*Caracterização Funcional e
Histológica de Modelos Experimentais
de Estudo do Trauma Raquimedular*

*Autor: Carlos Alberto Gíglio
Orientador: Prof. Dr. Helton L. A. Defino
2000*

**BIOENGENHARIA
USP**

Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

*Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos*

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E
HISTOLÓGICA DE MODELOS
EXPERIMENTAIS DE ESTUDO DO
TRAUMA RAQUIMEDULAR**

Carlos Alberto Giglio

**Ribeirão Preto
2000**

Class.	TESE-EESC
Curr.	2450
Tombo	T0256/00

st 112/1813

Universidade de São Paulo
Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DO ALUNO CARLOS ALBERTO GÍGLIO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC-USP,
EM 12/09/2000.

Prof. Dr. Helton L. A. Defino (orientador) –FMRP/USP

Prof. Dr. José Batista Volpon – FMRP-USP

Prof. Dr. Elcio Landim – UNICAMP

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E HISTOLÓGICA DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO DO TRAUMA RAQUIMEDULAR

Carlos Alberto Giglio

Dissertação apresentada à Área de Bioengenharia Interunidades - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Bioengenharia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Helton Luiz Ap. Defino

Ribeirão Preto
2000

*Aos meus pais, verdadeiros amigos e
companheiros incansáveis, pelo apoio necessário
para a realização deste trabalho. Muito
obrigado!*

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Helton Luís A. Defino pela confiança em mim depositada, pela sugestão do tema e pela orientação segura e criteriosa.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Elaine Del Bel Guimarães pelo espaço físico de seu laboratório e por sua marcante dedicação neste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À Célia, Sara, Patrícia, Elisângela, Zuleika, Renata, Pablo, Leopoldo, Albert, Marcela e Margareth, colegas de laboratório, o meu muito obrigado pela amizade, companheirismo e pelo tempo dedicado ao nosso trabalho.

À Dra. Marina Augusta de Oliveira e a Dra. Maria Luiza Nunes M. Rosa pela colaboração apoio e incentivo.

Ao prof. Dr. Francisco Guimarães pelo espaço físico cedido de seu laboratório e pelas valiosas orientações relacionadas à estatística do nosso trabalho.

À profa. Dra. Vera Lúcia Polon e à Rute Aparecida Marcon, pelos ensinamentos técnicos e científicos relacionados à canulação de animais e aferição da pressão arterial.

Ao prof. de computação Rodrigo César Tercal e Frankie Pitta pelas valiosas e imprescindíveis orientações de digitação e diagramação do trabalho.

À minha noiva Rose pelo tempo dedicado a esse trabalho e pelas sugestões com relação à montagem e diagramação da dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IV
LISTA DE SÍMBOLOS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTADO ATUAL DO ESTUDO DA LESÃO DA MEDULA ESPINHAL.....	1
1.1.1. Intervenções biológicas no trauma raquimedular.....	3
1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL.....	6
1.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA LESÃO MEDULAR.....	8
1.4. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	10

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Animal utilizado.....	12
------------------------------	----

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo dos animais.....	12
2.2.2. Técnica cirúrgica.....	13
2.2.3. Grupos experimentais.....	15

2.2.3.1. Grupo controle Anestesia.....	16
2.2.3.2. Grupo controle Divulsionamento.....	16
2.2.3.3. Grupo controle Laminectomia.....	16
2.2.3.4. Grupo da Secção Total da Medula Espinhal.....	17
2.2.3.5. Grupo da Secção Total da Medula Espinhal (precedida da aplicação de xilocaína).....	17
2.2.3.6. Grupo da Hemissecção Direita da Medula Espinhal.....	18
2.2.3.7. Grupo do Pinçamento Vertebral.....	18

2.2.4. Métodos de avaliação.....	19
----------------------------------	----

2.2.4.1. Avaliação motora e funcional.....	19
--	----

2.2.4.1.1. Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras do Animais.....	19
2.2.4.1.2. Escala da Avaliação Motora de Bohlman.....	19
2.2.4.1.3. Teste do Campo Aberto.....	20
2.2.4.1.3.1. Análise Quantitativa da Marcha.....	22
2.2.4.1.3.2. Auto Limpeza.....	22
2.2.4.1.3.3. Exploração no Plano Vertical.....	23
2.2.4.1.3.4. Bolos Fecais.....	23

2.2.4.2. Avaliação Sensitiva e Funcional.....	23
2.2.4.2.1. <i>Teste da Placa Quente</i>	23
2.2.4.2.2. <i>Teste da Retirada de Cauda</i>	24
2.2.4.2.3. <i>Teste do Pinçamento da Pata</i>	25
2.2.4.3. Avaliação Histológica.....	26
2.2.4.3.1. <i>Sacrifício e perfusão dos animais</i>	26
2.2.4.3.2. <i>Colorações histológicas</i>	27
2.2.4.3.3. <i>Análise estatística</i>	27
3. RESULTADOS	
3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	29
3.2. AVALIAÇÃO MOTORA E FUNCIONAL.....	30
3.2.1. <i>Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras</i>	30
3.2.2. <i>Escala de Avaliação Motora de Bohlman</i>	32
3.2.3. <i>Teste do Campo Aberto</i>	38
3.3. AVALIAÇÃO SENSITIVA E FUNCIONAL.....	47
3.3.1. <i>Teste da Retirada de Cauda</i>	47
3.3.2. <i>Teste da Placa Quente</i>	48
3.3.3. <i>Teste do Pinçamento da Pata</i>	49
3.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	52
4. DISCUSSÃO	58
5. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
OBRAS CONSULTADAS	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Animal no aparelho estereotáxico mostrando a região da incisão cirúrgica.....	13
FIGURA 02 – Divulsionamento dos tecidos: pele, tecido subcutâneo e muscular no segmento compreendido entre T ₁₀ e L ₁	14
FIGURA 03 - Laminectomia das vértebras compreendidas no segmento segmento T ₁₀ e L ₁ , com exposição da dura mater.....	15
FIGURA 04 – Dispositivo utilizado para a realização do Teste do Plano Inclinado	21
FIGURA 05 – Dispositivo utilizado para a realização do Teste do Campo Aberto.	22
FIGURA 06 - Dispositivo utilizado para a realização do Teste da Placa Quente....	24
FIGURA 07 – Dispositivo utilizado para a realização do Teste da Retirada de Cauda.....	25
FIGURA 08 - Dispositivo utilizado para a realização do Teste do Pinçamento da Pata	26
FIGURA 09 – Avaliação motora e funcional por meio da avaliação da Motricidade das Patas Traseiras dos animais	32
FIGURA 10 – Avaliação motora e funcional dos animais por meio do Teste do Plano Inclinado	35
FIGURA 11 – Avaliação motora e funcional dos animais por meio da Escala de Bohlman.....	38
FIGURA 12 – Avaliação motora e funcional dos animais por meio da Análise Quantitativa da Marcha	41
FIGURA 13 - Avaliação motora e funcional dos animais por meio da Auto Limpeza.....	43
FIGURA 14 – Avaliação motora e funcional dos animais por meio da Exploração no Plano Vertical.....	44
FIGURA 15 – Avaliação da motilidade intestinal dos animais por meio da eliminação de bolos fecais.....	46

FIGURA 16 – Avaliação sensitiva e funcional dos animais por meio do Teste da Retirada de Cauda.....	48
FIGURA 17 - Avaliação sensitiva e funcional dos animais por meio do Teste da Placa Quente.....	49
FIGURA 18 - Avaliação sensitiva e funcional dos animais por meio do Teste do Pinçamento da Pata Esquerda.....	50
FIGURA 19 - Avaliação sensitiva e funcional dos animais por meio do Teste do Pinçamento da Pata Direita.....	52
FIGURA 20 – Análise histológica, por meio, da Reação de Níssl, que mostra neurônios da medula espinhal nos grupos Anestesia e Laminectomia.....	54
FIGURA 21- Análise histológica, por meio, da Reação de Níssl, que mostra neurônios da medula espinhal nos grupos divulsionamento e Secção Total da Medula Espinhal.....	55
FIGURA 22 – Análise histológica utilizando as colorações Hematoxilina-eosina e Gleees que mostra neurônios da medula espinhal no grupo Anestesia	56
FIGURA 23 – Análise histológica utilizando a coloração Hematoxilina-eosina mostrando neurônios da medula espinhal nos grupos Divulsionamento e Secção Total da medula Espinhal.....	57
FIGURA 24 - Análise histológica por meio da coloração Gleees que mostra neurônios da medula espinhal nos grupos Divulsionamento e Secção Total da medula Espinhal	58

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Distribuição de frequência dos animais mostrando o efeito dos procedimentos sobre a motricidade das patas traseiras.....	31
QUADRO 2 - Distribuição de frequência dos animais mostrando o efeito dos procedimentos sobre a capacidade de locomoção dos animais no Plano Inclinado.....	34
QUADRO 3 -- Distribuição de frequência dos animais mostrando o efeito dos procedimentos sobre a Escala de Bohlman.....	37
QUADRO 4 - Distribuição de frequência dos animais mostrando o efeito dos procedimentos sobre os testes no Campo Aberto.....	40
QUADRO 5 - Distribuição de frequência dos animais mostrando o efeito dos procedimentos sobre os testes sensitivos funcionais.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anest.	- Anestesia
Divuls.	- Divulsionamento
Gr.	- grupo
HE	- Hematoxilina eosina
HEMISSEC.	- Hemissecção
I.P.	- Intraperitonal
Laminec.	- Laminectomia
n	- Tamanho da amostra ou número de variáveis
NASCIS	- Estudo Nacional do Trauma Agudo da Medula Espinhal
Sec. Tot.	- Secção Total precedida pela aplicação de Xilocaína
Sec. Tot. X.	- Secção Total precedida pela aplicação de Xilocaína
SNC	- Sistema nervoso central
Pinc. Vert.	- Pinçamento Vertebral

LISTA DE SÍMBOLOS

NADPH –	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
PFA	- Paraformaldeído

RESUMO

GIGLIO, C. A. (2000). Caracterização Funcional e Histológica de Modelos Experimentais de Trauma Raquimedular. Ribeirão Preto, 2000. Dissertação de Mestrado – Área interunidades: Escola de Engenharia de São Carlos - Instituto de Química - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Foi realizado estudo experimental com ratos Wistar Albinos, com o objetivo de avaliar diferentes modelos de estudo da lesão da medula espinhal

Os controles foram formados pelos grupos Anestesia, Divulsionamento dos tecidos moles pré-vertebrais e Laminectomia. Os grupos para estudo da lesão da medula espinhal foram formados por animais nos quais o segmento vertebral localizado entre T₁₀ e L₁ foi submetido à secção total da medula espinhal, secção parcial (hemissecção), secção total precedida da aplicação local de anestésico e compressão vertebral.

Os animais foram avaliados 2 e 24 horas após a realização dos procedimentos, por meio da Escala de Avaliação Locomotora, Teste do Campo Aberto, Teste de Retirada da Cauda, Teste da Placa Quente e Teste do Pinçamento da Pata (reflexos segmentares e supra-segmentares) e também por métodos histológicos, utilizando-se as colorações de Níssl, Hematoxilina-Eosina e Gleys.

Foi observado que as escalas de avaliação locomotora utilizadas foram menos sensíveis à detecção de mudanças funcionais nos animais se comparadas com os testes de comportamento sensório-motores. O teste Exploração no Plano Vertical foi o mais sensível para detectar deficiências sensório-motoras nos diferentes grupos experimentais. Por esse método detectamos uma diminuição da capacidade de exploração do plano vertical nos animais 24 horas após os procedimentos. O teste de função reflexa mais sensível à detecção de deficiências sensório-motoras nos animais após trauma raquimedular leve, moderado e grave, foi o Teste da Placa Quente.

Portanto, este estudo demonstrou que, além das Escalas de Avaliação Locomotora, o Teste do Campo Aberto e o Teste da Placa Quente são de utilização fácil, simples, barata, reprodutível e quantitativa, com sensibilidade para detectar

deficiências funcionais em animais que tenham sofrido trauma raquimedular leve, moderado ou grave. A análise histológica em segmentos da medula espinhal abrangendo o sítio da lesão permitiu a avaliação da lesão e correlação entre a lesão sensitiva e motora.

Palavras-chave: trauma raquimedular, lesão da medula espinhal.

ABSTRACT

Giglio, C. A. Functional and Histological Characterization of Experimental Models of Spinal Cord Injury. Ribeirão Preto, 2000. Dissertação de Mestrado – Área interunidades Escola de Engenharia de São Carlos - Instituto de Química – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

An experimental study was carried out using Wistar Albino rats, aiming at an evaluation of different models for the study of spinal injury.

Controls included the following groups: Anesthesia, Divulsion of the soft prevertebral tissues and Laminectomy. Groups for the study of spinal injury were composed by animals whose vertebral segment between T₁₀ and L₁ was submitted to Total Section of the Spinal cord, Partial Section (hemisection), Total Section Preceded of Application of Local Anesthetic and Vertebral Compression.

Animals were evaluated, 2 and 24 hours after the experimental procedures, by means of the Locomotor Evaluation Scale, Open Field Test, Tail Flick Test, Hot Plate Test and Paw Nippering Test (segmentary and suprasegmentary reflex), as well as by means of histological methods using Nissl, Hematoxylin-Eosin and Gies Staining.

It was observed that the Locomotor Evaluation Scales so far used were less sensitive to detection of functional changes in animals when compared with the sensorio-motor behaviour tests. The vertical Plain Exploration Test was the most sensitive for detection of sensorio-motor deficiencies in different experimental groups. By means of this method we could detect a decrease in the ability to explore the Vertical Plain in the animals of 24 hours. The more sensitive reflex function test to detect sensorio-motor deficiencies of animals, following light, moderate or severe spinal cord injury, was the Hot Plate Test.

Therefore, this study showed that, in addition to the locomotor Evaluation scales, the Open Field Test and Hot Plate Test are of easy, simple, cheap, reproducible and quantitative utilization, showing enough sensitivity to detect functional deficiencies in animals previously submitted to light, moderate or severe spinal cord injury. Histological analysis of spinal cord segments which enclosed the

injured site allowed the evaluation of the injury and the relationship between sensitive and motor lesions.

Key words: rachimedullar trauma, spinal cord injury

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTADO ATUAL DO ESTUDO DA LESÃO DA MEDULA ESPINHAL

O trauma raquimedular é um evento com conseqüências graves que podem persistir por toda a vida do indivíduo. Em vários países a lesão espinhal aguda ocorre numa proporção de 20-40 pessoas por milhão de habitantes (TAOKA & OKAJIMA, 1998) e, embora tenham sido iniciados diversos programas de prevenção ao trauma, não existem evidências concretas de que haja declínio na incidência. Segundo dados da literatura (DITUNNO, 1992), as lesões da medula espinhal podem ser clinicamente classificadas em completas ou incompletas de acordo com a extensão do segmento lesado da medula espinhal, expressada pelas evidências clínicas das funções sensoriais e motoras preservadas.

A lesão da medula espinhal ocorre em cerca de 15 a 20% das fraturas da coluna vertebral, e a incidência desse tipo de lesão apresenta variações nos diferentes países. Estima-se que na Alemanha ocorram anualmente 17 casos novos por milhão de habitantes, nos EUA essa cifra varia de 32 a 52 casos novos anuais por milhão de habitantes, e no Brasil cerca de 40 casos novos anuais por milhão de habitantes, perfazendo um total de 6 a 8 mil casos por ano, o que corresponde a um custo aproximado é de US\$ 300.000.000.00 por ano (MÜLLER & MUHR, 1997).

O prognóstico para pessoas que tenham sofrido trauma raquimedular grave é ainda hoje muito desanimador; portanto o desenvolvimento de tratamentos eficazes para a lesão da medula espinhal seria de grande benefício. Estes fatos têm estimulado a realização de estudos experimentais para investigação dos mecanismos da lesão e reparo após o trauma raquimedular.

O principal objetivo da pesquisa básica nos estudos do trauma raquimedular tem sido o desenvolvimento de intervenções terapêuticas, que geralmente precisam ser aplicadas rapidamente, para impedir ou diminuir as consequências da lesão. Durante anos houve a certeza de que um tratamento efetivo jamais poderia ser desenvolvido, o que era baseado no princípio de que a lesão seria instalada e determinada no momento do impacto do trauma raquimedular. Entretanto, existem evidências experimentais de que intervenções terapêuticas podem ter sucesso em modelos animais de trauma raquimedular. Por exemplo, estudos realizados com modelos animais evidenciaram que a metilprednisolona e o gangliosídeo GM1 eram efetivos na produção de melhora das consequências funcionais, vasculares, metabólicas e fisiopatológicas do trauma raquimedular (ROISEN *et al.*, 1981; YOUNG E FLAMM, 1982; HALL *et al.*, 1984; GORIO *et al.*, 1986; BRAUGHLER *et al.*, 1987).

Esses resultados experimentais permitiram o desenvolvimento de dois ensaios clínicos com terapias farmacológicas, duplo-cegos, prospectivos e randomizados, cujo resultado foi o aumento na recuperação neurológica em pacientes. O Segundo Estudo Nacional do Trauma da Medula Espinhal Agudo (NASCIS II) mostrou que a injeção intravenosa de metilprednisolona aplicada nas 24 horas subsequentes ao trauma produzia melhora neurológica significativa em pacientes (BRAKEN *et al.*, 1990). Também o Ensaio Clínico de Maryland com o Gangliosídeo GM1 demonstrou que pacientes tratados com GM1 apresentaram melhora neurológica significativa decorrido um ano da injúria, quando comparados com pacientes que receberam placebo (GEISLER *et al.*, 1991).

Esta confirmação de resultados obtidos em animais e em um ensaio clínico em seres humanos, utilizando-se protocolos de laboratório rigorosamente controlados tem implicações tanto na pesquisa básica como na clínica. Segundo BARROS FILHO (2000) as evidências permitem recomendar o uso de metilprednisolona e de gangliosídeos no tratamento da lesão medular traumática, respeitando as indicações e dosagens de cada uma das referidas drogas. Estabelece o precedente que o sucesso terapêutico obtido em estudos com modelos de trauma raquimedular em animais possa ser reproduzido em pacientes com doenças semelhantes. Também diminui o pessimismo com relação à aplicabilidade de resultados obtidos em modelos animais à doenças humanas que envolvem o sistema nervoso central (SNC), especificamente o trauma

(MOLINARI, 1988). Portanto, o sucesso do NASCIS II e do ensaio clínico com o GM1 representam resultados promissores para tratamentos farmacológicos em pacientes com trauma medular agudo, mostrando que são legítimos os estudos e os ensaios em modelos animais de trauma raquimedular.

1.1.1. INTERVENÇÕES BIOLÓGICAS NO TRAUMA RAQUIMEDULAR

A resposta das células do sistema nervoso e do organismo ao trauma é um processo complexo que envolve componentes teciduais assim como grande variedade de respostas sistêmicas (SCHWAB & BARTHOLDI, 1996). A perda funcional que ocorre após o trauma raquimedular resulta da magnitude da força inicial da contusão e, portanto, da lesão inicial, imediata e irreversível. Atuam, também, fatores mecânicos produzidos, muitas vezes, pelo deslocamento ou fratura das vértebras com lesão compressiva da medula espinhal (BOHLMAN, 1977). A lesão mecânica inicial causa dano por si só mas, além disso, desencadeia mecanismos secundários à lesão, que contribuem para a gravidade do trauma causado à medula espinhal (TATOR & FEHLINGS, 1991). Ocorre, ainda, durante as primeiras horas após o trauma, uma cascata de reações promovendo lesão secundária subsequente: alteração do fluxo sanguíneo e perfusão tecidual com diminuição do fluxo sanguíneo e hipóxia; produção de edema e focos de hemorragia medular; alterações celulares, mudanças bioelétricas que impedem a condução nervosa produzindo necrose celular, com conseqüente aumento na área de destruição tecidual (OSBORN, 1996; SCHWAB & BARTHOLDI, 1996).

Portanto, os eventos fisiológicos secundários à lesão devem ser considerados na interpretação de qualquer estudo experimental, (ANDERSON & STOKES, 1992), sendo importante o entendimento dos mecanismos de lesão sobre as células nervosas que resultam na perda da função normal (para revisão consultar HALL & WOLF, 1986; TATOR & FEHLINGS, 1991; COUGHLAN, 1993; JEFFERY, 1995; BARTHOLDI & SCHWAB, 1996).

Em resumo, a lesão aguda da medula espinhal inicia uma cascata complexa de reações bioquímicas incluindo a liberação de agentes vasoativos, aminoácidos citotóxicos, ácidos graxos livres, aumento da formação de radicais livres, o que

culminará com a entrada de cálcio nas células, que mediará a morte celular ou a degeneração axonal, via ativação de enzimas. Nas 48 horas subseqüentes à lesão ocorre aumento progressivo na extensão da lesão tecidual, com formação de edema resultante do aumento da pressão intramedular. A detecção destes mecanismos secundários das lesões é o que tem sugerido fortemente a possibilidade de intervenções terapêuticas nos vários estágios da cascata bioquímica de eventos pós-lesão.

Aparentemente, todos os axônios têm capacidade regenerativa, mas após a lesão da medula espinhal ou do SNC, esta capacidade não se manifesta. AGUAYO *et al.* (1990) realizaram elegantes experimentos nos quais foi demonstrado que os axônios de adultos não se regeneravam devido à reduzida capacidade regenerativa do adulto, ou à inibição do ambiente celular através do qual os axônios precisam crescer. No sistema nervoso central normal, os axônios estão em contato com os astrócitos e oligodendrócitos. Após a lesão, ocorre reação celular que resulta na divisão dos astrócitos, que se transformam em astrócitos cicatriciais, sendo a mielina destruída, a microglia multiplica-se e migra para a região de lesão, ocorrendo o mesmo com os precursores dos oligodendrócitos. O sistema nervoso central lesado passa, então, a possuir 4 tipos de células gliais: astrócitos, oligodendrócitos, precursores de oligodendrócitos e microglia. Infelizmente, tem sido observado que todos estes tipos de células gliais podem inibir o crescimento de axônios. Entretanto, Schwab produziu um anticorpo que neutraliza uma das mais potentes moléculas inibidoras de crescimento neuronal presente na mielina: a IN 250. Este anticorpo foi utilizado em modelos experimentais de lesão da medula espinhal e o resultado foi positivo, com a indução da regeneração de axônios (SCHWAB & KAPFHAMMER, 1993)

Por outro lado, algumas moléculas, os fatores associados com o crescimento neuronal, têm suas expressões gênicas induzidas durante o desenvolvimento, somente em algumas regiões do SNC de adultos (NICHOLLS & SAUNDERS, 1996; BROSAMLE & SCHWAB, 1996). Essas moléculas que são conhecidas pela capacidade plástica estrutural, também podem ser expressadas novamente ou aplicadas após lesões (CHENG & OLSON, 1996), o que resulta no aumento do número de axônios em processo de regeneração. Atualmente, uma proteína tem despertado interesse especial, a proteína associada ao crescimento neuronal (BROOK *et al.*, 1998), porque foi observado que a sua concentração no SNC de animais adultos é inversamente

proporcional ao conteúdo de mielina, que é um componente do sistema nervoso atualmente muito estudado pelos seus efeitos inibitórios na regeneração axonal (THALLMAIR *et al.*, 1998).

Adicionalmente, um grande número de dados experimentais tem sugerido que, no adulto, os 5 a 10% dos neurônios que sobrevivem à compressão (FEHLINGS & TATOR, 1992) ou contusão (BLIGHT, 1991) da medula espinhal podem recuperar alguma função neurológica. A medula de animais neonatos ou na fase embrionária pode apresentar crescimento, formação sináptica e até restauração da sua função, através e em torno da lesão (BERNSTEIN & BREGAMN, 1993). Neste contexto, uma variedade de mecanismos celulares e moleculares que promovem a regeneração do SNC e periférico tem sido identificada em vertebrados e invertebrados, *in vivo e in vitro* (BARDE *et al.*, 1987; NICHOLLS & SAUNDERS, 1996). O potencial de crescimento nervoso tem sido demonstrado em ratos imaturos, hamsters e gambás, assim como em frangos (BREGAMN *et al.*, 1983; NICHOLLS & SAUNDERS, 1996). Porém, é conhecido o fato de que o SNC perde progressivamente a capacidade de regeneração abruptamente, e cessa, quando atinge o seu crescimento e maturidade.

Em resumo, os estudos realizados até o momento têm indicado que na recuperação de pacientes com trauma raquimedular, devem ser desenvolvidas algumas estratégias, que devem ser aplicadas imediatamente após a lesão. O objetivo desta estratégia seria promover neuroproteção, reduzindo a progressão e ou agravamento da lesão, sendo que tal objetivo poderia ser alcançado em tratamentos na fase aguda, por meio da estimulação da regeneração axonal espontânea bloqueando a ação dos fatores de inibição do crescimento neuronal, principalmente aqueles produzidos pelas células gliais que atuam como barreira para regeneração; por meio da estimulação da liberação, e ou da aplicação local de fatores neurotróficos que promoveriam a recuperação de axônios lesados. A médio ou longo prazo, a manutenção dos pacientes seria (por sua vez) realizada por meio da estimulação sensório-motora, por meio de transplantes de fragmentos de nervos periféricos, tecido muscular, ou utilizando-se com a terapia gênica.

O principal objetivo do tratamento do trauma raquimedular seria alcançar a recuperação da função e os estudos realizados até o momento têm indicado caminhos que possam ser investigados com esta finalidade. Portanto, é extremamente necessária a

disponibilidade de modelos de lesão da medula espinhal em animais, a disponibilidade de métodos de monitorização da recuperação funcional associada com o tratamento, bem como os métodos histológicos quantitativos para a avaliação da gravidade e evolução da lesão.

1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL.

Os modelos experimentais, dentro do possível, devem reproduzir as lesões que ocorrem em humanos, com o intuito de comparar em resultados, com a utilização racional de modelos animais. A dinâmica da lesão da medula espinhal em humanos é complexa e variada, e algumas questões precisam ser respondidas para que sejam desenvolvidos tratamentos efetivos do trauma raquimedular como, por exemplo: Quais são as modificações patológicas que resultam da contusão da medula espinhal? Como estas modificações evoluem?

Algumas regras devem ser respeitadas na escolha e caracterização de um modelo experimental: ele deve produzir lesão efetiva da medula espinhal e com pouca variabilidade; deve ser simples e preciso, permitindo, assim, sua reprodução (BEHRMAN *et al.*, 1994).

Os ratos parecem ser uma espécie adequada para serem utilizados como animais experimentais, pelo baixo custo e por serem animais resistentes e de fácil manipulação para os testes de comportamento (TAOKA & OKAJIMA, 1998).

Vários modelos de lesão medular aguda têm sido desenvolvidos (FERNANDEZ *et al.*, 1991). Os modelos de lesão medular em laboratório foram descritos inicialmente por ALLEN (1911), que utilizou um modelo de queda de peso. A partir daí, foram criados outros modelos como a compressão medular por meio de instrumentos cirúrgicos (AYER, 1919) ou a compressão com o próprio polegar (FONTAINE *et al.*, 1954). A principal desvantagem destas técnicas era a avaliação imprecisa da intensidade desta compressão. TARLOV *et al.* (1953) introduziram a técnica de compressão extradural em cachorros, utilizando um balão inflável. Esses métodos de compressão medular simulam as lesões do tipo luxação ou fraturas/luxação da coluna vertebral em humanos. Foram encontradas dificuldades em

se manter o balão no local escolhido da medula espinhal, que foram solucionadas por HANSEBOUT *et al.* (1975), utilizando um balão em que se conseguia um posicionamento mais preciso sobre a medula espinhal. O desenvolvimento recente de balões menores permitiu o estudo em pequenos animais que são mais facilmente avaliados. Isto foi demonstrado por MARTIN & BLOEDEL (1973) que utilizaram o balão Fogarty para produzir lesão medular em gatos e a avaliação da medula espinhal por meio do potencial evocado.

KHAN & GRIEBEL (1983) reproduziram a lesão medular em ratos com sucesso utilizando um modelo de cateter de embolectomia arterial. Esta técnica permitia um conhecimento do volume de gás utilizado, o local exato da compressão, assim como o tempo. RIVLIN & TATOR (1978) descreveram um modelo de lesão aguda em ratos utilizando um grampo de compressão modificado. Este modelo foi utilizado por vários pesquisadores, e apresentou-se bastante confiável e de baixo custo (KHAN & GRIEBEL 1983).

Existem, ainda, descritos outros modelos mais modernos de trauma raquimedular cuja lesão pode ser produzida por incisão ou fatores fotoquímicos (SCHWAB & BARTHOLDI, 1996; SARUHASHI & YOUNG, 1994). VAN DE MEENT *et al.* (1996) utilizaram o modelo de contusão por queda de peso, adicionando um pequeno refinamento com respeito à imobilização e à estabilização da coluna vertebral. Na Universidade de Nova York, foi desenhado uma aparelhagem eletrônica computadorizada que produz lesão por contusão por meio da queda de peso padronizada, utilizando pesos e velocidade de impacto constantes (GRUNER, 1992). Este dispositivo foi utilizado por VIALLE *et al.*, (1999), mostrando ser bastante eficiente na padronização da lesão medular, tornando assim possível o estudo da progressão da área de necrose secundária, por meio de estudos histológicos de medulas em condições idênticas.

Aparentemente, não existe modelo experimental de lesão medular que possa ser usado com exclusividade durante uma pesquisa, que tenha como objetivo caracterizar a lesão medular nos aspectos motores e sensitivos. Dentre os diversos modelos que foram desenvolvidos, o mais utilizado é o do trauma raquimedular produzido pela queda de peso (ALLEN, 1911), com as várias modificações (DOHRMANN *et al.*, 1976; DUCKER *et al.*, 1978; FORD, (1983) e aperfeiçoamentos

introduzidos (GRUNER, 1992; VAN DE MEENT *et al.*, 1996). A utilização desses modelos tem permitido os estudos da fisiopatologia dos eventos secundários à lesão, assim como a aplicação de intervenções terapêuticas que têm sido amplamente investigadas em diversos centros de estudo.

1.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA LESÃO MEDULAR

A lesão espinhal aguda raramente secciona toda a medula e geralmente afeta apenas uma pequena população de neurônios concentrados na borda subpial (BEHRMANN *et al.*, 1992).

Os aspectos clínicos e fisiológicos devem ser analisados em todo modelo de trauma raquimedular (ANDERSON & STOKES, 1992; SARUHASHI & YOUNG, 1994; SCHWAB & BARTHOLDI 1996). A avaliação da função residual da medula espinhal e do provável estabelecimento de conexões sinápticas corretas devem fornecer uma verificação fidedigna do restabelecimento funcional após o trauma raquimedular, que deve ser correlacionada aos testes de comportamento (BASSO *et al.*, 1996). Existem, hoje, três abordagens principais para análise do restabelecimento funcional após o trauma raquimedular. A primeira seria a análise do comportamento sensorial e motor dos animais. Existem muitos métodos disponíveis para avaliação da intensidade e gravidade da lesão, assim como da recuperação funcional. A segunda seria a utilização de registros de potencial evocado sensorial e motor das células da medula espinhal após o trauma, para a demonstração de que os impulsos dos axônios, eventualmente transmitidos através da lesão, sejam produzidos pelas células que provavelmente se recuperaram, e adequados para a condução de informações entre as células nervosas. A terceira, a avaliação histológica detalhada do tecido no local e ao redor do trauma, permitindo a quantificação das dimensões da lesão.

Os métodos de análise de comportamento avaliam a função reflexa, a função locomotora, analisando o movimento individual das patas, e a função sensitiva por meio de medidas qualitativas e quantitativas. Um método de medida de comportamento geralmente utilizado para medida da recuperação funcional é a escala de TARLOV (1954) modificada por BOHLMAN (1981). Esta escala estabelece uma graduação de valores para a locomoção dos animais no campo aberto, em adição a um teste de marcha

num plano inclinado. Esta escala de avaliação locomotora com suas variações e aperfeiçoamentos, tem sido utilizada por diversos autores (DE LA TORRE, 1981; GALE *et al.*, 1985). Uma limitação da escala de Bohlman/Tarlov é que o sistema de escores depende muito da avaliação subjetiva do observador, sendo o teste do plano inclinado menos sujeito a interpretações subjetivas. Este fator impõe que, embora muitas vezes, os escores sejam reprodutíveis dentro de um mesmo laboratório, elas podem perder a reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. A Escala de Tarlov com algumas modificações foi utilizada por DE LA TORRE (1981) na análise das funções motoras dos animais submetidos a lesões medulares nas fases agudas (dentro das primeiras 48 horas após a lesão) e fase crônica (a partir de 48 horas após a lesão). GRUNER *et al.* (1992) demonstraram lesões motoras importantes quando compararam por meio do Teste do Plano Inclinado os ratos que haviam sofrido compressão medular com os do grupo controle.

Estes testes podem, ainda, ser combinados com as medidas de reflexos, produzindo, assim, um escore combinado de comportamento. GALE *et al.* (1985) analisaram o comportamento de ratos que haviam sofrido lesão medular de diferentes graus de intensidade, analisando padrões motores de locomoção em combinação com a análise de diversos reflexos segmentares e supra-segmentares. Recentemente foi descrita uma escala de avaliação locomotora que considera diversos aspectos, a Escala BBB, descrita por BASSO *et al.* (1995), com vantagens potenciais sobre a escala de Tarlov.

O conjunto de todos os testes fornecem uma avaliação geral do animal, mas ainda não são suficientes para a demonstração da especificidade de um determinado procedimento experimental na recuperação funcional ou o grau em que uma determinada função ou comportamento tenha sido comprometida pela lesão (KUNKEL-BADGEN *et al.*, 1993). Todos os estudos realizados neste campo de investigação têm demonstrado que somente uma combinação de estratégias de análise poderá fornecer uma base sólida para que futuras intervenções terapêuticas possam surgir e serem aplicadas na recuperação funcional dos traumatismos raquimedulares.

O nosso grupo iniciou o estudo do trauma raquimedular em 1995, utilizando-se do método de contusão por queda de peso. A avaliação da função da medula espinhal após trauma raquimedular foi realizada utilizando-se a escala de Tarlov de avaliação

locomotora (BORGES, 1999; DEL BEL *et al.*, 2000) e testes de reflexos segmentares e supra segmentares, como o Teste da Retirada de Cauda e o Teste da Placa Quente. A lesão foi produzida por meio do modelo de contusão por queda de peso, e também por compressão, ao nível do segmento T₁₀-L₁. Analisamos histologicamente a lesão produzida nos segmentos medulares cervical, torácico, lombar e sacral, utilizando a reação de Nissl e a histoenzimologia para as enzimas colinesterase e NADPH diaforase, e também a reação imunocitoquímica para a proteína Fos, analisando regiões da medula espinhal e do tronco cerebral (DEL BEL *et al.*, 2000). Nestes estudos observamos a expressão da proteína Fos após o trauma raquimedular em regiões adjacentes ao trauma, assim como em regiões mais altas do cérebro, ao nível do tronco cerebral, concluindo que a combinação de diversos testes para uma análise global do animal no que diz respeito às lesões sensitivas e motoras, assim como a recuperação funcional seria de grande importância, em concordância com outros autores (BAGDEN *et al.*, 1993). A escolha de um modelo específico de trauma raquimedular para nossas condições de laboratório deveria ser um tema mais intensamente estudado, assim como os métodos de avaliação da recuperação funcional dos animais, no intuito de podermos compreender melhor os mecanismos envolvidos no dano neurológico, seja relacionado ao trauma diretamente ou relacionado à cascata de eventos, envolvendo edema, inflamação, isquemia, reperfusão, fatores de crescimento e metabolismo de cálcio, já que essas formas de morte celular tem sido alvo de esforços científicos no sentido de obter seu controle (VIALLE *et al.*, 1999).

1.4. OBJETIVOS DO TRABALHO

A lesão da medula espinhal tem despertado a nossa atenção e motivado a realização de estudos experimentais, com o objetivo de esclarecer seus aspectos fisiopatológicos e possíveis alternativas terapêuticas. Com a finalidade de desenvolver os objetivos mencionados, idealizamos um plano de trabalho, baseado nas condições de estudo que possuímos, atendendo à nossa realidade de pesquisa. Nosso objetivo geral foi o estudo de modelos experimentais utilizados para a produção de lesão medular, com enfoque na avaliação da função motora, sensitiva e histológica. Nosso objetivo específico foi selecionar um dos modelos de lesão medular experimental, estudados

conhecendo-se sua reprodutibilidade, após a determinação de parâmetros sensoriais, motores e histológicos, para realização de estudos futuros pelo grupo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Animal utilizado

Foram utilizados 57 ratos Wistar machos; com peso variando de 250 a 300g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em gaiolas com água e alimentação *ad libitum*, temperatura da sala mantida em 25°C e ciclo claro/escuro controlados automaticamente.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo dos animais.

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal (i.p.), com solução de 2,2,2-Tribromoetanol*, na concentração de 250 mg/kg de peso corpóreo. Em seguida foi realizada a tricotomia na região dorsal, entre os segmentos vertebrais T₁₀-L₁, numa área de cerca de 3 a 5 cm de extensão, com os animais posicionados no aparelho estereotático para pequenos animais (marca David Kopf), por meio da introdução de duas hastes auriculares de metal (Fig. 1).

A região abdominal do corpo do animal foi apoiada sobre um tubo plástico (2 cm de diâmetro), e esse procedimento facilitou o acesso à medula espinhal na região vertebral selecionada para o estudo (T₁₀-L₁).

*(99%, Aldrich)

Fig. 1. Animal posicionado no aparelho Extereotático para pequenos animais, mostrando a região escolhida para a incisão.

2.2.2. Técnica cirúrgica

Com o animal posicionado no aparelho estereotático, conforme descrito acima, procedíamos com a localização da região da medula espinhal a ser exposta e manipulada experimentalmente. A referência anatômica utilizada foi a costela mais distal do animal e sua inserção na vértebra T₁₂. Foi realizada, então, uma incisão de aproximadamente 3 cm no local, sobre os processos espinhosos vertebrais. A pele, o tecido subcutâneo e muscular da região foram divulsionados até a exposição das lâminas ósseas vertebrais do segmento compreendido entre T₁₀ e L₁ (Fig. 2).

Fig. 2 – Divulsão dos tecidos epitelial, subcutâneo, muscular e fascial inserido nos processos espinhosos da região vertebral compreendida entre o segmento T₁₀ e L₁.

Em seguida, nos grupos experimentais nos quais era necessário, as lâminas ósseas vertebrais foram removidas com subsequente exposição da dura mater (Fig.3).

O passo seguinte foi a realização dos diferentes tipos de procedimentos para a produção da lesão da medula espinhal, conforme o grupo experimental a que pertencesse o animal. Após a realização dos procedimentos os animais foram suturados

e mantidos em gaiolas individuais com água e alimentação *ad libitum* até o momento da realização dos testes.

Fig. 3 – Retirada das lâminas ósseas com exposição da dura mater do segmento vertebral compreendido entre T₁₀ e L₁.

2.2.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais, sendo 3 grupos controle e 4 grupos submetidos a diferentes tipos de lesão da medula espinhal. O número de animais por grupo variou de 4 a 16.

Os 3 grupos experimentais controles foram representados pelo grupo em que foi realizada somente a anestesia dos animais (4 animais), grupo em que foi realizado somente o divulsionamento das partes moles e a exposição das lâminas das vértebras (9 animais), e pelo grupo em que foi realizada a exposição da dura-máter por meio de laminectomia (12 animais). Os 4 grupos experimentais nos quais foi realizada a lesão da medula espinhal eram formados pelo grupo de secção total da medula espinhal (16 animais), grupo de secção total da medula espinhal precedida da aplicação local de Xilocaína (8 animais), grupo de hemissecção direita da medula espinhal (4 animais) e pelo grupo do pinçamento vertebral (4 animais).

2.2.3.1 – Grupo Controle Anestesia

Quatro animais foram anestesiados com tribromoetanol na dosagem descrita anteriormente e mantidos em caixas separadas, com água e alimentação *ad libitum*.

2.2.3.2 – Grupo Controle Divulsionamento

Neste grupo foram utilizados 9 animais, submetidos à anestesia, seguida de uma incisão cutânea no segmento vertebral compreendido entre T₁₀ e L₁, de aproximadamente 3 cm, seguida do divulsionamento cuidadoso dos tecidos epitelial, subcutâneo, muscular e fascial inseridos nos processos espinhosos da região vertebral, até a exposição das lâminas ósseas. A pele e a camada muscular dos animais eram em seguida suturadas com fio de seda monofilamentada*, e os animais colocados em caixas individuais com água e alimentação *ad libitum* até o início dos testes.

2.2.3.3 – Grupo Controle Laminectomia.

Esse grupo constava de 12 animais submetidos a anestesia, seguida de uma incisão cutânea no segmento vertebral compreendido entre T₁₀ e L₁ de aproximadamente 3 cm seguido do divulsionamento do tecido epitelial, subcutâneo, muscular e fascial

*Ethicon

inseridos nos processos espinhosos da região vertebral, até a exposição das lâminas ósseas. Em seguida, foi realizada a remoção das lâminas vertebrais, ao nível de T₁₁-T₁₂, até a exposição completa da dura mater, com o auxílio de um pequeno alicate que teve sua ponta manipulada.

A pele e a camada muscular dos animais foram suturadas com fio de seda monofilamentada, e os animais colocados em caixas individuais com água e alimentação *ad libitum* até o início dos testes.

2.2.3.4 – Grupo da Secção Total da Medula Espinhal

Esse grupo compreendeu 16 animais que foram submetidos a anestesia, seguida da incisão sobre o segmento da coluna vertebral T₁₀-L₁ com divulsionamento dos tecidos da região vertebral, e a exposição das lâminas ósseas, seguida de sua remoção por meio de laminectomia e exposição completa da dura mater. Para a realização desta lesão, foi utilizada uma lâmina de bisturi nº 15, cuja extremidade distal foi manipulada, sendo reduzida a uma ponta de aproximadamente 1mm. A lâmina foi posicionada perpendicularmente sobre a medula espinhal exposta (segmento T₁₁-T₁₂) tocando ligeiramente a região posterior do corpo vertebral do lado direito. Em seguida realizava-se a secção completa da medula espinhal, até o lado contralateral, mantendo-se a extremidade da lâmina do bisturi sempre em contato com a porção posterior do corpo vertebral.

A pele e a camada muscular dos animais foram em seguida suturadas com fio de seda monofilamentada, e os animais colocados em caixas individuais com água e alimentação *ad libitum* até o início dos testes.

2.2.3.5 – Grupo da Secção Total da Medula Espinhal (Precedida da Aplicação Local de Xilocaína).

Neste grupo de 8 animais os procedimentos foram semelhantes aos do grupo da Secção Total da Medula Espinhal, diferindo apenas na aplicação do anestésico local previamente à secção medular. Com o auxílio de uma seringa, foi feita a aplicação de xilocaína (1 ml) no local da lesão, lentamente, sobre o segmento da medula espinhal

exposto, observando-se um intervalo de 2 minutos. Em seguida foi realizada a secção da medula espinhal e o fechamento da ferida cirúrgica conforme descrito no parágrafo anterior.

2.2.3.6 – Grupo da Hemissecção Direita da Medula Espinhal

Nesse grupo 4 animais foram submetidos a anestesia, seguida da incisão sobre o segmento da coluna vertebral (T₁₀ e L₁), com divulsionamento cuidadoso dos tecidos da região vertebral, e a exposição das lâminas ósseas, seguida de sua remoção através de laminectomia (T₁₁-T₁₂) e exposição completa da dura mater.

Para a realização desta lesão, o bisturi com lâmina fina foi posicionado cuidadosamente sobre a medula espinhal exposta (T₁₁-T₁₂), perpendicularmente, na sua região central (sulco central), com a face cortante da lâmina voltada para o lado direito, tocando ligeiramente a região posterior do corpo vertebral. Em seguida transcorria-se a hemissecção direita da medula espinhal, até alcançar a região pósterolateral do corpo vertebral, mantendo-se a extremidade da lâmina do bisturi sempre em contato com a porção posterior do corpo vertebral.

O fechamento da ferida cirúrgica era realizado de modo semelhante aos dos demais grupos.

2.2.3.7 – Grupo do Pinçamento Vertebral

Neste grupo, 4 animais foram submetidos a anestesia, seguida da incisão sobre o segmento da medula espinhal (T₁₀ - L₁) e o divulsionamento cuidadoso dos tecidos da região vertebral, até a exposição das lâminas ósseas. Não foi realizada a remoção da lâmina óssea das vértebras. Em seguida um grampo de aço com mola, com boca tipo jacaré, foi posicionado sobre os segmentos vertebrais expostos (T₁₀ -L₁) e mantido sobre as vértebras por 1 minuto, após o que era retirado.

A pele e a camada muscular de todos os animais foram, em seguida aos procedimentos descritos, suturados, e os animais colocados em caixas individuais com água e alimentação *ad libitum*.

2.2.4 – Métodos de Avaliação

2.2.4.1 - Avaliação Motora e Funcional

2.2.4.1.1 - Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras dos Animais

A avaliação da função motora dos animais foi feita por meio da Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras dos Animais, pela observação da capacidade de movimentação dos mesmos durante 2 minutos, após 2 e 24 horas da realização dos diferentes procedimentos. Para tanto, os animais foram colocados sobre uma superfície plana lisa, com aproximadamente 1m de raio, delimitada por paredes de plástico transparente.

Foi estabelecido um escore de valores que variaram de 0 a 2:

Grau 0 = normal - movimentação normal das patas traseiras;

Grau 1 = paresia - definida pela diminuição dos movimentos das patas traseiras;

Grau 2 = plegia - ausência de movimentos nas patas traseiras.

2.2.4.1.2 - Escala da Avaliação Motora de Bohlman

A Escala de Avaliação Motora de TARLOV (1954) modificada por BOHLMAN (1981), avaliou a motricidade das patas traseiras e dianteiras dos animais, 2 e 24 horas após a realização dos diferentes procedimentos. Os autores estabeleceram para esta escala um escore de valores que variaram de 0 a 5:

Grau 0 - paraplegia (perda total dos movimentos das patas traseiras);

Grau 1 - pequenos movimentos articulares das patas traseiras;

Grau 2 - grandes movimentos articulares das patas traseiras;

Grau 3 - animal podia permanecer com apoio das 4 patas sobre superfície plana;

Grau 4 - animal era capaz de caminhar sobre superfície plana;

Grau 5 - animal era capaz de caminhar no plano com inclinação de 30°.

Para análise e atribuição dos escores de 0-4, os animais foram colocados sobre uma superfície plana e lisa, com aproximadamente 1m de raio, e delimitada por paredes de plástico transparente, tendo sido observados durante 2 minutos pelo experimentador.

Para atribuição do escore 5, os animais foram submetidos ao Teste do Plano Inclinado. Foi usada uma rampa de madeira com as seguintes características: um metro de comprimento, 8,5cm de largura, com o assoalho coberto por borracha fosca (antiderrapante), rodeada por paredes laterais de 21,5 cm de altura e inclinação de 30° (Fig. 4).

Tais dimensões foram baseadas no trabalho de RIVLIN & TATOR (1978), com pequenas modificações, para só permitir que o animal adotasse a direção de subida. Os animais foram colocados na porção inferior da plataforma inclinada, sendo observados pelo experimentador por um período de 3 minutos, com relação ao nível alcançado pelos mesmos. O comprimento da rampa foi dividido em 3 partes iguais e foram atribuídos escores 0 aos animais que não alcançaram pelo menos o primeiro terço da rampa e 1 aqueles que o fizeram.

2.2.4.1.3 - Teste do Campo Aberto

O Teste do Campo Aberto consistiu na observação de determinados comportamentos dos animais, por um período de 5 minutos. O teste era realizado numa plataforma plana circular de aproximadamente 1 metro de diâmetro, com superfície branca lisa, dividida em quadrantes e isolada do meio externo por uma estrutura circular acrílica transparente, de aproximadamente 50 cm de altura (Fig. 5).

No momento da realização do teste, os animais eram individualmente colocados no centro do círculo, sendo observados com relação aos comportamentos “Análise Quantitativa da Marcha”, “Exploração do Plano Vertical”, comportamento “Auto-limpeza” e contagem do número de “Bolos Fecais”, abaixo descritos.

Figura 4 – Dispositivo utilizado para a avaliação dos animais por meio do Teste do Plano Inclinado: A - em vista lateral e B - em vista superior

2.2.4.1.3.1 - Análise quantitativa da marcha

No teste era observado o número de quadrantes percorridos pelo animal, demarcados na plataforma do dispositivo do Campo Aberto, durante 5 minutos. Padronizou-se considerar que o animal atravessava um quadrante somente quando o cruzamento era realizado com as 4 patas.

Figura 5 – Dispositivo utilizado para a realização do Teste do Campo Aberto nos animais.

2.2.4.1.3.2 - Auto limpeza

Nessa avaliação era registrado o número de vezes em que o animal friccionava as patas dianteiras no focinho ou estas eram lambidas, dentro do intervalo de tempo considerado.

2.2.4.1.3.3 - Exploração no plano vertical

Nesse teste foi observado o número de vezes em que o animal permanecia em pé, apoiado apenas sobre as patas traseiras.

2.2.4.1.3.4 - Bolos fecais

Ao final do teste, após a retirada do animal do dispositivo, foi feita a contagem do número de bolos fecais eliminados pelo mesmo.

Os animais foram submetidos ao teste 2 e 24 horas após os diferentes procedimentos.

2.2.4.2 - Avaliação Sensitiva e Funcional

Os testes de avaliação sensitiva e funcional foram realizados por meio do exame da função reflexa utilizando os testes da Placa Quente, Retirada da Cauda e Pinçamento da Pata.

2.2.4.2.1 - Teste da Placa Quente.

O teste consistia em colocar o animal sobre uma superfície de alumínio, aquecida a uma temperatura de 52°, por um período máximo de 20 segundos, sendo observado o comportamento adotado pelo mesmo (Fig. 6). É importante ressaltar que o tempo de corte de 20 segundos foi padronizado neste teste para não produzir lesão cutânea nos animais. Os animais que não apresentavam lesão nervosa lambiam as patas ou saltavam da placa, na tentativa de livrar-se do estímulo térmico aplicado, enquanto que os animais com lesão neurológica mantinham-se estáticos. Os animais foram retirados da placa assim que esboçaram qualquer um dos comportamentos descritos.

Fig. 6 – Dispositivo utilizado para a avaliação dos animais por meio do Teste da Placa Quente.

2.2.4.2.2 - Teste da Retirada da Cauda.

Para realização deste teste os animais foram contidos em um tubo cilíndrico de acrílico, com a cauda livre apoiada sobre uma superfície de níquel-cromo. Esta superfície aquecia-se progressivamente até alcançar a temperatura de aproximadamente 54°, o que ocorria em cerca de 6 segundos (Fig. 7). Este tempo foi considerado o tempo de corte do teste (6 segundos) e sabe-se que não produz lesão cutânea nos animais.

Fig. 7 – Dispositivo utilizado para a avaliação dos animais por meio do Teste da Retirada de Cauda.

2.2.4.2.3 - Teste do Pinçamento da Pata.

Neste teste as patas direita e esquerda dos animais foram colocados no aparelho Randal-Celitto de pressão progressiva. O aparelho é constituído de uma haste, sobre a qual corria um peso, que variava de 0-25g. Um dispositivo de plástico, conectado à haste era colocado em contato com o 3º espaço interdigital das patas traseiras, que por sua vez eram apoiadas sobre uma superfície plana própria do aparelho. O aumento progressivo do peso foi então transferido para o 3º espaço interdigital das patas traseiras, conforme o peso percorria a haste (Fig. 8). O teste era encerrado quando o animal esboçava algum movimento na pata avaliada ou quando o peso alcançava o nível máximo.

Fig. 8 – Dispositivo utilizado para avaliação dos animais por meio do Teste do Pinçamento da Pata.

2.2.4.3 - Avaliação Histológica

2.2.4.3.1 – Sacrifício e perfusão dos animais

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de uretana (dose de 1,5 g/kg de peso corpóreo) 24 horas após os procedimentos para a realização da perfusão e sacrifício.

Logo após a incisão cutânea, na região inferior à última costela, foi introduzida agulha de calibre 30x12 no ventrículo esquerdo do animal. Foi realizada a perfusão transcardíaca por meio da canulação da aorta do animal, utilizando-se a perfusão de 50 ml de solução salina (à temperatura ambiente) e, em seguida, a mesma quantidade de solução de paraformaldeído (PFA), na concentração de 10% (p/v).

Em seguida, foi feita a retirada da medula espinhal dos animais, que era colocada em solução de formol (10%) até a realização do preparo das lâminas para análise histológica.

2.2.4.3.2 - Colorações histológicas

A avaliação histológica dos tecidos foi realizada utilizando-se 3 colorações: a Coloração de Cresil Violeta ou Reação de Nissl, a reação histoquímica de Hematoxilina-Eosina (HE) e a Coloração de Gleys ou Kluver-Barrera.

Para realização das análises histológicas, os tecidos medulares foram incluídos em parafina, e cortes de 2 μ m foram realizados nos blocos. As lâminas foram, então, desparafinizadas e incubadas, cada uma com o seu respectivo corante.

O método de Coloração de Nissl consistiu na incubação das lâminas contendo o segmento medular, com o corante Cresil Violeta, na concentração de 0,5mg/100 ml, em tampão acetato de sódio pH 3.9, por 10 minutos. Em seguida, as secções de tecido foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas, diafanizadas, montadas e analisadas ao microscópio óptico.

A coloração de HE consistiu na incubação de lâminas contendo o segmento medular com o corante hematoxilina/eosina, seguida de desidratação e hidratação. As lâminas foram, então, lavadas no mesmo tampão, desidratadas, diafanizadas, montadas e analisadas ao microscópio.

O método de coloração de Gleys consistiu na incubação de lâminas contendo o segmento medular, seguida de desidratação e hidratação. As lâminas foram então incubadas com nitrato de prata. Em seguida, as secções de tecido foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas, diafanizadas, montadas e analisadas ao microscópio. Após a coloração os axônios aparecem como linhas pretas e as células da glia aparecem na cor marrom ao microscópio.

2.2.4.3.3 – Análise estatística

A análise estatística dos procedimentos da Placa quente e Teste da Retirada de Cauda foram realizados utilizando-se a análise de variância multivariada (MANOVA), com medidas repetidas, para comparar os grupos com o tempo. Os fatores analisados foram procedimento, tempo e interação procedimento/tempo. Em caso de significância

nas interações procedimentos x tempo, foi realizada Anova, seguida por DUNCAN. o grau de significância admitido foi de $p < 0,05$.

3 – RESULTADOS

3.1 – Considerações gerais

Durante a realização dos experimentos foram encontradas algumas dificuldades, como o controle do plano anestésico atingido pelos animais, tempo de realização de cada procedimento cirúrgico e realização da técnica cirúrgica propriamente dita.

No que diz respeito ao plano anestésico atingido pelos animais, observamos que sua avaliação e padronização foi difícil, devido ao anestésico utilizado, e principalmente a via de introdução escolhida. Os animais apresentaram diferente sensibilidade ao agente anestésico e assim reagiram, embora a dosagem tenha sido rigorosamente calculada, individualmente para cada animal. Algumas vezes chegou a ocorrer o óbito do animal durante a cirurgia devido a este fato (total de 4 animais).

O tempo de cirurgia variou pouco de um animal para outro, dependendo do procedimento realizado. Os animais nos quais o tempo da cirurgia se estendeu demasiadamente, necessitaram de uma dose suplementar de anestésico e foram desprezados, para evitar possível interferência com os estudos de comportamento, que foram iniciados apenas 2 horas após a anestesia.

Com relação às técnicas cirúrgicas, os procedimentos foram realizados de modo a causar o mínimo de dano aos tecidos adjacentes ao local da lesão. Por exemplo, o grupo de animais nos quais foi realizada a hemisseção nos trouxe inicialmente alguma dificuldade com relação à precisão da lesão, ou seja, se conseguíamos realizar a secção apenas na hemi porção da medula espinhal. Este problema foi solucionado após treinamento e adequação da lâmina do bisturi. Nesses casos a lesão era rigorosamente verificada, por meio de uma inspeção visual, após a retirada da medula espinhal dos animais.

3.2 – Avaliação Motora e Funcional

Para a avaliação da função motora dos animais foram utilizados os testes da Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras e a Escala de Avaliação Motora de TARLOV (1954) modificada por BOHLMAN (1981) e o Teste do Campo Aberto, descritos a seguir. Todos os testes motores foram realizados 2 e 24 horas após os procedimentos experimentais em todos os animais.

3.2.1. – Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras

No Quadro 1 e na Figura 9 estão apresentados os resultados dos escores atribuídos pela Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras dos Animais, nos diferentes grupos realizados. Na Quadro 1 os resultados são apresentados na forma de distribuição frequência. Na Figura 9 os resultados são apresentados como um escore médio dos animais para cada grupo. Podemos observar que os animais dos grupos Anestesia, Secção Total (Precedida ou não pela aplicação de Xilocaína), Hemissecção e Pinçamento Vertebral, apresentaram um único escore dentro de seu grupo, sugerindo homogeneidade do procedimento experimental e do efeito do tratamento, o que resultou em respostas de comportamento semelhantes. O mesmo não ocorreu para os dois outros grupos Divulsionamento e Laminectomia, sendo observados escores diferentes para os animais do mesmo grupo. No grupo Divulsionamento, 1 entre os 9 animais analisados apresentou um escore diferente, tanto na análise realizada 2 horas quanto naquela 24 horas após o tratamento. Por sua vez, no grupo Laminectomia observamos também uma mudança dos escores dos animais entre as medidas realizadas 2 ou 24 horas após os procedimentos experimentais. Neste grupo (n=12 animais), 9 apresentaram escore 1, enquanto 3 apresentaram escore 2 na medida realizada 2 horas após o procedimento cirúrgico; 24 horas após 8 animais apresentaram escore 1 enquanto que 4 animais apresentaram escore 2. Portanto, nos grupos experimentais Laminectomia e Divulsionamento quando avaliados pela Motricidade das Patas Traseiras observamos variação de escore entre os animais do mesmo grupo assim como variação no escore atribuído com o decorrer do tempo pós-cirúrgico.

Quadro 1: Resultados dos diferentes grupos experimentais pela avaliação da motricidade das patas traseiras, 2 e 24 horas após a realização dos procedimentos

	Tempo após Procedimento	Escore 0 (Movimentos normais)	Escore 1 (Paresia)	Escore 2 (Plegia)	Porcentagem de animais sem alterações funcionais
Grupo Anestesia (N= 4)	2 horas	4	0	0	100
	24 horas	4	0	0	100
Grupo Divulsionamento (N= 9)	2 horas	8	1	0	88.9
	24 horas	8	1	0	88.9
Grupo Laminectomia (N= 12)	2 horas	0	9	3	0
	24 horas	0	8	4	0
					Porcentagem de animais com alterações funcionais severas
Grupo Secção Total (N= 16)	2 horas	0	0	16	100
	24 horas	0	0	16	100
Grupo Secção Total precedida de Xilocaína (N= 8)	2 horas	0	0	8	100
	24 horas	0	0	8	100
Grupo Hemissecção Direita (N= 4)	2 horas	0	0	4	100
	24 horas	0	0	4	100
Grupo Pinçamento Vertebral (N= 4)	2 horas	4	0	0	0
	24 horas	4	0	0	0
TOTAL DE ANIMAIS NO ESCORE	—	28	19	63	—

($X^2 = 66$, $gl=12$, $p<0,001$ para o tempo de 2 horas e $X^2 =61,99$, $gl=12$, para o tempo de 24 horas, $p< 0.001$).

A Figura 9 mostra que os animais dos grupos Hemissecção, Secção Total (Precedida ou não pela aplicação de Xilocaína) apresentaram perda total dos movimentos. Os animais do grupo Laminectomia apresentaram perdas motoras parciais, enquanto que do grupo Anestesia, Divulsionamento e Pinçamento Vertebral apresentaram motilidade normal das patas traseiras na maioria dos animais.

Fig. 9 – Avaliação da motricidade das patas traseiras. Histograma ilustrando o resultado do Teste da Avaliação da Motricidade das Patas Traseiras após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da medida dos escores de cada grupo experimental de animais.

3.2.2 – Escala de Avaliação Motora de Bohlman

Os resultados da avaliação motora dos animais por meio da Escala de Bohlman estão apresentados nos Quadros 2 e 3 e Figuras 10 e 11. No Quadro 2 e Figura 10 estão apresentados separadamente o resultado do Teste do Plano Inclinado que foi utilizado para atribuição do escore 5 da Escala de Bohlman. Os resultados dos quadros estão apresentados na forma de distribuição de frequência, segundo os scores atribuídos experimentalmente. Os resultados das figuras estão apresentados sob a forma de escore médio dos animais por grupo.

No Quadro 2 estão apresentados os resultados referentes à análise da capacidade de os animais caminharem no plano inclinado a 30 graus. Podemos observar que para os grupos Anestesia, Secção Total (precedida ou não pela aplicação de Xilocaína), Hemissecção e no grupo Pinçamento Vertebral, o comportamento dos animais foi semelhante quando analisado 2 ou 24 horas após os procedimentos e todos os animais em seu grupo obtiveram os mesmos escores, indicando homogeneidade do efeito do tratamento experimental sobre os animais do grupo.

Contudo, nos grupos Laminectomia e Divulsionamento foi observada uma modificação dos escores dos animais no teste 2 horas em relação ao mesmo teste realizado 24 horas após o tratamento. No grupo Divulsionamento (N=12) 8 e 7 animais, respectivamente 2 e 24 horas após o tratamento, conseguiram realizar a tarefa a que foram submetidos; entretanto 1 (2 horas) e 2 animais (24 horas), não conseguiram realizar a tarefa proposta. No grupo Laminectomia, 2 horas após o tratamento, 10 dos 12 animais puderam se locomover no Plano Inclinado; contudo, nos testes realizados 24 horas, foi observada uma diminuição do número de animais que realizou a tarefa, sendo que apenas 5 dos 12 animais conseguiram se locomover. Estes resultados mostram que para os grupos Laminectomia e Divulsionamento, houve um efeito diferente do procedimento entre os animais, assim como modificação da resposta com o decorrer do tempo, que pode ser detectado através da análise da caminhada dos animais no plano inclinado a, 30 graus.

Na Figura 10 estão apresentados os resultados referentes às médias dos escores atribuídos e apresentados na quadro 2. A Figura ilustra que todos os animais dos grupos Anestesia e Pinçamento Vertebral realizaram a tarefa de caminhar, tanto 2 quanto 24 horas após os procedimentos. Somente parte dos animais dos grupos Divulsionamento e Laminectomia conseguiram realizar a tarefa, diminuindo esta capacidade no tempo 24 horas em relação ao tempo 2 horas após os procedimentos. Os animais dos grupos Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), e o grupo Hemissecção perderam a capacidade de se locomover até o nível mínimo de 1/3 do plano inclinado.

Portanto, a análise do efeito dos diferentes procedimentos sobre os animais, através do Teste do Plano Inclinado, mostrou resultados incongruentes em relação aos grupos Pinçamento Vertebral, quando comparado ao grupo Divulsionamento.

Quadro 2: Resultados dos diferentes grupos experimentais por meio do Teste do Plano Inclinado.

	Tempo após o Procedimento	Escore 0 (animal que não alcançou o nível mínimo do plano inclinado)	Escore 1 (animal que alcançou o nível mínimo do plano inclinado)	Porcentagem de animais sem alterações funcionais
Grupo Anestesia (N= 4)	2 horas	0	4	100
	24 horas	0	4	100
Grupo Divulsionamento (N= 9)	2 horas	1	8	88,8
	24 horas	2	7	77,7
Grupo Laminectomia (N= 12)	2 horas	2	10	83,3
	24 horas	7	5	41,6
				Porcentagem de animais com alterações funcionais severas
Grupo Secção Total (N= 16)	2 horas	16	0	100
	24 horas	16	0	100
Grupo Secção Total Precedida pela Aplicação de Xilocaina (N= 8)	2 horas	8	0	100
	24 horas	8	0	100
Grupo Hemisseção (N= 4)	2 horas	4	0	100
	24 horas	4	0	100
Grupo Pinçamento Vertebral (N= 4)	2 horas	0	4	0
	24 horas	0	4	0
TOTAL DE ANIMAIS NO ESCORE	—	68	46	

($X^2 = 33$, $gl=6$ $p<0,001$ para o tempo de 2 horas e $X^2 =25,32$, $gl=6$, para o tempo de 24 horas, $p< 0.001$).

Fig. 10 – Avaliação motora dos animais pelo teste do Plano inclinado. Histograma ilustrando resultado do teste do Plano Inclinado após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da medida dos escores de cada grupo experimental de animais

Assim, observamos que, a análise do efeito de diferentes lesões da medula espinhal por meio de escores obtidos pela avaliação da capacidade de caminhar no plano inclinado mostrou resultados incongruentes, diferentes daqueles previstos, principalmente no que se refere ao grupo Pinçamento Vertebral em relação ao grupo Divulsão. Estes resultados apresentaram significância estatística: ($X^2 = 33$, $gl=6$ $p<0,001$ para o tempo de 2 horas e $X^2 = 25,32$, $gl=6$, para o tempo de 24 horas, $p<0.001$).

No Quadro 3, os valores dos escores atribuídos segundo a Escala de Bohlman mostram que os animais dos grupos Anestesia, Secção total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), Hemissecção e Pinçamento Vertebral, apresentaram uma distribuição de frequência bastante homogênea, com a maioria dos animais do grupo, recebendo um escore final semelhante (com exceção de um animal do grupo Secção Total Precedida da aplicação de Xilocaína). Tal resultado sugere homogeneidade dos procedimentos, do efeito dos mesmos sobre o comportamento dos animais e portanto,

homogeneidade da lesão.

Porém, tal homogeneidade não foi observada nos demais grupos; por exemplo, no grupo Laminectomia, 2 horas após os procedimentos, 8 dos 12 animais do grupo receberam escore 5; por sua vez, 3 animais receberam escore 1 e 1 animal recebeu escore 4. Na análise 24 horas após os procedimentos, 6 dos 12 animais receberam escore 5, 5 animais receberam escore 4 e 1 animal recebeu escore 1. Para o grupo Divulsionamento (N=9), 2 horas após os procedimentos, 8 animais apresentaram escore 5; contudo 24 horas após os procedimentos, 6 animais apresentaram escore 5 enquanto que 3 animais apresentaram escore 3. Portanto, as observações dos grupos Laminectomia e Divulsionamento através da Escala de Avaliação Motora de Bohlman, sugerem que o efeito do procedimento foi modificado em função do tempo.

Novamente os escores resultantes da avaliação dos animais mostrou incongruência entre o procedimento ao qual os animais foram submetidos, no que se refere ao grupo Divulsionamento e ao grupo Pinçamento Vertebral

Na Figura 11 estão apresentados todos os valores médios computados relacionados à Escala de Bohlman. Os animais dos grupos Anestesia e Pinçamento Vertebral receberam escore 5, o que indicou normalidade das funções analisadas. Os animais dos grupos Divulsionamento e Laminectomia apresentaram perdas motoras parciais, e os animais dos grupos Seção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína) e Hemissecção, apresentaram perdas motoras totais, sendo que os animais alcançaram os escores mais baixos na Escala de Avaliação Motora de Bohlman ($X^2=21,46$; $p=0,005$ para o tempo 2 horas e $X^2 = 22,28$; $p=0,001$ para o tempo de 24 horas; $p< 0,001$).

Quadro 3: Resultados dos diferentes grupos experimentais por meio da Escala de Avaliação motora de Bohlman, 2 e 24 horas após a realização dos procedimentos.

		ESCORES						Porcentagem de animais sem alterações funcionais
	Tempo a pós procedimento	0	1	2	3	4	5	
Grupo Anestesia (N= 4)	2 horas	0	0	0	0	0	4	100
	24 horas	0	0	0	0	0	4	100
Grupo Divulsionamento (N= 9)	2 horas	0	0	0	1	0	8	88.9
	24 horas	3	0	0	0	0	6	66.6
Grupo Laminectomia (N= 12)	2 horas	0	3	0	0	1	8	66.6
	24 horas	0	1	0	0	5	6	50
								Porcentagem de animais com alterações funcionais severas
Grupo Secção Total (N= 16)	2 horas	16	0	0	0	0	0	100
	24 horas	16	0	0	0	0	0	100
Grupo Secção Total Precedida da Aplicação de Xilocaína (N= 8)	2 horas	8	0	0	0	0	0	100
	24 horas	7	1	0	0	0	0	87.5
Grupo Hemissecção Direita (N= 4)	2 horas	4	0	0	0	0	0	100
	24 horas	4	0	0	0	0	0	100
Grupo Pinçamento Vertebral (N= 4)	2 horas	0	0	0	0	0	4	0
	24 horas	0	0	0	0	0	4	0

0 – Paraplegia; 1 – Pequenos movimentos articulares das patas traseiras; 2 – Grandes movimentos articulares das patas traseiras; 3 – Animal pode permanecer em pé, com apoio das 4 patas sobre uma superfície plana; 4 – Animal era capaz de caminhar sobre uma superfície plana.; 5 – Animal era capaz de caminhar no plano inclinado à 30°. ($X^2 = 21,46$; $p=0,005$ para o tempo 2 horas e $X^2 = 22,28$; $p=0,001$ para o tempo de 24 horas; $p < 0,001$).

Fig. 11 – Análise dos animais pela Escala de Avaliação Motora de Bohlman. Histograma ilustrando a avaliação dos diferentes grupos experimentais por meio da Escala de Avaliação Motora de Bohlman, 2 e 24 horas após a realização dos procedimentos.

3.2.3 – Teste do Campo Aberto

O Teste do Campo Aberto consistiu na observação de alguns comportamentos dos animais, realizados num período de 5 minutos: Análise Quantitativa da Marcha, Exploração do Plano Vertical, comportamento Auto Limpeza e contagem do número Bolos Fecais, 2 e 24 horas após os procedimentos, cujos resultados estão ilustrados no Quadro 4.

A Análise Quantitativa da Marcha foi utilizada para avaliação da capacidade de o animal locomover-se, e seus resultados estão apresentados na Figura 12. Todos os grupos experimentais apresentaram tendência à redução do número de quadrantes percorridos em relação aos grupos submetidos à Anestesia e ao Divulsionamento, tanto na avaliação de 2 horas quanto na de 24 horas após os procedimentos. Esta diminuição foi estatisticamente significativa (ANOVA, ($F_{6,26}=6,68$; $p<0,001$, para o tempo de 2

horas e $F_{6,26}=13,21$; $p<0,001$, para o tempo de 24 horas) para os grupos Laminectomia, Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), Hemissecção e Pinçamento Vertebral em relação aos grupos Anestesia e Divulsionamento.

Nos testes realizados 2 horas após os procedimentos, foi observada uma diminuição do número de quadrantes percorridos pelos animais dos grupos Laminectomia, Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), Hemissecção, Pinçamento Vertebral, em relação aos grupos Anestesia e Divulsionamento.

Nos testes realizados 24 horas após a lesão, os grupos Anestesia e Divulsionamento percorreram um maior número de quadrantes quando comparados aos grupos Laminectomia, Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), Hemissecção e Pinçamento Vertebral. O grupo Anestesia mostrou-se ainda diferente estatisticamente do grupo Divulsionamento, apresentando maior número de quadrantes percorridos.

O comportamento Auto Limpeza avaliou a quantidade de vezes em que o animal friccionou as patas dianteiras no focinho, na tentativa de limpar-se. Os resultados estão apresentados na Figura 13. A análise estatística mostrou que houve um efeito estaticamente significativo do procedimento nos animais, quando comparados entre si ($F_{6,26}= 5,47$ $P=0,001$); esta variação não foi significativa na avaliação em relação ao tempo após o procedimento ($F_{6,26}=1,07$; $p=0,31$) e não houve interação entre o procedimento realizado e o tempo transcorrido para a sua avaliação ($F_{6,26}=1,74$; $p=0,15$).

Quadro 4: Resultados dos diferentes grupos experimentais (com média e erro padrão da média) por meio do Teste do Campo Aberto, 2 e 24 horas após os procedimentos

Grupos	Tempo após os procedimentos (horas)	Média / Erro padrão da média	Análise quantitativa da marcha	Exploração no plano vertical	Auto limpeza	Bolos fecais
Anestesia (n=4)	2	Média	32,75	15	7,75	1,5
		Erro padrão da média	3,19	1,41	1,49	0,28
	24	Média	33,75	6,25	12	1,75
		Erro padrão da média	1,37	3,09	1,73	0,62
Divulsionamento (n=9)	2	Média	23,77	5,11	8,66	1,22
		Erro padrão da média	11,27	4,13	6,74	1,71
	24	Média	22,66	5,22	7,77	1,55
		Erro padrão da média	9,26	4,20	5,80	1,33
Laminectomia (n=12)	2	Média	10,16	4,91	3,41	1
		Erro padrão da média	11,79	5,94	3,75	1,59
	24	Média	8,58	1	3,5	0,41
		Erro padrão da média	8,51	1,47	2,77	0,66
Secção total (n=16)	2	Média	6,25	0,25	2,56	0,06
		Erro padrão da média	4,04	0,77	3,50	0,25
	24	Média	4,93	0,18	1,18	0,12
		Erro padrão da média	4,53	0,75	1,37	0,5
Secção total (precedida xilocaína) (n=8)	2	Média	8	0	3,25	0,375
		Erro padrão da média	8,24	0	3,05	0,74
	24	Média	6	0,125	1,625	0,375
		Erro padrão da média	4,53	0,35	0,91	0,74
Hemissecção. (n=4)	2	Média	5,25	2	5,75	0,75
		Erro padrão da média	2,98	2,16	2,06	0,95
	24	Média	7,75	1,25	2,75	0,25
		Erro padrão da média	2,87	0,95	0,95	0,5
Pinçamento. Vertebral (n=4)	2	Média	14,5	1,75	3,25	0,75
		Erro padrão da média	1,91	1,70	2,21	1,5
	24	Média	14,25	0	4,25	1,25
		Erro padrão da média	1,70	0	0,95	1,89

Análise quantitativa da marcha

Fig. 12 – Análise Quantitativa da Marcha. Histograma ilustrando o resultado da Análise quantitativa da Marcha após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da média de escores de cada grupo experimental de animais. (+) indica que o grupo é diferente do grupo Anestesia; (o) indica que o grupo é diferente do grupo Divulsionamento.

Ainda referente ao comportamento Auto Limpeza, a comparação entre os grupos mostrou uma diferença estatisticamente significativa do tratamento ($F_{6,26}=5,47$; $p<0,001$) sendo que os grupos Anestesia e Divulsionamento apresentaram-se significativamente diferentes dos grupos Laminectomia, Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína) e Hemissecção, os quais apresentaram maior perda na capacidade de realizar a Auto Limpeza.

Nos testes realizados 2 horas após o procedimento, foi observada uma diminuição na capacidade de realização da Auto Limpeza apenas nos animais dos grupos Laminectomia, Secção Total, (precedida ou não da aplicação de Xilocaína) e Pinçamento Vertebral ($F_{6,26}=3,24$; $p=0,005$), quando comparados com grupo Divulsionamento. Nos testes realizados 24 horas após os procedimentos, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($F_{6,26}=5,83$; $p<0,001$), para os grupos Anestesia e Divulsionamento quando comparados aos grupos Laminectomia, Secção

Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), Hemissecção e Pinçamento Vertebral, que apresentaram maior perda na capacidade de realizar a Auto Limpeza.

Estes resultados com relação ao comportamento Auto Limpeza também mostraram-se de acordo com a intensidade da lesão sofrida pelos animais. A diferença observada entre o comportamento, 2 e 24 horas após os procedimentos, poderia, nos animais do grupo Anestesia estar relacionada à sensibilidade dos animais ao agente anestésico. Porém, tal diferença não foi observada para os demais grupos, os quais inclusive apresentaram uma piora no quadro analisado.

O comportamento Exploração no Plano Vertical analisou a capacidade de o animal manter-se com apoio apenas nas patas traseiras, um exemplo de comportamento exploratório, após os diferentes procedimentos realizados, e seus resultados estão ilustrados na Figura 14.

O procedimento (lesão) apresentou efeito nos animais, independente do tempo ($F_{6,26}=10,93$ $p<0,001$). O resultado dos animais que sofreram Secção Total, (precedida ou não da aplicação prévia de Xilocaína) e Pinçamento Vertebral foram estatisticamente diferentes dos grupos de animais que sofreram Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia. Além disso, os animais dos grupos Anestesia e Divulsionamento apresentaram resultados ainda estatisticamente diferentes dos animais dos grupos Laminectomia e Hemissecção.

Quando foram analisadas as medidas em função do tempo 2 e 24 horas, observou-se uma variação significativa entre as mesmas ($F_{6,26}=9,32$, $p=0,001$), demonstrando que houve interação entre o procedimento realizado e o tempo transcorrido para a sua realização. Na Figura 13 pode ser observado que o número de Explorações dos animais foi menor para a medida realizada 24 horas após o procedimentos realizados, e o tempo transcorrido para a sua avaliação.

Fig. 13 – Auto limpeza. Histograma ilustrando o resultado do comportamento Auto Limpeza Auto Limpeza após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da média de escores de cada grupo experimental e animais.(+)indica que o grupo é diferente do grupo Anestesia; (o)indica que o grupo é diferente do grupo Divulsionamento.

Nos testes realizados para avaliar a exploração no plano vertical 2 horas após o procedimento, diferença estatisticamente significativa ($F_{6,26} = 9,32$; $p < 0,001$) foi observada na comparação dos grupos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia em relação aos grupos Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), Hemissecção e Pinçamento Vertebral. Os animais dos grupos Laminectomia e Divulsionamento apresentaram ainda perda significativa da capacidade de realizar o comportamento quando comparados ao grupo Anestesia.

Nos testes feitos 24 horas após os procedimentos, foi observada diferença estatisticamente significativa ($F_{6,26} = 5,66$ $p = 0,001$) nos animais dos grupos Anestesia e Divulsionamento, quando comparados aos animais dos demais grupos. Observou-se

ainda para a avaliação tardia de 24 horas uma diminuição da capacidade de realizar Exploração vertical pelos animais dos grupos Laminectomia, Anestesia, Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), Hemissecção e Pinçamento Vertebral.

Fig. 14 – Exploração no plano vertical. Histograma ilustrando o resultado do comportamento Auto Limpeza após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da média de escores de cada grupo experimental de animais. (+) indica que o grupo é diferente do grupo Anestesia; (*) indica que o grupo é diferente dos grupos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia; (o) indica que o grupo é diferente do grupo Divulsionamento.

Quadro 5: Resultados dos diferentes grupos experimentais (com média e erro padrão da média) por meio do testes sensitivos funcionais, 2 e 24 horas após os procedimentos

	Tempo após os procedimentos (horas)	Média / Erro padrão da média	Teste de Retirada da Cauda	Teste da Placa Quente	Teste do Pinçamento da Pata Direita	Teste do Pinçamento da Pata Esquerda
Anestesia (N=4)	2	Média	3,07	10,25	5,62	4,25
		Erro padrão da média	0,15	3,30	1,43	1,25
	24	Média	2,37	13,25	5,75	4,37
		Erro padrão da média	0,28	3,5	1,25	2,49
Divulsionamento. (N=9)	2	Média	3,25	14,77	7,44	7,38
		Erro padrão da média	0,97	5,30	4,24	4,70
	24	Média	2,76	13,77	5,94	5,55
		Erro padrão da média	0,57	5,91	2,22	3,05
Laminectomia (N=12)	2	Média	4,08	16,58	15,62	10
		Erro padrão da média	1,07	5,59	9,22	8,02
	24	Média	3,32	19,5	13,91	9,20
		Erro padrão da média	0,82	1	9,95	6,10
Secção Total (N=16)	2	Média	4,51	19,56	23,68	23,37
		Erro padrão da média	1,72	1,75	1,25	5,52
	24	Média	3,66	20	23,81	23,96
		Erro padrão da média	1,66	0	4,75	4,12
Secção Total (precedida da aplicação de xilocaína) (N=8)	2	Média	5,56	20	25	25
		Erro padrão da média	1,23	0	0	0
	24	Média	5,17	20	25	25
		Erro padrão da média	1,53	0	0	0
Hemissecção. (N=4)	2	Média	4,45	16,75	21,62	11
		Erro padrão da média	2,04	6,5	5,79	10,45
	24	Média	3,97	20	13,25	8
		Erro padrão da média	1,44	0	10,90	1,154
Pinçamento vertebral. (N=4)	2	Média	4,02	20	10	6,75
		Erro padrão da média	0,33	0	2,30	1,5
	24	Média	3,6	20	6,12	5,62
		Erro padrão da média	1,36	0	2,46	1,97

Para avaliação da motilidade intestinal, que é um indicativo da integridade do controle do sistema nervoso autônomo, foi realizada a contagem dos bolos fecais eliminados pelo animal, durante sua permanência no campo aberto, pelo tempo de 5 minutos, e os resultados estão apresentados na Figura 15. O gráfico e a análise estatística mostram que não houve variação significativa entre os diferentes grupos, em relação aos diferentes procedimentos e de avaliação realizados ($F_{6,26} = 1,3$; $p=0,29$), quanto ao tempo de avaliação ($F_{6,26}=0,06$; $p=0,80$), ou interação dos diferentes procedimentos em relação ao tempo de realização do teste ($F_{6,26} = 1,96$; $p=0,11$).

Fig. 15 – Número de Bolos fecais. Histograma ilustrando o resultado do comportamento Bolos Fecais após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da média de escores de cada grupo experimental de animais. (+)indica que o grupo é diferente do grupo Anestesia.

3.3- Avaliação sensitiva e funcional.

Os testes sensitivos e funcionais foram realizados por meio do exame da função reflexa, dentre eles, arco-reflexo medular, utilizando os testes da Retirada da Cauda, Placa Quente e Pinçamento das Patas direita e esquerda.

3.3.1- Teste da Retirada da Cauda

O Teste da Retirada da Cauda analisou a resposta de sensibilidade térmica da cauda dos animais, como avaliação do arco-reflexo medular, após os diferentes procedimentos descritos. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

Houve um efeito do procedimento estatisticamente significativo quando comparamos os grupos entre si, independente do tempo dos procedimentos ($F_{6,26}=9,8$ $P<0,001$). Não houve variação geral estatisticamente significativa entre as medidas realizadas 2 e 24 horas após os procedimentos, embora houvesse indicação de tendência para tal ($F_{6,26}=3,48$; $p=0,073$). Não houve interação estatisticamente significativa entre o tipo de lesão e o tempo de medida ($F_{6,26}=0,23$ $p<0,96$).

A análise de cada tempo mostrou que, após 2 horas, o grupo Secção Total da Medula Espinhal (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), apresentou um tempo de latência para retirada da cauda maior que os grupos Anestesia, Divulsionamento, Laminectomia e Pinçamento Vertebral. O grupo Secção Total (precedida de Xilocaína) local foi ainda diferente do grupo Hemissecção ($F_{6,26}=7,32$ $p<0,001$).

Para o tempo de 24 horas, os grupos que sofreram Secção Total da Medula Espinhal apresentaram tempo de latência maior em relação aos demais grupos, de forma semelhante ao ocorrido no tempo de 2 horas ($F_{6,26}=6,32$ $p<0,001$). O grupo que sofreu Hemissecção da medula também apresentou tempo de retirada da cauda diferente do grupo Anestesia.

Portanto, o Teste da Retirada de Cauda analisou e detectou nos animais dos grupos Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína) e Hemissecção uma diminuição na capacidade de resposta ao estímulo térmico aplicado.

Fig. 16 – Gráfico do teste da retirada de cauda. Histograma ilustrando o resultado do teste da Retirada de Cauda após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da medida dos escores de cada grupo experimental. (*) indica que o grupo é diferente dos grupos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia; (+) indica que o grupo é diferente do grupo Anestesia; (o) indica que o grupo é diferente do grupo Divulsionamento.

3.3.2- Teste da Placa Quente

O Teste da Placa quente nos forneceu informações quanto à integridade dos reflexos medulares em integração com funções cerebrais. Os resultados são apresentados na Figura 17.

A análise estatística mostrou efeito significativo dos diferentes procedimentos ($F_{6,26}=7,38$; $P<0,001$). Não houve efeito do tempo sobre os procedimentos realizados ($F_{6,26}=1,88$; $p=0,18$) ou de interação entre o tipo de lesão e o tempo transcorrido para análise ($F_{6,26}=2,20$; $p=0,075$).

Uma análise em cada um dos tempos mostrou que, após 2 horas, apenas os grupos que sofreram Secção Total e Pinçamento Vertebral foram diferentes dos grupos

Anestesia e Divulsionamento ($F_{6,26}=2,68; p<0,005$). Nesse momento, o grupo Secção Total Precedido da Aplicação de Xilocaína também foi diferente do grupo Anestesia.

No entanto, 24 horas após a Secção Total da Medula, todos os grupos foram diferentes dos grupos Anestesia e Divulsionamento ($F_{6,26}= 23,76; p<0,001$). Portanto, o Teste da Placa Quente detectou deficiências na função em todos os grupos experimentais quando comparados aos grupos Anestesia e Divulsionamento.

Teste da Placa Quente

Fig. 17 – Gráfico do teste da Placa Quente. Histograma ilustrando o resultado do teste da Placa Quente após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da medida dos escores de cada grupo experimental. (+) indica que o grupo é diferente do grupo Anestesia; (o) indica que o grupo é diferente do grupo Divulsionamento.

3.3.3- Teste do Pinçamento de Pata

O teste do Pinçamento da Pata foi realizado para analisar a resposta de sensibilidade dolorosa frente a um estímulo de pressão progressiva, aplicado no 3º espaço interdigital da pata direita e esquerda dos animais, após os diferentes

procedimentos. Os resultados estão apresentados na Figura 18 para a pata esquerda e na Figura 19 para a pata direita.

O gráfico do pinçamento da pata esquerda, pata contralateral ao lado da hemissecção da medula, mostrou um efeito significativo estatisticamente do procedimento dos animais dos grupos Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína), quando comparado aos grupos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia ($F_{6,26} = 3,45$ $p=0,005$), onde os primeiros apresentaram um tempo maior de resposta ao estímulo doloroso aplicado. Não houve variação geral em função do tempo (2 e 24 horas), após os procedimentos ($F_{6,26}=0,79$ $P=0,38$), assim como não houve interação entre o tipo de lesão em função do tempo ($F_{6,26}= 0,64$ $P=0,69$).

Quando foram analisadas as medidas em função do tempo 2 e 24 horas, não houve variação significativa ($F_{6,26}=1,05$; $p=0,012$) demonstrando que não houve interação entre o fator analisado e o tempo transcorrido para a sua avaliação.

Fig. 18 Gráfico do teste do pinçamento da pata esquerda. Histograma ilustrando o resultado do teste do Pinçamento da Pata Esquerda após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da medida dos escores de cada grupo experimental. . (*) indica que o grupo é diferente dos grupos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia.

No Teste Pinçamento da Pata Direita, lado ipsilateral à lesão medular foi observada uma diferença significativa estatisticamente ($F_{6,26}=14,49$ $p<0,001$) entre os animais dos grupos Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína) e Hemissecção quando comparados aos demais grupos. Houve variação entre as medidas realizadas 2 e 24 horas após os diferentes procedimentos ($F_{6,26}=5,48$, $p=0,027$); entretanto não houve interação entre lesão e tempo ($F_{6,26}= 2,11$, $p=0,086$).

Nos testes feitos 2 horas após os procedimentos foi observado aumento no tempo de resposta ($F=14,43$ $p<0,001$) entre nos grupos Secção Total (precedida ou não pela aplicação prévia de Xilocaína) e Hemissecção, quando comparados aos grupos Anestesia, Divulsionamento e Pinçamento Vertebral.

Para o tempo 24 horas após os procedimentos, somente os grupos Secção Total (precedida ou não da aplicação de Xilocaína) com ($F=9,97$ $p<0,001$), apresentaram um tempo maior de resposta ao estímulo quando comparados aos demais grupos.

Teste do pinçamento da pata direita

Fig. 19 – Gráfico do teste do Pinçamento da Pata Direita. Histograma ilustrando o resultado do teste do Pinçamento da Pata Direita após os diferentes procedimentos realizados. Os resultados são expressos por meio da medida dos escores de cada grupo experimental. (*) indica que o grupo é diferente dos grupos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia.

3.4 - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Para avaliação histológica os animais foram perfundidos, conforme descrito em Métodos, 24 após realização dos procedimentos experimentais. Uma perfusão de sucesso pode ser reconhecida pela reação do fixador com as proteínas das células, causando fibrilações musculares no início da aplicação do PFA, situação esta bem característica nas extremidades dos membros anteriores e posteriores. Ao término da perfusão, o animal deve apresentar-se relativamente rígido, o que facilita o trabalho de retirada do segmento medular desejado para a análise histológica.

As características celulares das camadas neuronais da medula espinhal dos animais ao nível da transição tóraco-lombar, após os diferentes procedimentos, estão apresentados nas figuras 20 a 24. As colorações utilizadas para caracterização da medula espinhal foram a reação de Nissl (Figura 20 e 21), Hematoxilina-Eosina ou HE (Figura 22 A e 23) e Glees (Figura 22 B e 24). Todos os grupos de animais foram analisados, nas três colorações (resultados não apresentados).

A coloração de Nissl (Figura 20 e 21) nos permitiu verificar a integridade dos neurônios: corpo celular bem definido corado em azul intenso, podendo-se identificar o citoplasma, o núcleo e o nucléolo. Nesta coloração os efeitos da lesão são manifestados por modificações no volume ocupado pelo corpo celular e a não identificação de componentes subcelulares como o núcleo e o nucléolo.

A hematoxilina é um corante básico que cora em azul os núcleos celulares e outras estruturas de natureza ácida, como regiões do citoplasma ricas em DNA/RNA. A eosina cora o citoplasma e o colágeno em diversas tonalidades de vermelho. Na coloração de HE (Figura 22 A e 23), os neurônios e células da glia normais aparecem com uma coloração rosa-azulada no citoplasma e nucléolo; o núcleo se mostra com uma coloração rosa claro. Contudo através desta coloração neurônios e células da glia que provavelmente foram lesados aparecem com uma coloração geral avermelhada e não se podem distinguir as estruturas subcelulares.

A coloração de Glees (Figura 22 B e 23) se baseia na observação de que, se embebermos tecidos com uma solução diluída de nitrato de prata, este se combina em maiores proporções com alguns ingredientes do tecido do que com outros. Quando os tecidos submetidos a esse tratamento são expostos à luz, a prata se reduz e torna-se escura. Consequentemente, evidenciam-se bem aqueles componentes do tecido que se

combinaram com a prata. A coloração de Gleees (Figura 22 B e 24) é um método de impregnação de prata para as células da glia. As células da glia aparecem marcadas em coloração marrom-brilhante, com os prolongamentos bem definidos, enquanto que os neurônios não apresentam nenhuma estrutura subcelular corada e apresenta-se com cor marrom-amarelada.

Nos grupos controle, Anestesia e Divulsionamento, a maioria dos animais apresentou células com características normais, neurônios intactos e bem preservados, ao nível do corno dorsal e ventral da medula espinhal, o que está de acordo com as observações dos testes de comportamento. Estas características foram observada para as três colorações. (Figura 20 a 24).

No grupo Laminectomia foram observados poucos neurônios sensitivos e motores apresentando características de possível lesão, tanto quando observamos as colorações de Níssl como Hematoxilina-eosina; na coloração de Gleees, não foi observada diferença em relação aos grupos Anestesia e Divulsionamento.

Para o grupo Hemisseção observou-se a presença de neurônios com aparência de lesão no lado correspondente à secção medular, tanto para a coloração de Níssl quanto para Hematoxilina-Eosina. Alguns neurônios, com aparência avermelhada foram observados na coloração de Hematoxilina-Eosina, sendo forte indicação de lesão. Na coloração de Gleees não foi observada diferença em relação aos grupos Anestesia e Divulsionamento.

O grupo Pinçamento Vertebral apresentou dilaceramento da substância cinzenta, na porção motora e na porção sensitiva da medula espinhal. Pudemos observar uma leve desorganização da substância cinzenta, também através da coloração de Gleees. Neste procedimento pudemos observar a presença de sangramento ao redor do canal central, nas três colorações realizadas.

A Secção Total apresentou um número mais intenso de neurônios indicando possível lesão, tanto os motores quanto os sensitivos, tanto na coloração de Níssl quanto na de HE. Neste procedimento pudemos observar a presença de sangramento ao redor do canal central, nas 3 colorações.

Fig. 20 - Segmentos medulares de ratos ao nível tóraco lombar, corados pela reação de Nissl, mostrando neurônios da medula espinhal, após Anestesia (A) e Laminectomia (B). Aumento de 25 X.

Fig. 21 - Segmentos Medulares de ratos ao nível tóraco lombar, corados pela reação de Nissl, mostrando neurônios da Medula Espinhal, após Divulsionamento (A- aumento de 100 x), Secção Total (B- aumento de 100 x e C aumento de 400 x). Observar os neurônios com núcleo e nucléolo evidentes e neurônios lesados apresentando retração do citoplasma e desaparecimento do nucléolo ou núcleo.

Fig. 22 – Segmentos medulares de ratos ao nível tóraco lombar, corados pela Hematoxilina Eosina (A) e Glee's (B), após Anestesia. Aumento de 25 x.

Fig. 23 – Segmentos medulares de rato ao nível tóraco lombar, corados pela Hematoxilina-Eosina, mostrando Neurônios da Medula Espinhal após Divulsionamento (A- 100 x de aumento) e Secção Total da Medula Espinhal (B- 100 x de aumento) e C (400 x de aumento). Observar a presença de mudança de coloração do citoplasma de neurônios lesados (B) e o sangramento no canal central.

Fig. 24 – Segmentos medulares de rato ao nível tóraco lombar, corados pelo Gless, mostrando neurônios da Medula Espinhal após Divulsionamento (A- 100 x de aumento) e Secção Total da Medula Espinhal (B- 100 x de aumento) e C (400 x de aumento). Observar a marcação das células da glia, os neurônios em marron-dourado. Observar o arcabouço que formam as células gliais, na substância branca (A). Observar hemorragia em torno do canal central.

4 – DISCUSSÃO

Nos mamíferos, entre todos os tipos de lesão que podem ocorrer nos tecidos, aquelas que teriam reparo mais difícil seriam as lesões do tecido nervoso, principalmente as do SNC (cérebro e medula espinhal). Até aproximadamente 20 anos atrás nada essencialmente poderia ser feito para recuperação de lesões do SNC e as pesquisas não forneciam muitas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficientes. Entretanto, a injeção intravenosa de altas doses de metilprednisolona resultando em melhora neurológica significativa em pacientes (BRAKEN *et al.*, 1990) foi a primeira terapia que resultou em neuroproteção para o sistema nervoso, introduzindo o conceito de terapia para neuroproteção.

Atualmente, os resultados experimentais demonstram a validade da procura de diferentes modelos de lesão medular, de diferentes testes da avaliação sensitiva e motora, para aplicação na análise das conseqüências assim como da recuperação do traumatismo raquimedular, buscando o entendimento dos processos moleculares que sublinham as reações após o trauma raquimedular.

Este estudo faz parte de um projeto envolvendo área básica e clínica para implantar o estudo do trauma raquimedular em Ribeirão Preto. Iniciou-se com a dissertação de BORGES (1999), na qual foram estudados os modelos do trauma raquimedular produzido por contusão por queda de peso e esmagamento da medula espinhal. Foi analisado o comportamento dos animais logo após o trauma (fase aguda), assim como a reação celular local e em sítios distantes. O objetivo do presente trabalho foi o estudo de modelos experimentais utilizados para a produção de lesão medular, com enfoque na avaliação da função motora, sensitiva e histológica. Nosso objetivo específico foi selecionar um dos modelos de lesão medular experimental, estudados conhecendo-se sua reprodutibilidade, após a determinação de parâmetros sensoriais,

motores e histológicos, para realização de estudos futuros pelo grupo. Para isso utilizamos modelos de trauma raquimedular que pudessem produzir lesões de conseqüências sensório-motoras variadas: os modelos de Secção Total da Medula Espinhal (precedida ou não pela aplicação local de Xilocaína), o modelo de Hemissecção Direita e o modelo de Pinçamento Vertebral. Os grupos controle realizados foram os grupos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia. O local da medula espinhal determinado para lesão/controle foi entre os segmentos T₁₀-L₁ e o animal de escolha foi o rato.

Na análise dos efeitos e conseqüências do traumatismo raquimedular sobre a locomoção utilizamos a escala de Avaliação Motora das Patas traseiras e a Escala de Avaliação Motora de Bohlman.

Ambas as escalas detectaram mudanças nos escores, com significância estatística, nos grupos Secção Total da Medula Espinhal (precedida ou não pela aplicação de Xilocaína), na Hemissecção e na Laminectomia; os grupos Pinçamento Vertebral e Divulsionamento não apresentaram diferenças quando comparados com o grupo de animais anestesiados, embora tenham sido observadas alterações nos escores dos animais. O grupo Laminectomia não apresentou diferenças significativas estatisticamente em ambas as escalas, embora tenha havido alterações nos escores dos animais.

A observação dos resultados com relação à capacidade de os animais caminharem no Plano Inclinado, um dos fatores analisados para atribuição do escore de avaliação da Escala de Bohlman, mostra que o grupo experimental Laminectomia apresentou deficiências motoras significantes estatisticamente. Nos animais do grupo Pinçamento Vertebral, os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental que o grupo divulsionamento da camada muscular, não foram observadas deficiências.

Tais discrepâncias indicam deficiências na capacidade de discriminação nestes testes de avaliação motora. Este resultado, interpretado através das Escalas de Avaliação Motora, nos sugere que o procedimento experimental para realização da Laminectomia dos animais foi mais lesivo que o próprio Pinçamento Vertebral. Resultados semelhantes foram descritos no trabalho de BORGES (1999), através de testes de comportamento e da análise imunocitoquímica da expressão do gene de resposta

imediate Fos. A expressão da proteína Fos é utilizada em pesquisa para indicação de atividade neural aumentada; os resultados de Borges demonstram que nos animais experimentais após laminectomia, pode ocorrer modificação da atividade neural em regiões específicas da medula espinhal, principalmente próximos ao sítio da lesão, indicador de possível efeito lesivo do próprio procedimento experimental.

A Escala de avaliação motora de Bohlman sugeriu diferenças entre os resultados obtidos nos tempos 2 horas ou 24 horas após o procedimento para os grupos experimentais Divulsionamento e Laminectomia, enquanto que a avaliação da motricidade das patas traseiras não apresentou modificações. Embora estes resultados não apresentassem significância estatística, esta mudança no comportamento experimental não poderá ser explicada pelo término do efeito do anestésico, que foi utilizado em todos os procedimentos; poderá ser entendida como sensibilidade do método de avaliação em detectar deficiências funcionais.

A Escala de avaliação motora de Bohlman portanto, mostrou resultados incongruentes para os grupos experimentais Divulsionamento e laminectomia, em relação ao grupo que foi submetido ao Pinçamento Vertebral, principalmente na análise 24 horas após a contusão.

Diversos autores desenvolveram testes para medida de funções locomotora após o trauma raquimedular (TARLOV & KLINGER, 1954; GALE *et al.*, 1985; BRESNAHAM *et al.*, 1987), com o objetivo de detecção da integridade das funções do sistema nervoso. A maioria destes utiliza a descrição qualitativa da caminhada; não existe até hoje um consenso sobre qual método seria o melhor para descrever a recuperação funcional.

A Análise Quantitativa da Marcha em nosso estudo mostrou resultados bastante coerentes com relação a intensidade da lesão sofrida pelos animais.

Os métodos de avaliação ideais seriam de fácil utilização, sensíveis à pequenas modificações de comportamento, porém relevantes como indicador de recuperação e ainda, com a capacidade de fornecer rapidamente índices de atividade funcional motora em um número grande de animais. A sensibilidade de detecção de testes elaborados torna-os mais adequados para estudos detalhados de mecanismos de recuperação funcional, mas geralmente estes testes mostram-se pouco práticos. Por outro lado, os testes que fornecem informação qualitativa, como as escalas de avaliação motora

utilizadas, embora geralmente apresentam sensibilidade limitada devido ao seu embasamento em observações subjetivas, são mais simples de serem utilizados.

Até bem pouco tempo, os métodos mais próximos ao “método ideal” eram as escalas de avaliação motora, qualitativas ou semiquantitativas, baseadas naquela descrita por Tarlov, com as modificações de diversos autores (BRESNAHAM *et al.*, 1987). Estas escalas ainda apresentavam falhas na correlação entre lesão funcional e o prejuízo histológico.

Recentemente uma Escala de avaliação locomotora baseada no Teste do Campo Aberto foi descrita por BASSO, *et al.* (1995) e tem sido largamente utilizada na avaliação de recuperação de lesões da medula espinhal de intensidade moderada e média. A escala BBB compreende um sistema de 21 pontos baseados em comportamentos definidos operacionalmente que seguem uma progressão de recuperação da paralisia completa até a locomoção normal. Embora seja complexa, foi demonstrado que sua uniformidade na avaliação permanece mesmo que vários examinadores observem o animal (BASSO *et al.*, 1995); também pode ser adequadamente aplicada para avaliação de lesões de moderada à graves. Esta escala ainda apresenta uma alta correlação entre o resultante prejuízo anatômico e a descrição física da lesão.

As escalas de avaliação motora utilizadas neste estudo nos forneceram resultados qualitativos e, através de valores medianos, pudemos trabalhar com resultados semi-quantitativos. Ambas as Escalas detectaram deficiências significativas estatisticamente somente nos modelos experimentais que foram submetidos ao trauma raquimedular grave, não apresentando sensibilidade para a detecção de deficiências em lesões moderadas e leves, embora mostrassem mudanças nos escores. Estes resultados são coerentes com os resultados da literatura, porém, as discrepâncias nos indicam novamente a necessidade de procura de outros métodos de avaliação locomotora, quantitativos e mais sensíveis. Neste sentido o nosso grupo já está implantando a escala de avaliação locomotora BBB para estudo de animais lesados em nosso meio.

O Teste do Campo Aberto, no aspecto Análise Quantitativa da Marcha, mostrou que a atividade locomotora dos animais em superfície plana estava diminuída nos animais que sofreram Hemisseção, Secção Total (precedida ou não pela aplicação prévia de Xilocaína), Pinçamento Vertebral e Laminectomia; não foram detectadas

modificações na locomoção dos animais submetidos à Anestesia e Divulsionamento. Estes resultados foram semelhantes nas medidas realizadas 2 e 24 horas após o procedimento experimental. O comportamento Exploração no Plano_Vertical mostrou-se sensível para distinguir deficiências em todos os grupos experimentais, ressaltando-se em adição, deficiências no grupo Divulsionamento, quando comparados ao grupo que recebeu somente anestesia. Neste comportamento foi observada uma interação da lesão com o tempo, sugerida pela diminuição da emissão deste comportamento para todos os grupos, na medida realizada 24 horas após o tratamento experimental. O comportamento Auto Limpeza apresentou resultados semelhantes aos resultados da Exploração no Plano Vertical, com valores semelhantes nas medidas realizadas 2 e 24 horas após o procedimento experimental, embora sugestivos de piora do quadro. A contagem do número de bolos fecais não se mostrou eficiente para mostrar alterações diferenciais dos procedimentos em nenhum dos grupos experimentais analisados; não consideramos portanto parâmetro relevante de ser medido neste tipo de estudo.

Portanto, o comportamento Exploração no Plano Vertical foi o mais sensível para detectar deficiências sensório-motoras, assim como uma piora da resposta dos animais 24 horas após o procedimento experimental. O Teste do Campo Aberto foi de fácil utilização, sensível à modificações de comportamentos relevantes como índice de recuperação e ainda forneceu rapidamente índices de atividade funcional motora de 50 animais. Este é um teste simples, barato, reproduzível e quantitativo, com sensibilidade para detectar deficiências funcionais em animais que tenham sofrido trauma raquimedular leve, moderado ou grave. A revisão da literatura nos mostra que este é o primeiro trabalho a evidenciar estes resultados de utilização dos comportamentos medidos no Teste do Campo Aberto na análise do trauma raquimedular.

Na análise da integridade da função reflexa, os procedimentos Anestesia, Divulsionamento e Laminectomia, assim como o Pinçamento Vertebral não produziram alterações na resposta dos animais ao Teste de Retirada da Cauda, mostrando que esses animais mantiveram intactas as vias de reflexos medulares. No entanto mostrou que a Secção Total da Medula Espinhal (precedida ou não pela aplicação prévia de Xilocaína) e a Hemissecção, foram efetivas na produção da lesão medular em relação aos demais procedimentos utilizados. O Teste da Placa Quente mostrou-se ainda sensível para avaliarmos a lesão nos animais também após a Laminectomia, sendo mais eficiente na

avaliação das deficiências produzidas nos animais quando comparado ao Teste da Retirada de Cauda. O teste do Pinçamento da Pata apresentou resultados semelhantes ao teste da Retirada de Cauda e adicionalmente, detectou diferença na pata ipsilateral (direita) à lesão.

Portanto, o teste de função reflexa mais sensível à detecção de deficiências sensório-motoras nos animais após trauma raquimedular, entre leve, moderado e grave foi o Teste da Placa Quente, que é um teste simples, barato, reprodutível e quantitativo. O Teste da Pinçamento da Pata pode ser utilizado eficientemente no modelo de hemissecção.

A análise histológica realizada neste estudo por meio das colorações de Nissl, Hematoxilina-Eosina e Glees, foi apenas qualitativa. Contudo, pudemos observar que nos animais dos grupos que sofreram lesão medular grave (Hemissecção, Secção Total precedida ou não o da aplicação de Xilocaína) foi possível detectar modificações celulares. Nos demais grupos de procedimentos experimentais não foi possível visualizar nenhuma modificação celular, embora não fossem observadas modificações do comportamento. Portanto, estas colorações, no tempo de estudo após os procedimentos (24 horas) não detectaram alterações celulares nos animais que sofreram lesão de intensidade leve à moderada. Uma crítica que também pode ser feita à análise histológica realizada é que os cortes dos tecidos deveriam ter sido feitos ao nível do sítio da lesão, mas no sentido longitudinal da medula espinhal. Estes cortes são os recomendados pelo trabalho de BEATIE & BRESNAHAN (1997), e permitem a análise da área central da lesão, da área tecidual atingida, preservada e da área hemorrágica.

A importância dos testes de comportamento como instrumentos para a avaliação dos resultados de lesões medulares experimentais, incluindo melhora funcional em função do tempo e efeito de diferentes tratamentos tem sido confirmada em uma série de trabalhos. A maioria dos testes avalia a performance global do animal e, preferencialmente deve-se utilizar uma combinação de testes, cada um relacionado a componentes funcionais específicos, pois não existe um único tipo de teste capaz de avaliar completa e eficientemente a recuperação das funções motoras ou sensitivas, após lesão medular. Medidas bem definidas e controladas podem significar a identificação de potentes mecanismos de recuperação.

Acredita-se que somente a aplicação de testes de comportamento não seja suficiente para demonstrar se um determinado procedimento foi efetivo na recuperação funcional ou no grau de comprometimento das funções sensitivas e motoras do animal (KUNKEL-BAGDEN *et al.*, 1993). Isto pode ser explicado, segundo GOLDBERGER *et al.* (1990), pois uma deficiência pode perfeitamente ser compensada por funções intactas, dificultando a análise final. Seriam necessárias, também, as análises histológicas da lesão e de sítios adjacentes.

A secção parcial de vias descendentes, através de cirurgia (Hemissecção, Laminectomia) ou de contusão (Esmagamento, Compressão), interrompe as fibras descendentes na medula espinhal torácica, porém algumas fibras descendentes podem permanecer intactas, poupando ao menos parcialmente os circuitos segmentares e os motoneurônios necessários para a locomoção e também permite a volta de algumas das funções locomotoras. Adicionalmente, é conhecida a existência de um padrão central gerador de locomoção, presente na medula espinhal nos segmentos lombo-sacrais, o qual pode ser ativado e treinado para utilização em animais após a secção completa da medula espinhal, produzindo ao menos recuperação parcial da capacidade de locomoção. Entretanto, este tema é controverso entre os autores, sendo que muitos descrevem a não observação de recuperação espontânea em animais com transecção completa, a não ser em animais ainda durante o desenvolvimento (NICHOLLS & SAUNDERS, 1996). Neste sentido, a atividade locomotora tem sido utilizada tradicionalmente para avaliações de lesões da medula espinhal em animais de experimentação.

Os nossos resultados refletem estas informações da literatura: em termos de atividade locomotora, os comportamentos de Exploração Vertical no Campo Aberto e caminhada no Plano inclinado (Escala de Bohlman), foram os testes mais eficientes de detecção de deficiências motoras causadas pelos procedimentos experimentais, seguidos pela Análise Quantitativa da Marcha e a atividade de Auto-Limpeza, superando em acuidade as Escalas de Avaliação Motora utilizadas. O comportamento de Auto-Limpeza embora normalmente emitido pelos animais, é considerado muitas vezes um comportamento anormal, pois não reflete atividade motora, e entretanto, foi um dos comportamentos que mais fielmente refletiu deficiência fisiológica nos animais.

Em termos de integridade da atividade reflexa, o Teste da Placa Quente foi o teste mais eficiente para detecção de deficiências causadas pelos procedimentos experimentais, seguido pelo Teste da Retirada de Cauda. Este teste apresentou sensibilidade semelhante à Análise Quantitativa da Marcha e ao comportamento de Auto Limpeza, superando em acuidade as Escalas de Avaliação Motora utilizadas.

Vários modelos de lesão medular aguda têm sido desenvolvidos, na tentativa de obtenção de dados que reproduzam o modelo experimental o mais próximo possível daquele que ocorre nos humanos (FERNANDEZ *et al.*, 1991). Dados detalhados da patologia da lesão medular em humanos são restritos mas as avaliações dos resultados sugerem que a lesão medular em ratos é similar às lesões da medula espinhal humana (KAKULAS, 1987). Atualmente são diversos os modelos que vem sendo utilizados para o estudo da lesão medular experimental. Porém, o que deve-se pensar nesse aspecto é que o modelo simule as alterações celulares da lesão em humanos, seja de fácil reprodução e o animal utilizado de fácil manipulação. Eles precisam ser confiáveis, consistentes e reprodutíveis de um laboratório para outro. Adicionalmente, existem diferenças importantes entre os modelos de trauma raquimedular, os quais podem ser relacionadas com a biologia dos mecanismos de reparo e recuperação.

Diversos estudos sobre a recuperação e regeneração após trauma raquimedular têm utilizado a secção completa ou parcial da medula espinhal, produzindo lesões reprodutíveis, localizadas, as quais produzem deficiências inequívocas de vias motoras.

A lesão completa na maioria dos casos tem sido utilizada para estudos nos quais pontes de tecido embrionário ou de outros tipos de tecido são construídos, nos quais a destruição completa de todas as vias motoras é necessária, como uma linha de base para subsequente demonstração do efeito de regeneração de fibras ainda que pequeno (XU *et al.*, 1995; CHENG *et al.*, 1996).

A transecção completa da medula espinhal ao nível torácico resulta em paraplegia completa, sem recuperação para conseguir caminhar no plano horizontal. Após a transecção completa da medula espinhal qualquer recuperação da função resultará de reorganização da medula espinhal, como por exemplo a formação de novas conexões pelas fibras aferentes que entram na medula espinhal via raiz dorsal, o que é bastante raro em animais adultos (BASSO *et al.*, 1996; BEHRMANN *et al.*, 1992).

Entretanto, a transecção completa realizada em animais neonatos acarreta pouca interferência no desenvolvimento do padrão locomotor dos animais. NICHOLLS & SAUNDERS (1996) demonstraram o crescimento de axônios através de áreas lesadas da medula espinhal em mamíferos imaturos. Nesses animais o crescimento ocorre de forma rápida, sem a necessidade de anticorpos ou implantes. O problema é que as lesões não ocorrem somente em mamíferos jovens e devemos assim compreender as alterações no adulto para que possamos dar condições ao organismo de restabelecer a função perdida com a lesão. Em diversos casos de lesão da medula espinhal (mesmo em casos de secção total) existe uma pequena população de neurônios que sobrevive. Esses axônios residuais não estão seccionados, porém são incapazes de conduzir o potencial de ação como resultado de uma desmielinização, apresentando condução bloqueada ou diminuída. Adicionalmente, a transecção ou a hemissecção que é realizada após a abertura das meninges poderá produzir diferenças relativas ao número e tipos de células periféricas invasoras.

A aplicação intravenosa e subaracnóide de xilocaína, conforme relatado por HAGHIGHI *et al.* (1987), não altera a geração e condução de estímulos de respostas evocados em animais intactos. Nossos resultados se assemelham aos de HAGHIGHI, nos quais não foram encontradas alterações importantes relacionadas ao uso de xilocaína em lesão medular aguda.

Os resultados observados em nosso estudo refletiram a nossa preocupação ao iniciar o estudo das lesões da medula espinhal, e confirmaram a nossa insegurança na escolha de um modelo adequado para o estudo dessa lesão.

A natureza da lesão da medula espinhal é o ponto de partida de todos os estudos e o início das dúvidas, pois não é possível a reprodução do tipo de lesão que ocorre em humanos e a tentativa da produção desse tipo de lesão tem acarretado a produção de modelos heterogêneos de intensidade de lesão. Esses modelos heterogêneos podem apresentar superposição de seus resultados com grupos controle, dependendo dos critérios utilizados para a sua formação.

A padronização das lesões em estudos experimentais pode ser realizada por meio de lesão aberta, que são produzidas de modo diferente ao que ocorre nas lesões oriundas das fraturas da coluna vertebral, que são as mais freqüentes. As lesões abertas correspondem aos ferimentos produzidos por arma branca, que são raros na prática

clínica.

Apesar da possibilidade de padronização da técnica de produção de lesão, observamos que em alguns tipos de avaliação, não foi possível detectarmos a diferença entre a lesão completa e a lesão parcial, e essa observação indica que a sensibilidade de alguns testes empregados na avaliação não foram eficientes para detectar a diferença do ponto de vista funcional, entre a lesão total e parcial da medula espinhal. Com base nessa observação poderíamos imaginar que a recuperação parcial da lesão medular não poderia ser detectada por meio desses testes.

Os modelos utilizados para o grupo controle também merecem destaque, pois foi possível observarmos alterações das funções dos animais, mesmo na presença da integridade da medula espinhal. As funções examinadas não dependem exclusivamente da integridade da medula espinhal, explicando as alterações das funções observadas e alertando para a interpretação dos resultados nos chamados grupos controles.

A realização desse trabalho e a análise dos seus resultados foi de grande importância para a organização e padronização de modelos experimentais para nosso grupo de estudo, pois foi possível a observação das dificuldades na produção da lesão, na sua reprodução, avaliação funcional e do comportamento dos animais. Todas essas variáveis devem ser consideradas na elaboração de estudos dessa natureza, e esperamos que outros possam esclarecer as dificuldades que ainda persistem.

Na Lesão por Hemissecção da medula espinhal, a recuperação da função sensorio-motora espinhal pode resultar da reorganização de segmentos isolados ou da reorganização de segmentos não lesados, presentes na parte contralateral à lesão, estabelecendo conexões com estruturas supra-espinhais. Como resultado, as alterações resultantes nas influências descendentes são aparentes se comparadas com aquelas resultantes da transecção completa. Imediatamente após a hemissecção em animais experimentais ocorre a paralisia completa do membro inferior ipsilateral que, em alguns casos, pode vir acompanhada de uma perda de sensibilidade contralateral à dor e temperatura, caracterizando a Síndrome de Brown-Sequard (LITTLE & HALAR, 1985). Uma semana após a lesão a utilização do membro lesado melhora, as vezes resultando no retorno da locomoção. Portanto, aparentemente, a habilidade de caminhar é recuperada mais rápida e satisfatoriamente se conexões residuais com estruturas supra-espinhais são mantidas intactas. As lesões parciais, leves ou graves têm sido utilizadas

para produção de deficiências motoras entre média e leve, e permitem a quantificação da regeneração de vias motoras específicas

As lesões por transecção completa são diferentes das lesões produzidas por contusão, em termos de que a primeira apresenta espalhamento rostrocaudal menor da lesão secundária (DUSHART & SCHWAB, 1994). Na lesão por compressão ocorrem alterações semelhante àquelas da lesão por contusão da medula espinhal, embora os efeitos na lesão por compressão sejam aparentemente menos graves. As deficiências produzidas pela lesão causada por contusão ou por compressão são atribuídas à combinação de fatores, incluindo a perda de impulsos nervosos de condução, devido à compressão mecânica direta dos axônios (TARLOV, 1954) e ao rompimento do fluxo microcirculatório sanguíneo, que altera especialmente a drenagem venosa (WRIGHT E PALMER, 1969). O efeito da compressão, aparentemente, é mais forte na substância branca, embora também tenha conseqüências para a substância cinzenta, provavelmente resultante da isquemia crônica. As lesões por contusão também apresentam regiões onde a substância branca é parcialmente lesada, que poderão sofrer processo de desmielinização de axônios intactos. Remielinização, mesmo que em pequenos segmentos medulares podem garantir a restauração da propagação do potencial de ação através dessas fibras, se o Nódulo de Ranvier desenvolver propriedades da membrana, similares àquelas das fibras normais (WAXMAN & BRILL, 1978). O reaparecimento de canais de Na^+ relativamente normais no Nódulos de Ranvier remielinizados da medula mostraram que nódulos neoformados desenvolvem propriedades normais (WEINER *et al.* 1980).

Assim, dentre os modelos de trauma raquimedular aqui utilizados, o modelo de hemissecção foi o que produziu lesão raquimedular entre média e moderada, reprodutível, que possibilitou a quantificação dos comportamentos emitidos, permitindo a análise da evolução da lesão e suas conseqüências. Os resultados foram inclusive mais homogêneos (refletidos pela significância estatística), do que aqueles descritos por Borges em sua dissertação de Mestrado para os modelos de contusão e esmagamento. A grande crítica aos modelos de Hemissecção e Secção Total da medula é que se torna necessário, além da remoção da tábua óssea, a remoção das meninges para realização da lesão. Esta seria uma das grandes vantagens da lesão causada por esmagamento ou por contusão, onde embora haja remoção da tábua óssea as meninges são menos lesadas.

Existem modelos hoje descritos de trauma raquimedular que utilizam-se de aparelhos eletro-eletrônicos complexos. Por exemplo, NOYES (1987), descreveu modelo que é composto por um impactor eletromecânico, acoplado a um computador, para produzir lesões na medula espinhal de animais. A vantagem do dispositivo é a de se quantificar a intensidade da lesão, o que com outros modelos não era possível, tornando, assim a avaliação mais precisa de produção de lesão com homogeneidade, num grupo de animais. BASSO *et al.* (1996) também utilizam um dispositivo computadorizado no intuito de se padronizar o mecanismo de lesão à medula espinhal, tornando-o de fácil e perfeita reprodução em outros laboratórios. Realizaram uma lesão medular graduada, consistente, respeitando os parâmetros de altura da queda, velocidade e intensidade da compressão. Demonstraram que aumento na altura da queda de peso resulta em maior dano à medula espinhal e menor porcentagem de tecidos em condições de cicatrização. Este aparelho tem sido utilizado por uma série de laboratórios de excelência por todo o mundo, com o intuito de produzir resultados comparáveis, diminuindo a influência do experimentador e as diferenças entre laboratórios, que muitas vezes podem impedir a comparação de resultados e, portanto, a troca de informações preciosas. O NASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury) tem reunido os resultados de diversos laboratórios, no intuito de estabelecer terapias eficientes aos pacientes acometidos por lesão medular. Esta união torna-se especialmente importante em ensaios pré-clínicos, que serão a base para utilização terapêutica de drogas em seres humanos.

Os métodos aqui utilizados, simples, baratos e também reprodutíveis, têm sido utilizado por pesquisadores e, dependendo da questão sobre o trauma raquimedular a ser investigada, podem fornecer informações de extrema importância. Esta afirmação é apoiada pela recente publicação de resultados parciais da dissertação de mestrado de BORGES (1999), um dos primeiros estudos a evidenciar a participação, o recrutamento de estruturas cerebrais distantes do local do trauma, 2 horas apenas após a lesão.

A utilização de seções parciais ou totais da medula associadas a testes de comportamento tem trazido importantes avanços nas questões com relação aos processos de reparo pós lesão (FAWCETT, 1997; TAOKA & OKAJIMA, 1998) para questões, por exemplo, como promover mielinização dos axônios sobreviventes ou neo-formados a ponto de que possam produzir potencial de ação com eficiência à distância.

Experimentalmente foi demonstrado que o trauma raquimedular diretamente induz à lesão da medula espinhal (rompimento de membrana, lesão vascular, e hemorragia); entretanto, a lesão final é muito maior que aquela que pode ser identificada nas primeiras horas após a lesão (SCHWAB & BARTHOLDI, 1996). Esse fato ocorre pela ativação de eventos bioquímicos, que resultarão na quebra da membrana celular (necrose) e desencadeamento de processos de citotoxicidade que levariam à morte celular programada (apoptose). Nestes processos a contribuição das células da glia é central (liberação de citocinas, aminoácidos excitatórios). Então, o desenvolvimento de terapias que diminuam ou previnam os processos citotóxicos, como por exemplo a aplicação aguda de altas concentrações de corticóides, auxiliaria a amenizar os processos que produzem a citotoxicidade da lesão, reduzindo a morte celular e a desmielinização.

Vários dos problemas neurobiológicos envolvidos na pesquisa experimental relacionada ao estudo da lesão medular não são únicos para a lesão; na recuperação da lesão medular grave, com destruição tecidual, o sistema nervoso deve repetir algumas etapas do desenvolvimento, através da produção de axônios, com posterior manutenção destes através de eventos bioquímicos, até sua maturação. Após o trauma raquimedular, o objetivo principal seria restabelecer com precisão todas as conexões entre o cérebro e a medula espinhal que existiam antes da lesão e os neurônios que sobreviverem precisam ser estimulados a crescer novamente ou através da lesão ou ao redor dela. Então, muito se pode aprender com estudos moleculares sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central.

Como fazer com que os axônios lesados ultrapassem o foco da lesão, restabelecendo suas conexões? Os axônios para atingir seu alvo, elaboram ramificações, conduzem potencial de ação e estabelecem as conexões adequadas. O crescimento/brotamento de axônios de neurônios em adultos é limitado, pela produção de sinais de inibição do crescimento pelas células da glia, pela produção de fatores que estimulam o crescimento neuronal. Existem diversos fatores e mecanismos que contribuem para a recuperação da lesão da medula espinhal (KOBAYASHI, 1988) bem documentados na literatura. Assim, a aplicação de neurotrofinas, o bloqueio de receptores de aminoácidos excitatórios como glutamato, o bloqueio/prevenção da formação de radicais livres pode poupar neurônios e promover regeneração após trauma

raquimedular (DUCE *et al.*, 1983). Neurônios rubroespinhais sobrevivem em situações precárias, ocorrendo infusão de fatores de crescimento específico, com fatores neurotróficos derivados do SNC, os quais podem regular a expressão de gene associado a crescimento neuronal (TETZLAFF *et al.*, 1994). Somado a isso, a aplicação de drogas como o naloxone, bloqueadores de canais de cálcio, bloqueadores da síntese protéica como a cicloheximida, dentre outras, também podem contribuir para a regeneração após trauma raquimedular.

Atualmente o número de terapias é crescente, sem que, contudo, se conheça profundamente os mecanismos de ação de cada uma delas. Modelos de lesão da medula espinhal em ratos tem sido muito úteis em estudos pré-clínicos para avaliação de terapias neuroprotetoras (FAWCETT, 1997; TAOKA & OKAJIMA, 1998). É através destes estudos que a neurobiologia do trauma raquimedular será entendida, proporcionando cada vez mais métodos de avaliação da recuperação neurológica da função, em curto e médio prazos. Assim, os modelos animais serão cada vez mais aperfeiçoados fornecendo resultados biológicos e pré-clínicos que possam contribuir para a melhora do tratamento da lesão da medula espinhal em seres humanos (BEATIE *et al.*, 1997)

5 – CONCLUSÕES

- As escalas de avaliação locomotora utilizadas foram menos sensíveis à detecção de mudanças funcionais nos animais quando comparadas aos testes de comportamento sensório-motores.

- O Teste do Campo Aberto e o Teste da Placa Quente são de utilização fácil, simples, baratos, reprodutíveis e quantitativos, com sensibilidade para detectar deficiências funcionais em animais que tenham sofrido trauma raquimedular leve, moderado ou grave.

- A análise do comportamento Exploração no Plano Vertical, nos animais após os diferentes procedimentos experimentais foi o mais sensível para detectar deficiências sensório-motoras nos diferentes grupos, assim como piora da resposta dos animais 24 horas após o procedimento experimental.

- O teste de função reflexa mais sensível à detecção de deficiências sensório-motoras nos animais após trauma raquimedular, entre leve, moderado e grave, foi o Teste da Placa Quente.

- Os resultados reiteram a necessidade de se estabelecer modelos para controle pois, o Divulsionamento, a Laminectomia e o Pinçamento Vertebral produziram lesões conforme demonstradas em alguns testes.

- Portanto, nossos resultados mostram que, em nossas condições experimentais, com os modelos de trauma raquimedular analisados, a avaliação da capacidade locomotora dos animais com lesão medular deve ser acompanhada por meio do Teste do Campo Aberto (Exploração Vertical, Auto Limpeza, Análise Quantitativa da Marcha), do Teste do Plano Inclinado e do Teste da Placa Quente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, A. J.; BRAY, G. M.; RAMINSKY, M.; ZWINPFER, T.; CARTER, D.; VIDALSANZ, M. (1990). Synaptic connections made by axons regenerating in the central nervous system of adult mammals. *J. Exp. Biol.* 153: 199-224.

ALLEN, A. R. (1911). Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column – *JAMA*. v.57, p. 878-880.

ANDERSON, E. T.; STOKES, B. T. (1992). Experimental models for spinal cord research: physical and physiological considerations. *J. of Neurotrauma* – Supplement 1, v. 9, p.135-141.

AYER, J. B. (1919). Cerebrospinal fluid in experimental compression of the spinal cord. *Arch. Neurol. Psychiat.* v. 2, p. 158-164.

BADGEN, E. K.; DAI H. N.; BREGMAN, B. S. (1993) . Methods to asses the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp. Neur.* v. 119, p. 153-164.

BARDE, Y. A.; DAVIES, A.M.; JOHNSON, J. E. LINDSAY, R. M.; THOENEN H. (1987). Brain derived neurotrophic factor. *Prog. Brain Res.* v.71, p.185-189.

BARROS FILHO, T. E. P. (2000). Tratamento medicamentoso no traumatismo raquimedular. *Rev. Bras. Ortop.* v.35, nº 5, p. 143-146

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S., BRESNAHAM, C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. of Neurotrauma*. v12, nº 1, p. 1 - 22

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S., BRESNAHAM, C. (1996). Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* v.139, p.244-256.

BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J.C.; KOMONJ.; TOVARM, C.A; METER, M.V.; ANDERSON, D.K.; FADEN, A. I.; HSU. Y.; NOBLE, L. J.; SALZMAM, S.; W. YOUNG. (1997). Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp. Neurol.* v.148, p.453-463.

BEHRMANN, D. L.; BRESNAHAM J. C.; BEATTIE, M. S. (1992). Spinal cord injury produced by consitent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J. of Neurotrauma*, v.9, p.521-543.

BEHRMANN, D. L.; J. C. BRESNAHAN; M. S. BEATTIE (1994). Modeling of acute spinal cord injury in the rat: Neuroprotection and enhanced recovery with Methylprednisolone. U-74006 and YM-14673. *Exp. Neurol.* v.126, p. 1-16.

BLIGHT, A. R. (1991) - Morphometric analysis of a model of spinal cord injury in guinea pigs with behavioural evidence of delayed secondary injury. *J. Neuro Sci.* v.103. p.156-171

BERNSTEIN-GORAL, H.; BREGMAN, B. S. (1993). Spinal cord transplants support the regeneration of axotomized neurons after spinal cord lesions at birth: a quantitative double-labeling study. *Exp. Neurol.* v.123. p.118-132.

BOHLMAN, H. . (1977). Cervical spondylosis with moderate to severe myelopathy: a report of 17 cases treated by Robinson Anterior Dissectomy and fusion. *Spine*, v.2, p.151-162.

BOHLMAN, H. ; BAHNIUK, E.; FIELD, G.; RASKULINECZ, G. (1981). Spinal cord monitoring of experimental incomplete cervical spinal cord injury. *Spine*. V.6. nº 5. p.428-436

BORGES, C. A. G. (1999). Estudo experimental da expressão gene de resposta imediata e do sistema nitrérgico na lesão aguda da medula espinhal. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

BRACKEN, M. B.; SHEPARD, M. J.; COLLINS, W. F. (1990). A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *Engl. J. Med.* v.322, p.1405-1411.

BRAUGHLER, J. M.; E. D. HALL, E. D. MEANS, T. R. WATERS; D. K. ANDERSON. (1987). Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* v.67, p.102-105.

BREGMAN, B. S.; KUNKEL-BAGDEN E.; REIER P. J.; DAÍ H. N.; MCTEE, M.; GAO, D. (1983). Recovery of function after spinal cord injury : mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adults rats. *Exp. Neurol.* v.123, p. 3-16.

BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S.; TODD, F. D. III; NOYES, D. H. (1987). A Behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feed-back-controlled impaction device. *Exp. Neurol.* v.95, p. 548-570.

BROOK, G. A.; SCHMITT, A. B.; NACIMIENTO, W.; WEIS, J.; SCHRODER, J. M.; NOTH, J. (1998). Distribution of B-50 (GAP-43) Mrna and protein in the normal adult human spinal cord. *Acta Neuropathol.* v.95, p.378-386.

BROSAMLE, C.; SCHWAB M. E. (1996). Axonal regeneration in the mammalian CNS. *Neurosciences*, v. 8: p107-113.

BUKY, P. C. (1973). Spinal cord injury. *The University of Michigan Medical Center J.* p. 39-71.

CHENG, H.; Y. CAO; L. OLSON. (1996) Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of the hindlimb function. *Science*, v.273, p.510-513.

DE LA TORRE. (1981). Spinal cord injury. *Spine*. v.6, n° 4. July/august.

DEL BEL, E. A.; DEFINO, H. L. A.; BORGES, C A. G.; GUIMARÃES, F. S. (2000). Analysis of Fos protein immunoreactivity after spinal cord contusion. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.33 (5), p. 521/528.

DITUNNO, J. F. (1992). New spinal cord injury standarts. *Paraplegia*, v.30, p. 90-91.

DOHRMANN, G. J.; M. PANJABI. (1976). "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg. Neurol.* v.6, p.263-267.

DUCE, I. R.; DONALDSON, P. L.; USHERWOOD, P. N. R. (1983). Investigations into the mechanism of excitant amino acid cytotoxicity using a well-characterized glutamatergic system. *Brain Res.* v. 263, p. 77-87.

DUCKER, T. B.; M. SALEMAN; P. L. PEROT; D. BALENTINE. (1978). Experimental spinal cord trauma. 1. Correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg. Neurol.* v.10, p.60-63.

DUSART, I.; M. E. SCHWAB. (1994). Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal HEMISSEction of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* v.6, p.712-724.

FAWCETT, J. W. (1997). Astrocytic and neuronal factors affecting axons regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res.* v. 290, p. 371-377.

FEHLINGS, M. G.; C. H. TATOR. (1992). The effect of direct current field polarity on recovery after acute experimental cord injury. *Brain Res.* v.579, p.32-42

FERNANDEZ, E.; R. PALLINI; E. MARCHESE; G. TALAMONTI. (1991). Experimental studies on spinal cord injuries on the last fifteen years. *Neurol. Res.* v.13, p.138-159.

FONTAINE, R.; MANDEL, P.; DANY, A. (1954) Étude de déséquilibre biochimique provoqué par les traumatismes médullaires, chez l'homme et chez le chien. *Lion. Chir.* v.49, p.395-408.

FORD, R. W. J. (1983). A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J. Neurosurg.* v.59, p.268-275.

GALE, K.; H. KERASIDIS; J. R. WRATHALL. (1985). Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp. Neurol.* v.88, p.123-134.

GEISLER, F. H.; F. C. DORSEY.; W. P. COLEMAN (1991). Recovery of motor function after spinal-cord-injury a randomized, placebo controlled trial with GM-1 ganglioside. *N.Engl. J. Med.* v.324, p.1829-1838.

GOLDBERGER, M. E.; B. S. BREGMAN; C. J. VIERCK; M. BROWN. (1990). Criteria for assessing recovery of function after spinal cord injury: *Behavioral methods*, v.107, p. 113-117.

GRUNER, J. A. (1992). A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma*, v.9, p.123-128.

HAGHIGHI, S. S.; CHEHRAZI, B. B.; HIGGINS, R.S.; REMINGTON, W. J.; WAGNER, F.C. (1987). Effect of lidocaine treatment on acute spinal cord injury. *Neurosurg.* v.20, n° 4, p. 536-541.

HALL, E. D.; WOLF, D. L.; BRAUGHLER, J. M. (1984). Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on posttraumatic spinal cord ischemia: dose response and time-action analysis. *J. Neurosurg.* v.61, p.124-130.

HALL, E. D.; WOLF, D. L. (1986). A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of post-traumatic spinal cord ischaemia. *J. of Neurosurgery*, v.64, p.951-961.

HANSEBOUT, R. P.; EUGENE, F.; F. KUTHNER, F.; ROMERO-SIERRA. C. (1975). Effects of local hypothermia and of steroid upon recovery from experimental spinal compression injury. *Surg. Neurol.* v.4, p.531-536.

KAKULAS, B. A.(1987). The clinical neuropathology of spinal cord injury, a guide to the future. *Paraplegia*, v.25, p.212-216.

KHAN , M.; GRIEBEL, R. (1983). Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can. J. Neurol. Sci.* v.10, p.161-165.

KUNKEL-BAGDEN, E.; DAI HAI-HING; BREGMAN, B. S. (1993). Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* v.119, p.153-164.

LITTLE, J. W.; HALAR, E. (1985). Temporal course of motor recovery after Brown-Sequard spinal cord injuries. *Paraplegia*, v.23, p. 39-46.

MARTIN, S. H.; BLOEDEL, J. R. (1973). Evaluation of experimental spinal cord injury using cortical evoked potentials. *J. Neurosurg.* v.39, p.75-81.

- MÜLLER, E. J.; MUHR, G. (1997). Wirbelsäulenverletzungen. *Thieme*, p.158.
- NICHOLLS, J.; SAUNDERS, N. (1996). Regeneration of immature mammalian spinal cord after injury. *Elsevier Trends Journals*. v. 19, nº 6, p.229-234.
- NOYES, D. H. (1987). Eletromechanical impactor for producing experimental spinal cord injury in animals. *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 25. P. 335/340
- RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. (1978). Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute model in the rat. *Surg. Neurol.* v.10, p.38-43.
- ROISEN, F. J.; BARTFELD, H.; NAGELE, R. YORKE, G. (1981). Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro. *Science*, v.214, p. 577-578.
- SARUHASHI, Y.; YOUNG, W.; (1994). Effect of Miaserin on locomotory function after thoracic spinal cord HEMISSECTOMY in rats. *Exp. Neurol.* v.129, p.207-216.
- SCHWAB, M. E.; BARTHOLDI, D. (1996). Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.* v.76, p.319-370.
- SILVA, C.L.C.; (1998). Traumatismo raquimedular por mergulho em água rasa. Proposta de um programa de prevenção. Dissertação (mestrado). Área de interunidades. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos.
- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K.; (1998b). Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiology*, v.56, p.341-358.
- TARLOV, I. M.; KLINGER, H.; VITALE, S.; (1953). Spinal cord compression studies; 1. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. A. M. A.; *Arch. Neurol. Psychiat.* v.70, p.813-819.
- TARLOV, I. M.; KLINGER, H.; VITALE, S. (1954). Spinal cord compression studies. Am. Med. Assoc. *Arch. Neurol. Psychiat.* v.71, p.271-290.
- TATOR, C. H.; M. G. FEHLINGS. (1991) Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* v.7, p.15-26.
- TETZLAFF, W.; KOBAYASHI, N. R.; GIEHL, K. M.; TSUI, B. J.; CASSAR, S. L.; BEDARD, A. M. (1994) Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins. *Prog. Brain. Res.* V.103. p. 271-286

THALLMAIR, M.; METZ, G. A. S.; GRAGGEN, W. J. Z.; RAINETEAU, O.; KARTJE, G. L.; SCHWAB, M. E. (1998). Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nature Neurosci.* v.1, p.124-131.

VAN DE MEENT, H.; HAMERS F. P. T.; LANKHORST, A. J.; BUISE, M. P. JOOSTEN, E. A. J.; GISPEN, W. H. (1996). New assesment tchnique for evaluation of posttraumatic spinal cord function in tha rat. *J. of Neurotrauma*, v. 13, nº12, p.741-754.

VIALLE, L. R. G.; FISCHER, S.; MARCON, J. C.; VIALLE, E.; LUZZI, R.; BLEGGI-TORRES, L. F. (1999). Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev. Bras. Ortop*, v. 34, nº 2, p. 85-89

WALACE, M. C.; C. H. TATOR; P. FRAZEE. (1986) - Relathionship between postraumatic ischemia and hemorrhage in the injured rat spinal cord as shown by colloidal carbon angiography. *Neurosurgery*, v.18, p.433-439.

WAXMAN, S. G.; BRILL, M. H. (1978). Conduction through demyelinated plaques in multiple sclerosis: computer simulations of facilitation by short internodes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. v. 41, p 408-417

WEINER, L. P.; WAXMAN, S. G.; STOHKMAN, S. A.; KWAN, A. (1980). Remyelination following viral-induced demyelination: ferric ion-ferrocyanide staining of nodes of Ranvier within the CNS. *Ann. Neurol.* v. 8, p. 580-583.

WRIGHT,F.; PALMER, A. C. (1969) Morphological changes caused by pressure on the spinal cord. *Veterinary Pathology*. v. 6, P. 355-368

XU, X. M.; GUÉNARD, V.; KLEITMAN, N.; BUNGE, M. B. (1995). Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J. of Neurol.* v. 351, p. 145-160

YOUNG, W.; E. S. FLAMM.(1982) Effect of high-dose corticosteroide therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J. Neurosurg.* 57: 667/673.

OBRAS CONSULTADAS

DEL BEL, E. A.; DEFINO, H. L. A. (1998). *C-Fos and NADPH- Diaphorase detection in rat midbrain and spinal cord after contusion injury. a NATOmeeting/asi SERIES*, Vol F, Intern. School. Biophys. Neural Circuits and Networks. v. 167, p 21-40.

GORIO, A.; DI GIULINO, A. M.; YOUNG, W.; GRUNER, J.; BLIGHT, A.; DE CRESCITO, V.; DONA, M.; LAZZARO, A. FIGLIOMENI, B.; FUSCO, M.; HALLMAN, H.; JONSSON, G.; PANNOZO, C.; ZANONI, R.; VANTINI, G.; (1986). *GM 1 effects on chemical, traumatic and peripheral nerve induce lesions to the spinal cord. In: Development and Platicity of the Mammalian Spinal Cord*. Vol. 3 pp 227-242. Eds. M. E. Goldberger. A. Gorio and M. Murray. Liviana Press. Padova.

JEFERY, N. D. (1995). *Pathophysiology of spinal cord trauma in: Handbook of small animal spinal surgery*. London, W. B. Saunders. 64/71.

MOLINARI, G. F. (1988). *Why model stroke?* Stroke v.19, p.1195-1197.

OSBORN, A.G. (1996). *Transtornos neoplásicos de la columna vertebral y de la medula espinal*. In: Osborn AG (ed). *Neuroradiologia Diagnóstica*. Madrid: Mosby/Doyma Libros.; p. 867/972.

SCHWAB, M. E., J. P. KAPFHAMMER, AND C. E. BANDTLOW. (1993). *Inhibitors of neurite growth. In: Annual Review of Neuroscience*, edited by W. M. Cowan. Palo Alto, CA: v. 16: 565/595.