AYNE MURATA HAYASHI

Investigação dos níveis da proteína S100 β (técnica de Western blot) no líquido de cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar submetidos à eletroacupuntura

**São Paulo
2010**

AYNE MURATA HAYASHI

Investigação dos níveis da proteína S100 β (técnica de *Western blot*) no líquido de cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar submetidos à eletroacupuntura

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:
Prof^a Dra. Julia Maria Matera

Co-orientador:
Prof. Dr. Gerson Chadi

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
28/4/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2271
FMVZ

Hayashi, Ayne Murata

Investigação dos níveis da proteína S100 β (técnica de *Western Blot*) no líquido de cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar submetidos à eletroacupuntura / Ayne Murata Hayashi. -- 2010.
109 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirurgia Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirurgia Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

Co-orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi.

1. Eletroacupuntura. 2. Extrusão de disco intervertebral. 3. S100 β . 4. *Western Blotting*. 5. Medicina tradicional chinesa. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Correlação dos níveis da proteína S100 β no soro e líquido de cães portadores de afecções degenerativas do disco intervertebral toraco-lombar submetidos à eletroacupuntura", protocolado sob o nº1089/2007, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 17 de abril de 2007.

(We certify that the Research "Evaluation of S100 β levels in serum and cerebrospinal fluid of dogs affected by thoracolumbar intervertebral disk disease submitted to electroacupuncture", protocol number 1089/2007, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 04/17/2007).

São Paulo, 20 de abril de 2007

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HAYASHI, Ayne Murata

Título: Investigação dos níveis da proteína S100 β (técnica de *Western blot*) no líquido de cães extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar submetidos à eletroacupuntura.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

"NÃO HÁ TEMAS ESGOTADOS, MAS
PESQUISADORES ESGOTADOS NO TEMA"
CAJAL, 1928

DEDICATÓRIA

Ao meu filho **Renan** e meu marido **Wagner**, devo mais uma vez esta nova conquista a vocês, pelo apoio, paciência e compreensão, pelos meus períodos de ausência que parecem nunca ter fim. Em todos os momentos sempre estão presentes no meu pensamento e coração!

A minha orientadora, **Prof^a Dr^a Julia Maria Matera** por possibilitar a continuidade do projeto proposto anteriormente e à confiança novamente em meu trabalho! Agradeço por propiciar meu contínuo crescimento como pessoa e profissional. Novamente seus Ensinamentos, sua Dedicação, e seus Conselhos continuam sempre muito importantes para mim!

AGRADECIMENTOS

A minha supermãe **Edona**, pelo suporte psicológico e administrativo em casa, sem os quais não teria sido possível esta nova jornada! Aos meus familiares que deram apoio e compreensão.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)** pelo financiamento da bolsa durante a realização deste projeto e parte do período do doutorado.

Ao Prof^o Dr. **Gerson Chadi** e toda sua equipe do Departamento de Neurologia da FM/USP pela excelente orientação e apoio durante a execução de parte do projeto realizado através do seu Laboratório LIM-45.

Ao Prof^o Dr. **Paulo Sérgio de Moraes Barros** pelos sábios conselhos e apoio desde os tempos do mestrado.

Ao Prof^o Dr. **Angelo João Stopiglia** pela orientação dada como nosso Coordenador da Pós-Graduação e pelos conselhos desde os tempos de aluna, residente até o doutorado.

À Prof^a Dr^a **Ana Carolina Fonseca Pinto** pela paciência e ensinamentos das tomografias computadorizadas e nas coletas de LCR, além dos inúmeros conselhos!!

À Prof^a Dr^a **Sílvia Renata Gaido Cortopassi** pelo auxílio nas anestésias durante a execução dos exames de mielografia e tomografia contrastadas e nas coletas do LCR.

Ao Prof^o Dr. **Stelio Pacca Loureiro Luna** da FMVZ/UNESP – Botucatu, pelo exemplo e a ajuda contínua que propiciaram meu crescimento e aprendizado através das inúmeras oportunidades que se abriram por meio da acupuntura.

Ao Prof^o Dr. **Ricardo Augusto Dias** e Prof^o **Valdecir Marvulle** pela orientação da análise estatística do projeto.

À Prof^a Dr^a **Débora Rejane Fior Chadi** por possibilitar a quantificação dos resultados em seu laboratório no Instituto de Biociências da USP.

Aos docentes Prof^o Dr. **Cássio Ricardo Auada Ferrigno**, Prof^a Dr^a **Denise Tabachi Fantoni**, Prof^o Dr. **Marco Antonio Gioso**, Prof^a Dr^a **Aline Ambrósio** pela convivência e aprendizado. A todos os professores da FMVZ/USP que retornei a conviver após longa data.

A todos os meus “Mestres” da MTC, amigos e colegas praticantes da acupuntura.

A todos os amigos e companheiros de pós-graduação, cujo apoio, convivência, aprendizado e incentivo ajudaram a superar as dificuldades.

Às médicas veterinárias do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais, FMVZ/USP, **Andressa Gianotti Campos**, **Patrícia Ferreira de Castro**, **Sandra Aparecida Rosner**,

Tatiana Soares da Silva e Viviane Sanchez Galeazzi pelo companheirismo, apoio e aprendizado. Obrigada pela ajuda por mais um estudo clínico!

A todos os veterinários (as) e residentes do HOVET, pelo auxílio no projeto.

Ao médico veterinário **Salvador Rocha Urtado e Helena Arantes do Amaral** pelas dicas e ensinamentos nas coletas de LCR.

Aos queridos e prestativos enfermeiros **Cledson Lélis dos Santos, Jesus dos Anjos Vieira, José Miron Oliveira da Silva, Maurício Pavão de Oliveira, Otávio Rodrigues dos Santos**. A todos os funcionários do HOVET pela ajuda e convivência.

A todos os amigos e colegas veterinários que incentivam e confiam no meu trabalho.

Aos secretários do Departamento de Cirurgia, **Alessandra Aparecida Araújo de Sousa e Belarmino Ney Pereira**, pelo esforço e apoio para solucionar nossos problemas burocráticos.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ/USP pela ajuda na execução deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo auxílio e atenção prestados.

RESUMO

HAYASHI, A. M. **Investigação dos níveis da proteína S100 β (técnica de *Western blot*) no líquido de cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar submetidos à eletroacupuntura.** [S100 β Western blotting searching in cerebrospinal fluid of dogs with thoracolumbar intervertebral disk disease submitted by electroacupuncture treatment]. 2010.109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O tratamento da afecção de disco intervertebral tóraco-lombar com eletroacupuntura tem o objetivo de analgesia e reabilitação motora e sensorial. As melhoras funcionais observadas após lesão medular decorrem de fenômenos de plasticidade sináptica, correspondendo a um mecanismo compensatório e não de reparo estrutural. S100 β é considerado um fator neurotrófico glial que pode estar relacionado a estas alterações. Durante o período de fevereiro de 2007 a junho de 2008 foi realizado um estudo clínico prospectivo em cães com extrusão de disco intervertebral (n=10) submetidos à eletroacupuntura (grupo EA) sem o uso de corticosteróides. Foram coletadas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) destes animais em dois momentos: durante o exame de mielografia e/ou tomografia computadorizada (M1) e após 35.5 $\pm$ 21.33 dias de tratamento (M2). Níveis de S100 β foram investigados no LCR de cães do grupo EA através da técnica de *Western blot*. LCR de cães sem sinais neurológicos (grupo normal, n=7) foram utilizados para comparação. Para a análise estatística, com nível de significância de 5%, foram utilizadas ANOVA para medidas repetidas e medidas independentes e comparação múltipla de Bonferroni, teste t-Student para a comparação entre duas médias e correlação linear de Pearson para as variáveis quantitativas. Todos os animais do grupo EA, graus de lesão 3 a 5, obtiveram melhora neurológica crescente e significativa (P-valor <0.001) através da Escala Funcional Numérica (EFN) nos M1 e M2 e M3 (momento da última avaliação). O grupo EA foi dividido em grupo A - cães com retorno à locomoção em até 30 dias (6.7 $\pm$ 7.89; n=7) e grupo B - após 30 dias (76 $\pm$ 17.06; n=3) do tratamento. Níveis de S100 β (Média $\pm$ DP) em cães do grupo A foram superiores no M1 (P-valor=0.0107) em relação ao M2 e grupo normal, mas entre M2 e grupo normal não houve diferença significativa (P-valor=0.423). No entanto, níveis de S100 β em cães do grupo B foram superiores no M2 (P-valor=0.039) em relação ao M1 e normal, e não houve diferença significativa entre M1 e grupo normal (P-valor=0.756). Níveis de S100 β no M1 não diferiram (P-valor=0.069) entre os grupos A e B. Entretanto, níveis de S100 β no M2 em cães do grupo B foram superiores (P-valor=0.032) ao M2 em cães do grupo A. Não houve correlação dos

níveis de S100 β no M1 com idade ($r^2=0.2042$, P-valor=0.189); peso ($r^2=0.02634$, P-valor=0.654), evolução clínica ($r^2=0.0062$; P-valor=0.828), tempo de retorno à locomoção ($r^2=0.2522$; P-valor=0.139) e extensão da extrusão ($r^2=0.0345$; P-valor=0.607). Níveis de S100 β no M1 não apresentaram diferenças significativas entre os graus de lesão 3, 4 e 5 (P-valor=0.931); entre o grupo com escores de compressão extradural 1 e 2 comparado com grupo com escore de compressão 3 (P-valor=0.771); entre grupo de cães com EFN<10 e EFN>10 (P-valor=0.520) e entre grupo de cães com escores de nº de lesões 1, 2, 3 e 4 (P-valor=0.526). Níveis de S100 β no M2 não apresentaram diferenças significativas com a evolução clínica ($r^2=0.0304$; P-valor=0.629), extensão da extrusão ($r^2=0.0158$; P-valor=0.729), entretanto houve uma tendência a correlação com o tempo de retorno à locomoção ($r^2=0.3852$; P-valor=0.055). A eletroacupuntura promoveu uma modulação dos níveis de S100 β detectados no LCR de cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar. A eletroacupuntura induziu aumento de S100 β no LCR de cães com recuperação motora tardia sugerindo sua contribuição na plasticidade neural após injúria da medula espinhal devido à extrusão de disco intervertebral.

Palavras-chave: Eletroacupuntura. Extrusão de disco intervertebral. S100 β . *Western blotting*. Medicina tradicional chinesa.

ABSTRACT

HAYASHI, A. M. **S100 β Western blotting searching in cerebrospinal fluid of dogs with thoracolumbar intervertebral disk disease submitted by electroacupuncture treatment.** [Investigação dos níveis da proteína S100 β (técnica de *Western blot*) no líquido de cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar submetidos à eletroacupuntura]. 2010. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Electroacupuncture treatment in dogs with thoracolumbar disk disease has the purpose of analgesia, motor and sensorial rehabilitation. The functional improvements observed after spinal cord lesion are resulting of synaptic plasticity. This fact is a result of compensatory mechanisms and not structural repair. S100 β is considered a glial neurotrophic factor. It can be involved with these improvements. A prospective clinical study during February 2007 to June 2008 evaluated electroacupuncture (EA) treatment (group EA) in dogs with thoracolumbar disk extrusion (n=10) without corticosteroids. Cerebrospinal fluids (CSF) were collected from these animals in two time points: during the myelography and/or computed tomography (M1) and after 35.5 ± 21.33 (Mean $\pm$ SD) days after EA treatment (M2). S100 β levels in CSF were investigated in dogs of group EA by Western blot. CSF of dogs without neurological signs (group normal; n=7) were used for comparisons. For the statistical analysis, significant level of 5%, ANOVA for repeated and not repeated variables (post-test Bonferroni's), Student-t test for two variables comparisons and Pearson's linear correlation for quantitative variables, were used. All dogs (group EA) with lesion levels of dysfunction 3 to 5, reached neurological improvements with significant higher scores (P-value<0.001) from a functional numerical score (FNS) at each successive time points (M1; M2; M3 – last evaluation). Group EA dogs were divided in group A - dogs with return of ambulation before 30 days (6.7 ± 7.89 ; n=7) and group B - after 30 days (76 ± 17.06 ; n=3). S100 β levels (Mean $\pm$ SD) in group A dogs were higher in M1 (P-value=0.0107) than M2 and group normal, and there was not significant difference between M2 and group normal (P-value=0.423). Although, S100 β levels in group B dogs were higher in M2 (P-value=0.039) than M1 and group normal, and there was not significant difference between groups B M1 and normal (P-value=0.756). S100 β levels in M1 were not different (P-value=0.069) between dogs of group A and B. However, S100 β levels at M2 in group B dogs were significantly higher (P-value=0.032) than group A. The S100 β levels in M1 have no correlation with age ($r^2=0.2042$; P-value=0.189); weight ($r^2=0.0263$; P-value=0.654), duration of clinical signs ($r^2=0.0062$; P-

value=0.828), time of ambulation return ($r^2=0.2522$; P-value=0.139) and extrusion length ($r^2=0.0345$; P-value=0.607). There were no associations between S100 β levels at M1 and lesion levels of dysfunction 3, 4 e 5 (Pvalue=0.931); between extradural compression scores 1 and 2 compared with score 3 (Pvalue=0.771); between dogs with FNS<10 and FNS>10 (Pvalue=0.520) and between group of dogs with number of lesions scores 1, 2, 3 and 4 (Pvalue=0.5262). S100 β levels at M2 have no correlation with duration of clinical signs ($r^2=0.0304$; Pvalue=0.629), extrusion length ($r^2=0.0158$; P-value=0.729), however there was a tendency of correlation with time of ambulation return ($r^2=0.3852$; Pvalue=0.055). Electroacupuncture can modulate the S100 β levels in CSF of dogs with thoracolumbar disk extrusion. Electroacupuncture up-regulated S100 β in CSF of dogs with late motor rehabilitation. This fact suggests its contribution in the neural plasticity after spinal cord lesion due to intervertebral disk extrusion.

Key words: Electroacupuncture. Intervertebral disk disease. S100 β . Western blotting. Chinese traditional medicine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1– Valores (Média±DP) dos escores obtidos da Escala Funcional Numérica (EFN) de todos os cães do grupo EA tratados com eletroacupuntura (n=10) nos momentos 1, 2 e 3. P-valor<0,0001 (Análise de variância para medidas repetidas – ANOVA entre todos os momentos, nível de significância 5%). *P-valor<0,001 (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre M1 e M2). #P-valor<0,001 (entre M1 e M3). **Pvalor<0,05 (entre M2 e M3). FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 63
- Figura 2 - Representação da melhora neurológica através da Escala Funcional Numérica (EFN) nos momentos 1 (M1), 2 (M2) e 3 (M3) e distribuição conforme grau de lesão 3 a 5 do grupo EA. Comparação da EFN entre M1 e M2 com grau de lesão 3 (Pvalor<0,05); comparação da EFN entre M1 e M2 com grau de lesão 4 (Pvalor<0,001), ambos com ANOVA e teste de Bonferroni. FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 63
- Figura 3 – Representação do tempo de retorno à locomoção (em dias) dos cães (1 a 10) do grupo EA tratados com eletroacupuntura. FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 64
- Figura 4 – Valores (Média±DP) dos escores obtidos da Escala Funcional Numérica (EFN) de todos os cães do grupo EA, subgrupo A, tratados com eletroacupuntura com recuperação antes 30 dias (n=7) nos momentos 1, 2 e 3. Pvalor=0,0001(ANOVA entre todos os momentos, nível de significância 5%). *P-valor<0,001 (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre M1 e M2). #P-valor<0,001 (entre M1 e M3). P-valor=0,116 (entre M2 e M3). FMVZ/USP - São Paulo, 2010..... 65
- Figura 5 – Valores (Média±DP) dos escores obtidos da Escala Funcional Numérica (EFN) de todos os cães do grupo EA, subgrupo B, tratados com eletroacupuntura com recuperação após 30 dias (n=3) nos momentos 1, 2 e 3. P-valor=0,002 (ANOVA entre todos os momentos, nível de significância 5%). *P-valor<0,05 (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre M1 e M2). #Pvalor<0,01 (entre M1 e M3). P-valor>0,05 (entre M2 e M3). FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 66
- Figura 6 – Valores (Média±DP) de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100β no líquido em relação ao grupo EA, cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura (n=10), nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) (comparados pelo teste t-Student para medidas pareadas, com p = 0,405) e grupo normal (n=7)(*comparação entre EA M1 e Grupo Normal com p = 0,039 e entre EA M2 e Grupo normal com p = 0,116, ambas comparações feitas pelo teste t-Student para medidas independentes) - FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 67

- Figura 7 – Comparação dos valores de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100 β no líquido entre cães do grupo EA (cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura) no momento 1 (M1) do grupo A com recuperação até 30 dias com o grupo B com recuperação após 30 dias do tratamento. P-valor=0,069 (Teste t-Student). FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 68
- Figura 8 – Comparação dos valores de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100 β no líquido entre cães do grupo EA (cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura) no momento 2 (M2) que tiveram recuperação até 30 dias (A) com os que tiveram recuperação após 30 dias do tratamento (B). *P-valor=0,032 (Teste t-Student). FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 68
- Figura 9 – Valores (Média $\pm$ DP) de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100 β no líquido em relação ao grupo EA, subgrupo A, cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura com recuperação até 30 dias do tratamento (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) e grupo normal (n=7). P-valor=0,0107 (ANOVA para medidas independentes entre todos os grupos). *P-valor=0,008 (Teste t-Student para medidas pareadas entre M1 e M2). #P-valor=0,01 (Teste t-Student para medidas pareadas entre grupos A M1 e normal). P-valor=0,423 (Teste t-Student para medidas independentes entre grupo A M2 e normal). FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 69
- Figura 10 – Valores (Média $\pm$ DP) de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100 β no líquido em relação ao grupo EA, subgrupo B, cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura (n=3) com recuperação após 30 dias do tratamento nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) e grupo normal (n=7). P-valor=0,039 (ANOVA para medidas independentes entre todos os grupos). *P-valor=0,016 (Teste t-Student para medidas pareadas entre M1 e M2). P-valor= 0,756 (comparação entre grupos B M1 e normal) e #P-valor= 0,022 (comparação entre grupos B M2 e normal), ambos com teste t-Student para medidas independentes - FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 70
- Figura 11 – A) Resultado ilustrado dos níveis da proteína S100 β pela técnica de *Western blot* do cão do grupo normal; M2 e M1, respectivamente do animal 1 do grupo EA, subgrupo A tratado com eletroacupuntura. B) Resultado ilustrado dos níveis da proteína S100 β pela técnica de *Western blot* do animal do grupo normal; M1 e M2, respectivamente do cão 3 do grupo EA, subgrupo B tratado com eletroacupuntura e que teve recuperação após 30 dias - FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 70
- Figura 12 – Imagens digitalizadas: A) Exame tomográfico simples (com seleção de janela e nível para avaliação de tecidos moles) do cão 7 com escore de

compressão 1 em T11-12. Exames tomográficos após a mielografia (B e C). B) Seleção de janela e nível para avaliação de tecido ósseo do cão 2 com escore de compressão 2 em T11-12. Houve interrupção da progressão da coluna de contraste que não foi visibilizada neste corte. C) Seleção de janela e nível para avaliação de tecido ósseo do cão 4 com escore de compressão 3 em L1– Serviço de Diagnóstico por Imagem – FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 71

Figura 13 – Imagens digitalizadas de exames tomográficos após a mielografia demonstrando a extrusão do disco intervertebral com interrupção da coluna de contraste exceto na imagem C. A) Cão 1 - Extrusão ventrolateral direita com compressão de 50% em T11-12. B) Cão 3- Extrusão ventrolateral direita com compressão de 50% em T12-13. C) Cão 5- Extrusão ventrolateral direita com compressão de 50% em T12-13. D) Cão 6 - Extrusão ventral com compressão de mais de 50% em L1-2. E) Cão 8 - Extrusão ventrolateral direita com compressão de 25 a 50% em L1-2 -25 a 50%. F) Cão 8 - Extrusão ventral com compressão de 25% em L3-4. G) Cão 8 - Extrusão ventral com compressão de 25% em L4-5. H) Cão 9 - Extrusão ventrolateral esquerda com compressão de 50% em T13-L1. I) Cão 10 - Extrusão dorsolateral esquerda com compressão de mais de 50% em T12-13 - Serviço de Diagnóstico por Imagem – FMVZ/USP – São Paulo, 2010..... 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Análise estatística descritiva dos dados obtidos dos cães do grupo EA submetidos à eletroacupuntura no Momento 1 em relação à peso, idade, escore da escala funcional numérica (EFN), grau de lesão (GL), tempo de evolução clínica (Evol Clin) e tempo de retorno à locomoção em dias (RL) após eletroacupuntura – FMVZ/USP - São Paulo, 2010..... 62
- Tabela 2 – Análise estatística descritiva dos dados obtidos na mielografia e tomografia computadorizada (TC) dos cães do grupo EA submetidos à eletroacupuntura no Momento 1 em relação ao escore de compressão, escore do número de lesões (extrusões) e extensão da extrusão – FMVZ/USP - São Paulo, 2010..... 62
- Tabela 3 – Comparação dos dados obtidos no Momento 1 nos cães com extrusão de disco intervertebral submetidos à eletroacupuntura e que retornaram à locomoção antes (grupo A) e após 30 dias (grupo B) do tratamento – FMVZ/USP - São Paulo, 2010..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância
aFGF	Fator de crescimento fibroblástico ácido
B	Meridiano ou Canal da Bexiga
BBB	Teste Basso Beattie e Bresnahan
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina de soro bovino
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BP	Meridiano ou Canal do Baço-Pâncreas
C	Vértebra cervical
CBS	Escore de comportamento combinado
Cd	Vértebra coccígea
CGRP	Peptídeo calcitonina-gene-relacionado
DP	Desvio padrão
E	Meridiano ou Canal do Estômago
EA	Eletroacupuntura
EC	tempo de evolução clínica
EFN	Escala Funcional Numérica
F	Meridiano ou Canal do Fígado
FM/USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GL	grau de lesão
HOVET	Hospital Veterinário
ID	Meridiano ou Canal do Intestino Delgado
IG	Meridiano ou Canal do Intestino Grosso
IL1 β	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
Kda	Quilodaltons
L	Vértebra lombar
LCR	Líquido cefalorraquidiano

M1	Momento 1
M2	Momento 2
M3	Momento 3
Md	Valores da mediana
MP	Membro pélvico
MT	Membro torácico
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
n°	Número
NT3	Neurotrofina 3
NT6	Neurotrofina 6
NGF	Fator de crescimento neuronal
NMI	Neurônio Motor Inferior
NMS	Neurônio Motor Superior
P	Meridiano ou Canal do Pulmão
PC	Meridiano ou Canal do Pericárdio
R	Meridiano ou Canal do Rim
RL	Tempo de retorno à locomoção em dias
S	Vértebra sacral
S100 β	Proteína S100 beta
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS – PAGE	Gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
T	Vértebra torácica
TA	Meridiano ou Canal do Triplo Aquecedor
TBS-T	Solução tampão salina, Trizma e detergente Tween 20
TC	Tomografia computadorizada
TGF β	Fator de crescimento tumoral beta
VB	Meridiano ou Canal da Vesícula Biliar
VG	Meridiano ou Canal do Vaso Governador
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

LISTA DE SÍMBOLOS

W	watts
μV	micro volts
Hz	hertz
β	beta
%	porcentagem
P-valor	valor da estatística p
=	igual
>	maior
<	menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	AFEÇÃO DEGENERATIVA DO DISCO INTERVERTEBRAL	25
2.2	ACUPUNTURA	30
2.2.1	Bases neurofisiológicas e indicações da acupuntura para desordens neurológicas	32
2.2.2	Acupuntura e discopatia intervertebral	40
2.3	PERSPECTIVAS DE RECUPERAÇÃO DA INJÚRIA MEDULAR	42
2.4	PROTEÍNA S100 β	46
3	OBJETIVO	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	52
4.2	PROTOCOLO DE ACUPUNTURA	52
4.3	AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DO GRUPO EA	54
4.4	COLETA DE DADOS	56
4.5	MOMENTOS DE AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM ELETROACUPUNTURA	56
4.6	AVALIAÇÃO DA COMPRESSÃO EXTRADURAL DA MEDULA ESPINHAL DO GRUPO EA	56
4.6.1	Escore de avaliação de compressão extradural da medula espinhal e de conteúdo de material opacificado no canal vertebral por meio da tomografia computadorizada associada ou não à mielografia	57
4.6.2	Escore de avaliação quanto ao número de espaços intervertebrais comprometidos por compressões extradurais da medula espinhal	57
4.7	DOSAGENS DA PROTEÍNA S100 β E COLETA DO LÍQUOR DO GRUPO EA E NORMAL	58
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5	RESULTADOS	61

5.1	Análise estatística dos cães do grupo EA.....	61
5.2	Detecção dos níveis da proteína S100 β no líquido de cães do grupo EA e grupo normal	67
5.3	Correlação e associação dos níveis da proteína S100 β com parâmetros clínicos e de imagem	70
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICES	104

1 INTRODUÇÃO

A acupuntura é um método terapêutico milenar da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), e consiste na estimulação sensorial periférica, provocando liberação de neuropeptídeos local e a distância, devido envolvimento do SNC e SNP (DAWIDSON et al., 1999). A aceitação desta modalidade de tratamento tem sido grande na medicina (CARNEIRO, 2001) assim como no campo da medicina veterinária (KLIDE; KUNG, 1977; DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1994; SCHOEN, 1994; LÓPEZ; BUENDIA, 1990). A estimulação periférica pode acelerar a liberação de fatores de crescimento neural tendo implicações clínicas evidentes e importantes, podendo estar relacionada com a eletroacupuntura (JI-SHENG HAN, 2003).

A afecção de disco intervertebral tóraco-lombar representa uma das moléstias músculo-esqueléticas degenerativas mais comuns na prática veterinária (OLBY; DYCE; HOULTON, 1994; MCDONNELL; SIMON; CLAYTON, 2001). Os sinais clínicos variam desde uma hiperestesia a paraplegia com ou sem percepção da sensibilidade dolorosa e acompanhada ou não de retenção urinária. Em alguns casos podem-se observar sintomas suspeitos de mielomalácia (JANSSENS, 1992; PADILHA FILHO; SELMI, 1999; COATES, 2000). A grande variação de sintomas ocorre devido a graus diferentes de concussão, compressão e/ou isquemia na medula espinhal (JANSSENS, 1991; COATES, 2000). Em relação à abordagem terapêutica, há o tratamento conservador e cirúrgico, sendo citada acupuntura, repouso, medicamentos antiinflamatórios e técnicas de descompressão cirúrgicas como a laminectomia e hemilaminectomia (JANSSENS, 1983, 1985, 1992; STILL, 1989; OLBY; DYCE; HOULTON, 1994; NECAS, 1999; PADILHA FILHO; SELMI, 1999; SHARP; WHEELER, 2005).

A acupuntura pode ser utilizada em afecções do disco intervertebral tóraco-lombar com o intuito de controlar a dor, normalizar a função motora e sensorial e alterações na micção (STILL, 1989), sendo que a melhora pode ser observada a partir de uma semana até 6 meses, na dependência do grau de lesão nervosa (JANSSENS, 1992). Pode atuar também acelerando a cicatrização tecidual e ter efeito antiinflamatório (ROGERS; SCHOEN; LIMEHOUSE, 1992) e na reabilitação em casos de paraplegia e espasticidade (GADULA, 1999). Hayashi; Matera; Fonseca Pinto (2007) comprovaram em estudo clínico controlado a eficácia da eletroacupuntura associada ao tratamento médico em cães com discopatia intervertebral tóraco-lombar. A associação da eletroacupuntura antecipou o retorno à

locomoção e o estado neurológico em comparação ao grupo que não recebeu o estímulo da acupuntura.

O grande desafio da neurologia tem sido vencer a falta de regeneração espontânea do sistema nervoso central (SNC) adulto após perda de neurônios e/ou a interrupção de seus prolongamentos, representados pelos axônios. As melhoras funcionais observadas após lesão medular decorrem de fenômenos de plasticidade sináptica, correspondendo a um mecanismo compensatório e não de reparo estrutural. Portanto, o foco de estudos científicos tem concentrado no desenvolvimento e aplicação de estratégias para ampliar o potencial regenerativo dos neurônios lesados (GEBRIN et al., 1997).

Por outro lado os progressos em pesquisas de neurociência tornam plausível a idéia do reparo da injúria da medula espinhal (MCDONALD; SADOWSKY, 2000). As neurotrofinas representam fatores de diferenciação e sobrevivência com profundos efeitos no SNC e sistema nervoso periférico (SNP). Estes fatores, isolados ou em combinação, estão em constante investigação como agentes de tratamento para desordens degenerativas e injúria nervosa. São capazes de promover sobrevivência e diferenciação de neurônios sensoriais (EBADI et al., 1997).

Após um trauma medular ocorre uma neurodegeneração secundária nos tecidos lesionados subjacentes. Os eventos envolvidos no reparo tecidual podem transformar uma contusão parcial de uma injúria medular a uma transecção completa ou em contrapartida, pode desencadear neuroregeneração, capaz de mudar o curso no processo de reabilitação. A glia, ou seja, astrócitos e microglia, na medula espinhal podem regular o desenvolvimento, manutenção da homeostase e função celular e participar de respostas após injúrias aguda e crônica. Há interesse recente em fatores neurotróficos gliais, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF e FGF-2) e proteína S100 β relacionados a eventos após injúria do prosencéfalo. Entretanto, foram observados níveis elevados de FGF-2 e S100 β em astrócitos reativos após contusão da medula espinhal, porém não na microglia ativada, correlacionando a importância deles também nos eventos de reparação e cicatrização e respostas tróficas parácrinas mediadas por astrócitos na medula espinhal lesionada (CUNHA et al., 2007).

No líquido cefalorraquidiano (LCR) há marcadores específicos de lesão em tecido nervoso que são proteínas derivadas de células gliais e que podem ter seus níveis aumentados após uma injúria (BRISBY et al, 1999). Recentemente há grande interesse na análise de marcadores séricos para monitorar a destruição tecidual subclínica nas doenças do SNC. A monitorização de proteínas específicas de neurônios ou da astroglia, como a proteína S100 β , na corrente sanguínea tem sido demonstrada como mensuração sensível para avaliar o nível

de injúria cerebral traumática, infarto cerebral, hemorragia intracraniana, progressão de neoplasia cerebral, lesão cerebral após marca-passo cardiopulmonar, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Creutzfeld-Jakob, esclerose múltipla, injúria da medula espinhal, tanto em pacientes humanos com lesão de medula espinhal como em animais experimentais (OTTO et al., 1997; BRISBY et al., 1999; JIANJUN MA et al., 2001; ROTHERMUNDT et al., 2003; LOY et al., 2005; TANAKA et al., 2007).

A proteína S100 β não é normalmente mensurável na corrente sanguínea devido à barreira hemato-encefálica. Na teoria os marcadores séricos representam uma opção atrativa para a avaliação da perda tecidual e sua correlação com o estado neurológico e prognóstico de indivíduos com injúria aguda da medula espinhal (LOY et al., 2005). Por outro lado, alguns autores relatam que há diversos problemas metodológicos acerca da mensuração de S100 β no soro. Há necessidade de investigação da S100 β no LCR para confirmar sua origem do SNC ou o estabelecimento de uma razão soro/LCR para as diversas afecções, sendo que neste caso uma ampla amostra dever ser investigada.

Observa-se que faltam estudos clínicos correlacionando os prováveis mecanismos de ação ou fatores neurotróficos liberados ou modulados pela eletroacupuntura em cães com extrusão do disco intervertebral tóraco-lombar e que tenham uma relação com um provável reparo da injúria medular e regeneração nervosa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os dados obtidos em literatura foram divididos em afecção degenerativa do disco intervertebral, acupuntura, perspectivas de reparação da injúria medular e proteína S100 β .

2.1 AFECÇÃO DEGENERATIVA DO DISCO INTERVERTEBRAL

A degeneração do disco intervertebral representa uma moléstia sistêmica e músculo-esquelética que pode provocar lesão da medula espinhal através da protusão ou extrusão do núcleo pulposo para o interior do canal medular (BRAUND, 1986; COATES, 2000). Há considerável controvérsia na literatura veterinária em relação ao diagnóstico e tratamento da discopatia intervertebral. Os animais apresentam alterações neurológicas de graus variados (COATES, 2000). Com o intuito de auxiliar no diagnóstico e planejamento terapêutico, é de extrema relevância a compreensão da anatomia e fisiopatologia da discopatia intervertebral (JERRAM; DEWEY, 1999).

A maioria das extrusões em cães ocorre na área tóraco-lombar (85%), seguida da região cervical (15%) e lombo-sacra (2%). Dentre as lesões na região tóraco-lombar, 80% ocorrem na região entre as vértebras T11 e L3 (BRAUND, 1986). Hayashi (2006) observou que em 32 cães com discopatia intervertebral tóraco-lombar, 34,38% das lesões ocorreram entre T11-T12 e 21,88% em T13-L1.

As alterações degenerativas do disco intervertebral nas raças condrodistróficas ocorrem de forma precoce. Ao redor de 2 meses de idade, os discos intervertebrais destes cães sofrem metaplasia condróide que se completa por volta de 1 ano de idade. O processo envolvido decorre de uma diminuição de glicosaminoglicanas e um aumento de colágeno. Estudo sobre a composição estrutural do núcleo pulposo sugere uma predisposição genética a doença degenerativa do disco intervertebral (COATES, 2000).

Durante a degeneração do disco ocorre uma desidratação e invasão por cartilagem hialina no núcleo pulposo. Após este processo, ocorre a mineralização, alterando a característica gelatinosa para uma substância arenosa e seca, promovendo uma redução da propriedade hidrostática do núcleo pulposo e um enfraquecimento das fibras do anel fibroso.

Este fato predispõe a futuras protusões e extrusões do disco intervertebral (NECAS, 1999; SHARP; WHEELER, 2005).

A metaplasia fibróide é outra forma de degeneração e ocorre com frequência em outras raças e em animais idosos, devido a um aumento no conteúdo de glicoproteína não colagenosa, sendo rara a ocorrência de calcificação do disco (LECOUTEUR; CHILD, 1992). Este processo degenerativo no núcleo pulposo altera as propriedades mecânicas do disco e provoca microrupturas do anel fibroso que pode levar a uma saliência do anel dentro do canal vertebral, ou seja, uma protusão (JANSSENS, 1992), nem sempre correlacionado a sinais clínicos. Ocorre também a desidratação do núcleo pulposo com a invasão característica de tecido fibrocartilaginoso (SHARP; WHEELER, 2005).

Estas lesões também são denominadas de hérnia de disco. Existem dois tipos de herniações. A hérnia de Hansen tipo I ou extrusão acomete principalmente raças como Dachshund, Poodle, Cocker, Pequinês, representantes das raças condrodistróficas. A apresentação clínica ocorre entre 3 a 6 anos e é decorrente de uma ruptura do anel fibroso dorsal e projeção do material do núcleo pulposo para dentro do canal vertebral, ocasionando frequentemente uma compressão aguda, mas em alguns casos pode ter apresentação mais lenta. Esta projeção pode ser de grau mínimo associado a lesões inflamatórias ou ocorre de forma massiva com importante compressão da medula espinhal e raízes nervosas. A hérnia de Hansen tipo II ou protusão acomete com maior frequência raças não condrodistróficas e de maior faixa etária, sendo a compressão de ocorrência lenta, acarretando pressão na medula espinhal ou raízes nervosas além de reação local inflamatória (JANSSENS, 1992; LECOUTEUR; CHILD, 1992; COATES, 2000).

A fisiopatologia da extrusão e protusão do disco intervertebral são bem descritas em literatura. Causam primariamente lesão da medula espinhal e sinais neurológicos clínicos devido à concussão ou compressão da mesma (HOERLEIN, 1953; COATES, 2000).

Podem ocorrer mudanças patológicas secundárias na medula espinhal. Estas são representadas pela mielopatia compressiva e mielomalácia com desmielinização dos funículos ventral, lateral e dorsal. A degeneração Walleriana pode estar presente nos segmentos espinhais acima e abaixo da lesão nos tratos ascendentes e descendentes. Como resultado do processo de degeneração neuronal há uma reação inflamatória formada primariamente por macrófagos e desenvolvimento de astrócitos fibrosos (COATES, 2000).

A mielomalácia corresponde a uma liquefação da medula espinhal, sendo um processo autodestrutivo, com indício de ser um estágio final dos processos circulatórios e isquêmicos, estendendo-se do local do impacto para a região ascendente ou descendente da medula

espinhal. No entanto, sua patogenia é desconhecida, mas provavelmente reflexo de uma lesão extensa da vascularização intramedular acompanhada por infarto hemorrágico ou não hemorrágico (COATES, 2000). É de ocorrência rara (JERRAM; DEWEY, 1999) e associada com um tipo de extrusão discal denominada de tipo 3 de Funkquist, caracterizada pela extrusão do núcleo disseminada ao longo do espaço epidural por uma distância de uma ou mais vértebras, podendo circundar ou penetrar a dura-máter. Além disso, a mielomalácia está associada a uma hemorragia nos espaços extradural e subaracnóideo e parênquima da medula espinhal (COATES, 2000).

Os sinais clínicos de extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar são variáveis devido à intensidade da lesão, ou seja, do grau de compressão mecânica, hemorragia e/ou peroxidação lipídica seguida da isquemia da substância branca e cinzenta da medula espinhal, e em casos extremos, necrose (FERREIRA; CORREIA; JAGGY, 2002).

Embora a extrusão aguda na região tóraco-lombar geralmente acarreta em disfunção neurológica grave como paraparesia a paraplegia associada ou não a disfunção urinária, pode-se observar apenas dor na região espinhal, embora não tão intensa como ocorre na região de disco intervertebral cervical (JERRAM; DEWEY, 1999; SHARP; WHEELER, 2005).

Portanto os animais com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar podem ser classificados em diferentes graus de acordo com os sinais clínicos e neurológicos presentes (JANSSENS, 1992; OLBY; DYCE; HOULTON, 1994; YOYOVICH; EGER, 1994; COATES, 2000):

- ✓ GRAU 1 – caracterizam os cães que apresentam somente dor ou hiperestesia toraco-lombar e sem disfunção neurológica detectável clinicamente. Os animais apresentam ambulação lenta e com relutância em pular ou subir escadas e algumas vezes podem manifestar constipação e cifose. A vocalização pode ocorrer ao pequeno movimento ou quando são carregados. Devido a uma provável irritação de raízes nervosas e meninges pode ocorrer dor à palpação da região. Pode se observado espasmo da musculatura da região.
- ✓ GRAU 2 – Podem ocorrer os sintomas anteriores associados a uma paraparesia, ou seja, perda parcial da função motora, deficiência da propriocepção consciente e presença de percepção da sensibilidade dolorosa profunda. Ao exame clínico o animal pode manifestar lesão de neurônio motor superior no membro pélvico, ou seja, aumento dos reflexos espinhais. No entanto possuem capacidade de locomoção.
- ✓ GRAU 3 – os cães podem apresentar hiperalgesia tóraco-lombar, paraparesia e incapacidade de locomoção, porém ainda está presente a percepção da sensibilidade

dolorosa profunda. Podem ser observadas retenção urinária e extravazamento da urina pelo excesso de conteúdo. Não há capacidade de sustentação do peso e manutenção da postura em estação, mas os animais apresentam movimentos voluntários dos membros pélvicos. O cão pode manifestar lesão de neurônio motor superior no membro pélvico. Há presença de deficiência na propriocepção consciente.

- ✓ GRAU 4 – a hiperalgesia tóraco-lombar pode estar presente. Ocorre a paraplegia, ou seja, ausência da função motora em membros pélvicos e, portanto ausência de movimentos voluntários. No entanto, há preservação da percepção da sensibilidade dolorosa profunda, mas os animais podem apresentar retenção urinária e incontinência. Ocorre lesão de neurônio motor superior no membro pélvico e deficiência da propriocepção consciente.
- ✓ GRAU 5 – pode ocorrer hiperalgesia tóraco-lombar, mas estarão presentes a paraplegia e ausência de controle da micção e perda da percepção da sensibilidade dolorosa profunda. Ocorre lesão de neurônio motor superior no membro pélvico e deficiência da propriocepção consciente.

Os sinais neurológicos da mielomalácia incluem a tetraplegia, arreflexia e analgesia. A principal suspeita de mielomalácia ascendente é a perda ascendente do reflexo tronco-cutâneo ou panículo. Geralmente ocorre falência respiratória dentro de poucos dias (COATES, 2000), e segundo Jerram e Dewey (1999) pode ocorrer entre 3 a 10 dias. A incidência da mielomalácia corresponde de 3% a 6% em cães que apresentam a extrusão tóraco-lombar (COATES, 2000).

O diagnóstico inicial da extrusão do disco intervertebral pode ser obtido através da combinação de sinais clínicos, história, exames clínico e neurológico, radiografias simples e contrastadas do canal medular (mielografia), tomografia computadorizada e ressonância magnética (LECOUTEUR; CHILD, 1992; SANDE, 1992; OLBY; DYCE; HOULTON, 1994; DUVAL et al., 1996; COATES, 2000).

Quando as radiografias simples não caracterizam bem a extrusão discal ou há discordância de localização neuroanatômica, presença de lesões múltiplas, indecisão entre tratamento conservador e indicação de cirurgia descompressiva, é realizada a técnica da mielografia. Ocorre opacificação do espaço subaracnóide e pode demonstrar a compressão extra-dural da medula espinhal (OLBY; DYCE; HOULTON, 1994; COATES, 2000). Alguns estudos citam que radiografias simples foram eficazes em 68 a 72% para identificar o local da extrusão discal e a mielografia em 86 a 97% (COATES, 2000). Outro estudo indica que a mielografia lombar é superior do que radiografia simples em identificar a protusão discal

toraco-lombar (OLBY; DYCE; HOULTON, 1994). A tomografia computadorizada sozinha ou em conjunto com a mielografia é mais completa para identificar a lateralização do material discal que sofreu extrusão (COATES, 2000).

O líquido cefalorraquidiano (LCR) circunda o SNC no espaço subaracnóideo. A localização do LCR no interior do SNC ocorre em quatro cavidades conectoras no cérebro, os ventrículos, e no canal central que contém a medula espinhal. Sua produção ocorre dentro dos ventrículos através dos plexos coróides. Seu fluxo ocorre em sentido caudal para o espaço subaracnóideo, entre a membrana aracnóide e pia-máter, onde também ocorre a sua absorção. A função do LCR é proporcionar suporte estrutural e metabólico e uma proteção para o SNC (CHRISMAN et al., 2005).

O exame do LCR é importante para a investigação em pacientes neurológicos, porém apresenta limitações por ser relativamente inespecífico mesmo com anormalidades observadas em análises laboratoriais rotineiras. Para afecções de medula espinhal deve ser analisado em conjunto com outros aspectos. A coleta do LCR deve ser realizada com anestesia geral em pequenos animais. Há dois locais de coleta a serem considerados: cisterna magna e região lombar. Na cisterna magna a coleta é mais fácil e com menor probabilidade de contaminação por sangue. A coleta na região lombar é mais difícil e frequentemente ocorre contaminação com sangue (SHARP; WHEELER, 2005). Aproximadamente 1 ml de líquido a cada 5 kg de peso corpóreo pode ser extraído (CHRISMAN, 1985).

O objetivo do tratamento da discopatia intervertebral consiste no alívio e remissão dos sintomas, além de evitar recidivas do processo. Diversos autores citam vários métodos de tratamento conservador e cirúrgico, envolvendo tratamento medicamentoso, acupuntura, repouso, antiinflamatórios, quimionucleólise e técnicas de descompressão cirúrgica (JANSSENS, 1983, 1985, 1992; STILL, 1989; ALTMAN, 1992; PADILHA FILHO; SELMI, 1999).

A recuperação pode ocorrer em muitos animais, tanto com tratamento cirúrgico como não cirúrgico, inclusive com graus moderados de deficiência neurológica (SHARP; WHEELER, 2005).

O tratamento clínico é usado em todos os casos de acometimento agudo de deficiência neurológica, para a diminuição do edema da medula espinhal e consiste na maioria dos casos do uso de corticosteróide (LECOUTEUR; CHILD, 1992; COUGHLAN, 1993). Deve-se também incluir o repouso absoluto em espaço limitado ou confinamento por no mínimo 2 até 4 semanas, com a finalidade de cicatrização das fissuras do anel fibroso dorsal e evitar extrusão adicional do material discal. O uso de antiinflamatórios em conjunto ao repouso

absoluto é controverso (JANSSENS, 1992; LECOUTEUR; CHILD, 1992). Podem ser usados os corticosteróides como dexametasona, prednisolona e metilprednisolona, ou antiinflamatórios não esteroidais, além de relaxantes musculares como metilcarbamol e diazepam (BRAUND, 1986). Além disso, é necessário o monitoramento da micção e defecação e antibioticoterapia quando necessário (JANSSENS, 1992; LECOUTEUR; CHILD, 1992). O tratamento não cirúrgico é reservado a animais com sinais de grau leve, com presença de dor ou paraparesia média ou moderada e proprietários sem condição financeira (COATES, 2000).

O tratamento cirúrgico é indicado em cães que não melhoram em 24 horas do tratamento conservador, sinais recorrentes ou progressivos de dor e ataxia, paraplegia com presença da percepção da sensibilidade dolorosa profunda ou com a perda da mesma num período inferior a 24 até 48 horas. O tratamento cirúrgico também é instituído se há piora aguda das funções neurológicas, que incluem paresia, paralisia e anormalidades da função de micção urinária (LECOUTEUR; CHILD, 1992; COATES, 2000). Há controvérsia sobre o tratamento em consideração à necessidade de procedimento cirúrgico, o tipo de procedimento e a necessidade da retirada do material da extrusão, e o valor terapêutico da fenestração do disco (NECAS, 1999; PADILHA FILHO; SELMI, 1999). As técnicas cirúrgicas citadas são a laminectomia dorsal, com ou sem durotomia, a hemilaminectomia, mini-hemilaminectomia, pediclectomia e fenestração do disco intervertebral (PADILHA FILHO; SELMI, 1999; COATES, 2000; SHARP; WHEELER, 2005). A recuperação pós-operatória varia conforme o nível de comprometimento nervoso, variando de 24 horas em casos menos severos, até um período de 2 a 3 meses em estados mais graves (YOVICH; READ; EGER, 1994).

2.2 ACUPUNTURA

O tratamento com acupuntura consiste na inserção de agulhas e/ou transferência de calor (moxabustão) em áreas definidas da pele e tecidos adjacentes (acupontos), restabelecendo o equilíbrio de estados funcionais alterados, atingindo a homeostase, através da influência sobre determinados processos fisiológicos (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1994; YAMAMURA, 2001).

Na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) a acupuntura é utilizada para tratar doenças que surgem devido ao desequilíbrio de duas energias, *Yin e Yang*, em regiões diferentes do corpo. O objetivo deste tratamento é o de equilibrar a energia através do estímulo dos pontos de acupuntura localizados nos meridianos (JOSEPH, 1992). Segundo a MTC, *Yin e Yang* são energias opostas e complementares cuja interpretação pode ser resumida em processos de catabolismo representado pelo *Yin* e anabolismo representado pelo *Yang*, ou seja, influência parassimpática e simpática, respectivamente (JAGGAR, 1992). Quando comparada com outras modalidades de tratamento a acupuntura é considerada mais segura devido a sua regulação em duas vias. Quando um ponto de acupuntura é estimulado há respostas fisiológicas que se adaptam às necessidades do organismo naquele momento. Exemplo deste fato é o uso de um mesmo ponto de acupuntura para o tratamento de constipação ou diarreia (HUIHENG XIE; ORTIZ-UMPIERRE, 2006).

Os Meridianos ou Canais são descritos em MTC como condutores de energia pelo organismo. São formados por 12 pares principais e 2 canais, localizados um na linha média dorsal e outro na linha média ventral. Recebem nomenclatura de Pulmão, Intestino Grosso, Estômago, Baço-Pâncreas, Coração, Intestino Delgado, Bexiga, Rim, Pericárdio, Triplo-Aquecedor, Vesícula Biliar e Fígado (HUIHENG XIE; PREAST, 2007). Em outros países, ao invés dos nomes chineses tradicionais dos acupontos, estes são identificados por um código alfanumérico, demonstrando o Meridiano onde se localiza e o seu número sobre o mesmo (SCOGNAMILLO-SZABÓ, 1999).

Os pontos de acupuntura podem ser localizados através do seu relacionamento com músculos, tendões, ossos e os nervos periféricos e influência em segmentos medulares, conforme descrições de diversos autores (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1994; MACIOCIA, 1996; YAMAMURA, 2001; WYNN; MARSDEN, 2003). Quando a agulha de acupuntura é manipulada ocorre uma deformação do tecido conjuntivo (matriz extracelular e fibras de colágeno). Este fato gera uma transmissão de sinal mecânico dentro de fibroblastos e outras células aderidas às fibras de colágeno e uma resposta celular de rearranjo no citoesqueleto, estimulando variados sensores mecanorreceptores e/ou nociceptores. Este efeito é importante, pois não se restringe ao local da agulha de acupuntura, podendo atingir planos de tecido conjuntivo intersticial. Ocorrem também alterações no fluxo sanguíneo, citocinas e/ou fatores de crescimento que resultam na modulação a longo prazo da informação sensorial e o efeito da acupuntura que podem durar horas ou dias (LANGEVIN; CHURCHILL; CIPOLA, 2001).

A eletroacupuntura pode ser utilizada para estimular o ponto de acupuntura. Seu uso se estende a animais, além da técnica clássica descrita. A eletroacupuntura percutânea consiste na aplicação de uma corrente elétrica que é conduzida através das agulhas inseridas, estimulando os pontos de acupuntura (LOPEZ; BUENDIA, 1990; ALTMAN, 1992; DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1994; LUNA, 2002). Considerada mais efetiva do que a acupuntura manual quando se objetiva analgesia. Quando a eletricidade é adicionada a modulação do alívio da dor é 100% mais efetiva (ULETT; SONGPING HAN; JI-SHENG HAN, 1998).

Recentemente a acupuntura foi reconhecida como especialidade veterinária no Brasil (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2001). Desde 1990, várias pesquisas científicas foram feitas, aumentando a aceitação e incorporação desta técnica no protocolo de tratamento de diversas condições. A acupuntura promove efeitos fisiológicos em diversos sistemas internos e pode ser indicada no tratamento de várias doenças que são resistentes aos procedimentos médicos ou cirúrgicos (HAYASHI; MATERA, 2005).

Entretanto, a acupuntura, tanto na medicina como medicina veterinária, não significa a cura para todos os males. Devido a sua abordagem peculiar na saúde e na doença, ela integra outros tratamentos para diversas doenças através de vários mecanismos neurofisiológicos (LOONEY, 2000).

2.2.1 Bases neurofisiológicas e indicações da acupuntura para desordens neurológicas

Nas últimas décadas, especialmente na China, os efeitos da acupuntura são descritos e explicados através da neurofisiologia e observações morfológicas (DING-ZONG WU, 1990).

A transmissão de informação dentro do sistema nervoso é modulada por neurotransmissores. Muitos destes neurotransmissores como as endorfinas, serotonina, norepinefrina e acetilcolina, estão envolvidos na transmissão e inibição da dor. As endorfinas têm sido implicadas como a causa da analgesia e de alguns efeitos sistêmicos induzidos pela acupuntura. Há pelo menos 18 peptídeos endógenos com atividade opióide e que são referidos como endorfinas (SMITH, 1992).

A descoberta dos opióides endógenos e seus receptores representaram um marco para que a analgesia por acupuntura tivesse aceitação através da compreensão de seu mecanismo

de ação. São citados três tipos de endorfinas: encefalina, beta-endorfina e dinorfina (STEISS, 2006). Ji-Sheng Han (2004) cita um quarto tipo de endorfina, a endomorfina.

A beta-endorfina é encontrada na pituitária e no cérebro. Já a encefalina não é encontrada na pituitária e apresenta-se com uma distribuição multifocal no cérebro entre células locais com tratos nervosos curtos. A maior concentração de encefalinas é encontrada ao longo da via de transmissão da dor, como substância cinzenta periaquedutal e periventricular, núcleo magno da rafe, núcleo caudal e substância gelatinosa na medula espinhal. A dinorfina é encontrada nos interneurônios na medula espinhal (SMITH, 1992).

A beta-endorfina está envolvida além do controle da dor, na pressão sanguínea e temperatura do corpo. A sua influência na sensibilidade à dor e nas funções autonômicas é devida à sua liberação após estímulo pela atividade nervosa aferente e inclui o hipotálamo e projeções para o mesencéfalo e núcleos do tronco cerebral. As evidências clínicas e experimentais sugerem que a acupuntura tem influência no sistema simpático via mecanismos hipotalâmicos e do tronco cerebral. Efeitos inibitórios sobre o centro vasomotor ocorrem pelo sistema hipotalâmico da beta-endorfina (STEISS, 2006).

A encefalina apresenta-se sob duas formas, metionina-encefalina ou metencefalina e leucina encefalina ou leuencefalina. Possui menos de 1% da potência da morfina e por ser um peptídeo com cinco aminoácidos são degradadas em segundos a minutos. É responsável pela ativação do sistema inibitório descendente da rafe. Ao nível da medula espinhal, age com a dinorfina para bloquear a transmissão da dor. As dinorfinas são peptídeos maiores compostos por 17 aminoácidos. São liberadas dentro da medula espinhal em respostas a um estímulo elétrico de alta frequência promovendo alívio segmentar da dor. É um opiáceo extremamente poderoso com potência analgésica de 200 vezes ao da morfina (STEISS, 2006).

Outros efeitos sistêmicos dos opiáceos são atribuídos devido à localização de receptores opióides em órgãos como o intestino, podendo resultar na alteração de sua motilidade (STEISS, 2006). Um efeito da acupuntura mediada pela beta-endorfina inclui a inibição da secreção de ácido gástrico. Outras fontes de beta-endorfinas compreendem células imunológicas que podem ter influência na inflamação, sugerindo que as endorfinas não estão envolvidas somente com analgesia. Outros neuropeptídeos podem estimular linfócitos. Deste modo, a acupuntura pode amplificar esta interação de neuropeptídeos e citocinas produzidas por linfócitos, além do conhecido efeito em aumentar a contagem de leucócitos no sangue periférico. Este fato justifica os relatos dos efeitos da acupuntura em condições imunoinflamatórias como na asma brônquial e artrite reumatóide (BONTA, 2002).

A acupuntura influencia o sistema nervoso, fato que tem sido investigado em estudos com pacientes humanos e animais. O estímulo da acupuntura afeta tanto o sistema motor e sensorial do SNC como o sistema nervoso autônomo. Estudos demonstraram que a estimulação com acupuntura exerce seu efeito aumentando a liberação de neuropeptídeos de terminações nervosas e que mimetiza os efeitos do exercício físico (DAWIDSON et al., 1999). A acupuntura ativa receptores ou fibras nervosas no tecido estimulado determinando efeitos nas funções de determinados órgãos. O mesmo ocorre fisiologicamente através de exercícios prolongados e contrações musculares. Assim sendo, tanto a acupuntura como exercício físico produz descargas rítmicas nas fibras nervosas e causam liberação de opióides endógenos e ocitocina. (ANDERSON; LUNDEBERG¹, 1995, apud CARNEIRO, 2001, p. 151-152).

O emprego de técnicas de neuroimagem já registrou a ativação de áreas do SNC sensitivo e motor após o estímulo em pontos clássicos de acupuntura, reforçando a hipótese de que a acupuntura modula a resposta sensitiva e motora decorrente da dor crônica (HONG JIN PAI, 2005). Em um estudo controlado randomizado onde pacientes humanos foram submetidos ao estímulo de eletroacupuntura a 2 Hz no ponto IG4, observou-se a ativação do hipotálamo evidenciada através da tomografia computadorizada (JEN-CHUEN HSIEH et al., 2001).

Outro estudo controlado em humanos utilizando a ressonância magnética funcional evidenciou ativação do córtex visual com estímulo a laser no acuponto B67, descrito classicamente para uso em distúrbios visuais ou dor ocular, o mesmo não ocorrendo com o grupo placebo. Este resultado demonstrou que o laser estimulando o ponto de acupuntura pode induzir resposta específica na região do córtex cerebral (SIEDENTOPF et al., 2002).

Segundo Jen-Hwey Chiu et al. (2003), através de um estudo experimental em ratos utilizando a ressonância magnética funcional, ocorreu uma ativação precoce e proeminente em áreas cerebrais moduladoras da dor após eletroacupuntura em pontos de acupuntura comumente usados em analgesia quando comparados a outros sem indicação analgésica (JEN-HWEY CHIU et al., 2003).

Portanto, através dos conhecimentos neuroanatômicos e neurofisiológicos (YAMAMURA et al., 1997), a acupuntura médica atual pode ser definida como um método de estimulação neural periférica que acessa o SNC. Seus objetivos se resumem em reajustar as

¹ ANDERSON, S.; LUNDEBERG, T. Acupuncture – from empirism to science: functional knowledge of acupuncture effects in pain and disease. **Med Hypotheses**, v. 45, n. 3, p. 271-281, 1995.

funções cerebrais, neurais, hormonais, imunitárias e viscerais, originando o termo neuromodulação (CARNEIRO, 2001).

Há relatos tanto de efeitos sistêmicos, com participação dos centros superiores do SNC como efeitos locais após o estímulo com acupuntura. Seus resultados são relacionados à liberação de diversas substâncias e neurotransmissores: histamina, bradicinina, prostaglandina, serotonina (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1994), substância P e peptídeo calcitonina-gene-relacionado (CGRP), beta-endorfinas, leuencefalina e dinorfinas, noradrenalina, acetilcolina, adenosina, somatostatina, ácido gama-aminobutírico, vasopressina, angiotensina, ACTH, colecistoquinina, ácido glutâmico (SMITH, 1992; CARNEIRO, 2001; HONG JIN PAI, 2005; STEISS, 2006).

Dois estudos demonstraram que a estimulação sensorial (acupuntura) aumentou a liberação de peptídeo calcitonina-gene-relacionado (CGRP) e do peptídeo vasoativo intestinal (VIP) na saliva de pacientes portadores de xerostomia, sendo que estariam relacionados ao efeito benéfico sobre o fluxo salivar (DAWIDSON et al., 1998; 1999). O estímulo com acupuntura pode produzir uma liberação de neurotrofinas que afeta o Sistema nervoso sensorial e autonômico pelo mecanismo de indução de aumento na produção de CGRP nas células nervosas e subsequente liberação de CGRP nos órgãos alvo. O mecanismo por trás do efeito da estimulação sensorial poderia ser a ativação de fibras nervosas do sistema envolvido, chamadas aferentes sensoriais, levando a uma liberação aumentada do neuropeptídeo CGRP (DAWIDSON et al., 1999). O neuropeptídeo VIP foi relacionado com o aumento da taxa de fluxo salivar por estimulação em pontos de acupuntura. A estimulação sensorial através de reflexos ativou eferentes parassimpáticos, aumentando a liberação de VIP, com propriedades antiinflamatórias e imunoregulatórias (DAWIDSON et al., 1998).

Os resultados da acupuntura estão relacionados ao estímulo que é feito no ponto, ou seja, intensidade, duração e frequência do estímulo (YAMAMURA, 2002). As baixas frequências liberam encefalina por todo Sistema Nervoso Central e beta-endorfina no cérebro, sendo inibidas por naloxone e tendo efeito na atividade visceral, e as mais altas liberam dinorfina na medula espinal (LIANGFANG HE, 1987; YAMAMURA, 2002; HONG JIN PAI, 2005; CASSU et al., 2008).

A frequência baixa de 0,5 a 3 Hz pode também liberar o hormônio liberador de tirotropina (JI-SHENG HAN, 2003). Segundo Smith (1992) as baixas com < 5 Hz promovem a liberação de metaencefalinas na medula espinal, com estimulação de fibras A-delta e as altas >100 Hz liberam dinorfina na medula espinal e estimula principalmente fibras C, e

frequências mais altas (200Hz) estimulam analgesia relacionada com serotonina e noradrenalina.

A acupuntura foi correlacionada a significativo aumento sérico de serotonina em pacientes humanos com fibromialgia ($p < 0,01$) e decréscimo de níveis de dor (SPROTT et al., 1998). Por outro lado a serotonina também foi relacionada ao efeito hipoglicêmico quando aplicada eletroacupuntura com frequência de 2 Hz no acuponto E36 em ratos normais (SHIH-LIANG CHANG et al., 2005).

Ji-Sheng Han (2004) revelou com mais precisão que 2 Hz acelera a liberação de encefalina, beta-endorfina e endomorfina, enquanto que 100 Hz aumenta seletivamente a liberação de dinorfina. A combinação destas duas frequências leva a produção simultânea dos quatro peptídeos opióides e um efeito terapêutico máximo. A frequência de 15 Hz promoveu ativação parcial de encefalinas e dinorfina, sugerindo seu uso combinado com 2 Hz.

As técnicas atuais, como a imunohistoquímica, permitem o registro de marcadores genéticos da atividade elétrica do neurônio do SNC. Diversas áreas são mapeadas de forma diferencial quando há estimulação por eletroacupuntura em alta ou baixa frequência. Este rastreamento é feito pela detecção de marcadores genéticos como as proteínas de expressão rápida c-fos e c-jun. Deste modo, após a inserção da agulha de acupuntura há aumento quantitativo dessas proteínas em nervos que contém encefalinas e beta-endorfinas. Este fato provocaria a redução da liberação de substâncias neuroexcitatórias como o glutamato e o aumento das neuroinibitórias como acetilcolina e noradrenalina. Ocorreria a redução da atividade elétrica do nervo e da transmissão dolorosa no SNC (HONG JIN PAI, 2005).

A eletroacupuntura também promoveu a liberação de hormônio de crescimento em pacientes portadores de dores crônicas, sendo mediada através dos peptídeos opióides endógenos, que por sua vez estão em grandes concentrações nos neurônios hipotalâmicos, sugerindo o envolvimento destes opióides no controle de secreção de hormônios pituitários. A administração de naloxone inibiu parcialmente este efeito (PULLAN et al., 1983).

Outros efeitos da acupuntura não estão relacionados aos opióides. Estudo experimental em ratos após indução de inflamação com carragenina e submetidos à eletroacupuntura com 4 Hz nos acupontos E36 e BP6 determinou efeito antiinflamatório não dependente de opióide, pois este não foi inibido por naloxone (SHI PING ZHANG et al., 2004). O efeito antiinflamatório da eletroacupuntura em ratos com colite demonstrou ser mediado por ativação de receptores β -adrenérgicos, mas não por mecanismos dependentes de glicocorticóides endógenos (JEOUNG-WOO KANG et al., 2004).

Gaviolle (1999) cita que o efeito da acupuntura sobre a regeneração induzida em girinos submetidos à amputação da cauda promove mudanças significativas na morfologia do tecido em regeneração no grupo tratado. Em 44 dias de evolução após 13 estímulos observou-se neoformação evidente de células musculares. Há sugestão da interação da acupuntura com a regeneração e provável ativação de produção de neuropeptídeos com ação vasodilatadora, sendo estes considerados fundamentais para a cicatrização de feridas e doenças isquêmicas.

O BDNF pode ser liberado pela estimulação periférica de 100 Hz em picos, mas não com frequências baixas de 1 Hz ou altas e constantes de 100 Hz. O fato de a estimulação periférica acelerar a liberação de fatores de crescimento neural tem implicações clínicas evidentes e importantes, podendo estar relacionado com a eletroacupuntura (JI-SHENG HAN, 2003).

A doença de Parkinson é considerada uma desordem crônica e neurodegenerativa. Os tratamentos que promovam sobrevivência e recuperação funcional de neurônios dopaminérgicos afetados possuem valores terapêuticos significativos a longo prazo. Um estudo em modelo de doença de Parkinson em ratos utilizou a acupuntura em dois protocolos (nos pontos VB34 e F3 ou IG4 e IG11) e avaliou efeitos neuroprotetores no sistema nigroestriatal. A acupuntura aumentou a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso sugerindo seu uso no tratamento de doença de Parkinson (HI-JOON PARK et al., 2003).

Estudo clínico em pacientes humanos com acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico e crônico obteve eficácia da acupuntura escalpeana de Wen (WEN, 2008) na melhora e reabilitação dos mesmos. Foram atendidos 62 pacientes com sequelas de derrame com histórico médio da afecção de 7,5 anos submetidos a esta técnica associada à eletroacupuntura densa-dispersa, nas frequências de 2 Hz alternada com 100 Hz (WU TU HSING, 2001).

Outro estudo clínico controlado foi realizado em pacientes humanos (n=100) com injúria traumática aguda da medula espinhal submetidos precocemente à eletroacupuntura transcutânea nos pontos ID3 e B62 além de acupuntura auricular em 4 pontos relacionados à medula espinhal. Foi associada terapia de reabilitação em ambos os grupos. Foram observadas melhoras significativas em escores neurológicos, funcional e média total de escores da Associação Americana de Injúria Espinhal (ASIA) no grupo da acupuntura entre o período da admissão e alta e após 1 ano de *follow-up* (WONG et al., 2003).

Angeli et al. (2005) obtiveram 79,6% de recuperação em cães e gatos submetidos a acupuntura, sendo que a maioria das doenças eram neurológicas (63%) e músculo-esqueléticas (10%), demonstrando que representam as principais indicações da acupuntura na rotina veterinária. As desordens neurológicas representaram o primeiro grupo de afecções atendidas, sendo as mais comuns representadas por dor e paraparesia ou paralisia associada com doença de disco intervertebral. Convulsões, cinomose, paralisia facial, dor ou subluxação cervical, síndrome da cauda equina e síndrome de Wobbler corresponderam outras afecções atendidas.

Na China a combinação de acupuntura e terapia farmacológica para o controle da epilepsia é usada frequentemente. Ocorre redução dos efeitos colaterais fortes e desagradáveis da terapia farmacológica exclusiva. Experimentos mostraram que há um efeito supressor de descargas epileptiformes em ratos com o uso de estimulação elétrica nos pontos de acupuntura VG14, VG2 ou E36. Este efeito foi abolido com naloxone e com a destruição da substância cinzenta periaquedutal e núcleo accumbens. O efeito foi reduzido com um agente bloqueador da serotonina. A acupuntura parece exercer seu efeito antiepiléptico através do ácido gama-aminobutírico (GABA), pois também ocorre abolição do seu efeito quando é aplicado um bloqueador de sua síntese (DING-ZONG WU, 1990).

Segundo Kline; Kaplan e Joseph (2006) a acupuntura deve ser considerada quando a combinação de fenobarbital e brometo de potássio é ineficaz para o controle de convulsões. O objetivo é reduzir a gravidade ou a frequência das mesmas e se possível reduzir a dose efetiva de fenobarbital, sendo que a acupuntura não é considerada um substituto para a medicação anticonvulsivante. Os pontos de acupuntura incluem IG4 e F3, combinação chamada de “os quatro portões”; VG20, VG14, IG11, F2, VB20, PC6, R3, R6 e B23. O relato de cinco cães com epilepsia idiopática intratável apresentou redução da frequência das convulsões após um implante subcutâneo de esferas de ouro em pontos de acupuntura sobre o crânio: VG17, VG20, VG24, além de VB9, VB13 e B15. As doses de anticonvulsivantes foram mantidas e dois cães tiveram recorrência de sintomas durante o período de cinco meses de tratamento. Para animais com estado epiléptico os pontos a serem considerados são R1, C7, PC6, VG 26 e VG20, além dos pontos citados anteriormente.

A manifestação cutânea como o prurido nem sempre é originada pela estimulação da pele associada à desordem dermatológica primária. Pode ser ocasionada por desordem neurológica ou comportamental (GNIRS; PRÉLAUD, 2005). Um estímulo local ou trauma pode induzir uma sensação cutânea local alterada, dor ou prurido, que persiste após a remoção do estímulo ou trauma, além disso, uma doença neurológica pode induzir uma parestesia

local. Estas sensações alteradas causam ativação de fibras nervosas e da substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal, alterando a percepção da aferência sensorial ou motora, reduzindo ou aumentando a sensação (LOONEY; ROTHSTEIN, 1998).

O uso da acupuntura no tratamento de psicodermatose em uma cadela Greyhound de 3 anos demonstrou melhora progressiva nas lesões e uma redução de 90-95% do comportamento de lambadura e mordedura da região do flanco direito. Utilizou-se os pontos F2, R3, B27, B25, B23 e Bai Hui lombar (VG20) e pontos locais ao redor da área de alopecia e ulceração de aproximadamente 10 cm de diâmetro. O animal foi tratado semanalmente por 6 semanas, seguido de 2 aplicações cada 14 dias. Após 6 semanas foi colocado implante de magnetos de ouro nos pontos citados com intuito de prolongar o estímulo da acupuntura, com resolução completa das lesões após 6 semanas da implantação (LOONEY; ROTHSTEIN, 1998).

Stefanatos (1984) relatou 4 casos de paralisia do nervo radial tratados com eletroacupuntura transcutânea para promover a cicatrização. O efeito do tratamento é acumulativo e no geral foi realizado duas vezes no 1º dia do tratamento com intervalo de pelo menos 1 hora. Em seguida foi aplicado diariamente, sendo incluídos os pontos IG4 (bilateral); IG5; IG10 e IG11; ID1 a ID6; PC5 a PC9; TA10 e TA11 e pontos no coxim do membro afetado R1; PC8; TA4; TA3; PC2 e IG1. Três cães jovens (8 meses a 2 anos) apresentaram apoio normal do membro em 1 semana a 4 semanas, sendo que em dois animais foram colocados bandagens com talas. O 4º caso relatado referiu-se a um coioote de 8 meses e após 12 dias apresentou apoio normal.

A acupuntura foi utilizada no tratamento de paralisia facial idiopática direita em um cão com evolução clínica de 35 dias após início agudo. Foram aplicados durante 20 minutos os seguintes pontos de acupuntura: locais (aplicados no contralateral) IG20; E2; E7; ID18; TA17; VB3 e distais (aplicados bilateralmente) IG4 e VB34. O tratamento único com acupuntura foi instituído em dias alternados durante a 1ª semana e após uma vez por semana durante 3 semanas. A melhora foi observada desde a 1ª aplicação e ocorreu recuperação completa da simetria facial após o 5º tratamento. Embora a paralisia facial possa melhorar em semanas ou meses, esta pode persistir por meses ou anos. Neste relato ocorreu melhora logo após a primeira aplicação sugerindo que a acupuntura pode ser efetiva no seu tratamento, corroborando com outros relatos de casos em cavalo e humanos (JEONG et al., 2001).

Jie-Lian La et al. (2005) observaram que a eletroacupuntura promove regeneração em nervo ciático de coelhos submetidos à lesão por esmagamento, ocasionando maior número de fibras mielinizadas finas do que o grupo tratado com diclofenaco sódico.

2.2.2 Acupuntura e discopatia intervertebral

A acupuntura é um método de tratamento que pode ser utilizado para a analgesia, normalizar a função motora e sensorial e distúrbios de controle voluntário da micção (STILL, 1989).

Em afecções de discos intervertebrais cervicais em cães, a acupuntura foi realizada uma vez por semana e em casos de dor intensa, duas vezes por semana, no total de 1 a 6 sessões. O tempo de duração do tratamento foi de 15 a 20 minutos, sendo associado a tratamento medicamentoso conforme necessário, além de repouso por 30 dias. Os pontos bilaterais utilizados foram: TA15, VB20, ponto local doloroso na região cervical, VB39, ID3 e IG11. Houve recuperação de 70% dos animais tratados, a grande maioria com sintomatologia do grau 1, seguido do grau 2 e 3. Observou-se recorrência de 19%. Mesmo após cirurgias e com persistência de dor, pode-se associar a acupuntura. No entanto, não mostrou efeito profilático na recorrência dos sinais clínicos (JANSSENS, 1985).

Um cão tetraplégico há 2 meses e portador de discopatia intervertebral cervical associada à hipertrofia do ligamento amarelo diagnosticado com exame mielográfico junto com tomografia computadorizada foi tratado somente com eletroacupuntura e medicina herbal chinesa. Obteve-se reabilitação motora em 15 dias com melhora progressiva do quadro sugerindo como eficaz o protocolo de pontos – IG4 e IG11; VG14 e IG15; B23; VB39 transfixado com BP6; R3 transfixado com B60 e pontos locais cervicais (HAYASHI et al., 2007).

Em afecções tóraco-lombares, a acupuntura pode ser utilizada em média uma vez por semana até duas vezes por semana e em casos crônicos a cada 15 dias, aliado ao repouso e medicação se necessário. Os pontos locais descritos variam ao longo do meridiano da bexiga, de B17 a B28, correspondentes a vértebras T10 a L7, além de pontos locais do meridiano do vaso governador, VG6, entre T12 a T13, e VG4, entre L2 e L3. Os pontos distais são variáveis, como B40, B60, E36, VB30 e VB34, sendo utilizados para que fibras nervosas levem aferência até centros superiores e no segmento medular afetado, combatendo a inflamação, dor e ativando a regeneração. Outros pontos usados são: R3 e R6, BP4 e BP6. A média de recuperação ocorre ao redor de 4 semanas para os graus 1 a 3 (JANSSENS, 1983, 1992; STILL, 1989).

O mecanismo de ação da acupuntura nestes casos não foi plenamente elucidado, mas podem-se relacionar vários aspectos. Acupuntura tem efeito analgésico, pode destruir os

pontos gatilho e abolir dor e encurtamento muscular, rigidez e dor referida. Pode ainda ativar regeneração axonal de axônios destruídos na medula espinhal. Além disso, a acupuntura tem efeito antiinflamatório, diminuindo a inflamação medular, edema, vasodilatação ou constrição e liberação de histamina ou cinina (JANSSENS, 1992).

O uso da acupuntura foi relatado em 25 cães apresentando discopatia intervertebral tóraco-lombar com ausência da percepção à sensibilidade dolorosa profunda por mais de 48 horas e não submetidos à cirurgia. Os pontos locais variaram do B18 a B28, pontos distais VB30, VB34, E36, VB39, BP6, R3 e pontos extras *Baxie*, localizados entre os dígitos dos membros pélvicos. A eletroacupuntura foi conectada nos pontos B20 e B23 ou B23 e B25 e VB30 e VB34 ipsilaterais, sendo as agulhas deixadas por 20 minutos e aplicadas duas vezes por semana até recuperação da capacidade de andar. O tempo de recuperação variou de 3 semanas a 8 meses (SHIMUZU, 2003).

O relato do uso de acupuntura e medicina herbal chinesa na reabilitação locomotora em cães, incluindo discopatia intervertebral tóraco-lombar sugere o efeito benéfico e sinérgico das duas modalidades de tratamento (HAYASHI; SHIGUIHARA; TORRO, 2003).

Joseph (1992) relata que lesões severas da medula espinhal resultando em fraqueza, paresia ou paralisia podem melhorar com acupuntura, porém é difícil diferenciar a melhora pela acupuntura ou evolução natural do quadro.

Estudo experimental foi realizado em 20 cães submetidos à injúria da medula espinhal lombar, promovendo uma compressão de 25%, e determinando paraparesia com capacidade de locomoção, ausência de propriocepção consciente e presença da percepção da sensibilidade dolorosa profunda (grau 2). Foram divididos em 4 grupos: A - tratamento com corticosteróide; B - tratamento com eletroacupuntura; AB – tratamento com eletroacupuntura e corticosteróide e C – grupo controle e sem tratamento. A eletroacupuntura, frequência 25 Hz por 20 minutos, era realizada em dias alternados nos pontos VG4 e E36, sendo usada também acupuntura tradicional com agulhas nos pontos: VG3; B23; B24; VB30; VB34; E40 e E41. A recuperação da propriocepção ocorreu em média $8,2 \pm 2,6$ dias e foi mais precoce no grupo AB do que os outros grupos ($p < 0,05$), sugerindo um efeito sinérgico de ação desta combinação terapêutica (JUNG-WHAN YANG et al., 2003).

Recente estudo clínico controlado avaliou a eficácia da acupuntura integrada ao tratamento médico da discopatia intervertebral tóraco-lombar em cães. Observou-se que cães com percepção a sensibilidade dolorosa profunda e que receberam eletroacupuntura (EA) anteciparam em 50% o tempo para o retorno à locomoção ($10,10 \pm 6,49$ dias) em comparação a cães que não receberam EA ($20,83 \pm 11,99$ dias) com diferença significativa ($p < 0,034$).

Apresentaram médias superiores e com diferença significativa no escore total da escala funcional numérica na 7ª e 14ª avaliações ($p < 0,039$ e $p < 0,020$) em relação ao grupo que não recebeu acupuntura, representando um estado neurológico superior. A taxa de sucesso nestes cães em relação ao retorno a locomoção foi de 100% e 66%, respectivamente grupo com EA e sem EA, sendo a diferença significativa ($p < 0,047$). A maioria dos animais foi medicada com corticosteróides, tanto no grupo com acupuntura como no grupo sem acupuntura (HAYASHI; MATERA; FONSECA PINTO, 2007). Neste estudo foi aplicada uma escala funcional numérica adaptada e simplificada de Olby et al. (2001) para abranger todos os graus de lesão e avaliar não só a recuperação motora como também a função de micção. Além disso, dois grupos de tratamento foram comparados nos mesmos momentos e a escala de Olby et al. (2001) estabelece escores na dependência da fase de recuperação motora, impossibilitando a comparação de escores no mesmo momento para dois grupos de tratamento com possível velocidade de recuperação diferente.

2.3 PERSPECTIVAS DE RECUPERAÇÃO DA INJÚRIA MEDULAR

Na composição do sistema nervoso há bilhões de neurônios. Cada unidade é composta por um corpo celular e um ou vários dendritos e axônios. A função dos dendritos é de trazer informações para o corpo celular e o axônio transmite estas informações para outros neurônios ou músculos. Os neurônios fazem conexão e formam circuitos eletroquímicos responsáveis pelo recebimento e transmissão de sinais elétricos. Este sistema assegura o funcionamento adequado de todos os sistemas corporais. As células gliais superam em número os neurônios no sistema nervoso e consistem em três tipos principais – oligodendrócitos, astrócitos e micróglia. As células gliais circundam os neurônios e realizam diversas funções importantes tais como dar suporte estrutural, mielinização no SN periférico pelas células de Schwann e no SN central pelos oligodendrócitos, formação da barreira hematoencefálica, regulação de função metabólica e defesa imunológica (CHRISMAN et al., 2005).

A injúria da medula espinhal pode causar incapacidade física grave devido à morte celular focal e perda de transmissão axonal. A lesão causada por injúria do SNC pode ser dividida em duas fases, primária e secundária. O impacto da injúria inicial destrói muitos

neurônios e células da glia. Mas a perda celular não se limita ao mecanismo de insulto primário, sendo exacerbada por mecanismos secundários que são ativados em resposta ao trauma ao SNC. Cerca de 50% de astrócitos e oligodendrócitos da substância branca restante na região de epicentro da lesão morrem em 24 horas após a injúria da medula espinhal. Mas a densidade destas células retorna ao nível normal em aproximadamente 6 semanas. Este repovoamento é em grande parte devido à proliferação de progenitores locais que se dividem em resposta à injúria. Os eventos secundários que causam morte celular após injúria da medula espinhal também aumentam fatores locais representados por diversos fatores de crescimento que estimulam a proliferação destes progenitores endógenos (ZAI; YOO; WRATHALL, 2005).

Após uma injúria medular, ocorre reação das fibras nervosas intactas para equilibrar o circuito neural através de fibras compensatórias germinativas. A plasticidade, ou seja, habilidade de um grupo de fibras nervosas em suplantar a função de outro grupo lesado, é pouco proeminente no SNC do adulto. Portanto, intervenções que promovam regeneração de fibras nervosas lesadas, como fatores neurotróficos podem certamente aumentar o crescimento compensatório de fibras nervosas não lesionadas. O fluxo de impulso elétrico num circuito neural conhecido fortalece conexões ou até mesmo induzem germinação e formação de novas conexões. Novas estratégias, combinadas ou não, para a reparação de lesão medular oferecem a possibilidade de tratamentos clinicamente efetivos para pacientes paraplégicos e tetraplégicos num futuro não muito distante (SCHWAB, 2002).

As três maiores categorias de moléculas de sinalização para a comunicação entre as células são representados pelos peptídeos hormonais, fatores de crescimento e citocinas. Os peptídeos hormonais são produzidos por células endócrinas secretoras especializadas e carreados pelo sangue até diversas células alvo. Os fatores de crescimento e citocinas são produzidos por uma variedade de tipos celulares em tecidos locais, porém as citocinas podem ser induzidas na maioria das vezes. São polipeptídeos ou glicoproteínas que são produzidas por um grande número de células. Dentre os diferentes tipos de citocinas encontram-se as neurotrofinas, cujos membros são BDNF, NGF, neurotrofina 3 (NT3) e 6 (NT6) e *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF). As principais atividades das neurotrofinas são o crescimento e diferenciação dos neurônios. O fator de crescimento do fibroblasto (FGF) pode ser utilizado em combinação com as neurotrofinas (EBADI et al., 1997).

Além da expressão alterada de fatores neurotróficos em neurônios, também tem sido observado um aumento na expressão de fatores tróficos e citocinas após convulsões, isquemia e trauma em astrócitos reativos e microglia reativa que proliferam em áreas que estão

sofrendo neurodegeneração. Estes fatores associados à glia e que possuem expressão aumentada no local de injúria são bFGF, IGF1, TGF β , TNF α , IL1 β e IL6. Provavelmente estão relacionados na regulação da extensão da morte neuronal tardia, germinação axonal e rearranjo sináptico que ocorrem nestas regiões. TNF α e bFGF tem sido relacionados à prevenção da degeneração de neurônios embrionários corticais e do hipocampo cultivados e seguidos de tratamento hipoglicêmico e excitotóxico. Em contrapartida, muitos destes fatores têm também efeitos mitogênicos nas células gliais (ISACKSON, 1995). FGF promove regeneração axonal e TGF β provavelmente mantém uma interação balanceada de células neuronais e acessórias durante a reparação, pois promove crescimento e atividade de células de Schwann (EBADI et al, 1997). Há dois componentes de FGF e que compartilham de 60% de homologia e são chamados de ácido FGF (aFGF ou FGF1) e básico FGF (bFGF ou FGF2) e que exercem efeitos numa variedade de células, como fibroblastos e células endoteliais e tecido nervoso incluindo neurônios e células gliais. O bFGF tem promovido aumento de crescimento neural em neurônios cultivados do hipocampo e medula espinhal de rato (CHADI; FUXE, 1998).

FGF1 e FGF2 têm sido encontrados em grandes concentrações somente no sistema nervoso maturo. FGF2 estimula a proliferação de células-tronco multipotenciais que subsequentemente dão origem a neurônios do córtex. Os FGFs também exibem atividade trófica em neurônios maduros, promovendo a sobrevivência destas células sem estimular a síntese de DNA. Há alguma evidência de que FGFs podem ter um papel crítico na facilitação de regeneração axonal no sistema nervoso periférico e promove suporte trófico a neurônios seguidos de trauma ou injúria (LANDRETH, 1999).

As neurotrofinas atuam através de seus correspondentes receptores tirosina quinases, que por sua vez são enzimas ligadas a receptores associados à membrana celular. As neurotrofinas são reguladas nos nervos periféricos após injúria. Não se sabe ao certo se aumentam a extensão axonal ou regulam outros aspectos das respostas à injúria neuronal (MARKUS; PATEL; SNIDER, 2002). Há estudos com efeitos das neurotrofinas e promoção de reparo nervoso e aumento da recuperação após lesão nervosa, onde o sucesso da regeneração axonal representa papel fundamental na reparação funcional em nervos periféricos lesados (LONG-EN CHEN, 2002).

Todos os fatores neurotróficos são capazes de promover sobrevivência e diferenciação de neurônios sensoriais, mas desempenham atividades distintas em outras populações de células. O número restrito de células alvo do NGF levou a pesquisa por outros fatores neurotróficos. Estudo demonstrou que administração sistêmica de várias neurotrofinas pode

atenuar a lesão neuronal induzida por hipóxia química por um mecanismo que pode envolver a atenuação do estresse oxidativo (EBADI et al., 1997).

Já a morte neuronal pôde ser evitada em grande parte pela introdução exógena de NGF (GEBRIN et al., 1997). Entretanto seu uso clínico para regeneração em nervo periférico é limitado, pois afeta neurônios sensoriais dolorosos e consequente hiperalgesia (SCHWAB, 2002).

Fibras sensoriais primárias ascendentes respondem a neurotrofinas. O uso de infusão intratecal de NT3 promoveu regeneração de aferentes sensoriais de diâmetros largos dentro da medula espinhal após lesão na raiz dorsal. Ocorreu indução da expressão de *growth-associated protein-43* (GAP-43). O GAP-43 é associado com crescimento axonal e sua expressão pode promover regeneração na medula espinhal (DAVID; LACROIX, 2003).

Após um trauma medular pode ocorrer morte apoptótica de grande parte da população neuronal e pode ser prevenida com uso de fatores neurotróficos. Esta morte neuronal pode ser evitada em grande parte pela introdução exógena de fatores neurotróficos como NGF entre outros. Motoneurônios também podem ser salvos da morte apoptótica após axotomia pelo uso de fatores como BDNF. Os fatores neurotróficos têm ação protetora principalmente na fase aguda e subaguda do trauma, através de dois mecanismos: sobrevivência neuronal, ou efeito neurotrófico, e estimulação da formação e extensão de prolongamentos neuronais, ou efeito neurotrópico. Para a recuperação dos reflexos viscerais após o trauma medular estes efeitos representam processos essenciais. Infelizmente o uso destes fatores é ainda basicamente experimental (GEBRIN et al, 1997).

Zochodne e Chu Cheng (2000) observaram que BDNF e, em menor extensão, NGF, em mastócitos de troncos nervosos lesionados em ratos, mas também em nervos não lesionados. Macrófagos não expressaram BDNF e NGF. Os mastócitos podem representar uma reserva importante de BDNF em nervos periféricos.

Os membros das neurotrofinas são regulados no cérebro através da atividade aferente e após injúria. As mudanças que ocorrem na expressão neuronal de neurotrofinas em resposta a atividade aferente influenciam provavelmente a sobrevivência neuronal, eficácia sináptica e conexão a longo prazo. Além da indução após convulsão, outros fatores que resultam em neurodegeneração, como injúria mecânica, isquemia e hipoglicemia, também resultam em expressão de neurotrofina alterada (ISACKSON, 1995).

2.4 PROTEÍNA S100 β

S100 β é membro da família de proteínas S100. Este termo surgiu devido a sua solubilidade em uma solução de sulfato de amônio 100% saturada (ROTHERMUNDT et al., 2003). Esta família de proteínas S100 compreende 21 membros e são expressos somente em vertebrados (DONATO, 2003). S100 β é uma proteína ácida e consiste de duas subunidades betas. Os dois monômeros são ligados por ligantes disulfídicos. A forma da S100 β ligada por disulfídicos parece ser necessária para uma ação neurotrófica funcional completa, enquanto que a forma mutante com falta de um ou ambos os resíduos de cisteína induz resposta de ativação na glia, mas não nos neurônios. S100 β é uma proteína ligante de Ca^{2+} do tipo *EF-hand* com 4 sítios ligantes de cálcio (ROTHERMUNDT et al., 2003).

O desequilíbrio nos níveis de cálcio está correlacionado com a manutenção da homeostasia dos níveis de sódio e potássio, na ativação de diversas enzimas que alteram o metabolismo celular e na liberação de transmissores nas fendas sinápticas, evidenciando o aumento intracelular de cálcio como via comum nos vários mecanismos de lesão secundária do SNC (RASMUSSEN, 1986).

As proteínas ligantes de cálcio como a S100 β nas células do SNC podem retirar cálcio em excesso e auxiliar a prevenção de morte neuronal. S100 β também participa no desenvolvimento do cérebro e estimula a proliferação e maturação astrogliar e promove sobrevivência neuronal. Promove também reunião de microtúbulos e extensão neurítica. Estes eventos podem estar relacionados com a plasticidade que ocorre subsequente a uma lesão da medula espinhal. Desta forma, há possibilidade de regiões com tecido preservado onde a proteína S100 β de células astrogliais pode estar relacionada com trofismo neuronal e plasticidade nos neurônios e axônios remanescentes na medula espinhal (CUNHA et al., 2007).

S100 β é produzida principalmente por astrócitos. Exerce efeitos parácrino e autócrino em neurônios e células gliais. A secreção glial de S100 β exerce efeito trófico ou tóxico na dependência de sua concentração. Em concentrações nanomolares pode estimular crescimento neural e aumentar a sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento. Já níveis micromolares extracelulares de S100 β *in vitro*, estimulam a expressão de citocinas próinflamatórias e induz apoptose. Em estudos experimentais, as mudanças na concentração cerebral de S100 β promovem distúrbios comportamentais e cognitivos em animais. Em

humanos, o aumento de S100 β tem sido detectado em trauma cerebral e isquemia, provavelmente pela destruição de astrócitos. São encontrados níveis altos desta proteína e este fato pode estar relacionado à secreção de S100 β ou liberação por astrócitos lesionados (ROTHERMUNDT et al., 2003).

Embora o mecanismo exato *in vivo* da proteína S100 β não é conhecido, há evidências que sugerem um papel extracelular. Esta proteína tem sido detectada em fluido extracelular cerebral e meios condicionados de células gliais. Seus níveis extracelulares são mais altos durante o crescimento exponencial de células gliais e parece agir como fator trófico para certas populações neuronais. Estimula brotamento neurítico de neurônios corticais, neurônios serotoninérgicos da rafe mesencefálica, teto óptico, medula espinhal e neurônios do gânglio de raízes dorsais. Além da atividade neurotrófica da proteína S100 β nas células neuronais, há evidências indiretas que sugerem a sua contribuição para a proliferação de células gliais (SELINFREUND et al., 1991).

S100 β também está localizada nas células de Schwann do sistema nervoso periférico (BRISBY et al., 1999). As interações de neurônios sensoriais e células satélites assim como neurônios motores e células de Schwann tem sido descritas durante o desenvolvimento e eventos de neuroplasticidade relacionadas à regeneração neural. Esta habilidade das células de Schwann em iniciar a regeneração neural no sistema nervoso periférico tem sido aplicada em promover a restauração neuronal no SNC. A cultura de células de Schwann de nervo ciático tem sido empregada na regeneração da medula espinhal experimentalmente, e levando a uma melhora da função sensoriomotora. FGF-2 e S100 β tiveram níveis aumentados expressados nas células de Schwann do nervo ciático lesado e nas células satélites do gânglio da raiz dorsal após secção. Este fato sugere uma possível interação destas duas moléculas e podem estar associadas com a neovascularização local, glicogênese e reparo assim como trofismo neuronal parácrino e plasticidade nos neurônios motores remanescentes (DUOBLES et al., 2008).

De um modo geral podem se resumir os efeitos extracelulares da S100 β em: atividade na extensão neurítica e efeitos prévios para a sobrevivência dos neurônios, estimulação de proliferação de astrócitos, apoptose de astrócitos, apoptose neuronal, estimulação da secreção de IL6 pelos neurônios, estimulação de óxido nítrico pelos astrócitos e microglia, modulação da plasticidade sináptica e inibição da miogênese (DONATO, 2003). S100 β também estimula a síntese de óxido nítrico em astrócitos, gliose e neovascularização local (CUNHA et al., 2007).

Por outro lado, a proteína S100 β é expressa abundantemente em astrócitos dentro do SNC e, portanto pode ser considerado um marcador predominantemente de anormalidades da substância branca após injúria da medula espinhal. Entretanto não é normalmente mensurável na corrente sanguínea devido à barreira hemato-encefálica. Embora não seja uma medida direta da injúria axonal, estudos sugerem que quando está elevada de forma significativa pode indicar regiões da substância branca que não são condutoras da sobrevivência axonal (LOY et al., 2003).

Um estudo de modelo experimental de injuria medular realizou mensurações de marcadores séricos, enolase específica para neurônio e S100 β e avaliou a aplicação em potencial para diagnosticar a mensuração da injúria. Encontrou-se um aumento nos níveis séricos logo após a injúria, em 6 horas. Após 24 horas os níveis tenderam a se normalizar. Porém não houve uma correlação destas concentrações com a severidade da injúria ou acompanhamento da evolução funcional destes animais (LOY et al., 2005).

Dois tipos de trauma neural foram avaliados com mensuração sérica de S100 β . Na injúria da medula espinhal houve aumento em 72 horas com diferença significativa do controle, voltando ao normal em 6 dias. Na lesão do plexo lombar não houve aumento significativo. Conclui-se que a mensuração de S100 β pode ser usada como um diagnóstico precoce de injúria da medula espinhal. Entretanto, não correlacionou com a extensão da lesão neural (JIANJUN MA et al., 2001).

Pacientes da espécie humana com hérnia de disco lombar e dor no trajeto do nervo ciático foram submetidos à análise do LCR para determinar se há aumento de marcadores de injúria de células gliais e nervosas. Houve aumento significativo da proteína neurofilamentar e S-100 no grupo herniado quando comparado com pacientes do grupo controle, particularmente em indivíduos com evolução clínica de até 3 meses. Não houve diferença nas análises da enolase específica do neurônio e proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Estes resultados indicam lesão axonal e injúria das células de Schwann, sendo compatível com injúria de nervo periférico afetando axônios da região intratecal. A correlação dos níveis de marcadores no LCR com deficiência neurológica e achados da TC não foi encontrada, pois apresentavam um mesmo grau de sintomas e imagens diagnósticas, além disso, o número da amostra (n=15) foi pequeno (BRISBY et al., 1999).

Recente estudo experimental em ratos adultos submetidos à contusão da medula espinhal demonstrou que houve aumento da proteína S100 β e FGF-2 em astrócitos reativos e o mesmo não ocorreu na microglia inativa. Este aumento da S100 β pode também ocorrer durante os eventos de reparação nas proximidades do sítio da lesão. Houve constatação de

recuperação motora espontânea nestes animais observados através do teste Basso Beattie e Bresnahan (BBB) e escore de comportamento combinado (CBS), relacionado, portanto aos efeitos da S100 β no trofismo neuronal e plasticidade dos axônios e neurônios remanescentes da medula espinhal. A recuperação funcional espontânea foi observada de forma progressiva ao longo do tempo até 3 semanas após a contusão da medula espinhal. Concluiu-se que a modulação de FGF-2 e S100 β astrogliais podem ter importância nos processos de reparação e cicatrização e respostas tróficas parácrinas mediadas por células astrogliais na medula espinhal lesionada (CUNHA et al., 2007).

Foi observado na revisão da literatura que os estudos clínicos já realizados com cães acometidos com discopatia intervertebral e tratados com acupuntura, não correlacionaram os prováveis mecanismos de ação ou fatores tróficos liberados ou modulados pela eletroacupuntura na recuperação da deficiência neurológica e retorno da locomoção. Portanto, o objetivo primordial desta pesquisa é detectar um possível fator neurotrófico que esteja implicado com os efeitos da eletroacupuntura na extrusão de disco intervertebral, atuando na recuperação após injúria medular.

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis da proteína S100 β no líquido de cães paraplégicos ou paraparéticos com extrusão de disco intervertebral antes e após o tratamento com eletroacupuntura. E como objetivos secundários correlacionar os achados anteriores com o grau de lesão neurológica clínica e por imagem, bem como a evolução clínica destes animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em cães com afecções de disco intervertebral tóraco-lombar (grupo EA) encaminhados ao Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP) e líquido de cães submetidos à eutanásia oriundos da rotina hospitalar (grupo normal). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ/USP, protocolo número **1089/2007**.

Durante o período de fevereiro de 2007 a junho de 2008, foram avaliados 66 cães com suspeita de extrusão de disco intervertebral. Dentre estes animais 40 apresentavam sinais clínicos de discopatia intervertebral tóraco-lombar.

Foram coletados amostras de líquido de 7 animais sem sinais neurológicos submetidos à eutanásia durante a rotina de atendimento do HOVET.

O exame neurológico dos cães com discopatia intervertebral consistiu na avaliação dos reflexos espinhais, propriocepção consciente, capacidade de manter-se em estação, reflexo anal, panículo tronco-cutâneo, percepção da sensibilidade à dor profunda e observação de retenção urinária e capacidade de locomoção. Todos os proprietários foram orientados em relação ao manejo adequado da micção e defecação, além da necessidade do confinamento e repouso absoluto do animal por pelo menos 30 dias.

Os cães foram submetidos à eletroacupuntura após o diagnóstico de extrusão do disco intervertebral (grupo EA) através da mielografia e/ou tomografia computadorizada (TC). Nos casos de extrusão aguda os cães foram submetidos a tratamento médico com corticosteróides (prednisona 0,5 a 1 mg/kg cada 12 a 24 horas durante 3 a 5 dias) e se necessário associados a analgésicos (cloridrato de tramadol 2 mg/kg cada 8 horas e/ou dipirona 25mg/kg cada 8 horas) até o início do tratamento com eletroacupuntura. Durante o período de tratamento com eletroacupuntura os animais foram medicados somente com analgésico (dipirona) se necessário.

Amostras de líquido (LCR) pela punção da cisterna magna foram coletadas nos seguintes momentos:

- Grupo EA – antes da eletroacupuntura, no momento da realização da mielografia e/ou TC. (M1) e após 30 dias do tratamento (M2).
- Grupo normal – cães submetidos à eutanásia na rotina hospitalar e sem sintomas neurológicos. Somente uma coleta correspondendo ao momento 1.

Os animais foram submetidos à anestesia geral conforme o protocolo do Serviço de Anestesia da FMVZ/USP e adaptados às condições físicas individuais para que fossem realizados a coleta do LCR e exame mielográfico e/ou TC.

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão do grupo EA foram estabelecidos em:

- Cães incapazes de locomoção – graus de lesão 3 a 5.
- Cães que não foram submetidos a tratamento com eletroacupuntura.

Os critérios de exclusão do grupo EA foram estabelecidos em:

- Cães com lesões cutâneas ulceradas e/ou inflamadas de grande extensão.
- Animais com alterações sistêmicas ou funcionais com contra-indicação para anestesia geral para a realização da mielografia e tomografia computadorizada (TC) e coleta do líquido.
- Os animais que apresentassem sinais neurológicos com evolução desfavorável, após o consentimento do proprietário, foram encaminhados para tratamento cirúrgico, exceto aqueles com suspeita de mielomácelo.
- Cães com sinais clínicos evidentes de mielomácelo ascendente ou descendente.
- Proprietários sem condições de comparecer aos retornos semanais.

4.2 PROTOCOLO DE ACUPUNTURA

De acordo com Hayashi (2006), os animais do grupo EA foram tratados com o seguinte protocolo:

- Início do tratamento após o diagnóstico de extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar e após a coleta de líquido.
- Foi realizada a eletroacupuntura percutânea, com as frequências densa-dispersa de 3 Hz alternada com 100 Hz a cada 3 segundos, com a duração de 20 minutos, nos pontos

B20 e B23 ou B23 e B25, *Bai Hui lombar* e VG1 ou VB30, E36 e R3/B60. A intensidade da voltagem foi regulada até a observação de discreta contração muscular local.

- Os principais pontos selecionados tiveram variação de acordo com a condição da paraparesia/paraplegia, presença ou não da percepção a sensibilidade dolorosa. Além dos pontos citados foram também utilizados sem eletroacupuntura: ID3, B62 e alguns pontos entre os espaços intervertebrais correspondentes ao local da extrusão e que representam o meridiano VG situado na linha da coluna vertebral.
- Localização dos demais pontos selecionados (WYNN; MARSDEN, 2003; HUI SHENG XIE; PREAST, 2007):
 1. ID3 ou *Hou Xi* está localizado na margem lateral do 5º osso metacarpiano e proximal à 5ª articulação metacarpo-falangeana.
 2. B20 ou *Pi Shu* está presente lateral ao bordo caudal do processo espinhoso da 12ª vértebra torácica, ao longo da linha longitudinal do tubérculo costal.
 3. B23 ou *Shenshu* ou Ponto de Transporte Posterior do Rim, localizado lateral ao bordo caudal do processo espinhoso da 2ª vértebra lombar.
 4. B25 ou *Da Chang* localiza-se lateral ao bordo caudal do processo espinhoso da 5ª vértebra lombar.
 5. B60 ou *Kun Lun* situa-se na depressão entre o maléolo lateral da fíbula e a inserção do tendão do calcâneo comum a tuberosidade calcânea.
 6. B62 ou *Shen Mai* está localizado numa depressão diretamente distal ao maléolo lateral da fíbula.
 7. E36 ou *Zusanli* localiza-se em um aprofundamento lateral à crista tibial, na base do músculo tibial cranial, aproximadamente a largura de um dígito na face lateral do músculo tibial cranial, sendo um ponto longo e linear.
 8. R3 ou *Taixi* situa-se no aspecto caudo medial do membro pélvico, a meia distância entre o maléolo medial e o tendão do calcâneo, sendo que aprofundando-se a agulha atinge-se o ponto B60, *Kunlun*.
 9. *Baihui* ou *Yao Bai Hui* ou *Bai Hui lombar* ou VG20, no espaço lombo-sacro, sendo que nos humanos o VG20 localiza-se no topo da cabeça e nos animais situa-se na linha dorso mediana no limite entre o processo espinhoso do sacro e última vértebra lombar, sendo a nomenclatura usual para esta localização como *Bai Hui lombar*.

10. VB30 ou *Huantiao* localiza-se no terço médio da linha traçada que passa pelo trocanter maior do fêmur e articulação sacro-coccígea.
 11. VG1 ou *Hou Hai* ou *Chang Qiang* localiza-se numa depressão na linha média dorsal entre a região do ânus e a base da cauda.
- O estímulo da acupuntura foi realizado uma vez por semana durante um período mínimo de 3 semanas. As agulhas sem a eletroacupuntura permaneceram no local por 20 minutos, após inserção profunda e de acordo com a localização.
 - Materiais: aparelho de eletroestimulação modelo DS100CB (Sikuro®), agulhas de acupuntura de aço inoxidável de dimensões 0,25X25mm (Cloud & Dragon®).

4.3 AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DO GRUPO EA

As avaliações clínicas foram realizadas mediante a observação de evolução de sintomas, obedecendo a uma escala funcional numérica (HAYASHI, 2006) modificada acrescentando o item relativo à propriocepção. Foi anotado em dias, o tempo em que se observou a capacidade de locomoção, mesmo com dificuldades, e o retorno da dor profunda. Os animais foram acompanhados com filmagens nos períodos de avaliação.

A escala funcional numérica, em ordem crescente de evolução favorável, foi simplificada de Olby et al (2003) e adaptada de Hayashi (2006) para os seguintes parâmetros a serem avaliados semanalmente:

- Postura em estação
 - 0 = não se mantém em estação, mesmo com ajuda
 - 1 = levanta-se e mantém-se em estação somente com auxílio para sustentação
 - 2 = levanta-se e mantém-se em estação somente com auxílio e permanece por 2 segundos sozinho sem auxílio
 - 3 = levanta-se e mantém-se em estação somente com auxílio e permanece sozinho por mais de 2 segundos sozinho sem auxílio
 - 4 = levanta-se e mantém-se em estação sem necessidade de auxílio
- Movimentação dos membros pélvicos
 - 0 = ausência de movimentos/paralisia
 - 1 = movimento de um só membro pélvico e sem capacidade de locomoção
 - 2 = movimento dos dois membros pélvicos e sem capacidade de locomoção
 - 3 = movimento dos dois membros e com capacidade de locomoção, com apoio de um ou dos dois membros, com ataxia

- 4 = movimento dos dois membros e com capacidade de locomoção com apoio normal dos membros
- Presença de dor profunda
 - 0 = ausência de dor profunda
 - 1 = presença questionável da dor profunda, necessidade de pesquisar vários dígitos ou a cauda, sendo detectado em uma das estruturas, porém com intensidade duvidosa
 - 2 = presença discreta da dor profunda em um dígito e/ou cauda, vira o olhar e não manifesta choro.
 - 3 = presença de dor profunda em grau maior que anterior
 - 4 = presença inquestionável de dor profunda
 - Controle voluntário da micção ou defecação
 - 0 = ausência de controle voluntário da micção- retenção ou incontinência
 - 1 = grau de incontinência razoável, quase o tempo inteiro
 - 2 = grau de incontinência mediana, intermitente ou quando manipulado e necessidade de massagem para esvaziamento da urina residual
 - 3 = controle voluntário esporádico e ausência de incontinência
 - 4 = controle voluntário e sem deficiência
 - Capacidade de locomoção
 - 0 = ausência de locomoção
 - 1 = locomoção somente quando sustentado pelo abdômen ou região inguinal
 - 2 = locomoção sem sustentação, intermitente, com quedas a maior parte do tempo e ataxia evidente
 - 3 = locomoção sem sustentação e sem quedas na maior parte do tempo e ataxia ligeira ou em piso liso/escorregadio
 - 4 = locomoção normal
 - Movimentação da cauda
 - 0 = ausência da movimentação voluntária da cauda
 - 1 = movimentação da cauda não voluntária
 - 2 = movimentação da cauda intermitente
 - 3 = movimentação normal da cauda
 - Propriocepção consciente
 - 0 = ausência de propriocepção consciente
 - 1 = moderada diminuição da propriocepção consciente em pelo menos um membro pélvico
 - 2 = discreta diminuição da propriocepção consciente em pelo menos um membro pélvico
 - 3 = propriocepção consciente normal

A soma total dos escores obtidos variou de 0 a 26 (animal sem deficiência).

Para o proprietário foi solicitado que observasse e marcasse as datas ou tempo estimado dos seguintes eventos: recuperação da habilidade de andar sem assistência, descrição do grau de extensão da recuperação da função motora e urinária, fraqueza residual e/ou incoordenação em piso liso, recorrência de dor lombar, paresia ou paralisia durante o período do estudo, recuperação do movimento voluntário da cauda.

4.4 COLETA DE DADOS

Dados clínicos dos animais encaminhados ao estudo foram coletados: sexo, idade, raça e peso. Aspectos clínicos foram coletados como início de evolução dos sintomas, local da extrusão, classificação em grau de lesão de acordo com sintomas clínicos neurológicos, grau de controle da micção urinária, presença de paraparesia ou paraplegia, movimentação da cauda, capacidade de se manter em estação, grau de locomoção, presença, ausência ou diminuição da propriocepção, retorno da locomoção, presença ou ausência da percepção da sensibilidade à dor profunda, escore da escala numérica funcional do estado neurológico e escores de compressão extradural, de número de lesões e extensão da extrusão, além dos resultados dos níveis da proteína S100 β dos grupos EA e normal.

4.5 MOMENTOS DE AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM ELETROACUPUNTURA

Os dados dos animais do grupo EA foram agrupados em 3 momentos em relação a contagem total do escore da escala numérica funcional, consistindo em **momento 1**, coletados no 1º dia de avaliação pelo pesquisador; **momento 2** – coletados no momento da segunda coleta de líquido; **momento 3** - no dia em que foi dado alta ao animal. O mesmo pesquisador coletou as informações da escala funcional numérica.

Os animais do grupo EA tratados com eletroacupuntura foram classificados no momento 1 em graus de lesão clínica 1 a 5.

4.6 AVALIAÇÃO DA COMPRESSÃO EXTRADURAL DA MEDULA ESPINHAL DO GRUPO EA

O exame de tomografia computadorizada (TC) associado ou não à mielografia foi realizado de acordo com o protocolo do Serviço de Diagnóstico por Imagem da FMVZ/USP e descrito por Santos (2006).

Os animais do grupo EA submetidos ao exame de mielografia e/ou tomografia computadorizada foram classificados em escore de lesão de acordo com o grau de compressão extradural da medula espinhal (BURGESE, 2006; SANTOS, 2006) e número de extrusões. A extensão da extrusão foi estimada em milímetros.

4.6.1 Escore de avaliação de compressão extradural da medula espinhal e de conteúdo de material opacificado no canal vertebral por meio da tomografia computadorizada associada ou não à mielografia

- 0 ausência de compressão da medula espinhal ou conteúdo de material opacificado no canal vertebral
- 1 Leve compressão extradural da medula espinhal com desvio da mesma ou presença de material opacificado determinando compressão de menos de 25% da altura medular
- 2 Moderada compressão extradural da medula espinhal com achatamento da mesma ou presença de material opacificado determinando compressão de até 50% da altura medular
- 3 Grave obstrução do canal vertebral com material opacificado ocupando 50% ou mais da altura do mesmo

4.6.2 Escore de avaliação quanto ao número de espaços intervertebrais comprometidos por compressões extradurais da medula espinhal

- 0 ausência de lesões
- 1 presença de um espaço intervertebral acometido
- 2 presença de dois espaços intervertebrais acometidos – uma lesão principal e uma leve
- 3 presença de três espaços intervertebrais acometidos – uma lesão principal e duas leves

- 4 presença de mais de três espaços intervertebrais acometidos – uma lesão principal e mais de duas leves

4.7 DOSAGENS DA PROTEÍNA S100 β E COLETA DO LÍQUOR DO GRUPO EA E GRUPO NORMAL

A dosagem da proteína S100 β foi realizada nas amostras de LCR dos grupos EA e grupo normal no Laboratório de Neurologia da Faculdade de Medicina/USP, LIM 45, durante o período de outubro de 2007 a junho de 2008. Até o procedimento da dosagem, as amostras foram armazenadas a temperatura de -70°C.

Os níveis de proteína S100 β foram detectados através da técnica de *Western blot* que após reação de quimiluminescência foi realizada leitura por densidade relativa óptica.

A análise de *Western blot* demonstra o tamanho do antígeno protéico e serve para distinguir anticorpos que possuam reatividade similar. As proteínas da amostra são separadas de acordo com o peso molecular usando-se um gel de eletroforese. Após a corrida do gel, proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose para que o anticorpo possa ser detectado após incubação e reação com anticorpo secundário adequado. A detecção do anticorpo é realizada através do método de quimiluminescência, onde a membrana é incubada com um substrato que fluoresce quando exposto à enzima reveladora do anticorpo secundário. A luz é então detectada por um filme fotográfico e a imagem analisada por densitometria (DALMAU; ROSENFELD, 1995).

A padronização do método de dosagem pela técnica de *Western blot* dos níveis da proteína S100 β no líquido será descrita a seguir, conforme o método relatado por Chadi et al. (2008). A concentração dos níveis de proteína total do líquido foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). As amostras (50 μ g de proteína), após serem fervidas por 6 minutos e serem submetidas ao choque térmico com gelo, foram separadas através de um gel de eletroforese composto por poliacrilamida (Bio-Rad®) e dodecil sulfato de sódio (SDS) na concentração de 20% (SDS-PAGE 20%) devido ao baixo peso molecular da proteína de interesse (10Kda). Esta etapa foi realizada com um tampão de corrida com concentração de SDS de 0.05%. As proteínas foram transferidas em membranas de nitrocelulose (Bio-Rad®) por 40 minutos em 100 V. Após bloqueio por 30 minutos com 3% de albumina de soro bovino (BSA) em solução de tampão salina, Trizma e detergente Tween

20 (TBS-T), as membranas foram então incubadas *overnight* em refrigeração e agitação com o anticorpo primário S100 β , monoclonal anti-mouse (Abcam®, ab 11178) na concentração 1:800 diluído em solução de 5% de leite desnatado em solução TBS-T. O anticorpo anti-S100 β , ab 11178 (Abcam®), foi obtido pela proteína nativa inteira e purificada de vaca e reage com espécies mamíferas, reconhecendo S100 α e S100 β . As membranas após a incubação foram lavadas duas vezes (por 10 minutos cada lavagem) com TBS-T e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora com uma diluição de 1:6000 de anticorpo secundário anti-mouse conjugado IgG-ECL (GE Healthcare UK limited). Em seguida foram realizadas duas lavagens de 10 minutos com TBS-T e uma lavagem de 10 minutos com solução de tampão salina e Trizma base (TBS). As membranas foram então incubadas com o reagente de quimiluminescência (PerkinElmer Life Science, USA) por 1 minuto. As membranas foram expostas a um filme de raio-X para imagem (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences, USA) e visualização das bandas de proteína. Os níveis da proteína S100 β foram quantificados por densitometria através de um analisador de imagem assistido por computador e *software* desenvolvido pela *Imaging Research (Brock University, Canada)*.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise estatística descritiva dos dados obtidos dos cães com extrusão de disco intervertebral. As médias obtidas na EFN nos momentos 1, 2 e final dos animais tratados com eletroacupuntura – grupo EA - foram avaliadas com análise estatística de variância para medidas repetidas (ANOVA) e comparações múltiplas de Bonferroni (*post-test*) para detectar as diferenças

Os níveis da proteína S100 β nos M1 e M2 do grupo EA foram avaliados com teste t-Student para medidas repetidas. Para a comparação dos mesmos níveis da proteína S100 β , M1 e M2, do grupo EA com os do grupo normal, foi realizado o teste t-Student para medidas independentes. Para a correlação dos níveis da proteína S100 β do M1, grupo EA, com as variáveis quantitativas - evolução clínica, idade, tempo de retorno à locomoção, peso e extensão da extrusão (em milímetros-mm) foi utilizada a correlação linear de Pearson. Para verificar se há associação dos níveis da proteína S100 β do M1, grupo EA, com as variáveis qualitativas - graus de lesão clínica (3 a 5), escore de compressão extradural, escore de número de lesões, escore pela EFN, realizou-se a categorização dos dados em diferentes

subgrupos de graus ou escores e foram submetidos à ANOVA ou teste t-Student para medidas independentes. Para verificar se há correlação dos níveis da proteína S100 β do M2, grupo EA, com as variáveis quantitativas - evolução clínica, tempo de retorno à locomoção e extensão da extrusão, foi realizada a correlação linear de Pearson. Foram utilizados os programas *Minitab* 14 e *Graph Pad Instat*.

O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Foram incluídos como grupo EA no presente estudo 10 animais com o diagnóstico de extrusão de disco intervertebral na região tóraco-lombar após exame de mielografia e/ou tomografia computadorizada, sendo 6 machos (60%) e 4 fêmeas (40%), e todos da raça Dachshund (Apêndice A). Todos os cães foram tratados com eletroacupuntura e não houve desistências ou perdas de dados. O período (média±desvio padrão) compreendido entre a suspensão das medicações e o início da eletroacupuntura foi de 10.5±8.2 dias.

Em relação aos espaços intervertebrais observou-se incidência de extrusões principais nos 10 animais: T11-12 (30%), T12-13 (30%), T13-L1 (10%) e L1-2 (30%). A lateralização do material extruído foi observada 50% para o lado esquerdo e 50% para o lado direito. Oito dos cães (80%) apresentaram lesões múltiplas que corresponderam a extrusões em L3-4 (2) e L4-5 (1) e compressões extradurais leves em T11-12 (4), T12-13 (3), T13-L1 (2) e C2-3 (1) (Apêndice A).

5.1 Análise estatística dos cães do grupo EA

Os resultados da análise estatística dos cães do grupo EA em relação à idade, peso, grau de lesão, escores obtidos pela avaliação da imagem na mielografia e TC, evolução clínica (período de tempo entre o início dos sintomas até o dia da primeira avaliação clínica), tempo de retorno à locomoção após início do tratamento e escore da EFN foram descritos na tabela 1 e 2 (Apêndices B e C).

Tabela 1- Análise estatística descritiva dos dados obtidos dos cães do grupo EA submetidos à eletroacupuntura no Momento 1 em relação à peso, idade, escore da escala funcional numérica (EFN), grau de lesão (GL), tempo de evolução clínica (EC) e tempo de retorno à locomoção em dias (RL) após eletroacupuntura - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Análise estatística	Peso (kg)	Idade (anos)	EFN	EC (dias)	GL	RL (dias)
Média	8,30	7,0	10,0	30,8	3,9	27,5
SEM	0,63	0,8	1,3	4,5	0,2	11,1
DP	2,0	2,4	4,2	14,3	0,7	35,0
Mínimo	5,9	4	2	12	3	1
Q1	6,07	5,0	7,0	20,2	3,0	1,7
Mediana	8,40	7,0	9,5	30,0	4,0	8,5
Q3	9,65	8,2	14,0	36,5	4,2	63,0
Máximo	12,0	12,0	16,0	63,0	5,0	90,0
IC mínimo 95%	6,87	5,3	7,0	20,6	3,4	2,4
IC máximo 95%	9,73	8,7	13,0	41,0	4,4	52,6

SEM – Erro padrão da média; DP – Desvio padrão da média; Q1 – 1º Quartil; Q3 – 3º Quartil; IC – Intervalo de confiança

Tabela 2- Análise estatística descritiva dos dados obtidos na mielografia e tomografia computadorizada (TC) dos cães do grupo EA submetidos à eletroacupuntura no Momento 1 em relação ao escore de compressão, escore do número de lesões (extrusões) e extensão da extrusão - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Análise estatística	Escore de compressão	Escore nº de lesões	Extensão
Média	2,2	2,4	7,2
SEM	0,2	0,3	0,9
DP	0,6	1,1	2,7
Mínimo	1	1	2
Q1	2,0	1,7	5,5
Mediana	2,0	2,0	8,0
Q3	3,0	3,2	10,0
Máximo	3	4	10
IC mínimo 95%	1,7	1,6	5,3
IC máximo 95%	2,7	3,2	9,1

SEM – Erro padrão da média; DP – Desvio padrão da média; Q1 – 1º Quartil; Q3 – 3º Quartil; IC – Intervalo de confiança

A Escala Funcional Numérica do grupo EA obtida nos momentos 1 e 2 e momento 3 está representada na figura 1 e demonstra uma melhora neurológica crescente e significativa em todos os momentos.

Figura 1 - Valores (Média±DP) dos escores obtidos da Escala Funcional Numérica (EFN) de todos os cães do grupo EA tratados com eletroacupuntura (n=10) nos momentos 1, 2 e 3. Pvalor<0,001 (Análise de variância para medidas repetidas – ANOVA entre todos os momentos, nível de significância 5%). *Pvalor<0,001 (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre M1 e M2). #Pvalor<0,001 (entre M1 e M3). **Pvalor<0,05 (entre M2 e M3) - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Com relação aos graus de lesão dos animais do grupo EA observou-se 2 animais com grau de lesão 3; 6 animais com grau de lesão 4 e 2 animais com grau de lesão 5. Nos animais tratados com eletroacupuntura com graus de lesão 3 e 4 constatou-se melhora neurológica significativa através da EFN entre os momentos 1 e 2 conforme demonstra a figura 2.

Figura 2 – Representação da melhora neurológica através da Escala Funcional Numérica (EFN) nos momentos 1 (M1), 2 (M2) e 3 (M3) e distribuição conforme grau de lesão 3 a 5 do grupo EA. Comparação da EFN entre M1 e M2 com grau de lesão 3 (Pvalor<0,05); comparação da EFN entre M1 e M2 com grau de lesão 4 (Pvalor<0,001), ambos com ANOVA e teste de Bonferroni - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Conforme a figura 3 observou-se uma variação no tempo de retorno à locomoção, identificando-se duas categorias de cães do grupo EA: A - grupo de animais com recuperação em até 30 dias de tratamento (n=7) e B - grupo de animais com recuperação após 30 dias de tratamento (n=3). Realizou-se uma comparação destes animais com relação aos dados obtidos conforme descrito na tabela 3 e figuras 4 e 5. Observou-se que não houve diferenças significativas entre os dois grupos em relação ao escore de compressão, número de extrusões e extensão da extrusão pela tomografia computadorizada, além do tempo de evolução clínica, idade, escala funcional numérica e peso. Exceto no tempo de retorno à locomoção houve diferença significativa entre os grupos. Em ambos os grupos observou-se uma melhora neurológica crescente e significativa entre os momentos 1 e 2, mantendo-se a melhora até o momento 3 embora sem diferença significativa (Figuras 4 e 5).

Figura 3 - Representação do tempo de retorno à locomoção (em dias) dos cães (1 a 10) do grupo EA tratados com eletroacupuntura - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

O número de sessões de acupuntura necessário para o retorno à locomoção do grupo A foi de 1.8 ± 1.06 e no grupo B foi de 11.3 ± 2.3 (Apêndice F).

Tabela 3 - Comparação dos dados obtidos no Momento 1 nos cães com extrusão de disco intervertebral submetidos à eletroacupuntura (Grupo EA) e que retornaram à locomoção antes (A) e após 30 dias (B) do tratamento (média±DP) – FMVZ/USP - São Paulo - 2010

Variáveis obtidas no M1	A (n=7)	B (n=3)	P-valor
Escore compressão pela TC	2,3±0,8	2,0±0,0	0,356
Escore nº de extrusões pela TC	2,0±0,8	3,3±1,2	0,067
Retorno à locomoção (dias)	6,7±7,9	76,0±17,1	<0,001
Extensão extrusão pela TC	6,9±3,0	8,0±2,0	0,571
Tempo evolução clínica (dias)	30,7±16,1	31,0±11,8	0,979
Grau de lesão clínica	3,7±0,8	4,3±0,6	0,245
Idade (anos)	6,4±1,8	8,3±3,5	0,275
Escala funcional numérica	11,3±3,6	7,0±4,4	0,144
Peso (Kg)	8,44±2,11	7,97±2,10	0,752

Nível de significância de 5% (P<0,05) - Teste t-Student. TC – Tomografia computadorizada.

Figura 4 - Valores (Média±DP) dos escores obtidos da Escala Funcional Numérica (EFN) de todos os cães do grupo EA, subgrupo A, tratados com eletroacupuntura com recuperação antes 30 dias (n=7) nos momentos 1, 2 e 3. P-valor=0,001(ANOVA entre todos os momentos, nível de significância 5%). *P-valor<0,001 (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre M1 e M2). #P-valor<0,001 (entre M1 e M3). P-valor=0,116 (entre M2 e M3) - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Figura 5 - Valores (Média±DP) dos escores obtidos da Escala Funcional Numérica (EFN) de todos os cães do grupo EA, subgrupo B tratados com eletroacupuntura com recuperação após 30 dias (n=3) nos momentos 1, 2 e 3. P-valor=0,002 (ANOVA entre todos os momentos, nível de significância 5%). *P-valor<0,05 (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre M1 e M2). #P-valor<0,01 (entre M1 e M3). P-valor>0,05 (entre M2 e M3) - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

A idade e o peso não tiveram correlação com o tempo de retorno à locomoção do grupo EA, respectivamente $r^2=0,2002$ ($r=0,447$) com P-valor=0,195 e $r^2=0,03814$ ($r=-0,195$) com P-valor=0,589. A evolução clínica e extensão da extrusão não tiveram também correlação com o tempo de retorno à locomoção, respectivamente $r^2=0,01825$ ($r=-0,135$) com P-valor=0,710 e $r^2=0,06444$ ($r=0,254$) com P-valor=0,479. O escore de compressão da extrusão pela TC e escore do número de lesões não foram associados com o tempo de retorno à locomoção, respectivamente $r^2 = 0,0441$ ($r=-0,221$) com P-valor=0,540 e $r^2 = 0,2756$ ($r = 0,525$) com P-valor = 0,119.

O **momento 2** (Média±DP) foi realizado em $35,5\pm 21,33$ dias de tratamento e o **momento 3** foi realizado em $86,2\pm 61,83$ dias de tratamento, considerando todos os animais do grupo EA. O **momento 2** do grupo A (com recuperação em até 30 dias) foi realizado em $21,85\pm 2,23$ dias de tratamento e o **momento 3** foi realizado em $52\pm 18,31$ dias de tratamento. Já o **momento 2** do grupo B (com recuperação após 30 dias) foi realizado em $67,33\pm 7,58$ dias de tratamento e o **momento 3** foi realizado em $166\pm 53,54$ dias de tratamento.

5.2 Detecção dos níveis da proteína S100 β no líquido de cães do grupo EA e grupo normal

A detecção dos níveis da proteína S100 β no líquido foi realizada após padronização da técnica de *Western blot* no Laboratório de Neurologia da Faculdade de Medicina/USP durante o período de outubro de 2007 a junho de 2008. Os resultados obtidos foram representados nas figuras 6 a 11.

Na figura 6 observou-se uma tendência decrescente dos valores médios da proteína S100 β nos momentos 1, 2 do grupo EA e momento 1 do grupo normal (Apêndices D e E).

Figura 6 - Valores (Média±DP) de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100 β no líquido em relação ao grupo EA, cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura (n=10), nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) (comparados pelo teste t-Student para medidas pareadas, com p = 0,405) e momento 1 do grupo normal (n=7) (*comparação entre EA M1 e Grupo Normal com p = 0,039 e entre EA M2 e Grupo normal com p = 0,116, ambas comparações feitas pelo teste t-Student para medidas independentes) - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Em relação ao M1 observou-se valores médios de S100 β inferiores em cães com recuperação após 30 dias (grupo B) quando comparados ao grupo de cães com recuperação até 30 dias (grupo A), porém sem diferença significativa (Figura 7).

Figura 7- Comparação dos valores de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100β no líquido entre cães do grupo EA (cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura) no momento 1 (M1) que tiveram recuperação até 30 dias (A) com os que tiveram recuperação após 30 dias do tratamento (B). P-valor=0,069 (Teste t-Student) - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Já no M2 observou-se níveis médios de S100β superiores em cães com recuperação após 30 dias (B) quando comparados ao grupo de cães com recuperação até 30 dias (A), sendo esta diferença significativa (P-valor=0,032), conforme a figura 8.

Figura 8- Comparação dos valores de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100β no líquido entre cães do grupo EA (cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura) no momento 2 (M2) que tiveram recuperação até 30 dias (A) com os que tiveram recuperação após 30 dias do tratamento (B). *P-valor=0,032 (Teste t-Student) - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Análise dos níveis médios de S100β em todos os momentos em cães com recuperação até 30 dias (Grupo A) e no grupo normal observou-se valor médio superior no M1 quando comparados ao M2 e grupo normal, sendo a diferença significativa (P-valor=0,0107). Diferença significativa foi encontrada entre valores de M1 e M2 (P-valor=0,008) e M1 e

grupo normal (P-valor=0,01), porém não houve diferença significativa entre valores de M2 e grupo normal (P-valor=0,423), conforme mostra a figura 9.

Figura 9 - Valores (Média±DP) de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100β no líquido em relação ao grupo EA, subgrupo A, cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura com recuperação até 30 dias do tratamento (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) e grupo normal (n=7). P-valor=0,0107 (ANOVA para medidas independentes entre todos os grupos). *P-valor=0,008 (Teste t-Student para medidas pareadas entre M1 e M2). #P-valor=0,01 (Teste t-Student para medidas independentes entre grupos A M1 e normal). P-valor=0,423 (Teste t-Student para medidas independentes entre grupos A M2 e normal) - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

Entretanto, análise dos níveis médios de S100β em todos os momentos em cães com recuperação após 30 dias (Grupo B) e no grupo normal observou-se valor médio superior e significativo no M2 quando comparado ao M1 (Pvalor=0,016) e em relação ao grupo normal (Pvalor=0,022). Porém não houve diferença significativa entre M1 e grupo normal (Pvalor=0,756), conforme demonstra a figura 10. A figura 11 representa os resultados ilustrados dos níveis da proteína S100β pela técnica de *Western Blot*.

Figura 10 - Valores (Média±DP) de densidade óptica relativa dos níveis da proteína S100β no líquido em relação ao grupo EA, subgrupo B, cães com extrusão de disco intervertebral tratados com eletroacupuntura (n=3) com recuperação após 30 dias do tratamento nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) e grupo normal (n=7). P-valor=0,039 (ANOVA para medidas independentes entre todos os grupos). *P-valor=0,016 (Teste t-Student para medidas pareadas entre M1 e M2). P-valor= 0,756 (comparação entre grupos B M1 e normal) e #P-valor= 0,022 (comparação entre grupos B M2 e normal), ambos com teste t-Student para medidas independentes - FMVZ/USP – São Paulo - 2010.

Figura 11 - A) Resultado ilustrado dos níveis da proteína S100β pela técnica de *Western blot* do animal do grupo normal; M2 e M1, respectivamente do cão 1 do grupo EA, subgrupo A tratado com eletroacupuntura. B) Resultado ilustrado dos níveis da proteína S100β pela técnica de *Western blot* do animal do grupo normal; M1 e M2, respectivamente do cão 3 do grupo EA, subgrupo B tratado com eletroacupuntura e que teve recuperação após 30 dias - FMVZ/USP – São Paulo - 2010

5.3 Correlação e associação dos níveis da proteína S100β com parâmetros clínicos e de imagem

Foram calculadas as correlações, para os animais do **grupo EA** tratados com eletroacupuntura, entre os níveis da proteína S100β (Apêndice D) e os parâmetros clínicos (Apêndices A, B e C) e de imagem (Apêndice B e Figuras 12 e 13).

O nível da proteína S100β no M1 não teve correlação com idade ($r^2=0,2042$; $r=-0,4519$; P-valor=0,189), peso ($r^2=0,02634$; $r= 0,1623$; P-valor=0,654), evolução clínica

($r^2=0,0062$; $r=-0,0791$; $P\text{-valor}=0,828$), tempo de retorno à locomoção ($r^2=0,2522$; $r=-0,5022$; $P\text{-valor}=0,139$) e extensão da extrusão ($r^2=0,03450$; $r=-0,1857$; $P\text{-valor}=0,607$).

O nível da proteína S100 β no M1 não apresentou diferenças significativas entre os graus de lesão 3, 4 e 5 (teste ANOVA com $P\text{-valor}=0,931$); entre o grupo com escores de compressão extradural 1 e 2 comparado com grupo com escore de compressão 3 (teste t-Student para amostras independentes com $P\text{-valor}=0,771$); entre grupo de cães com EFN<10 e EFN>10 (teste t-Student para amostras independentes com $P\text{-valor}=0,520$) e entre grupo de cães com escores de nº de lesões 1, 2, 3 e 4 (teste ANOVA com $P\text{-valor}=0,526$).

O nível da proteína S100 β no M2 não teve correlação com a evolução clínica ($r^2=0,03044$; $r=-0,1745$; $P\text{-valor}=0,629$), extensão da extrusão ($r^2=0,0158$; $r=-0,1257$; $P\text{-valor}=0,729$). Houve uma tendência a correlação em relação ao tempo de retorno à locomoção e nível de S100 β no M2 ($r^2=0,3852$; $r=0,6206$; $P\text{-valor}=0,055$).

Poder na comparação de S100 B em M1 entre os grupos A e B = 27,4%.

Poder na comparação de S100 B em M2 entre os grupos A e B = 12,6%.

A figura 12 demonstra imagens digitalizadas de exames tomográficos simples e/ou associado à mielografia correspondentes aos escores de compressão na medula espinhal 1 a 3 dos animais do grupo EA, cães 7, 2 e 4 respectivamente.

Figura 12 – Imagens digitalizadas: A) Exame tomográfico simples (com seleção de janela e nível para avaliação de tecidos moles) do cão 7 com escore de compressão 1 em T11-12. Exames tomográficos após a mielografia (B e C). B) Seleção de janela e nível para avaliação de tecido ósseo do cão 2 com escore de compressão 2 em T11-12. Houve interrupção da progressão da coluna de contraste que não foi visibilizada neste corte. C) Seleção de janela e nível para avaliação de tecido ósseo do cão 4 com escore de compressão 3 em L1– Serviço de Diagnóstico por Imagem – FMVZ/USP – São Paulo - 2010

A figura 13 demonstra imagens digitalizadas de exames tomográficos simples e/ou associado à mielografia correspondentes aos cães 1, 3, 5, 6, 8, 9 e 10.

Figura 13 – Imagens digitalizadas de exames tomográficos após a mielografia demonstrando a extrusão do disco intervertebral com interrupção da coluna de contraste exceto na imagem C. A) Cão 1 - Extrusão ventrolateral direita com compressão de 50% em T11-12. B) Cão 3- Extrusão ventrolateral direita com compressão de 50% em T12-13. C) Cão 5- Extrusão ventrolateral direita com compressão de 50% em T12-13. D) Cão 6 - Extrusão ventral com compressão de mais de 50% em L1-2. E) Cão 8 - Extrusão ventrolateral direita com compressão de 25 a 50% em L1-2 -25 a 50%. F) Cão 8 - Extrusão ventral com compressão de 25% em L3-4. G) Cão 8 - Extrusão ventral com compressão de 25% em L4-5. H) Cão 9 - Extrusão ventrolateral esquerda com compressão de 50% em T13-L1. I) Cão 10 - Extrusão dorsolateral esquerda com compressão de mais de 50% em T12-13 - Serviço de Diagnóstico por Imagem – FMVZ/USP – São Paulo - 2010.

6 DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo mostraram a raça Dachshund como única dentre os cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar, confirmando os achados de outros autores que determinam a mesma como uma das raças condrodistróficas mais susceptível a esta doença (OLBY; DYCE; HOULTON, 1994; NECAS, 1999; COATES, 2000).

As lesões principais encontradas no presente estudo e localizadas nos espaços T11-12, T12-13, T13-L1 correspondem aos dados já relatados em literatura como as regiões de maior incidência (BRAUND, 1986; YOVICH; READ; EGER, 1994; NECAS, 1999; COATES, 2000; HAYASHI, 2006; SANTOS, 2006).

A doença de disco intervertebral tóraco-lombar constitui-se na principal causa de alteração neurológica em pequenos animais (OLBY; DYCE; HOULTON, 1994). Segundo Braund (1986), a lesão tóraco-lombar entre T3 a L3 produz uma síndrome tóraco-lombar caracterizada por tônus muscular espástico, fraqueza ou paralisia dos membros pélvicos, com seus reflexos, patelar, tibial cranial e gastrocnêmio intactos, variando de normais a aumentados correspondendo à lesão de neurônio motor superior, e nos membros torácicos normais. A sensibilidade cutânea é reduzida ou ausente abaixo da lesão e aumentada na região ou imediatamente após o nível da lesão. Se a lesão ocorre após L3, haverá sinais de lesão do neurônio motor inferior nos membros pélvicos, devido compressão da medula espinhal lombo-sacra ou nervos da cauda equina ou mielomalácia progressiva descendente (LECOUTEUR; CHILD, 1992). Cerca de 10 a 15% dos animais podem apresentar lesão de neurônio motor inferior devido a lesões discais entre L3-L4 e L6-7 (SHARP; WHEELER, 2005). Os resultados do presente estudo corroboram com a descrição destes autores, pois todos os animais com extrusão apresentaram clinicamente síndrome tóraco-lombar e sinais de lesão de NMS. Embora fossem observados lesões em L3-4 e L4-5 em 2 animais, estes não apresentavam clinicamente sinais de lesão de NMI.

Ruddle et al. (2006) avaliaram a localização específica do espaço intervertebral em cães com extrusão como prognóstico indicador para o retorno da função motora e tempo de retorno da mesma, concluindo que não há efeito regional do espaço envolvido. Entretanto observaram que os pacientes com extrusões de disco ao nível de ou caudal a L3-4 alcançaram retorno de uma ambulação forte mais precocemente do que pacientes com lesão entre T10-L3 após tratamento cirúrgico com a técnica de hemilaminectomia. Este fato contraria estudos anteriores onde animais com lesão caudal em medula espinhal lombar justificariam um

prognóstico pobre devido à lesão potencial na intumescência lombo-sacra. Este fator não pôde ser evidenciado no presente estudo já que todos os animais apresentaram sinais neurológicos de NMS com recuperação motora posterior à eletroacupuntura, apesar das observações de algumas lesões múltiplas em espaços L3-4 e L4-5.

A progressão dos sinais clínicos ocorre de acordo com o aumento da lesão medular e sua relação com envolvimento de fibras nervosas de diversos tamanhos. De acordo com este conceito, a perda da propriocepção ocorre em lesões médias. Lesões cada vez mais severas promovem perda da habilidade de sustentação, do movimento voluntário e no final, da percepção da sensibilidade dolorosa. A posição dos tratos espinhais representa um fator que é associado com a progressão de sinais clínicos. O trato proprioceptivo ascendente está mais superficial na medula espinhal e por este motivo mais sensível à injúria (SHARP; WHEELER, 2005). O acompanhamento dos animais do presente estudo através da EFN permitiu quantificar a melhora gradativa do quadro neurológico, numa ordem inversa de aparecimento dos sinais clínicos, ou seja, o retorno da propriocepção é o último acontecimento que ocorre, muito embora seja o primeiro sinal observado clinicamente quando da extrusão de disco com compressões médias e severas como observadas nos animais deste estudo com graus de lesão 3 a 5.

Já os tratos espinotalâmicos e proprioespinhais ascendentes, que carregam percepção de dor são localizados mais profundamente. A lesão medular deve envolver a maior parte do seu diâmetro para que seja afetada a percepção da sensibilidade dolorosa do paciente (SHARP; WHEELER, 2005), sendo um indicador de prognóstico grave (DUVAL et al., 1996). A ausência persistente da percepção da dor profunda indica lesão grave, mas não significa transecção completa da medula espinhal. A recuperação destes animais pode implicar no caminhar espinhal ou ainda sobrevivência de axônios cruzando o local da injúria. Acredita-se que o caminhar espinhal se origine de circuitos espinhais locais e têm sido demonstrados em cães adultos, gatos e roedores após transecção da medula espinhal. Foi demonstrado que uma sobrevivência de 5 a 10% de axônios descendentes é suficiente para determinar os circuitos locais que produzem a locomoção básica (OLBY et al., 2003). Esta afirmação foi observada no presente estudo. Dos cães com grau 5 (n=2), um dos animais retornou com a percepção à dor profunda com melhora gradativa até o retorno à locomoção, e outro animal embora não retornasse com percepção à dor profunda, conseguiu o caminhar espinhal como locomoção básica (animais 6 e 5, Apêndice B). Este caminhar espinhal também está relacionado com o fato de animais paraplégicos recuperarem movimentos dos membros pélvicos com um padrão alternado e complexo. Os centros responsáveis pela

coordenação de atividades de marcha complexa são chamados de geradores de padrão central. É uma marcha mais complexa do que simples reflexos espinhais que são capazes de informação sensorial específica para ativar uma reposta motora de fase única (MCDONALD; SADOWSKY, 2002).

Olby et al. (2003) determinaram que o peso e idade foram fatores associados à velocidade de retorno à locomoção em cães com injúrias severas da medula espinhal tóraco-lombar e ausência da percepção à dor profunda (n=87). O prognóstico destes animais foi pior quando a lesão foi traumática, mas as chances de recuperação motora foram melhores em cães com hérnia de disco submetidos à intervenção cirúrgica. Quanto menor o peso ou idade, mais precoce foi o tempo de retorno à locomoção em dias. No presente estudo não foi observado correlação do peso e idade com o tempo de retorno à locomoção, provavelmente devido ao pequeno número de animais do presente estudo. Observou-se que o animal mais jovem (4 anos) com grau 3 retornou à locomoção em 1 dia e o animal mais velho (12 anos) com grau 4 retornou à locomoção em 90 dias após a eletroacupuntura. Porém observou-se que o animal mais leve (5.9 Kg) com grau 5 retornou à locomoção em 81 dias e o animal mais pesado (12 Kg) com grau 4 retornou à locomoção em 1 dia após a eletroacupuntura. Estes achados sugerem que o grau de apresentação clínica e a presença ou não da percepção à dor profunda determinam efeito na velocidade de recuperação motora.

Kazakos et al. (2005) observaram que a severidade e duração dos sinais clínicos não tiveram relação com a recuperação clínica em 30 cães com discopatia tóraco-lombar submetidos à cirurgia descompressiva. Além disso, um estudo clínico foi realizado em pacientes humanos com hérnia de disco lombar tratados com acupuntura. Os autores também não correlacionaram o grau de compressão mecânica através de TC com a gravidade de sinais neurológicos e evolução clínica (YAMAMURA et al., 1996). No presente estudo também foi observado que não houve associação da evolução clínica e grau de compressão medular e extensão da extrusão com o retorno à locomoção. Portanto, estes estudos observaram que a intensidade do efeito da massa compressiva não pode ser indicador do prognóstico devendo-se levar em conta o quadro clínico do paciente.

Coates (2000) cita que cães capazes de locomoção e que apresentem somente dor ou paresia de grau médio tem taxa de sucesso de 82% a 100% e cães incapazes de locomoção têm taxa de sucesso de 43 a 51 %. Estes dados diferem do presente estudo onde todos os cães com graus de lesão 3 a 5 e portanto incapazes de locomoção obtiveram retorno à locomoção após a eletroacupuntura obtendo-se taxa de sucesso de 100%.

Ao se considerar a técnica cirúrgica descompressiva nos casos de extrusão de disco, não se deve esquecer que a deficiência neurológica pode ser devida à concussão inicial. Entretanto o grau da compressão contínua pode frequentemente ser avaliado somente com a tomografia computadorizada ou com a exploração cirúrgica (COUGHLAN, 1993). McDonald e Sadowsky (2002) citam que a tomografia computadorizada define melhor estruturas ósseas do que a radiografia e pode detectar mudanças em tecidos moles, e a combinação da mesma com a mielografia define melhor anormalidades no canal espinhal do que a tomografia sozinha. Este fato foi observado no presente estudo após a realização de mielografia associada à tomografia computadorizada nos animais submetidos à eletroacupuntura, confirmando graus de compressão severos compreendendo 50% ou mais de 50% na maioria dos animais, exceto um animal com menos de 25% de compressão (Apêndice B). Estes dados não seriam possíveis de serem obtidos somente com radiografias simples, demonstrando a importância de outros métodos de imagem para avaliar a intensidade de compressão extradural. Além disso, foi observado que estes animais mesmo com compressões severas se recuperaram com o tratamento com eletroacupuntura e sem descompressão cirúrgica ou medicamentos.

Em contrapartida, o diagnóstico exato da extrusão permitiu a aplicação de acupuntura em pontos do meridiano do Vaso Governador correspondentes e um efeito local importante evidenciado com os resultados precoces de retorno à ambulação como nos animais 7 e 1 com grau 3 de lesão clínica e que retornaram à locomoção em 1 e 2 dias respectivamente, e nos animais 4 e 6, graus 4 e 5 de lesão clínica e que retornaram à locomoção em 1 e 3 dias respectivamente. No presente estudo, a média do retorno à locomoção do grupo com recuperação até 30 dias ($6,71 \pm 7,89$ dias) foi menor do que a obtida em estudo anterior com eletroacupuntura com cães com graus 3 e 4 de lesão clínica ($10,1 \pm 6,49$ dias) (HAYASHI; MATERA; FONSECA PINTO, 2007).

McDonnel, Platt e Clayton (2001) citam que técnicas de imagem avançadas são úteis no diagnóstico de extrusão lateralizada, como a tomografia computadorizada, ressonância magnética, tomografia linear, discografia e ultrassonografia. A tomografia computadorizada e ressonância magnética são vantajosas para estes casos devido à natureza de suas imagens em posição transversa e a habilidade de visualizar as áreas de interesse em planos múltiplos. Indicam também a associação da tomografia e mielografia para a localização precisa da lesão quando esta ocorre na região cervical e tóraco-lombar, assim como realizado no presente estudo que conseguiu detectar a lateralização da extrusão em todos os casos.

A alta dose de succinato sódico de metilprednisolona é recomendada em estudo com pacientes humanos dentro de 8 horas do trauma espinal, sendo que após este período ou continuado por 24 horas não obteve boa recuperação neurológica. Em cães e gatos, o protocolo pode ser adaptado: em caso agudo o tratamento deve ser instituído dentro de 8 horas do trauma, sendo indicado 30 mg/kg de succinato sódico de metilprednisolona por via venosa durante vários minutos, seguido de 15 mg/kg a cada 4 a 6 horas e não exceder 24 horas. Quando a opção for o tratamento cirúrgico em animais não submetidos ao protocolo descrito, este pode ser integrado no momento da indução anestésica com a mesma dosagem de corticóide citada anteriormente. Devem-se levar em conta os efeitos colaterais associados a estas altas doses (COUGHLAN, 1993). Outro autor cita a dosagem de 10 mg/kg de succinato sódico de prednisolona ou 2 mg/kg de dexametasona por via venosa no pré-operatório imediato (YOVICH; READ; EGER, 1994). O uso de manitol e dimetil sulfoxido é citado por alguns autores (COUGHLAN, 1993; DUVAL et al, 1996; FERREIRA; CORREIA; JAGGY, 2002). Entretanto, efeitos adversos com o uso de dexametasona previamente à cirurgia descompressiva em cães com extrusão de disco tóraco-lombar foram maiores do que o grupo que não recebeu ou que recebeu outro corticóide, não tendo diferenças com a evolução neurológica. Os autores concluíram que o uso da dexametasona nestes casos deve ser reconsiderado (LEVINE et al., 2008).

Portanto, a administração de corticosteróides em traumas do SNC não foi ainda provada ser superior ou definitiva em estudos clínicos (PLATT; ABRAMSON; GAROSI, 2005). O seu uso é controverso nestes casos podendo acarretar em efeitos adversos na recuperação neurológica em humanos e efeito negativo no tratamento com acupuntura (STILL, 1988). O presente estudo avaliou a eletroacupuntura sem o uso do corticosteróide, cujo resultado descrito no grupo com recuperação antes de 30 dias sugeriu ser melhor do que o estudo realizado por Hayashi; Matera e Fonseca Pinto (2007) em que associou a eletroacupuntura com corticosteróide na maioria dos animais, sem, contudo avaliar o grau de compressão medular em todos os casos.

Estudo clínico com eletroacupuntura em cães com sinais de discopatia tóraco-lombar foi realizado utilizando-se frequências baixas alternadas de 2 Hz e 15 Hz, obtendo-se índices de melhora superiores no grupo tratado com acupuntura associado ou não com cirurgia descompressiva em relação ao grupo submetido somente com cirurgia. Entretanto o grupo submetido somente à cirurgia não apresentava disfunção urinária em nenhum animal, muito embora tenha o maior índice de ausência da percepção à dor profunda quando comparado aos outros grupos de tratamento. Além disso, todos os animais foram submetidos

à cirurgia descompressiva após 48 horas do início dos sintomas (JOAQUIM, 2008). As frequências de eletroacupuntura utilizadas no presente estudo foram diferentes, sendo alta e baixa, 3 Hz alternada com 100 Hz, onde obteve-se também recuperação de todos os animais tratados, utilizando pontos de acupuntura em comum como B23, R3, VB30, E 36 e acrescidos dos pontos ID3, B62, B20 ou B25, Bai Hui lombar, VG1 e outros pontos locais do meridiano do Vaso Governador. Não foram usados os pontos descritos por Joaquim (2008) como VB34, B40, B18 e citados por outros autores (JANSSEN, 1983; STILL, 1988; WYNN; MARSDEN, 2003).

A concentração de glutamato no LCR de cães com extrusão tóraco-lombar foi realizada em um estudo clínico para medir a severidade da injúria da medula espinhal e possibilidade de correlacionar com o escore funcional do animal. Entretanto seus níveis foram considerados menos sensíveis do que um escore funcional primitivo. O mesmo ocorre com avaliações do tamanho da lesão em imagens de ressonância magnética. Assim como em estudos humanos com injúria aguda da medula espinhal, o acompanhamento da função neurológica é a mensuração de escolha para avaliação dos resultados do tratamento (OLBY et al., 2001). Esta observação também foi encontrada no presente estudo onde todos os animais tratados com eletroacupuntura se recuperaram e pôde-se mensurar a melhora neurológica com o escore obtido com a EFN. Além disso, os níveis da proteína S100 β no líquido não foram correlacionados com a intensidade da compressão medular e número de extrusões.

No presente estudo os níveis de S100 β no líquido dos cães com extrusão não apresentaram diferenças significativas entre o M1 e M2, porém houve diferença entre o M1 e o grupo normal, sugerindo que após a eletroacupuntura os níveis desta proteína tenderam a retornar a condições de cães sem alteração. No entanto, ao avaliarmos os cães com recuperação precoce e cães com recuperação tardia foram observadas respostas diferentes nos níveis de S100 β . Os níveis médios de S100 β no M1 do grupo com recuperação até 30 dias (grupo A) foram superiores ao do grupo com recuperação após 30 dias (grupo B), porém sem diferença significativa. Este fato sugere no primeiro grupo (A) um grau maior de reatividade das células gliais frente à lesão medular. Contudo ao comparar os níveis médios de S100 β no M2 observou-se que foram significativamente inferiores no grupo com recuperação precoce (A) do que no grupo com recuperação tardia (B), evidenciando neste último grupo que ainda havia uma alta resposta das células gliais para promover a recuperação neurológica.

Os animais do grupo normal não apresentavam lesões neurológicas e, portanto os níveis de S100 β no líquido foram comparados aos dos animais com extrusão tratados com EA

nos diferentes momentos. Nos cães com recuperação até 30 dias (grupo A) os níveis de S100 β no líquido foram superiores no M1 antes do tratamento, decaindo no M2 quando os animais já haviam se recuperado e se igualando aos níveis dos animais do grupo normal, representando uma provável auto-regulação de sua secreção pelas células gliais. Já os cães com recuperação após 30 dias (grupo B) tiveram níveis de S100 β no M1 iguais aos do grupo normal, sugerindo que os mecanismos compensatórios das células gliais frente à injúria medular não foram estimulados ao redor de 4 semanas após a lesão. Porém com o decorrer do tratamento com EA, os níveis de S100 β aumentaram no M2, indicando uma modulação para que ocorra uma compensação da lesão inicial.

Os resultados do presente estudo parecem representar os achados de Cunha et al. (2007) que observou aumento de S100 β e FGF-2 em astrócitos reativos e o mesmo não ocorreu na microglia inativa após contusão medular em ratos adultos, representando provável evento de reparação nas proximidades do sítio de lesão associado a recuperação motora destes animais.

A extrusão aguda provoca uma hemorragia significativa do plexo venoso vertebral e uma reação inflamatória local que pode resultar em aderências fibrinosas entre o material extruído e a dura-máter (NECAS, 1999). O principal fenômeno fisiopatológico no trauma da medula espinhal é a ocorrência de ruptura de membranas celulares e microvasos, levando a formação de radicais livres, agregação plaquetária, obstrução de vasos, além da produção de tromboxanos, prostaglandinas e prostaciclina. Ocorre, portanto, vasoconstrição, edema, anóxia celular e morte celular, sendo todo o processo completado dentro de 24 horas e posteriormente ocorrendo o processo de regeneração (JANSSENS, 1991). Coughlan (1993) e Janssens (1991) citam também o aumento de íons de cálcio no interior de neurônios devido à ruptura da membrana celular. Além disso, com a injúria aguda da medula espinhal, há aumento de concentração de glutamato, um neurotransmissor excitatório, que se liga ao complexo receptor de N-metil D-aspartato que é associado ao canal iônico e permite a entrada predominante de íons de cálcio, gerando mais lesão celular ao nível de neurônios e axônios. Janssens (1991) relata que após 24 horas, o tratamento deve ser centrado na regeneração tecidual. A proteína S100 β tem importância nesta fase inicial, pois tem a propriedade de ser ligante de cálcio e auxiliar na prevenção da morte neuronal.

A proliferação e hipertrofia de astrócitos é uma resposta característica à degeneração Walleriana no SNC. As implicações funcionais desta reação ainda são obscuras. Inicialmente parece refletir uma adaptação ao equilíbrio homeostático devido a uma alteração na

transmissão sináptica e propagação do impulso. Em sequência, a desintegração axonal, fragmentação da bainha de mielina e perda sináptica são adicionados ao padrão de resposta inicial e a manutenção da hipertrofia e hiperplasia astrogliar. Esta fase envolve compensação estrutural pela perda de componentes do tecido neural, chamada de “cicatriz glial”, mas provavelmente também representa contribuição ativa ao reparo e plasticidade. Assim sendo a degeneração de fibras nervosas na medula espinhal acompanha proliferação astrogliar. Foi evidenciada a diferenciação e migração de astrócitos na medula espinhal após injúria na raiz dorsal de ratos adultos. Encontrou-se células precursoras de astrócitos após 30 horas da injúria, decaindo após 1 semana e chegando a níveis indetectáveis em 3 meses (KOZLOVA, 2003). Os resultados encontrados no presente estudo podem ter refletido os achados de Kozlova (2003), justificando o ocorrido nos animais com recuperação precoce (grupo A) que podem ter tido esta resposta glial devido os níveis altos de S100 β no M1 e decaindo no M2 ocorrendo uma provável auto-regulação de seus níveis após o reparo e plasticidade do tecido neural. Uma coleta de líquido mais precoce do que o M2 deste grupo poderia ter detectado um provável aumento dos níveis de S100 β após a eletroacupuntura. Já nos cães com recuperação tardia (grupo B) há sugestões de que a eletroacupuntura tenha iniciado certo estímulo de hipertrofia ou induzido aumento da atividade glial, pois os níveis de S100 β se tornaram altos após o início do tratamento e detectados no M2.

S100 β é produzido principalmente por astrócitos (ROTHERMUNDT et al., 2003) mas também está localizada nas células de Schwann do sistema nervoso periférico (BRISBY et al., 1999) e em melanócitos e adipócitos (LAMERS et al., 2003). São encontrados níveis altos desta proteína em humanos com trauma cerebral e isquemia e este fato pode estar relacionado à secreção de S100 β ou liberação por astrócitos lesionados (ROTHERMUNDT et al., 2003). Este fato não poderia ser avaliado no presente estudo de caráter clínico, devendo ser confirmado em estudos futuros experimentais com métodos de imunohistoquímica de tecidos lesados e perilesionais íntegros em diferentes tempos.

Após lesão da medula espinhal ocorrem mecanismos de injúria primária e secundária descritos por diversos autores (MC DONALD; SADOWSKY, 2002; ZAI; YOO; WRATHALL, 2005). Os eventos secundários após a injúria medular não só provocam a morte celular como também ajudam a restaurar a função pelo aumento de níveis locais de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de progenitores endógenos. Ocorre, portanto o repovoamento de oligodendrócitos e astrócitos, representantes de células gliais, que retornam a níveis normais ao redor de 6 semanas da injúria. Esta proliferação de progenitores

gliais é ajustada mediante a injúria fazendo parte de mecanismos endógenos de recuperação que permite um repovoamento crônico de células gliais na medula espinhal lesada. No entanto não tem significado sem o retorno da função normal (ZAI; YOO; WRATHALL, 2005). A eletroacupuntura pode ter modulado estes mecanismos secundários que são ativados em resposta ao trauma medular, pois se encontrou níveis mais elevados de S100 β no M2, ao redor de 8 semanas após o tratamento e cerca de 12 semanas da injúria inicial, em cães com recuperação motora tardia. Este achado sugere uma maior secreção da proteína S100 β por células gliais proliferadas e possivelmente estimuladas após o tratamento resultando na recuperação motora destes animais. A eletroacupuntura pode ter importância no potencial terapêutico em manipular a proliferação endógena de células progenitoras e recuperação crônica da densidade de células gliais.

A associação da eletroacupuntura e aumento na expressão de RNA mensageiro para o NGF foi encontrada em nervos lesados de ratos entre a 2^a e 4^a semana após a lesão (CHEN; GU; YANG, 2000). Além disso, Fen Liu et al. (2009) realizaram um estudo experimental em gatos adultos submetidos a ganglionectomia parcial da raiz dorsal de L1-L5 e L7-S2 e evidenciaram uma possível associação da eletroacupuntura promovendo plasticidade na medula espinhal através da expressão aumentada de neurotrofina-4 no gânglio e segmento medular na região L6 ao redor de 14 dias após a lesão. A eletroacupuntura promove aumento da circulação na medula espinhal após um trauma e os autores relatam que este fato possivelmente facilitaria o transporte de materiais como radicais básicos ou aminoácidos para o gânglio da raiz dorsal e segmentos da medula espinhal para a síntese de neurotrofina-4 e outras substâncias. Embora o exato mecanismo onde a expressão de neurotrofina-4 associada à neuroplasticidade é desconhecido, há informações relevantes de seu efeito positivo na sobrevivência de neurônios e também promoção de diferenciação e proliferação de células no SNC. Estes estudos representam mais evidências da modulação de fatores neurotróficos através da eletroacupuntura e seu benefício em pacientes neurológicos.

A expressão de GDNF em gânglio da raiz dorsal L4-5 foi avaliada com a técnica de *Western blot* e imunohistoquímica. Esta expressão foi aumentada na região ipsilateral durante a dor neuropática e posteriormente foi aumentada com EA nos pontos VB30 e VB34 e frequências densa-dispersas de 2 e 60 Hz por 30 minutos em dias alternados a partir do 7º dia da lesão até o final do experimento. Os autores concluíram que GDNF pode estar envolvido na analgesia por EA na dor neuropática (ZHI-QIANG DONG et al., 2005). Entretanto este fator neurotrófico derivado de células de linhagem glial, membro distante da família do TGF-

β , suporta a sobrevivência neural em diversas populações neuronais, incluindo neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo e motoneurônios no sistema nervoso central. Promove a sobrevivência e diferenciação de muitos neurônios periféricos, como os simpáticos, parassimpáticos e neurônios sensoriais. Após a injúria, o GDNF mostra um efeito benéfico para resgatar motoneurônios degenerados após avulsão de raiz espinal e axotomia neural distal. Promove regeneração axonal e aumento de regeneração de raízes dorsais na medula espinal de ratos adultos. GDNF é disponível para auxiliar a plasticidade funcional locomotora por exercer neuroproteção anatômica e comportamental após injúria da medula espinal (HAO-LI ZHOU et al., 2008). Estas informações associam a eletroacupuntura com mais um fator neurotrófico possível de ser modulado.

Não se pode excluir o transporte retrógrado axonal de GDNF de um tecido alvo para os corpos celulares neuronais. Tem sido reportado que o GDNF produzido pelo músculo esquelético é capturado nos terminais nervosos e transportado via retrógrada aos motoneurônios do corno ventral pelos axônios. Foi observada também a expressão de GDNF em astrócitos. Pode estar envolvido na neuroplasticidade seguida de injúria após transecção da medula espinal. Um estudo experimental em medula espinal transeccionada de ratos adultos sugere que GDNF tem papel essencial na neuroplasticidade no circuito local especialmente na região caudal de medula espinal transeccionada (HAO-LI ZHOU et al., 2008). Desta forma o estímulo da eletroacupuntura, principalmente em pontos como E36 localizado no músculo tibial cranial ou pontos locais do meridiano da Bexiga, poderia aumentar níveis locais de GDNF e seu transporte retrógrado axonal até motoneurônios, devendo ser confirmado em outros estudos experimentais. Da mesma maneira, níveis de S100 β produzidos por células de Schwann após estímulo por eletroacupuntura poderiam ser transportados através da mesma via até o tecido alvo, necessitando de mais estudos para sua confirmação.

Diversos estudos associaram a proteína S100 β como marcador de lesão tecidual após injúria em medula espinal detectada no soro (LOY et al., 2005; JIANJUN MA et al., 2001) e no líquido (BRISBY et al., 1999). Estes autores relatam que níveis séricos de S100 β podem ser úteis para a mensuração aguda de perda tecidual após injúria da medula espinal, podendo ser considerado um marcador predominante de anormalidades da substância branca ou indicar microambiente da mesma que não são condutíveis à sobrevivência axonal (LOY et al., 2005). Níveis séricos elevados de S100 β foram observados após 6 horas de injúria medular e grande variabilidade no período de 24 horas (LOY et al., 2005), picos máximos em 3, 12 e 72 horas

após injúria medular com retorno ao normal em 6 dias e picos máximos em 3, 6, 12 e 72 horas após avulsão de plexo lombar embora em níveis menores do que na lesão medular (JIANJUN MA et al., 2001). No presente estudo a mensuração de S100 β no líquido foi feita após 4 semanas da injúria (M1) e sem diferença com o grupo normal e sem associação com o grau de compressão extradural, não podendo ser correlacionada como marcador agudo de lesão tecidual. Se a coleta fosse feita em período mais precoce da lesão talvez fosse possível detectar seu aumento. No entanto ao avaliarmos os seus níveis em relação a animais com velocidade de recuperação diferentes, no grupo com recuperação precoce em até 30 dias houve aumento significativo no M1 em relação ao grupo normal. Contudo a evolução clínica destes animais com média de 4 semanas não corresponde a uma fase aguda pós-lesional e não poderia representar a mensuração de perda tecidual descrita anteriormente pelos autores.

Contudo, a mensuração sérica da S100 β apresenta problemas metodológicos e ainda não há um consenso para estabelecer critérios válidos e aplicação clínica. Como a S100 β tem concentrações mais altas no cérebro, há necessidade da investigação no LCR para confirmar sua origem. Deve-se levar também em consideração os achados combinados de diagnóstico por imagem, e testes neurológicos, além do estabelecimento de uma fração da concentração no soro/LCR em um amplo número de pacientes (ROTHERMUNDT et al., 2003).

Em um estudo clínico em humanos com hérnia de disco lombar foi observado aumento de S100 β no líquido quando comparado a pacientes sem lesão. Estes pacientes tinham um histórico de menos de 3 meses de duração dos sintomas. Os autores consideraram uma indicação de lesão em axônios e células de Schwann nas raízes nervosas afetadas (BRISBY et al., 1999). Entretanto não fizeram acompanhamento dos níveis com o decorrer do tratamento como foi realizado no presente estudo, o que possibilitou observar respostas diferentes de acordo com a velocidade de recuperação motora.

Smith e Jeffery (2006) avaliaram lesões na substância branca após injúria em medula espinhal em 4 cães e 3 gatos por causas clínicas variando de extrusão discal e protusão a fratura associada ou não com sub-luxação. Fizeram análise histopatológica e ultraestrutural e observaram que há uma complexidade de achados em injúrias espontâneas, isto é, não induzidas experimentalmente, resultando em variações individuais. O presente estudo clínico mostrou que cães condrodistróficos e do mesmo padrão racial com extrusão discal apresentaram velocidades de recuperação diferentes e que podem estar relacionadas com graus variados de lesões e/ou respostas à injúria inicial. A análise deve ser feita buscando grupos de indivíduos com respostas semelhantes para serem comparados. Desta forma

conseguimos avaliar os achados dos níveis de S100 β nos animais com recuperação precoce e tardia, detectando as diferenças e suas relações com a função motora.

Rosato, Gama e Santana (2006) verificaram que o LCR permanecia estável para exame citológico e físico-químico quando armazenado acima de 30 dias em temperatura a -4°C. No presente estudo as amostras foram armazenadas a temperaturas mais baixas (-70°C) e, portanto consideradas estáveis até o processamento.

Estudo experimental que analisou o LCR antes e após 1, 3, 7 e 14 após a injeção de agentes contrastados iohexol ou iotrolan não mostrou diferenças significativas entre as amostras com relação à contagem total de leucócitos e concentração de glicose. Apenas a concentração de proteína aumentou após o iohexol na amostra do dia 1 e a atividade da enzima lactato desidrogenase aumentou na amostra do dia 3 (VAN BREE; VAN RIJSSEN; VAN HAM, 1991). A redução de neurotoxicidade pós-mielográfica após injeção de metrizamida foi estudada em cães normais, onde um grupo de animais foi submetido ao contraste para mielograma cervical de rotina e outro grupo após a mielografia foi submetido à aspiração do meio de contraste do espaço subaracnóide. Observou-se neste último grupo uma resposta inflamatória maior com aumento de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos e da concentração de proteína no LCR, porém uma taxa menos freqüente de convulsões foi associada à retirada do contraste pós-mielografia (WIDMER et al., 1990). O presente estudo utilizou o iohexol como meio de contraste não iônico. As amostras do M2 foram coletadas após 35,5 $\pm$ 21,33 dias da injeção do contraste e processadas após um período superior a 30 dias de criopreservação até o estoque de todos os animais se completarem. A coleta no M2 foi acima do período descrito de 14 dias pós mielografia (VAN BREE; VAN RIJSSEN; VAN HAM, 1991) e sem indução da inflamação e alteração de concentração protéica no líquido, pois não foi retirado o meio de contraste pós-mielografia como descrito por Widmer et al. (1990) sugerindo que o meio de contraste não tenha alterado as amostras analisadas no M2 do presente estudo.

A análise do LCR não é parte da rotina de avaliação da injúria traumática da medula espinhal, mas é essencial para a diferenciação de outras causas de lesões medulares (MCDONALD; SADOWSKY, 2002). Estudo clínico correlacionou níveis de ocitocina no LCR de cães com dor induzida por compressão da medula espinhal, sendo maior em casos crônicos quando comparados com cães clinicamente normais. Sugerem que este peptídeo atuaria como um neurotransmissor ou agente neuromodulador com papel no trato descendente inibitório da dor, justificando seu uso intratecal na analgesia perioperatória em cães

submetidos ao exame de mielografia, após a injeção do meio de contraste (BROWN; PERKOWSKI, 1998). Entretanto nenhum dos animais submetidos ao exame contrastado ou após a coleta do LCR no M2 necessitou do uso da dipirona ou opióide após o procedimento segundo observações relatadas pelos proprietários que não correlacionaram nenhum sinal de desconforto nos animais. Para a coleta do LCR no M2 os animais eram submetidos à anestesia geral logo após o tratamento com eletroacupuntura sugerindo que a mesma pode ter contribuído na ausência de dor ou desconforto após o procedimento.

A proteína S100 β foi correlacionada a um aumento de sua expressão na medula espinhal de ratos e camundongos submetidos à modelo experimental de dor neuropática e detectados pela técnica de Western Blotting e imunohistoquímica, especificamente 14 dias após a injúria quando comparados a um grupo controle *sham*. Além disso, houve aumento do seu RNA mensageiro ao nível da medula espinhal entre 4 e 28 dias da injúria nervosa detectado através da técnica de *Polimerase Chain reaction – Real Time* (PCR-RT). Os animais com expressão acentuada de S100 β foram correlacionados a uma resposta aumentada a um estímulo não nociceptivo. Estes resultados envolvem esta proteína na fisiopatologia da dor neuropática (TANGA et al., 2006). Entretanto no presente estudo não foram encontrados sinais clínicos de dor em todos os momentos analisados, impossibilitando a associação dos mesmos com os níveis encontrados de S100 β .

O peptídeo não opióide CGRP está envolvido na angiogênese (HUKKANEN et al., 1993), importante na regeneração tecidual, sendo que as fibras nervosas não estimuladas parecem não liberar este peptídeo para nenhuma grande extensão, mas a estimulação acarreta liberação em terminais nervosos e as concentrações locais deste neuropeptídeo tornam-se significativas (KONTTINEN; IMAI; SUDA, 1996). Pesquisa anterior demonstrou que a acupuntura é capaz de liberar CGRP (DAWIDSON et al., 1999) e este fato pode ter beneficiado a recuperação neurológica dos cães do presente estudo.

O hormônio liberador de tirotropina tem efeitos neurotróficos e influência na plasticidade e facilidade de estímulo no neurônio motor, tornando sua aplicação promissora. O uso experimental em gatos e ratos com injúria medular demonstrou ser benéfico, inclusive em fase mais tardia. Mas seus análogos sintéticos devem ser mais estudados para evitar outros efeitos sistêmicos que este hormônio provoca no organismo (OLBY, 1999). Entretanto a liberação deste hormônio pode ser obtida pela estimulação elétrica a frequências baixas de 0,5 a 3 Hz (JI-SHENG HAN, 2003) e possivelmente pode ser alcançada com o uso da

eletroacupuntura, justificando seu uso na reabilitação de pacientes com extrusão de disco intervertebral.

Mudanças patológicas alteram a atividade elétrica dos tecidos acarretando em áreas de alta resistência elétrica com baixa condutividade. O estímulo de pontos de acupuntura reduz estas áreas de alta resistência, restaurando a atividade elétrica normal nos locais alterados e promovendo função normal desta região. O fato de aumentar a atividade elétrica de tecido lesado tem mostrado aumento da taxa de cicatrização e aumento de recrescimento de axônios (STEFANATOS, 1984).

Algumas desordens neurológicas como a ocorrência de paralisia após extrusão de disco intervertebral em cães envolvem lesão neuronal e distúrbio na propagação neuronal. A recuperação da função normal deve no mínimo incluir uma habilidade reversível da transmissão neuronal no sítio da lesão. O tratamento com acupuntura pode sinalizar neurônios sobreviventes a produzir diferentes fatores de crescimento neuronais para manter e recuperar tratos neuronais normais (WING-WAH CHAN et al., 2001). No presente estudo foi sugerido que os níveis da proteína S100 β encontrados podem representar esta sinalização após o tratamento com eletroacupuntura desencadeando diferentes eventos ou liberação de outros fatores neurotróficos para promover a recuperação.

A cura da injúria em medula espinhal precisa obviamente de modalidades terapêuticas múltiplas. Os objetivos se resumem a uma manutenção da lesão em um grau mínimo, preservação e aumento da função residual e promoção de regeneração (MCDONALD; SADOWSKY, 2002). As intervenções no microambiente neuronal são necessárias para promover regeneração e proteção de neurônios medulares lesados (GEBRIN et al., 1997). Os resultados positivos após eletroacupuntura nos animais do presente estudo indicam que a mesma pode representar uma intervenção viável mesmo em cães com graus de lesão neurológica grave.

Segundo Wu Tu Hsing (2001) que utilizou a acupuntura na melhora e na reabilitação de vítimas de acidente vascular cerebral: “as células nervosas do cérebro reagem para começar a funcionar. As células mortas não são ressuscitadas. São as células quietas, afetadas pela falta de sangue em consequência do derrame, que provavelmente começam a funcionar, como se fossem células em hibernação ativas que se recuperassem”. No presente estudo a mesma analogia pode ser feita em relação à injúria do tecido medular, onde regiões que sofreram concussão ou áreas de hematomas voltem a funcionar devido ao estímulo das

células tanto da região afetada como de regiões perilesionais que se tornam reativas e determinem fenômenos de plasticidade neuronal.

A MTC é frequentemente retratada com conceitos medievais e metáforas naturalistas. Estes descrevem processos fisiológicos e parecem ter pouca importância prática para um indivíduo moderno ou praticante da medicina científica, ocasionando dificuldade na sua aceitação. A maioria da literatura atual sobre o assunto resulta de traduções diretas de termos antigos, não explicando o contexto científico e histórico, além do significado técnico da linguagem antiga. Há necessidade de fornecer ao profissional de saúde ocidental informações médicas confiáveis para explicar o contexto e a importância dos termos antigos utilizados. Entretanto, mesmo após anos de estudo e experiência neste campo, ainda há dificuldades em explicar síndromes e condições muito claramente identificadas nos conceitos da MTC para os termos da Medicina Ocidental e seus conceitos fisiológicos. Por mais difícil que seja esta integração, não se pode negar a validade e importância de cada uma das medicinas, sendo que os dois sistemas explicam a realidade de acordo com os seus princípios (WEN, 2008).

O principal objetivo da acupuntura e MTC é recuperar o equilíbrio através do uso de mecanismos fisiológicos do próprio indivíduo. Portanto através da acupuntura um fenômeno patológico ou fisiológico pode ser balanceado ou modulado, reduzindo ou aumentando alguma função orgânica.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos neste estudo permitiu concluir que:

1. A eletroacupuntura promoveu a recuperação motora de todos os cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar com graus de compressão extradural moderados a severos detectados por tomografia computadorizada.
2. A eletroacupuntura promoveu uma modulação dos níveis da proteína S100 β detectada no líquido de cães com extrusão de disco intervertebral tóraco-lombar.
3. A eletroacupuntura induziu aumento dos níveis da proteína S100 β em cães com recuperação motora tardia sugerindo sua contribuição na plasticidade após injúria da medula espinhal na extrusão de disco intervertebral em cães.

REFERÊNCIAS

ALTMAN, S. Terapia pela Acupuntura na clínica de pequenos animais. In: Ettinger, S.J., **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1992. v. 1, p.507-522.

ANGELI, A. L.; JOAQUIM, J. G. F.; GAMA, E. D.; LUNA, S. P. L. Outcome of 119 dogs and cats treated at the acupuncture unit of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo State, Botucatu city, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 68-74, 2005.

BONTA, I. L. Acupuncture beyond the endorphin concept? **Medical Hypotheses**, v. 58, n. 3, p. 221-224, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAUND, K. G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. U.S.A: Willianms e Wilkins, 1986, 257 p.

BRAY, J. P.; BURBIDGE, H. M. The canine intervertebral disk. Part one: Structure and function. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, n.1, p. 55-63, 1998.

BRISBY, H.; OLMARKER, K.; ROSENGREN, L.; CEDERLUND, C-G.; RYDEVIK, B. Markers of nerve tissue injury in the cerebrospinal fluid in patients with lumbar disc herniation. **Spine**, v. 24, n. 8, p. 742-746, 1999.

BROWN, D. C.; PERKOWSKI, S. Oxytocin content of the cerebrospinal fluid of dogs and its relationship to pain induced by spinal cord compression. **Veterinary Surgery**, v. 27, p. 607-611, 1998.

BURGESE, L. F. Radiologia convencional e tomografia computadorizada na avaliação de cães portadores de discopatia cervical: estudo comparativo. 2006. 152 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BUTTERWORTH, S. J.; DENNY, H. R. Follow-up study of 100 cases with thoracolumbar disc protrusions treated by lateral fenestration. **Journal of Small Animal Practice**. v. 32, n. 9, p. 443-447, 1991

CARNEIRO, N.M. **Fundamentos da Acupuntura Médica**. Florianópolis: Sistema, 2001, 728 p.

CASSU, R.N.; LUNA, S.P.L.; CLARK, R. M. O; KRONKA, S. N. Eletroacupuncture analgesia in dogs: Is there a difference between uni or bilateral stimulation? **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 35, p. 52-61, 2008.

CHADI, G.; FUXE, K. Analysis of trophic responses in lesioned brain: focus on basic fibroblast growth factor mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 231-241, 1998.

CHADI, G.; SILVA, C.; MAXIMINO, J. R.; FUXE, K.; SILVA, G. O. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. **Brain Research**, v. 1190, p. 23-38, 2008.

CHEN, X. D, GU, Y. D.; YANG, Y. Effect of electroacupuncture on mRNA expression of NGF and IGF-1 in injured nerve. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, v. 14, p. 328–331, 2000.

CHRISMAN, C. L. **Neurologia dos pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1985. 432p.

CHRISMAN, C.; MARIANI, C.; PLATT, S.; CLEMMS, R. **Neurologia para o clínico de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. 336 p.

COATES, J. R. Intervertebral disk disease. **Veterinary Clinics of North América**, v. 31, n. 1, p.77-110, 2000.

COUGHLAN, A. R. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, p. 117- 122, 1993.

CUNHA, J. C.; LEVY, B. F. A.; LUCA, G. A. L.; ANDRADE, M. S. R. A.; GOMIDE, V. C.; CHADI, G. Responses of reactive astrocytes containing S100 β protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: implications for wound repair and neurodegeneration. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, p. 134-146, 2007.

DALMAU, J.; ROSENFELD, M. R. Characterization of neuronal antigens and antineuronal antibodies. In: PHILLIPS, M. I.; EVANS, D. **Neuroimmunology. Methods in neuroscience**. San Diego: Academic Press, p. 261-271, 1995.

- DAWIDSON, I.; ANGMAR-MANSON, B.; BLOM, M.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. Sensory stimulation (acupuncture) increases the release of calcitonin gene-related peptide in the saliva of xerostomia sufferers. **Neuropeptides**, v. 33, n. 3, p. 244-250, 1999.
- DAWIDSON, I.; ANGMAR-MANSON, B.; BLOM, M.; THEODORSSON, E.; LUNDENBERG, T. Sensory stimulation (acupuncture) increases the release of vasoactive intestinal polypeptide in the saliva of xerostomia sufferers. **Neuropeptides**, v. 32, n. 6, p. 543-548, 1998.
- DING-ZONG WU. Acupuncture and neurophysiology. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 92, n. 1, p. 13-25, 1990.
- DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, p. 540-551, 2003.
- DRAEHMPAEHL, D.; ZOHMANN, A. **Acupuntura no cão e no gato. Princípios básicos e prática científica**. São Paulo: Roca, 1994, 245 p.
- DUOBLES, T.; LIMA, T. S.; LEVY, B. F.; CHADI, G. S100 β and fibroblastic growth factor-2 are present in cultured Schwann cells and may exert paracrine actions on the peripheral nerve injury. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 6, p. 555-560, 2009.
- DUVAL, J.; DEWEY, C.; ROBERTS, R.; ARON, D. Spinal cord swelling as a myelographic indicator of prognosis: a retrospective study in dogs with intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. **Veterinary Surgery**, v. 25, n. 1, p. 6-12, 1996.
- EBADI, M.; BASHIR, R. M.; HEIDRICK, M. L.; HAMADA, F. M.; EL REFAEY, H.; HAMED, A.; HELAL, G.; BAXI, M. D.; CERUTIS, D. R.; LASSI, N. K. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. **Neurochemistry International**, v. 30, n. 4/5, p. 347-374, 1997.
- FEN LIU; WEI-WEI SUN; YING WANG; LI-QUN HU; PING DAI; CHANG-FU TIAN; TING-HUA WANG. Effects of electro-acupuncture on NT-4 expression in spinal dorsal root ganglion and associated segments of the spinal dorsal horn in cats subjected to adjacent dorsal root ganglionectomy. **Neuroscience Letters**, v. 450, p. 158-162, 2009.
- FERABOLI-LOHNHERR, D.; BARTHE, J.Y. Serotonin-induced activation of the network for locomotion in adult spinal rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 55, n. 1, p. 87-89, 1999.

FERREIRA, A. J. A.; CORREIA, J. H. D.; JAGGY, A. Thoracolumbar disc disease in 71 paraplegic dogs: influence of rate of onset and duration of clinical signs on treatment results. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 158-163, 2002.

GADULA, E. Acupuncture in paraplegia. [1990]. Disponível em: <<http://users.med.auth.gr/~karanik/english/articles/icmart99/ab9.htm>>. Acesso em: 05 fev. 2004.

GARRET, J. D.; BROWN, D. C. Prognostic indicators for time to ambulation after surgical decompression in nonambulatory dogs with acute thoracolumbar disk extrusions: 112 cases. **Veterinary Surgery**, v. 31, n. 6, p.513-518, 2002

GAVIOLLE, M. C. **Modelo experimental para o estudo da interação entre acupuntura e o fenômeno regenerativo induzido em caudas de girinos de Rana catesbiana (SHAW, 1802)**. 1999. 105 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GEBRIN, A. S.; CUNHA, A. S.; SILVA, C. F.; BARROS FILHO, T. E. P.; AZZE, R. J. Perspectiva de recuperação do lesado medular. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 32, n. 2, p. 103-108, 1997.

GNIRS, K.; PRÉLAUD, P. Cutaneous manifestations of neurological diseases: review of neuro-pathophysiology and diseases causing pruritus. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 137-146, 2005.

GUERTIN, P. A. Paraplegic mice are leading to new advances in spinal cord injury research. **Spinal Cord**, v. 43, p. 459-461, 2005.

HAO-LI ZHOU; HUI-JUANG YANG; YONG-MEL LI; YING WANG; LING YAN; XI-LIANG GUO; YING-CHUN BA; SU LIU; TING-HUA WANG. Changes in glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the rostral and caudal stumps of the transected adult rat spinal cord. **Neurochemistry Research**, v. 33, p. 927-937, 2008

HI-JOON PARK; LIM, S.; WAN-SEOK JOO; CHANG-SHIK YIN; HYANG-SOOK LEE; HYE-JUNG LEE; JUNG-CHUL SEO; KANGHYUN LEEM; YANG-SUN SON; YOUN-JUNG KIM; CHANG-JU KIM; YONG-SIK KIM; JOO-HO CHUNG. Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. **Experimental Neurology**, v. 180, p. 92-97, 2003.

HAYASHI, A. M. **Estudo clínico da eficácia da acupuntura no tratamento da discopatia intervertebral tóraco-lombar em cães**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

HAYASHI, A. M.; MATERA, J. M. Princípios gerais e aplicações da acupuntura em pequenos animais: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 8, n. 2, p. 109-122, 2005.

HAYASHI, A. M.; MATERA, J. M.; FONSECA PINTO, A. C. B. C. Evaluation of electroacupuncture treatment for thoracolumbar intervertebral disk disease in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 6, p. 1-6, 2007.

HAYASHI, A. M.; MATERA, J. M.; SOARES, T. S.; FONSECA PINTO, A. C. B. C.; CORTOPASSI, S. R. G. Electro-acupuncture and chinese herbs for treatment of cervical intervertebral disk disease in a dog. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 95-98, 2007.

HAYASHI, A. M.; SHIGUIHARA, C. A.; TORRO, C. A. Acupuntura e fitoterapia chinesa como medicina complementar em alterações locomotoras em cães. Relato de 3 casos. **Brazilian Journal Veterinary Research And Animal Science**, v. 40, p. 200, 2003. Suplemento. Resumo 65.

HI-JOON PARK; LIM, S.; WAN-SEOK JOO; CHANG-SHIK YIN; HYANG-SOOK LEE; HYE-JUNG LEE; JUNG-CHUL SEO; KANGHYUN LEEM; YANG-SUN SON; YOUN-JUNG KIM; CHANG-JU KIM; YONG-SIK KIM; JOO-HO CHUNG. Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. **Experimental Neurology**, v. 180, p. 92-97, 2003.

HOERLEIN, B. F. Intervertebral disc protusions in the dog. I. Incidence and pathological lesions. II. Symptomatology and clinical diagnosis. III. Radiological diagnosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 14, n. 50, p. 260-283, 1953.

HONG JIN PAI. **Acupuntura**: de terapia alternativa a especialidade médica. São Paulo: CEIMEC, 2005, 191 p.

HUKKANEN, M.; KONTTINEN, Y.T.; SANTAVIRTA, S.; PAAVOLAINEN, P.; GU, X. H.; TERENCEHI, G.; POLAK, J.M. Rapid proliferation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves during healing of rat tibial fracture suggests neural involvement in bone growth and remodelling. **Neuroscience**, v. 54, n. 4, p. 969-979, 1993.

HUIHENG XIE; ORTIZ-UMPIERRE, C. What acupuncture can and cannot treat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, p. 244-248, 2006.

HUI SHENG XIE; VANESSA PREAST. **Xie's veterinary acupuncture**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, 359 p.

ISACKSON, P. J. Trophic factor response to neuronal stimuli or injury. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, p. 350-357, 1995.

JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 1992.

JANSSENS, L. A. A. Acupuncture for the treatment of thoracolumbar and cervical disc disease in the dog. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 107-116, 1992.

JANSSENS, L. A. A. Acupuncture treatment for canine thoracolumbar disk protusions. A review of 78 cases. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, v. 78, n. 10, p. 1580-1585, 1983.

JANSSENS, L. A. A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, p. 572-578, 1991.

JANSSENS, L. A. A. Observations on acupuncture therapy of chronic osteoarthritis in dogs: a review of sixty-one cases. **Journal Small Animal Practice**, v. 27, n. 12, p. 825-837, 1986.

JANSSENS, L. A. A. The treatment of canine cervical disc disease by acupuncture: a review of thirty two cases. **Journal Small Animal Practice**, v. 26, p. 203-212, 1985.

JEN-CHUEN HSIEH; CHUNG-HAOW TU; FANG-PEY CHEN; MIN-CHI CHEN; TZU-CHEN YEH; HUI-CHENG CHENG; YU-TE WU; REN-SHYAN LIU; LOW-TONE HO. Activation of the hypothalamus characterizes the acupuncture stimulation at the analgesic point in human: a positron emission tomography study. **Neuroscience Letters**, v. 307, n. 2, p. 105-108, 2001.

JEN-HWEY CHIU; MAO-SHU CHUNG; HUI-CHENG CHENG; TZU-CHENG YEH; JEN-CHUEN HSIEH; CHUNG-YEN CHANG; WAN-YO KUO; HENRICH CHENG; LOW-TOEN HO. Different central manifestations in response to electroacupuncture at analgesic and nonanalgesic acupoints in rats: a manganese-enhanced functional magnetic resonance imaging study. **Canine Journal Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 94-101, 2003

JEOUNG-WOO KANG; TAE-WAN KIM; JUN-HO LA; TAE-SIK SUNG; HYUN-JU KIM; YOUNG-BAE KWON; JEUM-YONG KIM; IL-SUK YANG. Electroacupuncture

ameliorates experimental colitis induced by acetic acid in rat. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 3, p. 189-195, 2004.

JEOUNG, S. M.; KIM, H-Y.; LEE, C-H.; KWEON, O-K.; NAM, T-C. Use of acupuncture for the treatment of idiopathic facial nerve paralysis in a dog. **Veterinary Record**, v. 148, p. 632-633, 2001.

JERRAM, R. M.; DEWEY, C. W. Acute thoracolumbar disk extrusion in dogs – Part I. **Compendium on Continuing Education for the Practice Veterinary**, v. 21, n. 10, p. 922-930, 1999.

JIANJUN MA; NOVIKOV, L. N.; KARLSSON, K.; KELLERTH, J-O.; WIBERG, M. Plexus avulsion and spinal cord injury increase the serum concentration of S-100 protein: an experimental study in rats. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Hand Surgery**, v. 35, p. 355-359, 2001.

JIAN-LIAN LA; JALALI, S.; SHAMI, S. J. Morphological studies on crushed sciatic nerve of rabbits with electroacupuncture or diclofenac sodium treatment. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 33, n. 4, p. 663-669, 2005.

JI-SHENG HAN. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 1, p. 17-22, 2003.

JI-SHENG HAN. Acupuncture and endorphins. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 258 – 261, 2004.

JOAQUIM, J. G. F. **Comparação entre eletroacupuntura, cirurgia e cirurgia associada à eletroacupuntura no tratamento da doença do disco intervertebral em cães**. 2008. 70 p. (Tese em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

JOSEPH, R. Neurologic evaluation and its relation to acupuncture. Acupuncture for neurologic disorders. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 98-106, 1992.

JUNG-WHAN YANG; SEONG-MOK JEONG; KANG-MOON SEO; TCHI-CHOU NAM. Effects of corticosteroid and electroacupuncture on experimental spinal cord injury in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 97–101, 2003.

KAZAKOS, G.; POLIZOPOULOU, Z. S.; PATSIKAS, M. N.; TSIMOPOULOS, G.; ROUBILIS, N.; DLSSIRIS, A. Duration and severity of clinical signs as prognostic indicators

in 30 dogs with thoracolumbar disk disease after surgical decompression. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 147-152, 2005.

KLIDE, A. M.; KUNG, S. H. **Veterinary Acupuncture**. Pennsylvania: University of Pennsylvania Press, 1977. 297 p.

KLINE, K. L.; CAPLAN, E. R.; JOSEPH, R. J. Acupuntura para tratar distúrbios neurológicos. In: SCHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária: da arte antiga à medicina moderna**. São Paulo: Roca, 2006. p. 175-189.

KONTTINEN, Y. T.; IMAI, S.; SUDA, A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. State of the art. **Acta Orthopaedica Scandinavica** , v. 67, n. 6, p. 632-639, 1996.

KOZLOVA, E. N. Differentiation and migration of astrocytes in the spinal cord following dorsal root injury in the adult rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 782-790, 2003.

LAMERS, K. J. B.; VOS, P.; VERBEEK, M. M.; ROSMALEN, F.; van GEEL, W. J. A.; van ENGELN, B. G. M. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. **Brain Research Bulletin**, v. 61, p. 261-264, 2003.

LANDRETH, G. E. Growth factors. In: SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, K. W.; FISHER, S. K.; UHLER, M. **Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects**. Philadelphia: Lippincott William e Wilkins, 1999. p. 383-398.

LANGEVIN, H. M.; CHURCHILL, D. L.; CIPOLLA, M. J. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **FASEB Journal**, v. 15, p. 2275-2282, 2001.

LAUNDRY, E. S.; LAPOINTE, N. P.; ROUILLARD, D.; LEVESQUE, D.; HEDLUND, P. B.; GUERTIN, P. A. Contribution of spinal 5-HT and 5-HT receptors to locomotor-like movement induced by 8-OH-DPAT in spinal cord-transected mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 535-546, 2006.

LECOUTEUR, R. A.; CHILD, G. Moléstias da medula espinhal. In: Ettinger, S.J., **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. v. 2, p.655-736,1992.

LEVINE, J. M.; LEVINE, G. J.; BOOZER, L.; SCHATZBERG, S. J.; PLATT, S. R.; KENT, M.; KERWIN, S. C.; FOSGATE, G. T. Adverse effects and outcome associated with

dexamethasone administration in dogs with acute thoracolumbar disk herniation: 161 cases (2000-2006). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 3, p. 1-7, 2008.

LIANFANG HE. Involvement of endogenous opioid peptides in acupuncture analgesia. **Pain**, v. 31, p. 99-121, 1987.

LIN, J-H.; PANZER, R. Acupuncture for reproductive disorders. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 155-161, 1992.

LIPPINCOTT, C. L. Hemilaminectomy in dogs without deep pain perception. **California Veterinary**, v. 45, n. 5, p. 24-28, 1991.

LONG-EN CHEN; KANG LIU; SEABER, A. V.; KATRAGADDA, S.; KIRK, C.; URBANIAK, J. R. Recombinant human glial growth factor 2 (rhGGF2) improves functional recovery of crushed peripheral nerve (a double-blind study). **Neurochemistry International**, v. 33, p. 341-351, 1998.

LOONEY, A. L. Using acupuncture in veterinary practice. **Veterinary Medicine**, v. 95, n. 8, p. 615-630, 2000.

LOONEY, A. L.; ROTHSTEIN, E. Use of acupuncture to treat psychodermatosis in the dog. **Canine Practice**, v. 23, n. 5, p. 18-21, 1998.

LÓPEZ, H. S.; BUENDIA, G.L. **Acupuntura veterinária**. México: Nueva Editorial Interamericana, 1990. 346 p.

LOY, D. N.; SROUFE, A. E.; PELT, J. L.; BURKE, D. A.; CAO, Q-J.; TALBOTT, J. F.; WHITTEMORE, S. R. Serum biomarkers for experimental acute spinal cord injury: rapid elevation of neuron-specific enolase and S100 β . **Neurosurgery**, v. 56, p. 391-397, 2005.

LUNA, S. P. L. Emprego da Acupuntura em Anestesia. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p. 337-343.

MACIOCIA, G. **Os fundamentos da Medicina Chinesa. Um texto abrangente para acupunturistas e fitoterapeutas**. São Paulo: Roca, 1996. 658 p.

MARKUS, A.; PATEL, T. D.; SNIDER, W. D. Neurotrophic factors and axonal growth. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, p. 523-531, 2002.

MAYER, D. J. Biological Mechanisms of acupuncture. **Progress in Brain Research**, v.122, p. 457-477, 2000.

MAYHEW, P. D.; McLEAR, R. C.; ZIEMER, L. S.; CULP, W. T. N.; RUSSELL, K. N.; SHOFR, F. S.; KAPATKIN, A. S.; SMITH, G. K. Risk factors for recurrence of clinical signs associated with thoracolumbar intervertebral disk herniation in dogs: 229 cases (1994-2000). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 8, p. 1231-1236, 2004.

MC DONNELL, J. J.; PLATT, S. R.; CLAYTON, L. A. Neurologic conditions causing lameness in companion animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17-38, 2001.

MCDONALD, J. W.; SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. **The Lancet**, v. 359, n. 2, p. 417-425, 2002.

NECAS, A. Clinical aspects of surgical treatment of thoracolumbar disc disease in dogs. A retrospective study of 300 cases. **Acta Veterinary Brunensis**, v. 68, p. 121-130, 1999.

OLBY, N. J.; DE RISIO, L.; MUNANA, K. R.; WOSAR, M. A.; SKEEN, T. M.; SHARP, N. J. H.; KEENE, B. W. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1624-1628, 2001.

OLBY, N. J.; DYCE, J.; HOULTON, J. E. F. Correlation of plain radiographic and lumbar myelographic findings with surgical findings in thoracolumbar disc disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, p. 345-350, 1994.

OLBY, N. J.; LEVINE, J.; HARRIS, T.; MUNANA, K.; SKEEN, T.; SHARP, N. Long term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 6, p. 762-769, 2003.

OTTO, M.; STEIN, H.; SZUDRA, A.; ZERR, I.; BODEMER, M.; GEFELLER, O.; POSER, S.; KRETZSCHMAR, H. A.; MÄDER, M.; WEBER, T. S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. **Journal of Neurology**, v. 244, p. 566-570, 1997.

PADILHA FILHO, J. G.; SELMI, A. L. Retrospective study of thoracolumbar ventral fenestration through intercostal thoracotomy and paracostal laparotomy in the dog. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 4, p. 233-227, 1999.

PLATT, S. R.; ABRAMSON, C. J.; GAROSI, L. S. Administering corticosteroids in neurologic diseases. **The Compendium on Continued Education in Veterinary Practice**, v. 27, n. 3, p. 210-220, 2005.

PULLAN, P. T.; FINCH, P. M.; YUEN, R. W. M.; WATSON, F. E. Endogenous opiates modulate release of growth hormone in response to electroacupuncture. **Life Science**, v. 32, p. 1705-1709, 1983.

RASMUSSEN, H. The calcium messenger system. **New England Journal of Medicine**, v. 314, p. 1094-1101, 1986.

ROGERS, P. A. M.; SCHOEN, A. M.; LIMEHOUSE, J. Acupuncture for immune-mediated disorders. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 162-193, 1992.

ROSATO, P. N.; GAMA, F. G. V.; SANTANA, A. E. Análise físico-químico do líquido cerebrospinal de cães hígidos em diferentes períodos e temperaturas de estocagem. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 36, n. 6, p. 1806-1810, 2006.

ROSS, J. **Combinações dos pontos de acupuntura. A chave para o êxito clínico**. São Paulo: Roca, 2003. 490 p.

ROTHERMUNDT, M.; PETERS, M.; PREHN, J. H. M.; AROLT, V. S100 β in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy research and technique**, v. 60, p. 614-632, 2003.

RUDDLE, T. L.; ALLEN, D. A.; SCHERTEL, E. R.; BARNHART, M. D.; WILSON, E. R.; LINEBERGER, J. A.; KLOCHE, N. W.; LEHENBAUER, T. W. Outcome and prognostic factors in non-ambulatory Hansen type I intervertebral disk extrusions: 308 cases. **Veterinary Comparative Orthop Traumatology**, v. 19, p. 29-34, 2006.

SANDE, R. D. Radiography, myelography, computed tomography, and magnetic resonance imaging of the spine. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 22, n. 4, p. 811-831, 1992.

SANTOS, I. L. **Radiologia convencional e tomografia computadorizada na avaliação de cães portadores de discopatia torácica, toracolumbar, lombar ou lombosacra: estudo comparativo**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SELINFREUND, R. H.; BARGER, S. W.; PLEDGER, W. J.; ELDIK, L. J. V. Neurotrophic protein S100 β stimulates glial cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 3554-3558, 1991.

SCHOEN, A. M. **Veterinary acupuncture, ancient art to modern medicine**. New York: Mosby, 1994. 707 p.

SCHWAB, M. E. Repairing the injured spinal cord. **Science**, v. 295, n. 8, p. 1029-1031, 2002.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R. **Efeito da acupuntura sobre a reação inflamatória imune induzida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em cobaias e cães**. Jaboticabal, 1999. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade de São Paulo. Jaboticabal, 1999.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BECHARA, G. H. Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 31, n. 6, p. 1091-1099, 2001.

SHARP, N. J. H.; WHEELER, S. J. **Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery**. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005. 380 p.

SHIH-LIANG CHANG; CHIN-CHUAN TSAI; JAUNG-GENG LIN; CHING-LIANG HSIEH; RONG-TSUNG LIN; JUEI-TANG CHENG. Involvement of serotonin in the hypoglycemic response to 2 Hz electroacupuncture of zusanli acupoint (ST36) in rats. **Neuroscience Letters**, v. 379, p. 69-73, 2005.

SHIMIZU, E. Eletroacupuncture treatment of acute thoracolumbar disk disease type I grade 4 C in condrodystrophic dogs not treated with surgery. In: 29. INTERNATIONAL CONGRESS ON VETERINARY ACUPUNCTURE. **Anais...** Santos, São Paulo, Brazil, 2003.

SHI PING ZHANG; JIN SHAN ZHANG; KEN K. L. YUNG; HONG QI ZHANG. Non-opioid-dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 327-334, 2004.

SIEDENTOPF, C. M.; GOLASZEWSKI, S. M.; MOTTAGHY, F. M.; RUFF, C. C.; FELBER, S.; SCHLAGER, A. Functional magnetic resonance imaging detects activation of the visual association cortex during laser acupuncture of the foot in humans. **Neuroscience Letters**, v. 327, n. 1, p. 53-55, 2002.

SMITH, F.W. K. Neurophysiologic Basis of Acupuncture. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 34-52, 1992.

SMITH, P. M.; JEFFERY, N. D. Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury. **Brain Pathology**, v. 16, p. 99-109, 2006.

SPROTT, H.; FRANKE, S.; KLUGE, H.; HEIN, G. Pain treatment of fibromyalgia by acupuncture. **Rheumatology International**, v. 18, p. 35-36, 1998.

STEFANATOS, J. Treatment to reduce radial nerve paralysis. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 79, n. 1, p. 67-71, 1984.

STEISS, J. E. Base neurofisiológica da acupuntura. In: SCHOEN, A. M., **Acupuntura veterinária da arte antiga à medicina moderna**, São Paulo: Roca, 2006. p. 24-43.

STENER-VICTORIN, E.; LUNDERBERG, T.; CAJANDER, S.; ALOE, L.; MANNI, L.; WALDENSTRÖM, U.; JANSON, P. O. Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electro-acupuncture on concentrations of endothelin-I and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p. 33, 2003.

STILL J. Acupuncture treatment of thoracolumbar disc disease: a study of 35 cases. **Companion Animal Practice**, v. 2, p. 19-24, 1988.

STILL, J. Analgesic effects of acupuncture in thoracolumbar disc disease in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 30, p. 298-301, 1989.

TANAKA, Y.; KOIZUMI, C.; MARUMO, T.; OMURA, T.; YOSHIDA, S. Serum S100 β indicates brain edema formation and predicts long-term neurological outcomes in rat transient middle cerebral artery occlusion model. **Brain Research**, v. 1137, p. 140-145, 2007.

TANGA, F. Y.; RAGHAVENDRA, V.; NUTILE-MCMENEMY, N.; MARKS, A.; DELEO, J. A. Role of astrocytic S100 β in behavioral hypersensitivity in rodent model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 140, p. 1003-1010, 2006.

ULLET, G. A.; SONGPING HAN; JI-SHENG HAN. Electroacupuncture: mechanisms and clinical application. **Biological Psychiatry**, v. 44, p. 129-138, 1998.

VAN BREE, H. VAN RIJSSEN, B.; VAN HAM, L. Comparison of nonionic contrast agents iohexol and iotrolan for cisternal myelography in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 6, p. 926-933, 1991.

WEN, T. S. **Manual terapêutico de acupuntura**. São Paulo: Manole, 2008. 401 p.

WISMWE, W. R.; BLEVINS, W. E.; DAN CANTWELL, H.; COOK, J. R.; DENICOLA, D. B. Cerebrospinal fluid response following metrizamide myelography in normal dogs: effects of routine myelography and postmyelography removal of contrast medium. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 19, n. 3, p. 66-76, 1990.

WING-WAH CHAN; KUANG-YANG CHEN; HANRU LIU; LEANG-SHIN WU; JEN-HSOU LIN. Acupuncture for general veterinary practice. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 63, n. 10, p. 1057-1062, 2001.

WONG, A. M. K.; CHAU-PENG LEONG; TING-YA SU; SHANG-WON YU; WEN-CHUNG TSAI; CHEN, C. P. C. Clinical trial of acupuncture for patients with spinal cord injuries. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 82, n. 1, p. 21-27, 2003.

WU TU HSING. **Modificações clínicas e cintilográficas de pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico crônico, tratados pela estimulação elétrica subcutânea**. 2001. 126 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

WYNN, S. G.; MARSDEN, S. **Manual of natural veterinary medicine science and tradition**. Missouri: Mosby, 2003. 740 p.

YAMAMURA, Y.; MELLO, L.E.A.M; TABOSA, A.M.F.; CRICENTI, S.V.; DIDIO, L. J. A. Acupuncture: physiologic effects explained on a neuroanatomical and neurophysiological basis. **Revista Paulista de Acupuntura**, v. 3, n. 1, p. 14-18, 1997.

YAMAMURA, Y. **Acupuntura tradicional. A arte de inserir**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2001. 919 p.

YAMAMURA, Y. **Efeitos da acupuntura evidenciados por estudos clínicos e experimentais controlados e realizados na Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, no período de 1992 a 2002**. 2002. 81 f. Tese (Livre-Docência em Ortopedia e Traumatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

YAMAMURA, Y.; FILHO, J. L.; NOVO, N. F.; PUERTAS, E. B.; VASCONCELOS, L. P. W. G. Tratamento da hérnia do disco intervertebral lombar pela acupuntura. **Revista Brasileira de Acupuntura**, v. 2, n. 1, p. 13-24, 1996.

YOVICH, J. C.; READ, R.; EGER, C. Modified lateral spinal decompression in 61 dogs with thoracolumbar disc protusion. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 7, p. 351- 356, 1994.

ZAI, L. J.; YOO, S.; WRATHALL, J. R. Increased growth factor expression and cell proliferation after contusive spinal cord injury. **Brain Research**, v. 1052, p. 147-155, 2005.

ZHI-QIANG DONG; FEI MA; HONG XIE; YAN-QING WANG; GEN-CHENG WU
Changes of expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor in dorsal root ganglions and spinal dorsal horn during electroacupuncture treatment in neuropathic pain rats. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 143-148, 2005.
927-937, 2008

ZOCHODNE, D. W.; CHU CHENG. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. **Journal of Anatomy**, v. 196, p. 279-283, 2000.

APÊNDICE A

Cão Nº	Nome	Prontuário HOVET	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Lesão
1	Billy	161342	Dachshund	Macho	7	9.5	Extrusão ventrolateral D T11-12 - 50%; compressão extradural ventral leve T12-13
2	Ludmylla	182047	Dachshund	Fêmea	9	8.9	Extrusão ventrolateral E T11-12 - 50%
3	Jerry	181638	Dachshund	Macho	7	9.1	Extrusão ventrolateral D T12-13-50%; compressão extradural leve T11-12
4	Frederico	184747	Dachshund	Macho	8	12.0	Extrusão ventrolateral D L1-2 – mais 50%; compressão extradural leve E T12-13 e T13-L1
5	Kalif	185521	Dachshund	Macho	5	5.9	Extrusão ventrolateral D T12-13- 50%; compressão extradural leve T11-12
6	Nina	185810	Dachshund	Fêmea	5	6.0	Extrusão ventrolateral E L1-2 – mais 50%; compressão extradural leve T11-12 e C2-3
7	Fiel	180729	Dachshund	Macho	4	7.5	Extrusão ventrolateral E T11-12 - 25%
8	Kid	117812	Dachshund	Macho	12	7.9	Extrusão ventrolateral D L1-2 -25 a 50%; extrusão ventral L3-4 e L4-5 - 25%; compressões extradurais discreta E T11-12; e leve T12-13, compressão extradural ventral T13-L1
9	Jully	173721	Dachshund	Fêmea	8	10.1	Extrusão ventrolateral E T13-L1 - 50%; extrusão leve L3-4; compressão extradural leve ventral T11-12 e ventrolateral D T12-13
10	Bombom	184939	Dachshund	Fêmea	5	6.1	Extrusão dorsolateral E T12-13 - mais 50%; compressão extradural leve T11-12

Quadro 1 – Número do animal (Nº), nome, número de identificação no Hospital Veterinário da FMVZ-USP, raça, sexo, idade (em anos), peso (em quilogramas) e local da lesão detectadas por mielografia e/ou tomografia computadorizada dos cães atendidos durante o estudo (1 a 10) – FMVZ/USP – São Paulo - 2010

APÊNDICE B

Cão Nº	Grau de lesão	Tempo de evolução clínica (dias)	Retorno à locomoção (dias)	Escore compressão Mielografia e/ou TC	Escore nº de lesões Mielografia e/ou TC	Extensão da extrusão (mm)
1	3	30	2	2	2	8
2	3	35	9	2	1	10
3	4	12	23	2	2	10
4	4	63	1	3	3	6
5	5	41	81	2	2	6
6	5	24	3	3	3	4
7	3	30	1	1	1	2
8	4	18	90	2	4	8
9	4	34	57	2	4	10
10	4	21	8	3	2	8

Quadro 2 – Número do animal (Nº), grau de lesão clínica (1 a 5), tempo de evolução clínica em dias, tempo de retorno à locomoção em dias, escore de compressão extradural obtido na mielografia e/ou tomografia computadorizada, escore do número de lesões obtido na mielografia e/ou tomografia computadorizada e extensão da extrusão em milímetros (mm) dos cães atendidos durante o estudo (1 a 10) – FMVZ/USP – São Paulo - 2010

APÊNDICE C

Etapas de Análise	Primeira Avaliação	Segunda Avaliação	Última Avaliação
Cão Nº	Momento 1	Momento 2	Momento 3
1	16	24	26
2	14	20	26
3	7	21	24
4	12	22	26
5	2	7	13
6	7	21	22
7	14	22	21
8	9	21	23
9	10	21	23
10	9	21	21

Quadro 3 – Avaliação do estado neurológico com relação a escala funcional numérica total nas diferentes etapas de análise dos cães de número 1 a 10 do grupo EA tratados com eletroacupuntura – FMVZ/USP – São Paulo- 2010

APÊNDICE D

Etapas de análise	Primeira dosagem S100β	Segunda dosagem S100β
Cão Nº	Momento 1	Momento 2
1	0.1582	0.1241
2	0.121	0.1056
3	0.1747	0.1327
4	0.152	0.1436
5	0.1374	0.1611
6	0.1364	0.1240
7	0.1532	0.1309
8	0.1192	0.1384
9	0.1192	0.1491
10	0.1415	0.1363

Quadro 4 – Níveis da proteína S100 β detectados pela técnica de *Western Blot* dos animais do grupo EA tratados com eletroacupuntura (Cão 1 a 10) nos momentos 1 e 2 – FMVZ/USP – São Paulo - 2010

APÊNDICE E

Análise	Dosagem S100β
Cão Nº	Momento 1
1	0.1399
2	0.1355
3	0.102
4	0.122
5	0.1316
6	0.1045
7	0.1199

Quadro 5 – Níveis da proteína S100 β detectados pela técnica de *Western Blot* no líquido de animais sem sintomas neurológicos (Cão 1 a 7) no momento1 correspondendo ao grupo normal – FMVZ/USP – São Paulo - 2010

APÊNDICE F

Cão N°	Nº sessões loc ¹	Nº total sessões ²	Eletroacupuntura ³	Acupuntura ⁴
1	1	10	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar	ID3; B62
2	2	6	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar	ID3; B62
3	4	10	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar ou VB30	ID3; B62
4	1	7	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar; VG4; VG5 e VG6	ID3; B62
5*	13	17	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar; VG6; VG7	ID3; B62
6	1	7	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar; VG4; VG5; VG6	ID3; B62
7	1	5	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar	ID3; B62
8	13	27	B20 e B23 ou B25; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar; VG2; VG4; VG7	ID3; B62; B25
9	8	17	B20 e B23; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar ou VB30; VG4; VG6; VG7	ID3; B62
10	2	7	B23 e B20 ou B25; E36 e R3/B60; VG1 e <i>Bai Hui</i> lombar ou VB30	ID3; B62

¹ **nº sessões loc:** número de sessões de acupuntura realizadas até observação de retorno a locomoção; ² **nº total sessões:** número total de sessões realizadas; ³ **Eletroacupuntura:** acupontos onde foi utilizado eletroacupuntura percutânea; ⁴ **Acupuntura:** acupontos onde foi utilizada acupuntura clássica com inserção agulhas; *Animal que retornou com o caminhar espinhal

Quadro 10 - Número do animal; número de sessões de acupuntura realizadas até o retorno a locomoção; número total de sessões; acupontos com eletroacupuntura; acupontos com inserção simples da agulha dos animais do grupo EA tratados com eletroacupuntura (Cão 1 a 10) – FMVZ/USP – São Paulo - 2010