variância	Desvio Padrão	Mín.*	Máx.**
			Limite inferior	Limite superior				
Semana 1	2	8,2	6,84	9,56	1,2	1,095	7	10
Semana 2	2	7,4	5,144	9,656	3,3	1,816	5	9
	3	0,3	-0,533	1,133	0,45	0,670	0	1,5
Semana 3	5	0,75	-8,78	10,28	1,125	1,060	0	1,5
	2	6,8	5,761	7,839	0,7	0,836	6	8
	3	0,1	-0,178	0,378	0,05	0,223	0	0,5
Semana 4	4	1,75	0,723	2,777	0,417	0,645	1	2,5
	5	1,5	-17,559	20,559	4,5	2,121	0	3
	2	10	8,244	11,756	2	1,414	8	11
Semana 5	3	1	0,24	1,76	0,375	0,612	0	1,5
	4	1,375	-0,131	2,881	0,896	0,946	0	2
Semana 6	2	9,6	7,717	11,483	2,3	1,516	7	11
	3	2,3	1,09	3,51	0,95	0,974	1,5	4
	4	2	0,701	3,299	0,667	0,816	1	3
Semana 7	5	0,5	-5,853	6,853	0,5	0,707	0	1
	2	10,4	9,72	11,08	0,3	0,547	10	11
	3	3,8	2,513	5,087	1,075	1,036	2,5	5
Semana 8	4	3,375	1,611	5,139	1,229	1,108	2	4,5
	5	2,5	-87,797	102,797	112,5	5,606	0	5

*Mínimo

**Máximo

Aplicamos o teste de Friedman que demonstrou diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupos entre todas as semanas ($p < 0,05$), conforme a **Tabela 13**.

Tabela 13 - Teste de Friedman - Escala MFS

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
P-value	NA	0,012	0,001	0,004

NA= Não se aplica

Também submetemos os dados ao teste de Kruskal-Wallis que demonstrou haver diferença entre múltiplos grupos ($p < 0,05$) em todos os momentos avaliados do experimento (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Teste de Kruskal-Wallis - Escala MFS

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Dado a diferença demonstrada pelos testes, avaliamos a evolução intragrupos pelas semanas com o Teste de Wilcoxon. O Grupo 1 se manteve constante durante as semanas com a nota máxima. À semelhança da escala BMS, o Grupo 4 não apresentou melhora estatisticamente significativa entre as semanas em nenhum período do experimento e o Grupo 2 apresentou melhora significativa no final da Semana 2 e durante a Semana 3. O Grupo 3 apresentou um padrão de melhora progressiva significativa a partir da Semana 3 até o final do experimento (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos por semana - Escala MFS

Tempo / Grupo	1	2	3	4
	P-Value			
Semana 2 - Semana 1	1	0,194	0,317	1
Semana 3 - Semana 1	1	0,102	0,317	0,068
Semana 4 - Semana 1	1	0,098	0,063	0,102
Semana 5 - Semana 1	1	0,334	0,039	0,066
Semana 6 - Semana 1	1	0,059	0,043	0,068
Semana 3 - Semana 2	1	0,339	0,655	0,068
Semana 4 - Semana 2	1	0,058	0,141	0,102
Semana 5 - Semana 2	1	0,131	0,039	0,066
Semana 6 - Semana 2	1	0,026	0,042	0,068
Semana 4 - Semana 3	1	0,026	0,077	0,414
Semana 5 - Semana 3	1	0,042	0,039	0,458
Semana 6 - Semana 3	1	0,026	0,042	0,068
Semana 5 - Semana 4	1	0,18	0,042	0,102
Semana 6 - Semana 4	1	0,414	0,042	0,066
Semana 6 - Semana 5	1	0,102	0,042	0,109

Na análise entre grupos específicos, pelo teste de Mann-Whitney, todos os grupos apresentaram-se diferentes entre si, com exceção dos Grupos 3 e 4. Diferentemente da escala BBB e à semelhança da escala BMS, os Grupos 3 e 4 se mantiveram semelhantes quando comparados entre si em praticamente todo o experimento, com exceção da Semana 3, quando encontramos

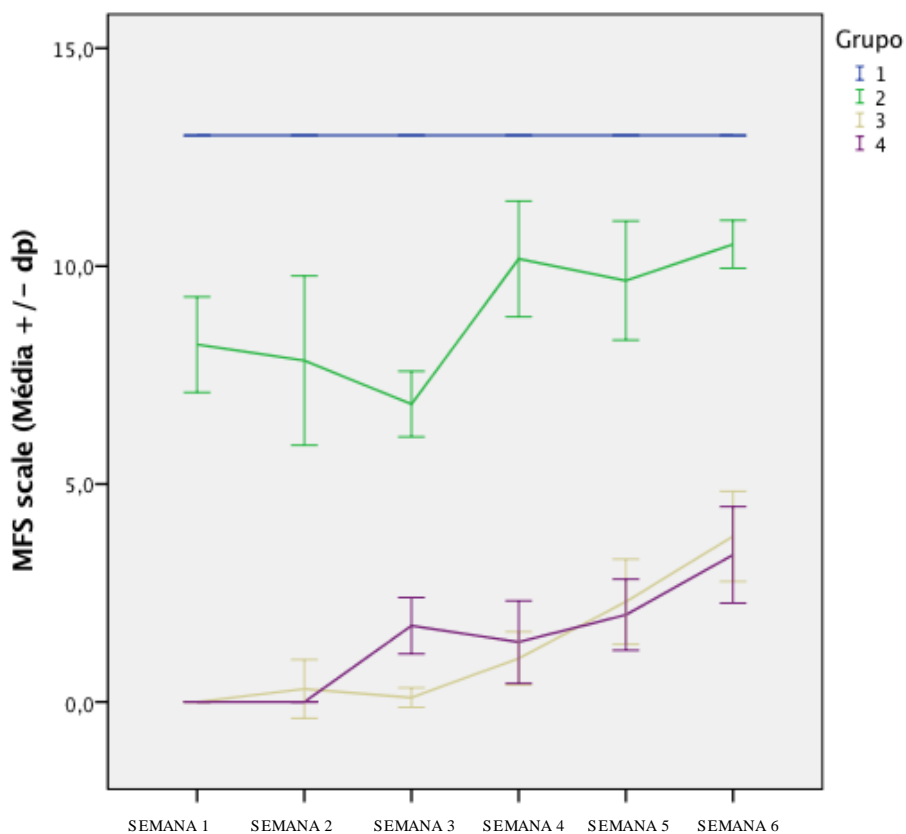
diferença estatisticamente significativa. Apresentamos os resultados na Tabela 16 com destaque do dado estatisticamente significativo.

Tabela 16 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escala MFS

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-Value	1,000	,317	,011	,256	,788	,535

No **Gráfico 4**, em que podemos observar a flutuação dos escores por tempo, resumimos os achados supracitados da escala MFS.

Gráfico 4 - Resultado da escala MFS de cada grupo por semana de acompanhamento



4.2 Avaliação de movimentação na Escada Horizontal

O número de passos acertados no plano horizontal e sua estatística descritiva são demonstrados na **Tabela 17**. Os grupos omitidos em todos os momentos apresentaram resultados constantes com nenhum (zero) acertos na avaliação de movimentação da Escada Horizontal.

Tabela 17 - Estatística descritiva - Escada Horizontal

Tempo	Grupo	Média	95% Intervalo de Confiança para Média		Variância	Desvio Padrão	Mín.*	Máx.**
			Limite inferior	Limite superior				
Semana 1	1	47	43,89	50,11	8,8	2,966	42	50
	2	30,67	25,33	36	25,867	5,086	25	39
Semana 2	1	47,67	45,71	49,62	3,467	1,862	45	50
	2	32,5	28,7	36,3	13,1	3,619	28	37
Semana 3	1	47,17	44,17	50,17	8,167	2,858	43	51
	2	36,5	30,07	42,93	37,5	6,124	28	47
	3	1,2	-0,42	2,82	1,7	1,304	0	3
Semana 4	1	47,17	44,17	50,17	8,167	2,858	43	51
	2	36,5	30,07	42,93	37,5	6,124	28	47
	3	2,2	1,16	3,24	0,7	0,837	1	3
	4	2,5	0,45	4,55	1,667	1,291	1	4
Semana 5	1	53,17	48,84	57,49	16,967	4,119	47	59
	2	44,17	38,56	49,78	28,567	5,345	36	50
	3	6,2	3,98	8,42	3,2	1,789	4	8
	4	3,25	1,25	5,25	1,583	1,258	2	5
	5	1	-11,71	13,71	2	1,414	0	2
Semana 6	1	52,33	48,43	56,24	13,867	3,724	47	58
	2	41,33	34,54	48,12	41,867	6,47	35	50
	3	10,8	8,41	13,19	3,7	1,924	8	13
	4	4	1,75	6,25	2	1,414	2	5

*Mínimo

**Máximo

Os dados foram então submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

Comprovada sua distribuição não paramétrica, o teste de Friedman demonstrou diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupos entre todas as semanas ($p < 0,05$), conforme a **Tabela 18**.

Tabela 18 - Teste de Friedman - Escada Horizontal

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
P-value	0,003	<0,001	<0,001	0,002

O teste de Kruskal-Wallis, por sua vez, também demonstrou diferença estatisticamente significativa entre múltiplos grupos ($p < 0,05$) em todos os momentos no experimento (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Teste de Kruskal-Wallis - Escada Horizontal

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Posteriormente, à semelhança dos outros desfechos, avaliamos a diferenciação intragrupos por semana com o Teste dos Postos de Wilcoxon. Diferentemente das outras escalas avaliadas, no teste da Escada Horizontal o Grupo 1 não se manteve constante, apresentando variação positiva estatisticamente significativa entre a Semana 5 e as demais semanas, e entre a Semana 6 e a Semana 1. Os Grupos 2 e 3 apresentaram melhora em quase todas as semanas do experimento. O Grupo 4, por sua vez, não apresentou

melhora em comparação consigo mesmo em nenhum momento do estudo. Os resultados são descritos na **Tabela 20**, em destaque estão os achados do Grupo 1 supracitados.

Tabela 20 - Teste de Wilcoxon - Diferença intragrupos (Escada Horizontal) por semana

Tempo / Grupo	1	2	3	4
	P-Value			
Semana 2 - Semana 1	0,655	0,197	1	1
Semana 3 - Semana 1	0,596	0,042	0,109	1
Semana 4 - Semana 1	0,596	0,042	0,041	0,068
Semana 5 - Semana 1	0,027	0,028	0,042	0,066
Semana 6 - Semana 1	0,027	0,027	0,042	0,068
Semana 3 - Semana 2	0,496	0,043	0,109	1
Semana 4 - Semana 2	0,496	0,043	0,041	0,068
Semana 5 - Semana 2	0,027	0,043	0,042	0,066
Semana 6 - Semana 2	0,058	0,027	0,043	0,066
Semana 4 - Semana 3	1	1	0,18	0,068
Semana 5 - Semana 3	0,028	0,046	0,042	0,066
Semana 6 - Semana 3	0,074	0,112	0,042	0,066
Semana 5 - Semana 4	0,028	0,046	0,042	0,083
Semana 6 - Semana 4	0,074	0,112	0,042	0,257
Semana 6 - Semana 5	0,414	0,273	0,042	0,581

Comparando-se os grupos entre si, o Teste de Mann-Whitney demonstra que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todos os

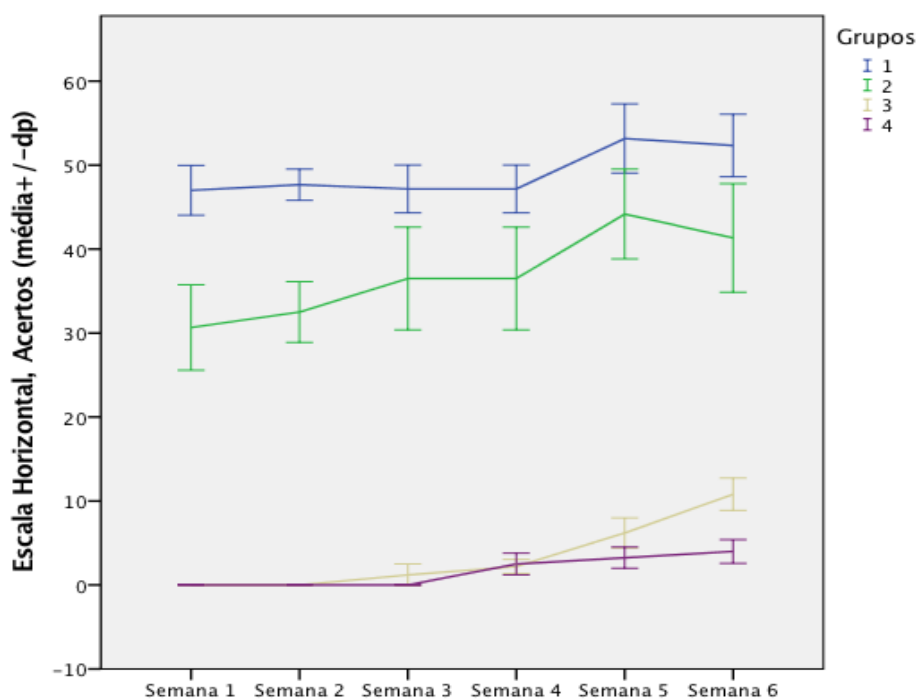
momentos do experimento, com exceção dos Grupos 3 e 4 quando comparados entre si. Estes, por sua vez, apresentam-se semelhantes na maior parte do experimento, havendo diferença estatisticamente significativa apenas nas últimas duas semanas do experimento (Semanas 5 e 6). Os achados seguem na **Tabela 21**.

Tabela 21 - Teste de Mann-Whitney entre os Grupos 3 e 4 - Escada Horizontal

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
P-value	1	1	0,081	0,702	0,035	0,014

No **Gráfico 5**, em que podemos observar a flutuação dos escores por tempo, demonstramos os achados supracitados da escada horizontal.

Gráfico 5 - Resultado da Escala Horizontal de cada grupo por semana de acompanhamento



4.3 Avaliação histopatológica

Avaliamos os cortes histológicos com relação à presença de degeneração neurológica, hiperemia e infiltrado celular. Os cortes são exemplificados na **Figura 6**.

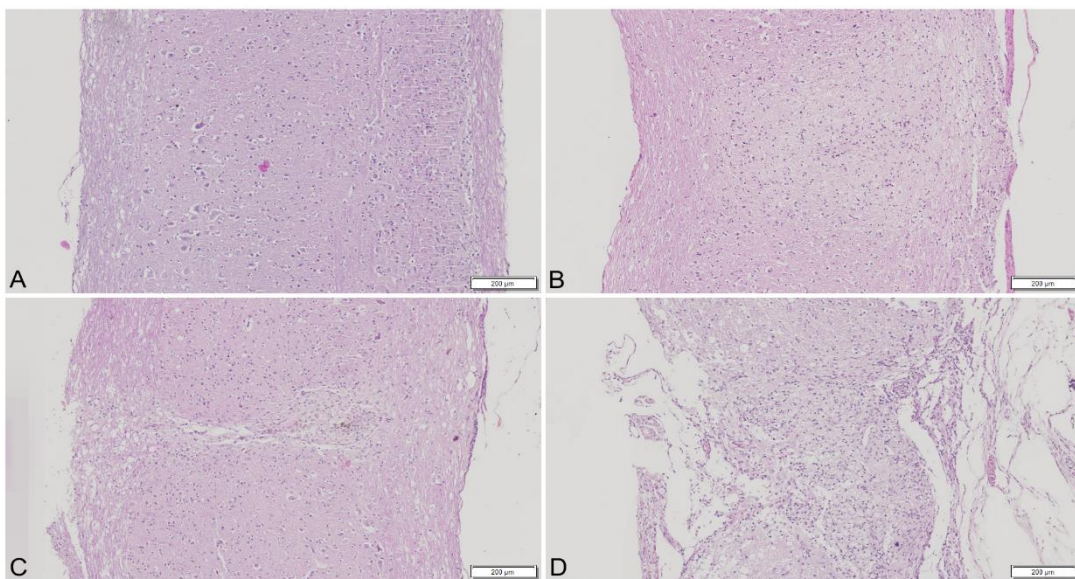


Figura 6 - **A**- área normal da medula. **B**- área de degeneração discreta. **C**- área de degeneração moderada. **D**- área de degeneração intensa com completa desorganização da estrutura da medula. Hematoxilina Eosina.

Os resultados da graduação dos achados histológicos seguem na **Tabela 22**, em que G = grupo de camundongo e C = número do camundongo no experimento.

Tabela 22 - Resultados da avaliação histopatológica (gradação)

		HIPEREMIA	DEGENERAÇÃO	INFILTRADO
Grupo 1	G1C1	0	0	0
	G1C2	0	0	0
	G1C3	0	0	0
	G1C4	0	1	0
	G1C5	0	0	0
	G1C6	0	0	0
Grupo 2	G2C1	0	0	0
	G2C2	1	2	2
	G2C3	0	2	1
	G2C4	1	0	0
	G2C5	1	1	1
	G2C6	2	1	1
Grupo 3	G3C1	2	2	1
	G3C2	2	3	1
	G3C3	1	1	0
	G3C4	2	2	2
	G3C6	1	2	2
Grupo 4	G4C1	0	2	2
	G4C3	2	3	2
	G4C4	3	3	3
	G4C5	2	3	2
Grupo 5	G5C3	2	3	3
	G5C6	1	3	3

A estatística descritiva segue conforme a **Tabela 23**. Os parâmetros infiltrado celular e hiperemia estavam ausentes no Grupo 1 e portanto todos os espécimes receberam nota 0. A falta de variância entre os animais impede a avaliação estatística e portanto os valores estão descritos como N/A (não aplicável).

Tabela 23 - Estatística descritiva da Avaliação Histológica

Parâmetro	Grupo	Média	95% Intervalo de Confiança para Média		Variância	Desvio Padrão	Mín.*	Máx**
			Limite inferior	Limite superior				
Degeneração	Grupo 1	0,17	-0,26	0,6	0,167	0,408	0	1
	Grupo 2	1	0,06	1,94	0,8	0,894	0	2
	Grupo 3	2	1,12	2,88	0,5	0,707	1	3
	Grupo 4	2,75	1,95	3,55	0,25	0,5	2	3
Infiltrado Celular	Grupo 1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Grupo 2	0,83	0,04	1,62	0,567	0,753	0	2
	Grupo 3	1,2	0,16	2,24	0,7	0,837	0	2
	Grupo 4	2,25	1,45	3,05	0,25	0,5	2	3
Hiperemia	Grupo 1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Grupo 2	0,83	0,04	1,62	0,567	0,753	0	2
	Grupo 3	1,6	0,92	2,28	0,3	0,548	1	2
	Grupo 4	1,75	-0,25	3,75	1,583	1,258	0	3

*Mínimo

**Máximo

A distribuição dos parâmetros entre os Grupos se resume na **Tabela 24**. Podemos observar que os parâmetros mais graves têm relação com a gravidade da lesão, sendo que os Grupos de lesão mais grave apresentam maior proporção de parâmetros histológicos com graduação maior (piores resultados). A relação tem significância estatística confirmada pelo teste de Qui Quadrado de Pearson.

Tabela 24 - Distribuição dos parâmetros histológicos entre os Grupos e correlação

Parâmetro	Graduação	Grupos				Total	Qui Quadrado de Pearson	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4			
Degeneração	0	Contagem	5	2	0	0	7	p=0,011
		%	71,40%	28,60%	0,00%	0,00%	100,00%	
	1	Contagem	1	2	1	0	4	
		%	25,00%	50,00%	25,00%	0,00%	100,00%	
	2	Contagem	0	2	3	1	6	
		%	0,00%	33,30%	50,00%	16,70%	100,00%	
	3	Contagem	0	0	1	3	4	
		%	0,00%	0,00%	25,00%	75,00%	100,00%	
Infiltrado	0	Contagem	6	2	1	0	9	p=0,012
		%	66,70%	22,20%	11,10%	0,00%	100,00%	
	1	Contagem	0	3	2	0	5	
		%	0,00%	60,00%	40,00%	0,00%	100,00%	
	2	Contagem	0	1	2	3	6	
		%	0,00%	16,70%	33,30%	50,00%	100,00%	
	3	Contagem	0	0	0	1	1	
		%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%	
Hiperemia	0	Contagem	6	2	0	1	9	p=0,015
		%	66,70%	22,20%	0,00%	11,10%	100,00%	
	1	Contagem	0	3	2	0	5	
		%	0,00%	60,00%	40,00%	0,00%	100,00%	
	2	Contagem	0	1	3	2	6	
		%	0,00%	16,70%	50,00%	33,30%	100,00%	
	3	Contagem	0	0	0	1	1	
		%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%	

Quando avaliados em bloco, os Grupos revelaram-se diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis sendo que todos os parâmetros apresentaram $p < 0,05$.

Quando comparados entre si pelo teste de Mann-Whitney, alguns Grupos demonstraram-se diferentes enquanto outros não revelaram diferenças significativas. O conjunto dos achados estão resumidos na **Tabela 25**.

Tabela 25 - Teste de Mann Whitney para os parâmetros histológicos

Grupos / Parâmetros	Degeneração	Infiltrado	Hiperemia
Grupo 1 x Grupo 2	$p=0,071$	$p=0,021$	$p=0,021$
Grupo 1 x Grupo 3	$p=0,005$	$p=0,011$	$p=0,002$
Grupo 1 x Grupo 4	$p=0,006$	$p=0,003$	$p=0,018$
Grupo 2 x Grupo 3	$p=0,081$	$p=0,434$	$p=0,094$
Grupo 2 x Grupo 4	$p=0,016$	$p=0,019$	$p=0,184$
Grupo 3 x Grupo 4	$p=0,107$	$p=0,059$	$p=0,590$

Os achados foram finalmente correlacionados pelo teste de Spearman. Todos os parâmetros histológicos demonstraram forte correlação com as escalas BBB e BMS. A escala MFS, por sua vez, revelou correlação forte com infiltrado celular porém uma correlação moderada, ainda que quase forte, com degeneração neurológica e com hiperemia. A Escada Horizontal, por sua vez, demonstrou correlação moderada com degeneração neurológica (quase forte), correlação fraca com infiltrado celular e correlação desprezível com hiperemia. O parâmetro histológico degeneração foi o único a apresentar correlação forte ou moderada em todas as escalas. A Escada Horizontal foi a única escala a

apresentar correlação sem significância estatística com alguns parâmetros histológicos. Todas as correlações moderadas e fortes foram estatisticamente significantes com $p < 0,05$. A correlação da Escada Horizontal com o parâmetro infiltrado celular apresentou $p = 0,298$ e a correlação da Escada Horizontal com o parâmetro hiperemia apresentou $p = 0,742$. O resumo dos resultados de correlação de Spearman estão resumidos na **Tabela 26**.

Tabela 26 - Teste de correlação de Spearman entre parâmetros histológicos e escalas (rô de Spearman)

Parâmetro/Escala	BBB	BMS	MFS	Escada Horizontal
Degeneração	$\rho = -0,813$	$\rho = -0,794$	$\rho = -0,696$	$\rho = -0,670$
Infiltrado	$\rho = -0,776$	$\rho = -0,828$	$\rho = -0,760$	$\rho = -0,238$
Hiperemia	$\rho = -0,773$	$\rho = -0,789$	$\rho = -0,678$	$\rho = 0,077$

5 DISCUSSÃO

A ausência de terapia satisfatória para a lesão da medula espinal e a morbidade associada à lesão justificam a manutenção de pesquisa científica sobre o tema (**Lidal et al., 2007; Priebe et al., 2007; Singh et al., 2008; Pearcey et al., 2007; Fouad et al., 2011; Rahimi-Movaghar et al., 2013**). Conforme argumentação do órgão norte americano “Instituto para Pesquisa com Animais de Laboratório” (*Institute for Laboratory Animal Research; Washington, DC*), a experimentação em animais não pode ser substituída por modelos de computador, nem mesmo os mais sofisticados, dado a complexidade das interações nos diversos níveis (molecular, celular, tecidual, órgãos e sistemas) em conjunto com o meio ambiente (**National Research Council, 2004**).

Dentre os muitos animais de experimentação já utilizados, os mais comuns são os roedores (**De La Torre, 1984; Kunkel-Bagden et al., 1992**), sendo estes amplamente recomendados na literatura (**Blight e Tuszynski, 2006**), inclusive em detrimento da utilização de animais com taxonomia mais próxima à espécie humana (**Courtine et al., 2007; Nout et al., 2012**). Estima-se que pelo menos 20 a 100 milhões de roedores entre ratos e camundongos eram utilizados anualmente para experimentação animal até o final do século XX (**Trull e Rich, 1999**). Entre ratos e camundongos, os últimos se destacam pelas vantagens de serem mais baratos, mais fáceis de criar e manejar em laboratório, ter maior taxa de reprodução e necessitarem de menos espaço,

além de ser mais fácil a engenharia genética em camundongos (**Rosenthal e Brown, 2007; Bryda, 2013**). O potencial de manipulação genética em camundongos é grande o suficiente para defender a transcrição de modelos que utilizem ratos para modelos com camundongos (**Kuypers et al., 2013**).

Existe ainda evidência que a padronização de modelos de lesão da medula espinal permite a reprodutibilidade e a análise dos resultados (**Basso et al., 1996; Rodrigues, 1999**). A manutenção da experimentação animal para a pesquisa em lesão da medula espinal e a padronização de modelos são ainda defendidas em estudos recentes (**Zhang et al., 2014; Forgione et al., 2017**).

Dado o supra exposto, defendemos a continuação do estudo do tratamento da lesão da medula espinal. Defendemos ainda a padronização de protocolos experimentais e nos parece extremamente favorável a escolha do camundongo como animal ideal para a continuação dessa linha de pesquisa.

O presente estudo destina-se à criação de um protocolo de pesquisa para padronizar a utilização de camundongos em um laboratório com vasta experiência prévia com experimentação em ratos. Utilizamos o camundongo do tipo BalbC por ser disponível no biotério de nossa instituição. Os espécimes foram escolhidos com peso dentro da média populacional da espécie e com idade adulta. O número de animais utilizados foi baseado em estudos prévios da literatura (**Sheng et al., 2004; Marques et al., 2009; Kim et al., 2010**) e supostamente utilizamos o mínimo possível para conseguir poder estatístico suficiente.

Todos os métodos foram baseados em protocolos previamente validados MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) - **(Basso et al., 1996); (Rodrigues,1999; Santos et al., 2011; Gargiulo et al., 2012; CONCEA, 2015)** ou arbitrariamente definidos para a padronização do protocolo, em caráter experimental.

A utilização de escalas funcionais de avaliação comportamental está amplamente embasada em literatura e é defendida por **(Kesslak e Keirstead, 2003)** por teoricamente representar o desfecho clínico mais fiel em modelos animais de lesão da medula espinal. Em nosso estudo, optamos pela comparação de algumas escalas e de um método de avaliação já previamente validados, no intuito de comprovar a melhor reprodutibilidade e aplicabilidade das escalas em nosso protocolo e junto `a equipe de nosso laboratório.

A avaliação histológica também é um desfecho frequente na literatura e serve como prova objetiva da lesão da medula espinal e de sua graduação. Utilizamos a histologia para esse mesmo fim, e também como controle para os resultados da avaliação funcional.

Avaliamos 30 camundongos em nosso estudo. Os grupos foram montados arbitrariamente de maneira a testar diversos graus de lesão e possibilitar a padronização dos resultados. Como controle de bons tratos e cuidado adequado com os animais, pesamos os animais no início e no final do estudo. Não observamos perda ponderal significativa dos espécimes, o que

consideramos como sinal de bom acondicionamento e cuidados com os animais.

A divisão de animais foi equivalente entre os grupos, sendo seis animais por grupo. Um total de seis camundongos (20%) vieram a óbito no decorrer do experimento. Esse resultado, caso fosse aleatório entre os grupos, poderia comprometer o estudo. Porém quando avaliamos em detalhe, apenas dois camundongos evoluíram para óbito entre os Grupos SHAM, Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 e Grupo 4 (2/24 camundongos ou 8,33%). O valor de 20% de perdas totais se torna enviesado quando se junta à mortalidade do Grupo 5, que totalizou espantosos 66,66% de óbitos (4 entre 6 camundongos). Dos óbitos do Grupo 5, dois camundongos não despertaram da anestesia, e um camundongo faleceu dentro das primeiras seis horas após o experimento. Três camundongos (50%) sobreviveram a essa primeira fase. Como todos os camundongos de um grupo são submetidos à experimentação no mesmo dia, um em seguida do outro, não foi possível abortar o experimento desses seis espécimes mesmo atingindo uma marca de 50% de mortalidade perioperatória. A experimentação em camundongos adicionais, no entanto, não foi cogitada mesmo quando da morte do quarto camundongo do grupo por infecção urinária, no sexto dia pós-operatório. Decidimos por não tentar novamente lesão desta magnitude, mesmo sabendo que isso significaria a exclusão do grupo por falta de dados. Consideramos que uma experimentação adicional em busca de poder estatístico não seria ético pelo alto risco de mortalidade desnecessária e sofrimento animal. Sendo assim, excluimos o Grupo 5 do estudo e contraindicamos uma lesão experimental dessa magnitude nesse modelo. Consideramos em suma que o Grupo 5 não é viável nesse modelo e

traz viés aos resultados, porém sua exclusão mostra dados concretos em um modelo viável.

Os resultados dos desfechos funcionais por escalas de avaliação demonstraram de maneira geral diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos e condizentes com o nível de gravidade da lesão, com o Grupo 4 apresentando resultados funcionais piores que todos os outros grupos; o Grupo 3 apresentando resultados piores que o Grupo 2 e o Grupo 1; e finalmente o Grupo 2 apresentando resultados piores que o Grupo 1.

Nas escalas BBB, BMS e MFS o Grupo 1 (SHAM) apresentou notas máximas na avaliação funcional, o que confere validade ao Grupo controle. Na avaliação da Escada Horizontal, o Grupo 1 não apresentou resultado perfeito porém apresentou a maior taxa de acertos em todos os períodos do experimento. Em comparações entre as semanas observamos que no Grupo 1 os camundongos obtiveram mais acertos nas últimas semanas em comparação às primeiras, como se o treinamento de realizar o teste repetidamente durante as semanas do experimento melhorasse o desempenho dos camundongos controles. Não acreditamos, contudo, que tal resultado invalide o teste. Sendo um teste dinâmico e uma vez que os melhores resultados são justamente os espécimes desse grupo, acreditamos que a análise final é válida por que há diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Observamos também diferenças esperadas entre os grupos, sendo que os Grupos 3 e 4 são mais semelhantes entre si, dado que as lesões são mais graves. Dessa forma, observamos em todas as escalas uma discrepância

evidente na recuperação funcional dos camundongos nos grupos, sendo que o Grupo 3 e 4 iniciam sua recuperação funcional mais tardiamente que o Grupo 2 e o resultado final é inferior ao Grupo 2.

Dentro desses achados, ponderamos a possibilidade de que as escalas apresentem sensibilidade diferente entre si. As diferenças entre os Grupos 1 e 2 com os demais grupos e entre si são demonstradas de maneira mais uniforme por todas as escalas, dado que as diferenças são maiores entre esses grupos e os demais. Entre os Grupos 3 e 4, por sua vez, dado que são mais graves e portanto mais semelhantes entre si, a melhora funcional é demonstrada pelas escalas em momentos diferentes do experimento, sendo que a escala BBB detecta as diferenças de maneira mais precoce (a partir da Semana 2) em comparação às escalas BMS e MFS (a partir da Semana 3) e da Escada Horizontal (a partir da Semana 5). Adicionalmente, a escala BBB demonstra diferença entre os Grupos 3 e 4 em todas as semanas do experimento a partir da Semana 2, enquanto as escalas MFS e BMS demonstram diferença apenas na Semana 3 e a Escada Horizontal apenas nas Semanas 5 e 6. Ponderamos se esses achados podem traduzir uma maior sensibilidade da Escala BBB frente às escalas BMF e MFS. Os achados da Escada Horizontal, por sua vez, transmitem que possivelmente a propriocepção tenha uma recuperação mais lenta em lesões mais graves.

Em contrapartida, subjetivamente durante o experimento tivemos a sensação de que as escalas BMS e MFS são de aplicação mais simples e rápida quando comparadas à escala BBB. Não houve registro do tempo gasto por avaliação no experimento, contudo, dado que esse desfecho não foi

planejado previamente. Talvez a complexidade inerente à escala BBB adicione ao mesmo tempo trabalho extra para a avaliação dos espécimes em troca de sensibilidade superior.

A avaliação histológica confirmou os achados das escalas funcionais. A distribuição dos resultados demonstrou que os parâmetros histológicos foram diferentes entre os grupos e foram progressivamente mais graves de acordo com o grau da lesão. Quanto pior a lesão da medula espinal esperada conforme os grupos, piores foram os achados histológicos encontrados em nosso estudo, sendo esses dados estatisticamente significantes. Tais resultados são de extrema importância em nosso estudo, dado que a histologia confirma a existência da lesão neurológica e traz evidência concreta de sua graduação, ou seja, que os diferentes graus de contusão trazem efetivamente graus diferentes de lesão medular comprovadamente significantes. Digno de nota, observamos que o resultado no grupo controle não foi perfeito, sendo que houve pequena degeneração neurológica em um dos camundongos. Esse resultado dá fé à realização da laminectomia e não invalida o grupo controle em nossa interpretação, dado que não houve repercussão na avaliação funcional.

Escolhemos a coloração de hematoxilina eosina por ser muito disponível em serviços de patologia, sendo portanto de fácil acesso e de baixo custo financeiro. Os parâmetros avaliados em nosso estudo (hiperemia, degeneração neural e infiltrado celular) são todos achados tardios da lesão da medula espinal (**De La Torre, 1984; Amar e Levy, 1999; Akhtar et al., 2008**); sendo

portanto adequados para nosso modelo, em cuja eutanásia ocorre na 6ª semana após a lesão da medula espinal.

Adicionalmente, analisamos que os achados histológicos apresentam forte correlação com os resultados das escalas funcionais BBB e BMS. A escala MFS, por sua vez, apresenta correlação forte ou moderada com os parâmetros histológicos. Com esses resultados demonstramos que a utilização das escalas BBB, BMS e MFS é sólida para identificar e graduar a lesão da medula espinal.

A Escada Horizontal, em contrapartida, demonstrou forte correlação com degeneração neurológica porém correlação fraca ou desprezível com infiltrado celular e hiperemia na análise histológica. Esse achado nos faz questionar a validade da Escada Horizontal como método de avaliação em nosso estudo. Em uma análise mais detalhada, contudo, o conjunto de evidências favorece a validação da Escada Horizontal, dado que a avaliação funcional demonstra diferença significativa entre os grupos e a correlação com os parâmetros histológicos é forte justamente com a degeneração neurológica, o marcador mais direto de lesão no tecido neural.

Os achados da Escada Horizontal não invalidam o restante dos resultados, porém nos revelam que talvez não seja uma escala excelente para avaliação de lesão da medula espinal em camundongos submetidos ao nosso modelo de lesão. Dado que demonstramos métodos suficientes e eficazes de identificação e graduação da lesão da medula espinal (escalas BBB, BMS e

MFS), a utilização da Escada Horizontal talvez seja desnecessária em estudos futuros. Consideramos que essa escala demonstrou menor eficácia na identificação, graduação e correlação com achados histológicos sendo assim, em nosso parecer, menos confiável para a avaliação da lesão de medula espinal em nosso modelo de lesão com camundongos.

Entre as escalas com melhores resultados se destacam as escalas BBB e BMS. Ambas demonstraram de maneira eficaz serem capazes de identificar e graduar a lesão da medula espinal, além de apresentarem correlação forte com todos os parâmetros histológicos avaliados. Em avaliação final, contudo, sugerimos a utilização da escala BMS. Essa escala, além de objetivamente apresentar maiores índices de correlação com os achados histológicos (mesmo em comparação com a escala BBB) ainda é, segundo nossa interpretação subjetiva, mais simples e rápida de ser aplicada.

Nosso estudo apresenta algumas falhas dignas de apreciação. A alta mortalidade da amostra, em especial do Grupo 5 talvez seja a mais importante delas. Infelizmente, dado a logística do experimento, todos os camundongos dentro um Grupo específico foram operados no mesmo dia. Como a mortalidade perioperatória foi a mais importante (os camundongos faleceram horas após a lesão da medula espinal), essa mortalidade excessiva não foi prevista e não a pudemos prevenir. Em estudos futuros é digno de ponderação que realizemos o experimento em metade de um Grupo por vez para evitar o mesmo erro. Nos limitamos também por não usarmos outras colorações histológicas. Outros estudos utilizam colorações específicas para avaliar lesão

de neurônios e da bainha de mielina (**Sheng et al., 2004; Marques et al., 2009; Kim et al., 2010**). Por fim, também não utilizamos outros métodos de avaliação de lesão medular como o potencial evocado, que poderia trazer maiores detalhes a nossa avaliação da lesão da medula espinal.

Em contrapartida, nosso estudo traz algumas vantagens a serem destacadas. Mesmo considerando a alta mortalidade, conseguimos demonstrar resultados sólidos utilizando uma amostra relativamente pequena. Adicionalmente acabamos por estabelecer um limite de intensidade de trauma acima do qual a mortalidade se torna inviável. Esse dado não está amplamente publicado em modelos semelhantes. Nosso protocolo de análise histológica também é digno de discussão. Apesar de parecer pouco completo dado sua simplicidade, é válido destacar que conseguimos demonstrar a lesão com recursos simples e mais baratos que os protocolos mais completos. Nosso estudo também é dos poucos que utilizam a Escada Horizontal como método de avaliação funcional.

O presente estudo demonstra um modelo de lesão medular e avaliação neurológica em camundongos que é simples, efetivo, financeiramente acessível e reprodutível. Sua utilização é uma ponte para novas linhas de pesquisa em lesão da medula espinal.

6 CONCLUSÃO

O presente modelo de lesão da medula espinal em camundongos é eficaz e reprodutível excluindo-se a contusão medular por queda de peso (10g) de 50 mm de altura, que traz mortalidade inviável ao modelo. Dentre os métodos de avaliação da lesão da medula espinal, as escalas BBB e BMS são as mais sólidas, enquanto a Escada Horizontal tem seu uso discutível.

7 ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação da Comissão Científica de ética em pesquisa

**DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo IOT nº 1178

Pesquisador Responsável: Prof. Raphael Martus Marcon
Pesquisador Executante: Dr. Paulo Alvim Borges
Título: Padronização de modelo experimental de lesão da medula espinhal e avaliação de lesão neurológica em camundongos.
Grau de Pesquisa: Doutorado

APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA

1º PARECER

O trabalho em apreciação faz parte da linha de pesquisas do "LETRAN" - O objetivo é a padronização do modelo experimental de lesão de medula espinhal e respectiva

lesão neurológica.

O modelo animal escolhido é o "camundongo".

Apresenta o número adequado de animais / amostra

Trabalho aprovado.

**Relator
Comissão Científica
12.02.2016**

=====

DECISÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA EM 12.02.2016: Projeto aprovado.

Após a coleta de assinaturas do DOT/FMUSP, o projeto será enviado para apreciação da CEUA.

Anexo B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **“Padronização de Modelo Experimental de Lesão da Medula Espinhal e Avaliação de Lesão Neurológica em Camundongos”** protocolo nº **012/16** sob a responsabilidade de **Raphael Martus Marcon** e **Paulo Alvim Borges**, apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 30.03.16

Vigência da Autorização	Dezembro/2016
Espécie/linhagem	Camundongo Balb/C
Nº de animais	50
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 30 de Março de 2016

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

Anexo C - Planilha da Escala BBB

Rato XX Grupo XX Data: / /

BBB SCALE		Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de Movimentos		0			
Movimentação <50% em 1-2 APT		1			
Movimentação >50% em 1 APT		2			
Movimentação >50% em 2 APT		3			
Movimentação em todas APT <50%		4			
Movimentação <50% em 2 APT e >50% na 3a ATP		5			
Movimentação >50% em 2 APT e <50% na 3a ATP		6			
Movimentação em todas APT >50%		7			
Arrasta dorso da pata sem apoio de peso		8			
Pisada plantar sem apoio de peso		8			
Pisada plantar com apoio de peso		9			
5-50% tempo passos apoiando o peso		10			
>50% tempo passos apoiando o peso		11			
5-50% tempo passos		12			

coordenados (PD e PT)					
51-95% tempo passos coordenados (PD e PT)		13			
>95% tempo passos coordenados (PD e PT)		14			
Patas rodadas/desprendimento hálux <50%		15			
Patas rodadas/desprendimento hálux 50-94%		16			
Patas paralelas/desprendimento hálux 50-94%		17			
Patas paralelas/desprendimento hálux >95%		18			
Cauda baixa parte to tempo		19			
Cauda sempre alta com tronco instável		20			
Cauda sempre alta com tronco estável		21			

APT = Articulações das patas traseiras (quadril / joelhos / tornozelos)

PD = Patas Dianteiras

PT = Patas Traseiras

Anexo D - Planilha da Escala BMS

Rato XX Grupo XX Data: / /

BMS SCALE		Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de movimentos		0			
Tornozelo movimentos discreto		1			
Tornozelo movimentos amplo		2			
Movimento dois membros post óbvio		3			
Pisada dorsal		3			
Apoio de pata sem apoio de peso		3			
Apoio de pata plantar com peso		4			
Frequente/Consistente passada plantar		5			
<50% Memb A/P coordenados PR		5			
<50% Memb A/P Coordenados PR/PP		6			
>50% Membros A/P coordenados RR		6			
>50% Membros A/P Coordenados PR		7			
PP+ Tronco instável		7			
Cauda 50% cima/ 50% baixo + TE		8			

Moderada instabilidade de tronco		8			
Normal TE cauda sempre cima		9			

A = Anterior

P = Posterior

PR = Paralelos no contato inicial / PP Paralelos

RR = Patas Rodadas Contato Inicial

PR = Paralelos no contato inicial

PP = Patas Paralelas

TE = Tronco Estável

Anexo E - Planilha da escala MFS

Rato XX

Grupo XX

Data: / /

MFS SCALE		Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de movimentos		0			
Movimentos ocasionais		1			
Óbvio movimento 1 membro posterior		2			
Óbvio movimento 2 membros posteriores		3			
Passada de 1 membro posterior		4			
Impulso de 2 membros posteriores		5			
Apoia o peso não deambula		6			
Deambulação com patas rodadas		7			
Deambulação normal baixa velocidade		8			
Barra 2 cm		9			
Barra 1,5 cm		10			
Barra 1 cm		11			
Barra 0,7 cm		12			
Barra 0,5 cm		13			

8 Referências

Akhtar AZ, Pippin JJ, Sandusky CB. Animal models in spinal cord injury: a review. *Rev Neurosci.* 2008;19(1):47-60.

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

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

Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1999;44(5):1027-39.

Ayer JB. Cerebrospinal fluid in experimental compression of spinal cord. *Arch Neurol Psychiatr.* 1919; 2(2):158-64.

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

Barros Filho TEP, Molina AE. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the basso, beattie, bresnahan (BBB) scale in wistar rats. *Clinics*. 2008;63(1):103-8.

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

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability: multicenter animal spinal cord injury study. *J Neurotrauma*. 1996;13(7):343-59.

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

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

Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006;23(5):635-59.

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

Blight AR, Tuszynski MH. Clinical trials in spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(3-4):586-93.

Blight AR. Morphometric analysis of a model of spinal cord injury in guinea pigs, with behavioral evidence of delayed secondary pathology. *J Neurol Sci*. 1991;103(2):156-71.

Borgens RB, Blight AR, McGinnis ME. Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: the effects of applied electric fields. *J Comp Neurol*. 1990;296(4):634-53.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. *Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA*. Brasília (DF): Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; 2015.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. *Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de*

pesquisa científica – DBCA. Brasília (DF): Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; 2016.

Bryda, EC. The mighty mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med*. 2013; 110(3): 207–11.

Courtine G, Bunge MB, Fawcett JW, Grossman RG, Kaas JH, Lemon R, Maier I, Martin J, Nudo RJ, Ramon-Cueto A, Rouiller EM, Schnell L, Wannier T, Schwab ME, Edgerton VR. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nat Med*. 2007; 13(5): 561-6.

Courtine G, Roy RR, Raven J, Hodgson J, McKay H, Yang H, Zhong H, Tuszynski MH, Edgerton VR. Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain*. 2005;128(Pt 10):2338-58.

Cummings BJ, Engesser-Cesar C, Cadena G, Anderson AJ. Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behav Brain Res*. 2007;177(2):232-41.

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

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

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

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

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

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

Eidelberg E, Staten E, Watkins JC, McGraw D, McFadden C. A model of spinal cord injury. *Surg Neurol.* 1976;6(1):35-8.

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

Farooque M, Suo Z, Arnold PM, Wulser MJ, Chou CT, Vancura RW, Fowler S, Festoff BW. Gender-related differences in recovery of locomotor function after spinal cord injury in mice. *Spinal Cord.* 2006;44(3):182-7.

Farooque M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathol.* 2000;100(1):13-22.

Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):377-91.

Ferreira R, Oliveira AR, Barros Filho TEP. Padronização da técnica para captação do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(3):112-4.

Forgione N, Chamankhah M, Fehlings MG. A mouse model of bilateral cervical-contusion-compression spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2017;34(6):1227-39.

Fouad K, Krajacic A, Telzlaff W. Spinal cord injury and plasticity: opportunities and challenges. *Brain Res Bull.* 2011;84(4-5):337-42.

Fujita Y, Yamamoto H. An experimental study on spinal cord traction effect. *Spine (Phila Pa 1976).* 1989;14(7):698-705.

Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, Endo K, Azuma T, Fujikawa T, Tsutsumi S, Shimizu Y. New canine spinal cord injury model free from laminectomy. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2005;14(3):171-80.

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.

Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, Vesce G. Mice anesthesia, analgesia, and care, part I: anesthetic considerations in pre-clinical research. *ILAR J.* 2012;53(1):E55-69.

Ghasemlou N, Kerr BJ, David S. Tissue displacement and impact force are important contributors to outcome after spinal cord contusion injury. *Exp Neurol.* 2005;196(1):9-17.

Hagen EM, Lie SA, Rekand T, Gilhus NE, Gronning M. Mortality after traumatic spinal cord injury: 50 years of follow-up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81(4):368-73.

Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(3-4):264-80.

Haghighi SS, Perez-Espejo MA, Rodriguez F, Clapper A. Radiofrequency as a lesioning model in experimental spinal cord injury. *Spinal Cord.* 1996;34(4):214-9.

Hoschouer EL, Basso DM, Jakeman LB. Aberrant sensory responses are dependent on lesion severity after spinal cord contusion injury in mice. *Pain.* 2010;148(2):328-42.

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

Isaksson J, Farooque M, Olsson Y. Spinal cord injury in ICAM-1-deficient mice: assessment of functional and histopathological outcome. *J Neurotrauma*. 2000;17(4):333-44.

Jakeman LB, Guan Z, Wei P, Ponnappan R, Dzwonczyk R, Popovich PG, Stokes BT. Traumatic spinal cord injury produced by controlled contusion in mouse. *J Neurotrauma*. 2000;17(4):299-319.

Jin Y, Bouyer J, Haas C, Fischer I. Evaluation of the anatomical and functional consequences of repetitive mild cervical contusion using a model of spinal concussion. *Exp Neurol*. 2015;271:175–188.

Joshi M, Fehlings MG. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse part 1: clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma*. 2002;19(2):175-90.

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

Kesslak PJ, Keirstead HS. Assessment of behavior in animal models of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2003;26(4):323-8.

Khan M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can J Neurol Sci*. 1983;10(3):161-5.

Kim JH, Loy DN, Wang Q, Budde MD, Schmidt RE, Trinkaus K, Song SK. Diffusion tensor imaging at 3 hours after traumatic spinal cord injury predicts long-term locomotor recovery. *J Neurotrauma*. 2010;27(3):587-98.

Kouyoumdjian P, Lonjon N, Prieto M, Haton H, Privat A, Asencio G, Perrin FE, Gaviria M. A remotely controlled model of spinal cord compression injury in mice: toward real-time analysis. *J Neurosurg Spine*. 2009;11(4):461-70.

Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Maeda T, Ohkawa Y, Aratani Y, Nagano T, Iwamoto Y, Okada S. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(16):1363-9.

Kuhn PL, Wrathall JR. A mouse model of graded contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1998;15(2):125-40.

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

Kuypers NJ, James KT, Enzmann GU, Magnuson DS, Whittemore SR. Functional consequences of ethidium bromide demyelination of the mouse ventral spinal cord. *Exp Neurol*. 2013;247:615-22.

Lee JH, Jones CF, Okon EB, Anderson L, Tigchelaar S, Kooner P, Godbey T, Chua B, Gray G, Hildebrandt R, Cripton P, Tetzlaff W, Kwon BK. A novel porcine model of traumatic thoracic spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(3):142-59.

Li Y, Oskouian RJ, Day YJ, Kern JA, Linden J. Optimization of a mouse locomotor rating system to evaluate compression-induced spinal cord injury: correlation of locomotor and morphological injury indices. *J Neurosurg Spine*. 2006;4(2):165-73.

Lidal IB, Huynh TK, Biering-Sørensen F. Return to work following spinal cord injury: a review. *Disabil Rehabil*, 2007;29(17):1341-75.

Marques SA, Almeida FM, Fernandes AM, dos Santos Souza C, Cadilhe DV, Rehen SK, Martinez AM. Predifferentiated embryonic stem cells promote functional recovery after spinal cord compressive injury. *Brain Res*. 2010;1349:115-28.

Marques SA, Garcez VF, Del Bel EA, Martinez AM. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. *J Neurosci Methods*. 2009;177(1):183-93.

Moonen G, Satkunendrarajah K, Wilcox JT, Badner A, Mothe A, Foltz W, Fehlings MG, Tator CH. A new acute impact-compression lumbar spinal cord injury model in the rodent. *J Neurotrauma*. 2016;33(3):278-89.

National Research Council (US) Committee to Update Science, Medicine, and Animals. Science, Medicine, and Animals. Washington (DC): National Academies Press (US);2004.

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

Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma*. 2004;21(4):429-40.

Nout YS, Rosenzweig ES, Brock JH, Strand SC, Moseanko R, Hawbecker S, Zdunowski S, Nielson JL, Roy RR, Courtine G, Ferguson AR, Edgerton VR, Beattie MS, Bresnahan JC, Tuszynski MH. Animal models of neurologic disorders: a nonhuman primate model of spinal cord injury. *Neurotherapeutics*. 2012;9(2):380-92.

Pearcey TE, Yoshida KK, Renwick RM. Personal relationships after a spinal cord injury. *Int J Rehabil Res*. 2007;30(3):209-19.

Pitzer C, Klussmann S, Krüger C, Letellier E, Plaas C, Dittgen T, Kirsch F, Stieltjes B, Weber D, Laage R, Martin-Villalba A, Schneider A. The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *J Neurochem*. 2010;113(4):930-42.

Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC, Wuermsler LA, Ho CH. Spinal cord injury medicine 6: economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88(3 Suppl 1):S84-8.

Purdy PD, Duong RT, White CL 3rd, Baer DL, Reichard RR, Pride GL Jr, Adams C, Miller S, Hladik CL, Yetkin Z. Percutaneous translumbar spinal cord compression injury in a dog model that uses angioplasty balloons: MR imaging and histopathologic findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24(2):177-84.

Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, Shokraneh F, Vaccaro AR. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology.* 2013;41(2):65-85.

Rawe SE, Lee WA, Perot PL Jr. The histopathology of experimental spinal cord trauma: the effect of systemic blood pressure. *J Neurosurg.* 1978;48(6):1002-7.

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

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

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

Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol.* 2007 Sep;9(9):993-9.

Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87-91.

Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, Iwakura Y, Atsumi T, Shioda S. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflammation.* 2012;9:65.

Scouten CW, O'Connor R, Cunningham M. Perfusion fixation of research animals. *Micros Today.* 2006; 14: 26-33.

Seki T, Hida K, Tada M, Koyanagi I, Iwasaki Y. Graded contusion model of the mouse spinal cord using a pneumatic impact device. *Neurosurgery.* 2002;50(5):1075-81.

Seki T, Hida K, Tada M, Koyanagi I, Iwasaki Y. Role of the bcl-2 gene after contusive spinal cord injury in mice. *Neurosurgery.* 2003;53(1):192-8.

Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajjghadery A, Khalatbari MM, Safdarian M, Meknatkhah S, Rezvan M, Chalangari M, Drakhshan P,

Rahimi-Movaghar V. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord*. 2017 Aug;55(8):714-721. 2017 Jan 24.

Sheng H, Wang H, Homi HM, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Pearlstein RD, Warner DS. A no-laminectomy spinal cord compression injury model in mice. *J Neurotrauma*. 2004;21(5):595-603.

Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clinical Epidemiology*. 2014;6:309-31.

Singh R, Dhankar SS, Rohilla R. Quality of live of people with spinal cord injury in Northern India. *Int J Rehabil Res*, 2008;31(3):247-51.

Sroga JM, Jones TB, Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 2003;462(2):223-40.

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

Tarlov IM, Klinger H. Spinal cord compression studies. II. Time limits for recovery after acute compression in dogs. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1954;71(3):271-90.

Thompson JE. Pathological changes occurring in the spinal cord, following fracture dislocation of the vertebrae. *Ann Surg.* 1923;78(2):260-93.

Trull FL, Rich BA. More regulation of rodents. *Science.* 1999;284(5419):1463.

Tysseling VM, Janes L, Imhoff R, Quinlan KA, Lookabaugh B, Ramalingam S, Heckman CJ, Tresch MC. Design and evaluation of a chronic EMG multichannel detection system for long-term recordings of hindlimb muscles in behaving mice. *J Electromyogr Kinesiol.* 2013;23(3):531-9.

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

Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord.* 2006;44(9):523-9.

Yeo JD, Payne W, Hinwood B, Kidman AD. The experimental contusion injury of the spinal cord in sheep. *Paraplegia.* 1975;12(4):275-98.

Yeo JD. A review of experimental research in spinal cord injury. *Paraplegia.* 1976; 14(1):1-11.

Zhang J, Wang H, Zhang C, Li W. Intrathecal decompression versus epidural-decompression in the treatment of severe spinal cord injury in rat model: randomized, controlled preclinical research. *J Orthop Surg Res.* 2016;11:34.

Zhang N, Fang M, Chen H, Gou F, Ding M. Evaluation of spinal cord injury animal models. *Neural Regen Res.* 2014;9(22):2008-12.

Zurita M, Aguayo C, Bonilla C, Otero L, Rico M, Rodríguez A, Vaquero J. The pig model of chronic paraplegia: a challenge for experimental studies in spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2012;97(3):288-303.