
OLAVO BIRAGHI LETAIF

**Padronização do modelo experimental de injeção intradural após lesão
medular em ratos**

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de
Barros Filho

SÃO PAULO
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Letaif, Olavo Biraghi
Padronização do modelo experimental de injeção
intradural após lesão medular em ratos / Olavo
Biraghi Letaif. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal
2.Ratos 3.Modelos animais 4.Via intratecal

USP/FM/DBD-206/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Às minhas amadas esposa, Leila, e filha, Lívia, elas são o meu porto seguro e meu constante e carinhoso estímulo para ser e fazer melhor.

À minha família, e em especial aos meus pais, Flavia e Nelson, pelos inabaláveis exemplos de amor incondicional, honestidade e ética que sempre pautam meus passos profissionais e pessoais.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP), meu orientador, líder incontestável, pelo exemplo de carreira profissional, pelo apoio e pelas inúmeras e significativas oportunidades de crescimento profissional.

Ao Professor Doutor Olavo Pires de Camargo (IOT-HC-FMUSP), pela confiança e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino.

Ao Professor Doutor Gilberto Luis Camanho (IOT-HC-FMUSP), pelo exemplo profissional e incentivo.

Ao Doutor Reginaldo Perilo Oliveira, diretor científico do Grupo de Coluna da Disciplina de Coluna Vertebral (IOT-HC-FMUSP), pela confiança no meu trabalho, apoio constante, por todas as oportunidades e os ensinamentos transmitidos, e pela chefia onipresente.

Ao Professor Doutor Alexandre Fogaça Cristante, chefe do Grupo de Coluna da Disciplina de Coluna Vertebral (IOT-HC-FMUSP), pelo exemplo de trabalho incansável e perfeccionista, liderança firme, pela ajuda constante, pelo incentivo, pelas incontáveis oportunidades de crescimento profissional e pela amizade.

Ao Professor Doutor Raphael Martus Marcon, Chefe do Grupo de Coluna da Disciplina de Coluna Vertebral (IOT-HC-FMUSP), pela confiança, pelo incentivo ao meu trabalho, pela ajuda constante no meu desenvolvimento profissional dentro da cirurgia de coluna, pelos conselhos e ensinamentos, e pela amizade.

Ao Doutor Ricardo Ferreira, pela dedicação na realização dos exames de potencial evocado.

Ao Doutor Renato José Mendonça Natalino, pela dedicação na realização dos exames de histologia.

À enfermeira Tânia Fernanda Cardoso da Silva, pelo profissionalismo, competência e zelo no trabalho junto ao Grupo de Coluna do IOT-HCFMUSP.

Ao biólogo Gustavo Bispo dos Santos, pela dedicação e profissionalismo com que conduz o laboratório de lesão medular do IOT-HCFMUSP.

Ao estatístico Rogério Ruscitto do Prado, pela competência e paciência na análise e discussão dos dados.

Aos meus colegas do Grupo de Coluna do IOT-HCFMUSP, companheiros de aprendizado, fontes de ensinamentos, constantes consultores e, sobretudo, amigos que me ajudam a crescer.

Aos meus colegas assistentes do IOT-HCFMUSP, exemplos de profissionais competentes e capazes, referências e amigos.

À bibliotecária Camila Gomes da Rocha D'Agostino, pelo excelente trabalho de revisão estrutural desta tese.

Às enfermeiras da Enfermaria de Coluna do IOT-HC-FMUSP, pelo exemplo de dedicação, eficiência e pela ajuda ao longo de todos esses anos.

Às secretárias da pós-graduação Tânia e Rosana, pela gentileza, prontidão, eficiência e competência da resolução das questões relacionadas à pós-graduação do IOT-HC-FMUSP.

A todos os funcionários do IOT-HC-FMUSP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas**Listas de figuras****Lista de tabelas****Resumo****Abstract**

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	5
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1	Modelos de lesão medular experimental.....	7
3.2	Métodos/estudos de cateterização/punção do espaço intratecal/intradural.....	8
3.3	Métodos de avaliação da lesão medular.....	11
3.4	Emprego de tratamento pela cateterização/punção do espaço intratecal/intradural – em modelo animal.....	13
3.5	Emprego de tratamento pela cateterização/punção do espaço intratecal/intradural – em humanos.....	23
4	MÉTODOS.....	27
4.1	Local de execução.....	27
4.2	Ética.....	27
4.3	Animais de experimentação.....	27
4.4	Formação dos grupos experimentais.....	28
4.5	Modelo experimental de lesão medular.....	29
4.5.1	Protocolo de anestesia.....	29
4.5.2	Lesão medular.....	31
4.5.3	Protocolo de punção e injeção intradural.....	34
4.6	Protocolo pós-operatório.....	36
4.7	Protocolo de avaliação da capacidade locomotora pela escala BBB.....	37
4.8	Avaliação comportamental sensório motora: plano horizontal.....	39

4.9	Análise por potencial evocado motor.....	40
4.10	Protocolo de eutanásia.....	41
4.11	Exame necroscópico e anatomopatológico.....	42
4.12	Descarte das carcaças.....	43
4.13	Avaliação histológica.....	44
4.14	Avaliação histológica qualitativa.....	45
4.15	Forma de análise de resultados.....	48
5	RESULTADOS.....	51
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO.....	73
8	ANEXOS.....	75
9	REFERÊNCIAS.....	108

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
ALF-5	Receptor 5 de Ácido Lisofosfatídico
ANOVA	Análise de Variância
APPLCE	Amplitude do Pulso de Pressão do Líquido Cérebro-espinal
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
cABC	Condroitinase ABC
CAPPesq – HC-FMUSP	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CARB	Carbenoxolona
CEMMO	Células Estromais do Mesênquima de Medula Óssea
CEMO	Células Estromais da Medula Óssea
ChABC	Condroitinase ABC
cm	Centímetro
CNECT	Células Neuroepiteliais Derivadas de Células Tronco Pluripotentes Induzidas Humanas
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTNh	Células-tronco Neurais Humanas
CTPN	Células Tronco Progenitoras Neurais
CTPN-ME	Células Tronco/progenitoras Neurais Derivadas da Medula Espinal
CTSH	Células-tronco Somáticas Humanas
DP	Desvio-padrão
DEX	Dexmedetomidina
EGCG	Epigallocatequina-3-Galato
EPO	Eritropoetina
FCDP	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
FDE	Fator 1 α Derivado de Células Estromais

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GABA	Gama-amino-butilato
GPC	Granuloma na Ponta do Cateter
Hz	Hertz
IT	Intratecal
kg	Quilograma
LCE	Líquido Cérebro-espinhal
LETRAN – IOT - FMUSP	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LM	Lesão Medular
LNE	Nervo Espinhal
MA	Monoartrite
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
Mg	Miligramas
MI	Membros inferiores
mm	Milímetros
MP	Metilprednisolona
MS	Membros superiores
mV/div	Milivolt por Divisão
NMDA	N-metil-D-aspartato
OAS	Oligonucleotídeos Antisense
°C	Grau Celsius
PAFG	Proteína Acídica Fibrilar Glial
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial Hidrogeniônico
QJN	Quinase C-Jun-NH ₂ -Terminal
qRT-PCR	Cadeia de Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa
SP	Substância P
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TC	tomografia Computadorizada
UI/ml	Unidades Internacionais por Mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Indução anestésica de rato com o uso de uma caixa de acrílico e isoflurano (1.5–2.0 vols.%).....	30
Figura 2 -	Máscara cobrindo todo o focinho do animal, obtendo-se um plano anestésico mais profundo. Realização da tricotomia e da limpeza da região dorsal.....	30
Figura 3 -	Incisão da pele na linha média dorsal.....	31
Figura 4 -	A) exposição da medula após a dissecação muscular, afastamento e laminectomia da coluna torácica. B) cabeça da haste de impacto do dispositivo acomodada na região da laminectomia.....	32
Figura 5 -	Posicionamento do peso na altura de 12,5 mm para a produção de lesão medular padronizada leve.....	33
Figura 6 -	Aproximação dos tecidos musculares e fechamento da pele após o término da lesão medular experimental.....	33
Figura 7 -	Punção do saco dural no centro da laminectomia, no local da contusão medular experimental.....	34
Figura 8 -	Retirada da agulha e introdução intratecal do cateter em cerca de 5 mm de comprimento.....	35
Figura 9 -	Teste BBB em rato experimental.....	38
Figura 10 -	Treinamento pré-lesão na escada horizontal.....	39
Figura 11 -	Exame de potencial evocado motor em rato experimental....	41
Figura 12 -	Avaliação macroscópica da medula.....	43
Figura 13 -	Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 6 do Grupo 1, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico normal, neste caso com hemorragia (0), alterações arquiteturais (0), necrose (0) e infiltrado inflamatório (0). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x.....	46

- Figura 14 -** Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 6 do Grupo 3, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com alterações arquiteturais difusas, hemorragia (3+), alterações arquiteturais (3+), necrose (3+) e infiltrado inflamatório (3+). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x..... 46
- Figura 15 -** Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 6 do Grupo 4, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com quase completa interrupção dos feixes neurais, hemorragia (3+), alterações arquiteturais (3+), necrose (3+) e infiltrado inflamatório (3+). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x..... 47
- Figura 16 -** Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 7 do Grupo 4, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com quase completa interrupção dos feixes neurais, hemorragia (1+), alterações arquiteturais (3+), necrose (2+) e infiltrado inflamatório (1+). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x..... 47
- Figura 17 -** Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 8 do Grupo 5, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com quase completa interrupção dos feixes neurais, hemorragia (3+), alterações arquiteturais (3+), necrose (3+) e infiltrado inflamatório (0). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos parâmetros do potencial evocado e da histologia segundo grupos e resultado das comparações.....	51
Tabela 2 - Comparação dos parâmetros do potencial evocado entre os grupos dois a dois.....	52
Tabela 3 - Comparação dos parâmetros histológicos entre os grupos dois a dois.....	53
Tabela 4 - Descrição do peso, plano horizontal e escore BBB segundo grupos ao longo dos momentos avaliados e resultado das comparações.....	54
Tabela 5 - Resultado das comparações do peso dos animais entre grupos e momentos.....	55
Tabela 6 - Resultado das comparações do plano horizontal entre os grupos em cada momento avaliado.....	56
Tabela 7 - Resultado das comparações do plano horizontal entre os momentos avaliados em cada grupo.....	57
Tabela 8 - Resultado das comparações do escore BBB entre os grupos em cada momento avaliado.....	58
Tabela 9 - Resultado das comparações do escore BBB entre os momentos avaliados em cada grupo.....	60
Tabela 10 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 1.....	83
Tabela 11 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 2.....	84
Tabela 12 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 3.....	85
Tabela 13 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 4.....	86
Tabela 14 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 5.....	87

Tabela 15 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 6.....	88
Tabela 16 - Pontuação do teste do plano horizontal, pré lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6.....	89
Tabela 17 - Pontuação do teste do plano horizontal, após 48 horas de lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6.....	92
Tabela 18 - Pontuação do teste do plano horizontal, após 21 dias de lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6.....	95
Tabela 19 - Pontuação do teste do plano horizontal, após 42 dias de lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6.....	98
Tabela 20 - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 1.....	101
Tabela 21 - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 2.....	102
Tabela 22 - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 3.....	103
Tabela 23 - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 4.....	104
Tabela 24 - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 5.....	105
Tabela 25 - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 6.....	106

RESUMO

Letaif OB. *Padronização do modelo experimental de injeção intradural após lesão medular em ratos* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2020.

INTRODUÇÃO: A padronização e avaliação da via intratecal no modelo experimental de lesão medular (LM) contusa em ratos Wistar ainda não foram estudadas em nosso meio. **OBJETIVO:** É objetivo deste estudo padronizar e avaliar o efeito da injeção intradural neste modelo animal. **MÉTODOS:** 48 ratos foram divididos em 6 grupos, com 8 animais cada: Grupo 1 - laminectomia e cateter intradural; Grupo 2 - laminectomia, cateter intradural e infusão de 0,1 ml de Solução Fisiológica; Grupo 3 - somente contusão medular; Grupo 4 - contusão medular e cateter intradural; Grupo 5 - contusão medular, cateter intradural e infusão de 0,1 ml de Solução Fisiológica; Grupo 6, controle - somente laminectomia. Foram realizadas avaliações motoras por meio dos testes “BBB” e “Plano Horizontal”, avaliação funcional pelo potencial evocado motor e avaliação histológica. Todos os dados experimentais foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** Para o potencial evocado, nos grupos com LM experimental, observaram-se piores resultados, mas nem a punção e nem a injeção de solução intratecais agravaram os efeitos da LM isolada. Na histologia, os efeitos teciduais foram piores nos indivíduos submetidos à LM experimental. Nos grupos 1 e 2 não houve alterações histológicas significativas comparativamente ao grupo 6. O escore BBB apresentou em média, estatisticamente, o mesmo comportamento que o plano horizontal, sendo que em todos os momentos avaliados os grupos sem LM apresentaram em média, estatisticamente, melhores escores que os grupos com LM ($p < 0,05$). A diferença de desempenho nos testes motores permaneceu, entre os ratos que sofreram ou não a LM experimental, do primeiro ao último teste. **CONCLUSÃO:** O presente trabalho padroniza o modelo experimental da injeção intradural na LM contusa em ratos. A punção e injeção de solução intratecais não causaram, de modo independente, alterações funcionais ou histológicas significativas.

DESCRITORES: Traumatismos da medula espinal; Ratos; Modelos animais; Via intratecal.

ABSTRACT

Letaif OB. *Standardization of the experimental model of intradural injection after spinal cord injury in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2020.

INTRODUCTION: The standardization and evaluation of the intrathecal route in the experimental model of spinal cord injury (SCI) in Wistar rats has not yet been studied in our institution. **OBJECTIVE:** The objective of this study is to standardize and evaluate the effect of intradural injection in this animal model. **METHODS:** 48 rats were divided into 6 groups, with 8 animals each: Group 1 - laminectomy and intradural catheter; Group 2 - laminectomy, intradural catheter and infusion of 0.1 ml of Saline Solution; Group 3 - only spinal cord contusion; Group 4 - spinal cord contusion and intradural catheter; Group 5 - spinal cord contusion, intradural catheter and infusion of 0.1 ml of Saline Solution; Group 6, control - laminectomy only. Motor evaluations were performed using the "BBB" and "Horizontal Plane" tests, functional evaluation by motor evoked potential and histological evaluation. All experimental data were submitted to statistical analysis with a significance level of 5%. **RESULTS:** For the evoked potential, in the groups with experimental SCI there were worse results, but neither the puncture nor the injection of intrathecal solution aggravated the effects of isolated SCI. In histology, tissue effects were worse in individuals submitted to experimental SCI. In groups 1 and 2 there were no significant histological changes compared to group 6. The BBB score presented on average statistically the same behavior as the horizontal plane, and at every evaluated moment the groups without SCI presented on average statistically better scores than the groups with SCI ($p < 0.05$). The difference in performance in motor tests remained among rats that underwent or did not undergo experimental SCI, from the first to the last test. **CONCLUSION:** The present work standardizes the model of intradural injection in experimental SCI in rats. Intrathecal puncture and injection did not independently cause significant functional or histological changes.

KEYWORDS: Spinal cord injury; Rats; Animal models; Intrathecal route

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular acomete habitual e principalmente adultos jovens e origina-se de acidentes ou de violência. Embora normalmente a incidência seja inferior a 50 por milhão, a morbidade e a mortalidade associadas são dispendiosas, com despesas hospitalares decorrentes da internação inicial de aproximadamente US\$95.000 (**Sekhon; Fehlings, 2001**). Além disso, as sequelas motoras e a perda de função, geralmente, são importantes, com 45% das lesões sendo completas (**Sekhon; Fehlings, 2001**). A América Latina tem uma incidência de lesões medulares traumáticas de 25/milhão de habitantes (intervalo de confiança: 14-27), com até 21% resultando em morte em até um ano após o trauma. Já a taxa de incidência global estimada está em 23/milhão de habitantes, com prevalência entre 236 e 4187/milhão de habitantes (**Lee et al., 2014**). No Brasil, a incidência do traumatismo raquimedular encontra-se em torno de 71 casos novos/ano/milhão de habitantes, ou cerca de 11 mil casos novos/ano, segundo **Masini, 2001**; mas segundo dados mais recentes de **Lee et al., 2014**, a incidência no Brasil está entre 10 e 29/milhão de habitantes.

Após o trauma raquimedular, a perda funcional resulta de um complexo processo que ocorre em duas etapas. Inicialmente, no local da lesão ocorre morte celular pelo estresse mecânico. Após a lesão celular imediata, segue-se a lesão secundária, de diferente natureza da primária, que atinge o local da lesão e o tecido adjacente (**Ray et al., 2001**). A lesão secundária está associada fundamentalmente a uma série de alterações neuroquímicas (cascata reativa), entre as quais: ativação da cascata do ácido araquidônico, resposta inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da concentração extracelular de aminoácidos (principalmente o glutamato), edema, redução do fluxo sanguíneo na medula espinhal, liberação de enzimas líticas e desmielinização (**Sharma et al., 1993; Farooque et al., 1996; Amar; Levy, 1999; Ding et al., 2000; Beattie et al., 2000; Schroeter; Jander, 2005**).

Como a lesão primária é irreversível, os esforços terapêuticos têm se concentrado em reduzir a lesão secundária, diminuir a inflamação e em promover a regeneração axonal. Atualmente, porém, não há qualquer opção farmacológica com benefício definitivamente comprovado (**Fu; Tummala, 2005**). Embora altas doses de corticóide ainda sejam usadas no tratamento do trauma raquimedular em muitas instituições, as evidências que comprovam sua eficácia são fracas e os efeitos colaterais nessa terapia são inúmeros (**Bracken et al., 1992; Bracken et al., 1997; Hurlbert, 2000; Short, 2001**).

Investigações experimentais sugerem ainda como possíveis agentes terapêuticos: o estrogênio (**Letaif et al., 2015**); os agonistas do estrogênio (**McDowell et al., 2011**); a eritropoietina (**Costa et al., 2015**); a progesterona (**Coronel et al., 2016**); os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (**Cristante et al., 2013**); e outras substâncias.

No estudo da lesão medular, os modelos animais experimentais, além de auxiliarem na pesquisa dos efeitos de diferentes medicamentos, também permitem a análise de diversas vias biológicas para administração dessas drogas (**Gradert et al., 2003; Johansen et al., 2004; Amemori et al., 2015**). Diferentes vias podem ter vantagens, desvantagens e complicações distintas (**Bahar et al., 1984; Amemori et al., 2015; Kratzsch et al., 2015**). Não há base de comparação segura na literatura para se afirmar que uma via de tratamento é definitivamente superior à outra na lesão medular (**Bahar et al., 1984; Miyazato et al., 2005; Neuhuber et al., 2008; Amemori et al., 2015**). A via de administração intratecal (ou intradural) parece demonstrar benefícios como simplicidade técnica e menor agressão tecidual (**Yaksh; Rudy, 1976; Martin et al., 1984; Storkson et al., 1996; Jasmin; Ohara, 2001; Neuhuber et al., 2008; Ughratdar et al., 2012; Pleticha et al., 2013; Chotivichit et al., 2015; Mazur et al., 2017**). Essa via pode ser utilizada tanto na administração de medicamentos (**Roh et al., 2010; Feng et al., 2014; Kim et al., 2015; Pakulska et al., 2017; Hosseini et al., 2020**) quanto de células, como por exemplo, células-tronco (**Yoshiyama; Groat, 2008; Mothe et al., 2011; Hama; Sagen, 2012; Schira et al., 2012; Cheng et al., 2012; Chotivichit et al., 2015; Chen et al., 2015; Cheng**

et al., 2016; Cheng et al., 2017; Kanekiyo et al., 2018; Führmann et al., 2018; Szczepanik et al., 2020).

O modelo animal de lesão medular experimental em ratos é consagrado em nosso meio (**Rodrigues et al., 2010; Santos et al., 2011**), o que ainda não ocorre, porém, com o uso de drogas pela via intratecal, neste modelo. A padronização, avaliação, segurança (**Stokes et al., 2011; Sang et al., 2016; Mamet et al., 2017**) e reprodutibilidade da via intratecal para pesquisa ainda não foram estudadas em sua integralidade, considerando-se aspectos motores, funcionais e histológicos (**Martini et al., 2016; Gao et al., 2016; Murai et al., 2017; Ozkunt et al., 2017; Rong et al., 2017**). Este presente estudo tem o intuito de padronizar o uso da via intratecal em ratos submetidos à lesão medular controlada, experimental, por queda de peso. Também é objeto de estudo desta pesquisa a mensuração dos efeitos funcionais e histológicos da infusão de líquido no espaço intradural no local do tecido medular contuso, já que há escassa literatura acerca desses efeitos (**Horiuchi et al., 2003; Protopapas et al., 2007; Tian et al., 2013**). O estabelecimento deste protocolo fortuitamente trará perspectivas de pesquisa ampliadas (**Schubert et al., 2011; Jones et al., 2012a; Jones et al., 2012b; Kucher et al., 2018**) seguindo o modelo de administração intratecal de substâncias.

2. OBJETIVO

2 OBJETIVO

Padronizar e avaliar o efeito da injeção intradural na lesão medular contusa em ratos Wistar e a segurança e reprodutibilidade deste modelo de pesquisa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Modelos de lesão medular experimental

Basso et al. (1996) padronizaram um aparelho, o New York University, Impactor (NYU Impactor) desenhado para realizar lesão medular contusa em ratos. Citam a escala BBB como sendo mais sensível que as demais até então descritas para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram lesão medular contusa. Demonstram que o sistema NYU permite produzir uma contusão medular graduada, consistente e reproduzível em todos os ratos. Afirmam que um exame dos efeitos terapêuticos para índices lentos e rápidos de recuperação é mais evidente nos grupos graduados com 12,5 e 25 mm de altura da queda do peso de 10 g sobre a medula. Confirmam que a quantidade de tecido medular íntegro está diretamente relacionada com a melhor função locomotora final quando aplicada a escala BBB. Documentam aumento dos movimentos dos membros inferiores em duas semanas após lesão compressiva ou por transecção medular. Concluem que a escala BBB é aplicável, após a utilização do sistema NYU, na análise da recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular contusa.

Rodrigues et al. (2010) publicaram a padronização de um modelo de lesão de medula espinhal em ratos Wistar. Verificam a existência de correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Concluem o artigo demonstrando que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos.

Santos et al. (2011) padronizaram o modelo de lesão e avaliação utilizado no laboratório LETRAN (Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos). Utilizam 20 ratos Wistar divididos em quatro grupos, diferenciando

o nível de gravidade da lesão raquimedular; realizando lesões intermediárias padronizadas, pelo sistema do MASCIS: Grupo 1 - 12,5 mm (lesão leve); Grupo 2 - 25 mm (lesão moderada); Grupo 3 - 50 mm (lesão grave); Grupo 4 - animais que não sofrem lesão (grupo controle). Após 48 horas, é avaliada função motora, segundo escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Os autores concluem que o modelo de lesão medular utilizando o sistema MASCIS e a avaliação funcional proposta por Basso, Beattie e Bresnahan são reprodutíveis, podendo ser utilizados, permitindo troca de informações entre os diferentes pesquisadores.

3.2 Métodos/estudos de cateterização/punção do espaço intratecal/intradural

Yaksh e Rudy (1976) foram os pioneiros no desenvolvimento da técnica para cateterização crônica do espaço intratecal de ratos. Neste experimento os animais permaneceram com o cateter introduzido pela membrana atlanto-occipital, no espaço subaracnóide, por até quatro meses. Foram realizadas injeções de morfina que não causaram alterações comportamentais e posteriormente, na autópsia dos animais, não foram constatados sinais visíveis de inflamação ou reação da medula espinhal. Os autores concluíram que tanto os cateteres quanto as injeções foram fisiologicamente bem toleradas.

Martin et al. (1984) descreveram uma técnica original para a cateterização crônica do espaço subaracnóide (intratecal) em ratos. A introdução do cateter diretamente na coluna lombar reduziu o comprimento do cateter e conseqüentemente a extensão da área medular comprimida. Os autores validaram a nova técnica pela administração de morfina e observação de seus efeitos, além de corarem o tecido medular com corante.

Storkson et al. (1996) desenvolveram um método para a cateterização direta do espaço subaracnóide em ratos. Os autores argumentaram que, diferentemente de técnicas descritas e desenvolvidas previamente, na abordagem deste estudo, o cateter é introduzido por punção de agulha, sem a necessidade de cirurgia grande com lesão muscular e óssea. Foi utilizado anestésico através do cateter para verificar seu funcionamento e localização anatômica. O cateter foi mantido na posição por 5 a 7 dias. Os autores concluíram que esta técnica apresentada é confiável e poupa tempo na preparação. Também alegaram que há minimização dos distúrbios neurológicos e do sofrimento dos animais.

Jasmin e Ohara (2001) propuseram uma técnica de cateterização intratecal de longa permanência para ratos. Esta nova técnica foi idealizada para permitir a manutenção dos animais em conjunto dentro da mesma caixa (gaiola) e para aumentar a eficácia das medicações, permitindo múltiplas injeções no rato desperto. O cateter de poliuretano (flexível) tem seu ponto de saída da pele protegido com uma capa ponteira de titânio com cobertura de rosca (que é retirada na administração das medicações). Os cateteres mostraram-se funcionais por período de até nove meses neste experimento.

Stokes et al. (2011) estudaram em camundongos os efeitos da punção lombar intratecal sobre os limiares da estimulação tátil. Os pesquisadores inicialmente dividiram os animais em 03 grupos: punção com injeção de solução salina, somente punção e somente anestesia. Nos animais com punção intratecal, houve persistência da alodínea por até 4 horas. Nos animais somente anestesiados a alodínea durou somente 1 hora. Também foram testados animais com deficiência de receptores do tipo Toll (receptores envolvidos na sinalização celular) nas mesmas condições acima descritas. Nestes animais, independentemente da punção intratecal, a alodínea durou apenas 1 hora, da forma como acontece em animais somente anestesiados.

Jones et al. (2012a) utilizaram o modelo animal de porcos miniatura Yucatan para realizar lesão medular (LM) experimental padronizada na coluna

torácica. Foram implantados transdutores de pressão de fibra ótica de modo intratecal e as pressões do líquido cérebro-espinhal (LCE) foram medidas após a LM realizada em dois graus de gravidade. Os autores concluíram ter desenvolvido um novo modelo experimental para avaliar a pressão do LCE em casos de contusão da medula levando à LM. Também afirmam que este modelo animal se assemelha mais ao ser humano em termos de tamanho, portanto é mais adequado para avaliar segurança de terapias, eficácia de tratamentos e particularidades da fisiologia da LM.

Jones et al. (2012b) investigaram no modelo animal de porcos miniatura Yucatan, submetidos à lesão medular (LM) experimental padronizada por compressão na coluna torácica, a pressão do líquido cérebro-espinhal (PLCE) e a amplitude do pulso de pressão do líquido cérebro-espinhal (APPLCE). As PLCE e APPLCE foram medidas cranial e caudalmente à área de LM, antes e depois de descompressão cirúrgica, por meio de transdutores de pressão em miniatura implantados de forma intratecal. O trabalho concluiu: que a PLCE lombar pode não indicar precisamente a PLCE cranial à lesão; que a descompressão pode gerar resolução imediata, embora talvez parcial, do diferencial de pressão crânio-caudal. A APPLCE não foi um indicador consistente de eficiência da descompressão.

Pleticha et al. (2013) testaram uma nova maneira de administrar medicação de forma intratecal (IT) para o modelo animal de porcos. Os animais tiveram sua coluna na porção lombo sacral estudada por tomografia computadorizada (TC). Os exames de TC foram realizados antes e após a punção do recesso lateral IT lombar. A precisão da punção do espaço IT foi confirmada pela injeção de contraste radiológico. Os autores concluíram que a punção lombar para administração de medicações IT tem resultados tecnicamente reproduzíveis. Também avaliaram que a técnica de injeção lateral lombar associada ao uso de TC facilita o acerto diante de alterações ou dificuldades anatômicas da região lombar.

Kratzsch et al. (2015) revisaram retrospectivamente os dados de pacientes que foram tratados com implantação de cateter intratecal e bomba para administração de terapia medicamentosa para dor crônica e/ou espasticidade. O estudo teve por objetivo identificar fatores de risco associados à formação de granuloma na ponta do cateter (GPC). Os dados coletados foram: idade na cirurgia; gênero; tabagismo; cirurgias prévias da coluna; nível anatômico da ponta do cateter; sintomas clínicos; teste do cateter com contraste; medicamentos utilizados; concentração dos medicamentos; dose cumulativa diária das medicações. Os autores identificaram como fatores de risco para a formação de GPC: ponta do cateter terminando na coluna torácica média; cirurgia prévia da coluna; e dor crônica como razão para a terapia intratecal.

Mazur et al. (2017) desenvolveram um método para cateterização intratecal da coluna lombar de ratos com o objetivo de administrar oligonucleotídeos antisense (OAS) ao tecido nervoso central ou ao fluido cérebro-espinhal. Após sete dias da cirurgia para implantação do cateter, os ratos foram submetidos aos seguintes testes: hiperalgesia térmica; alodínia mecânica; alodínia tátil. Para verificar se os OAS atingiram os tecidos medulares foram realizados os seguintes experimentos: reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR); quantificação de OAS tecidual com anticorpos; e imuno-histoquímica. Os autores defenderam que esta técnica descrita de utilização de cateteres comuns de polietileno é mais simples, prática, rápida e barata que as anteriormente descritas na literatura.

3.3 Métodos de avaliação da lesão medular

Tarlov et al. (1953) realizaram estudo experimental em cães, testando a perda e a recuperação das funções sensitiva e motora nesses animais.

Apresentaram um método de avaliação da função locomotora em animais que sofreram lesão medular experimental.

Basso et al. (1995) estudaram a lesão medular contusa em ratos fazendo uma modificação da escala locomotora desenvolvida por Tarlov et al. (1953). Os dados obtidos mostraram que a escala é válida e é uma medida preditiva da recuperação motora. Ela é capaz de distinguir resultados comportamentais devidos às diferentes lesões e de prever alterações anatômicas no centro da lesão. Os testes inter-ratos indicaram que examinadores com experiência na sua aplicação conseguem aplicá-la consistentemente e obter resultados similares. Esta nova escala, chamada BBB (Basso, Beattie e Bresnahan), oferece aos avaliadores uma medida mais discriminatória dos resultados comportamentais para avaliar o tratamento depois da lesão da medula espinal.

Ferreira et al. (2005) demonstraram experimentalmente a padronização da técnica para obtenção do potencial evocado motor em 50 ratos Wistar por meio da estimulação elétrica transcraniana. Concluíram que a técnica para captação do potencial evocado motor apresentada nesse estudo é eficaz na análise da evolução eletrofisiológica da lesão medular, inédita no nosso meio, podendo ser reproduzida de modo simples, com padrões de qualidade e aplicabilidade similares aos observados na literatura científica mundial.

Bolton et al. (2006) caracterizaram as adaptações no padrão da marcha de ratos sem lesão durante a travessia de um plano horizontal (escada disposta na posição horizontal) e as respectivas adaptações das patas para o posicionamento e apoio nos degraus. Foram utilizadas avaliações eletromiográficas e cinemáticas. Os autores observaram que, após uma lesão medular torácica experimental, os animais apresentam um aumento de erros nas pisadas nos degraus e mudanças na estratégia para a realização dos passos.

Marques et al. (2018) investigaram o melhor período para realizar treinamento locomotor em ratos submetidos à lesão medular experimental. Os animais foram divididos em grupos que iniciaram o treinamento locomotor (com

esteira) mais precoce ou mais tardiamente após a lesão medular. Os grupos passaram por avaliação motora funcional com a escala BBB e com o teste do plano horizontal. Também foram realizadas análises morfológicas e bioquímicas de fragmentos da medula espinal. Os resultados demonstraram um intervalo de tempo crítico para o início dos exercícios após a lesão medular. O treinamento locomotor mais tardio após a lesão medular contribuiu para a melhora funcional.

Tamakoshi et al. (2018) conduziram investigação sobre os efeitos de exercícios a curto e longo prazo na recuperação motora de ratos submetidos à lesão experimental intracerebral hemorrágica (por injeção de colagenase). Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, com diferentes protocolos de exercícios. Os grupos foram avaliados por meio de testes comportamentais e passaram por avaliação motora com o teste do plano horizontal. Os resultados mostraram que nos casos em que houve o início precoce dos exercícios após a lesão cerebral hemorrágica, seus benefícios de curto e longo prazo na recuperação funcional motora foram similares.

3.4 Emprego de tratamento pela cateterização/punção do espaço intratecal/intradural – em modelo animal

Bahar et al. (1984) foram os primeiros a relatar a administração e eficaz distribuição de medicações por via intratecal em modelo animal. Demonstraram em ratos Wistar a distribuição central de lidocaína e opióides pelo uso de cateter, por período de até três meses. A eficácia da ação da lidocaína foi comprovada pela anestesia e paralisia dos membros traseiros dos animais; e em doses maiores pela parada respiratória. Os efeitos da morfina ocorreram pela promoção de analgesia na cabeça e nos quatro membros. A análise histológica mostrou que não houve reação da medula espinal ao cateter. Houve formação óssea ao redor do cateter e pequeno infiltrado inflamatório e formação de células gigantes no tecido muscular e subcutâneo.

Horiuchi et al. (2003) testaram a infusão intratecal contínua de SB203580 (inibidor seletivo da enzima p38-MAPK) em ratos submetidos à lesão medular experimental por meio de compressão por peso. Os animais submetidos ao tratamento com SB203580 apresentaram melhores resultados na recuperação motora (capacidade de levantar) e diminuição no número de células apoptóticas, sem degeneração significativa da estrutura de mielina.

Gradert et al. (2003) estudaram a toxicidade da administração intratecal de morfina em ovelhas. Os animais foram divididos em grupos que receberam medicação diariamente ou infusão de solução salina e foram observados por cerca de trinta dias (até o sacrifício) com relação ao desenvolvimento de alterações neurológicas ou comportamentais. A toxicidade da morfina apresentou relação com a dose administrada, sendo que doses mais elevadas causaram o desenvolvimento de massa inflamatória que se prolongou por toda extensão subaracnóide do cateter. Nesses casos, os indivíduos apresentaram déficit motor e alterações histológicas.

Johansen et al. (2004) dividiram ovelhas em cinco grupos que recebiam: 1,5, 3, 6 ou 12 mg/dia de solução de hidromorfona, além de grupo controle que recebia solução salina. Cada grupo era composto por três animais e todos os indivíduos foram implantados com bombas de infusão e cateteres intratecais para a administração das soluções. Os animais foram avaliados com relação à função motora e alterações histológicas. As alterações motoras foram proporcionais à dose medicamentosa empregada, mas a hidromorfona não foi associada à formação de massa inflamatória. Essa medicação mostrou-se uma alternativa segura para infusão contínua intratecal de analgésico.

Miyazato et al. (2005) avaliaram a influência da administração intratecal de glicina e da dieta rica em glicina em ratos com lesão medular completa experimental. A glicina, tanto em sua forma intratecal como na dieta, causou inibição da atividade da bexiga e da uretra, além de melhorar a hiperreflexia do músculo detrusor e a dissinergia detrusor-esfíncter.

Yoshiyama e Groat (2008) administraram adenilato ciclase pituitária ativadora de polipeptídeo-38 (PACAP-38) de forma intratecal em ratos Sprague-Dawley fêmeas submetidos à lesão medular experimental. Os animais com lesão medular foram divididos naqueles com transecção experimental dos nervos hipogástricos e naqueles com nervos intactos. Em ambos os grupos experimentais, após a lesão medular, a PACAP-38 ativou circuitos espinhais para facilitar a resposta das vias parassimpáticas na bexiga urinária e eliminar a exacerbação das vias simpáticas neste órgão.

Roh et al. (2010) examinaram o efeito da carbenoxolona (CARB) (que possui efeitos anti-inflamatórios e citoprotetores) administrada de forma intratecal em ratos submetidos à lesão medular experimental. Os efeitos da medicação foram avaliados em dois períodos temporais (fases) após a lesão medular: fase de indução, que ocorre de 0 a 5 dias; e fase de manutenção, que ocorre de 15 a 20 dias. A CARB atenuou o desenvolvimento de hiperalgesia térmica bilateral e alodínea mecânica nos animais durante a fase de indução. Ratos tratados com CARB também tiveram diminuição dos marcadores inflamatórios encontrados no exame imunohistoquímico, quando comparados a ratos tratados com solução inerte.

Mothe et al. (2011) investigaram a disseminação e distribuição de células tronco/progenitoras neurais (CTPN) e de células estromais do mesênquima de medula óssea (CEMMO) administradas por via intratecal em ratos. As células CTPN ou CEMMO foram transplantadas por meio de punção lombar a animais submetidos à lesão medular (LM) torácica experimental (por compressão) ou a animais controle sem lesão. O transplante foi realizado uma semana após a LM e os ratos foram sacrificados com 3, 17 ou 27 dias após o transplante. Após 4 semanas, por meio de análise imunohistoquímica, os pesquisadores encontraram mais células CTPN no local anatômico da lesão comparativamente às células CEMMO. Concluíram que a punção lombar é um método minimamente invasivo de transplante que produz ampla disseminação de células no espaço subaracnóide da medula espinhal.

Hama e Sagen (2012) realizaram lesão medular (LM) experimental em ratos, causando uma duradoura hipersensibilidade a estímulos cutâneos abaixo do nível da lesão, que é condição similar à clínica de LM. Três semanas após a LM, cada animal recebeu um cateter intratecal na região cervical alta (conforme descrição da técnica de **Yaksh e Rudy, 1976**). A administração intratecal combinada de agonistas dos receptores gama-amino-butilato (GABA) e antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) mostrou sinergismo e levou à significativa antinocicepção. Os autores postulam que a combinação de tratamentos medicamentosos pode ser uma abordagem de tratamento útil no controle da dor neuropática associada à LM.

Schira et al. (2012) avaliaram a recuperação de ratos submetidos à lesão medular (LM) parcial (hemisseção dorsal) padronizada após a injeção intratecal de células-tronco somáticas humanas (CTSH) bem caracterizadas e definidas. As CTSH foram injetadas logo após a LM, por tubos capilares colocados 2 mm caudal e 2 mm cranial ao local anatômico da lesão. Os animais que receberam as CTSH foram imunossuprimidos antes e depois do transplante. Os ratos foram avaliados quanto à marcação de axônios rostrais à LM; por meio da preparação dos tecidos e procedimentos histológicos; pela quantificação axonal; pela avaliação da área de lesão e tecido poupado; pela análise comportamental com o teste BBB, com o teste da escada no plano horizontal e com a marcha na passarela. O transplante de CTSH mostrou migração de fator-dirigido de crescimento de hepatócito dentro da área lesada, redução do tamanho da lesão com aumento de área tecidual poupada, aumento do crescimento axonal e melhora locomotora funcional significativa.

Cheng et al. (2012) estudaram a lesão medular (LM) contusa padronizada torácica em ratos. Os animais foram divididos em quatro grupos de 6 indivíduos cada (após condução de análise de poder de estudo). Os grupos 1 e 2 foram submetidos à LM, sendo que logo após a lesão somente um desses dois grupos recebeu injeção subdural de células-tronco neurais humanas (CTNh), enquanto o outro grupo recebeu apenas solução veículo. Os grupos 3 e 4 receberam injeção intratecal lombar (caudal ao local anatômico da LM) com administração

de células-tronco neurais humanas (CTNh) somente para um dos grupos, enquanto o outro grupo recebeu apenas solução veículo. Os ratos foram submetidos ao teste locomotor funcional BBB após 48h da injeção intratecal e depois, semanalmente, até completar 6 semanas. Após o sacrifício dos animais, amostras do tecido medular foram submetidas à análise com anticorpos antinúcleo humanos (imunofluorescência) para detectar a presença de CTNh. O estudo concluiu que o transplante agudo de CTNh em ratos submetidos à LM levou à significativa recuperação funcional.

Tian et al. (2013) dividiram os animais de experimentação (ratos) em quatro grupos: sham, que passou somente por laminectomia; controle, que foi submetido à lesão medular (LM) e tratamento com solução salina; grupo com 10 mg/kg de epigallocatequina-3-galato (EGCG) administrada por injeção subaracnóide, associada à LM; e grupo com 20 mg/kg de EGCG administrada por injeção subaracnóide, associada à LM. As soluções salinas contendo ou não EGCG foram dadas por punção na região lombar (através de uma segunda laminectomia, diferente da torácica) logo após a LM. Testes neuro-motores de campo aberto, utilizando a escala BBB, e teste com plano inclinado foram realizados pré-operatoriamente, um e três dias após a LM e depois semanalmente, por 04 semanas, até o sacrifício dos animais. Após o sacrifício foram coletadas amostras teciduais medulares para testes imunohistoquímicos e análise Western Blot. O estudo mostrou que a administração de EGCG intratecal pode: reduzir significativamente a perda de mielina, melhorar a expressão de fatores neurotróficos, proteger a célula da apoptose e aumentar a recuperação funcional.

Feng et al. (2014) avaliaram o efeito antinociceptivo da rapamicina (medicação indutora de autofagia) em ratos. Os animais receberam a implantação de cateter intratecal na região lombar e foram divididos nos seguintes grupos: sham; ligadura experimental do nervo espinhal L5 (LNE); LNE associada à administração de solução veículo; LNE associada à administração de rapamicina. Os grupos experimentais foram submetidos à avaliação comportamental por meio de pesquisa de alodínea mecânica e hiperalgesia

térmica. Após serem sacrificados, os ratos tiveram espécimes teciduais coletadas para análise por Western Blot, imunohistoquímica, exame microscópico e reação de PCR. A conclusão do estudo mostrou que a autofagia foi inibida na microglia espinhal após a LNE. Contudo, o tratamento com rapamicina: aumentou significativamente a autofagia; inibiu a produção de IL-1 β ; melhorou a alodínea mecânica e hiperalgesia térmica induzidas. Medicamentos indutores de autofagia podem representar uma alternativa no tratamento da dor neuropática.

Chen et al. (2015) investigaram os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da curcumina em relação à dor artrítica de ratos. Monoartrite (MA) foi induzida nos animais pela administração intra-articular de adjuvante completo de Freund (ACF). Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: tratamento com curcumina oral, pré-administração de ACF, que causou atenuação da alodínea mecânica e hiperalgesia térmica; tratamento com curcumina oral, após a administração de ACF, que causou reversão da alodínea mecânica e hiperalgesia térmica; tratamento com curcumina intratecal (IT), após a administração de ACF, que causou reversão da alodínea mecânica e hiperalgesia ao calor. O surgimento de MA induziu a ativação de células da glia e aumento de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal. A injeção de curcumina intratecal (IT) diminuiu a ativação de células da glia e a presença de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal induzidas pelo ACF.

Kim et al. (2015) estudaram em modelo animal de ratos submetidos à lesão medular (LM) experimental padronizada (por compressão tecidual) os efeitos da substância P (SP) sobre as células tronco/progenitoras neurais derivadas da medula espinhal (CTPN-ME). A SP foi injetada nos animais de modo intratecal (através de cateter colocado na coluna lombar), continuamente por sete dias até o sacrifício. Os efeitos da SP sobre as CTPN-ME foram avaliados tanto in vitro quanto in vivo (animais com e sem LM). A administração da SP levou à proliferação das CTPN-ME in vitro e nas medulas de ratos normais e com LM. Estes achados foram comprovados por meio de testes

imonohistoquímicos de amostras teciduais de medula espinhal e análise por Western blot das proteínas celulares.

Martini et al. (2016) tiveram por objetivo investigar as mudanças na expressão de três proteínas-quinase ativadas por mitógeno após a lesão medular (LM) e o papel da quinase c-jun-NH2-terminal (QJN) na deficiência motora após a lesão. Os experimentos foram conduzidos com ratos submetidos à LM experimental padronizada (uso de balão e compressão) da coluna torácica. Para testar o grau de distúrbios motores causados pela LM, os animais foram avaliados pela escala motora BBB. Também foram realizados os seguintes testes com amostras da medula espinhal dos indivíduos: análise histológica; medida da infiltração neutrofílica pela atividade da mieloperoxidase; análise por Western blot; ensaio TUNEL; medida da área lesada (coloração por hematoxilina e eosina). Os autores demonstraram que pela administração intratecal (através de agulha lombar) de inibidor da QJN após a LM houve diminuição da neurodegeneração espinhal e da perda de função locomotora dos ratos.

Gao et al. (2016) estudaram os efeitos de anticorpos anti-fibroblasto fator-2 de crescimento (FFC-2) sobre a alodínea mecânica e a ativação de astrócitos da medula espinhal de modelo animal de dor neuropática. A dor neuropática foi induzida pela lesão parcial do nervo ciático (lesão de nervo poupado) de ratos. Após a administração intratecal de anticorpos FFC-2 foram realizados os seguintes testes: limiar mecânico de retirada da pata, imunofluorescência, ELISA. Concluiu-se que os anticorpos FFC-2 administrados de forma intratecal tiveram efeito analgésico sobre a dor neuropática e diminuíram a expressão de proteínas inflamatórias (fator de necrose tumoral α ; e interleucina-6) em modelo animal.

Cheng et al. (2016) avaliaram se a injeção intratecal de células tronco neurais humanas (CTNh) no local anatômico da lesão medular (LM) crônica ou em região distal à LM (região lombar) tem efeito funcional diferente na recuperação do modelo animal. Os ratos foram avaliados pela escala motora funcional BBB e foram submetidos a imagens de bioluminescência in vivo para

pesquisa de CTNh. Os autores concluíram que, após 28 dias da LM, apenas o transplante de CTNh realizado distalmente à LM levou à recuperação funcional significativa.

Murai et al. (2017) testaram o envolvimento do receptor 5 de ácido lisofosfatídico (ALF-5) na sinalização de dor na medula espinhal de camundongos e ratos. Dor neuropática foi provocada nos roedores pela ligadura do nervo ciático (cirurgia com lesão por constrição crônica) ou por administração intratecal de medicações sensibilizadoras para dor e indutoras de alodínia. Por meio de testes bioquímicos e funcionais, os pesquisadores demonstraram que o uso de antagonistas do ALF-5 desencadeia amplos efeitos analgésicos tanto na dor neuropática quanto na dor inflamatória.

Cheng et al. (2017) já haviam demonstrado a recuperação funcional de ratos submetidos à lesão medular (LM) após o transplante agudo de células-tronco neurais humanas (CTNh). Neste estudo administraram de forma intratecal as CTNh para os animais nos seguintes períodos temporais: imediatamente após a LM; uma semana após a LM; ou quatro semanas após a LM. Para realizar a avaliação funcional foi empregada a escala motora BBB. Os autores mostraram que o transplante intratecal distal (região lombar) de CTNh em ratos submetidos à LM torácica experimental levou à significativa recuperação funcional nas três fases temporais avaliadas: aguda, subaguda e crônica. Contudo, os maiores ganhos foram observados na fase subaguda (uma semana após a LM).

Mamet et al. (2017) analisaram a toxicologia e formulação da medicação AYX1, que é um oligonucleotídeo desenvolvido para reduzir a dor aguda pós-cirúrgica e prevenir sua cronificação em administração intratecal única perioperatória. Foram utilizados ratos com o modelo de lesão de nervo poupado. Não foram observados efeitos adversos relacionados à AYX1 e a não detecção de um nível de efeito adverso foi considerada pela máxima dose possível de injeção da medicação.

Ozkunt et al. (2017) estudaram a expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP)- β e da proteína acídica fibrilar glial (PAFG), que são marcadores de recuperação neurológica em ratos submetidos à lesão medular (LM) contusa experimental. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, que receberam no local da contusão medular, de forma intratecal, as seguintes infusões: grupo 1 solução salina; grupo 2 eritropoetina (EPO); grupo 3 metilprednisolona (MP). Após a LM, os indivíduos tiveram sua função neurológica motora avaliada pela escala motora BBB. Após a eutanásia dos animais, amostras teciduais foram submetidas a ensaio imunohistoquímico e avaliação histológica para detecção de FCDP- β e de PAFG. Neste estudo, a EPO mostrou maior aumento na expressão de FCDP- β em comparação com a MP, portanto também produziu melhores resultados na função motora comparativamente.

Pakulska et al. (2017) realizaram estudo com modelo experimental animal de lesão medular (LM) por contusão. Os autores analisaram a hipótese de que o emprego intratecal local de condroitinase ABC (ChABC) associada ou não ao fator 1α derivado de células estromais (FDE) promoveria reparo tecidual e funcional da medula. Pela ação da condroitinase ocorre degradação da cicatriz glial, combinada com o recrutamento de células endógenas neurais precursoras através do FDE. Ratos foram divididos em quatro grupos: ChABC + FDE; ChABC isolada; FDE isolado; solução veículo apenas. Os grupos que receberam ChABC isoladamente ou em combinação com FDE foram os que apresentaram os melhores resultados funcionais motores e histológicos. Nesta pesquisa, portanto, o reparo funcional e tecidual foi atribuído à ChABC.

Rong et al. (2017) fizeram experimento com modelo animal de lesão medular (LM) padronizada por compressão. Os autores do trabalho realizaram a LM na coluna torácica dos ratos e infundiram de forma intratecal, na região lombar, a substância dexmedetomidina (DEX). A DEX, agonista seletiva do $\alpha 2$ -adrenoceptor, tem propriedades neuroprotetoras. Neste estudo foi mostrado que a administração intratecal de DEX antes da LM foi responsável por melhorar a recuperação motora funcional (avaliada pelo teste BBB) nos dias subsequentes

à lesão, bem como causou a efetiva atenuação da inflamação e apoptose neuronal na medula espinhal (avaliações por imunohistoquímica, PCR, Western Blot e ensaio imunoenzimático).

Kanekiyo et al. (2018) investigaram a liberação de fatores neurotróficos eficientes no tratamento da lesão medular (LM) por células estromais da medula óssea (CEMO) administradas por via intratecal a ratos. Os animais sofreram LM experimental padronizada por compressão e receberam a infusão de CEMO por duas semanas. O exame motor realizado pela escala BBB mostrou melhora significativa nos indivíduos que receberam CEMO quando comparado ao grupo controle. O exame histológico também revelou melhora do reparo tecidual, incluindo regeneração axonal, o que significa que as CEMO estimularam a habilidade intrínseca de regeneração da medula espinhal.

Führmann et al. (2018) avaliaram os efeitos da administração intratecal de células neuroepiteliais derivadas de células tronco pluripotentes induzidas humanas (CNECT) e condroitinase ABC (cABC) em modelo animal de lesão medular (LM) padronizada. Os ratos foram divididos em cinco grupos: CNECT + cABC; apenas CNECT; apenas cABC; solução veículo; somente LM. As injeções intratecais foram feitas imediatamente após a LM (local da lesão) e depois com sete dias da lesão (1 mm rostral e 1 mm caudal à lesão). Os animais foram sacrificados com duas e nove semanas pós LM. Os autores concluíram que a administração de CNECT resultou em volume reduzido da lesão medular pela migração celular, deste modo promovendo reparo tecidual. Também observaram que a injeção combinada de CNECT e cABC promoveu uma porcentagem maior de neurônios com nove semanas após a LM do que o transplante isolado de CNECT. Não foi observado nenhum ganho funcional (teste motor BBB e teste do plano horizontal) após as injeções.

Hosseini et al. (2020) analisaram os efeitos da administração simultânea de muscimol (agonista GABA) e endomorfina-1, por injeção intratecal, em ratos submetidos à lesão medular torácica experimental. As drogas foram injetadas de forma intradural no segmento L5-L6 lombar. Os animais foram submetidos a

estudos comportamentais; escala BBB; teste de monofilamentos de Von Frey; teste de Acetona; teste de pressão sobre a pata; estudos histológicos; estudos bioquímicos; Western blotting; avaliação de stress oxidativo; medida de superóxido dismutase; medida de glutathione; medida de malondialdeído. A conclusão do estudo foi de que a administração simultânea dos fármacos pode ser uma nova terapia candidata para o alívio da dor resultante da lesão da medula espinal.

3.5 Emprego de tratamento pela cateterização/punção do espaço intratecal/intradural – em humanos

Protopapas et al. (2007) fazem um relato de caso clínico em que um indivíduo do sexo masculino recebeu a implantação de uma bomba intratecal de morfina e baclofeno para controlar a dor e diminuir a espasticidade após lesão medular cervical. Durante o tratamento houve deslocamento do cateter e formação de cicatriz epidural. O deslocamento do cateter e formação de cicatriz fibrosa podem ocasionar a diminuição da eficácia do tratamento intratecal.

Schubert et al. (2011) apresentaram a descrição de dois casos clínicos em que a videografia com emprego de indocianina verde intradural auxiliou na identificação e no tratamento de lesões intramedulares na coluna. A administração intratecal da medicação e videografia mostraram-se capazes de aumentar a segurança na identificação e ressecção dessas lesões.

Ughratdar et al. (2012) relataram uma série de pacientes (crianças), a maioria com diagnóstico de paralisia cerebral e grave escoliose, em que foi realizada a implantação de cateter intratecal para administração de baclofeno por bomba. Os pacientes tinham previamente aumento da espasticidade e alguns haviam passado por cirurgia para correção de escoliose, enquanto outros não. Os autores concluíram que a implantação deste cateter intratecal por via

cervical (entre C7 e T1) é segura, factível e deve ser considerada em se tratando de crianças com escoliose, como forma de evitar a punção na região lombar.

Chotivichit et al. (2015) relataram um caso clínico de um paciente com lesão medular parcial crônica (ocorrida havia 54 meses) na região cervical submetido ao transplante de células tronco mesenquimais (CTM) autólogas. As CTM foram injetadas no espaço intratecal lombar (entre L4-L5), sendo que metade dessas células cultivadas foi marcada com nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas. Estudos de ressonância magnética foram realizados imediatamente após o transplante, com 48 horas, duas semanas, um mês e sete meses após o transplante. A injeção de CTM na coluna lombar foi capaz de levar as células até a medula cervical lesionada, mas não ocorreu nenhuma melhora clínica da função neurológica.

Sang et al. (2016) avaliaram em teste clínico de fase 1ª os efeitos de substância análoga à neurotensina A (CGX-1160) em quatro pacientes internados com sintomas de dor neuropática, havia pelo menos seis meses, associada à lesão medular (LM). A medicação foi administrada de forma intratecal através de punção lombar e colocação de cateter. A CGX-1160 foi bem tolerada quando administrada em doses de até 1000 µg/h.

Kucher et al. (2018) promoveram estudo pioneiro na avaliação dos efeitos da injeção intratecal de anticorpos anti-Nogo-A (substância neutralizadora dos fatores inibitórios do crescimento de neuritos do sistema nervoso central) em um grupo de 52 pacientes com lesão medular (LM) aguda. Os pacientes com paraplegia ou tetraplegia completa pós-traumática iniciaram o tratamento entre 4 e 60 dias após a LM. Os objetivos primários do estudo foram avaliar: viabilidade; segurança aguda; tolerabilidade; e dosagem sérica e líquórica dos anticorpos administrados. Os objetivos secundários foram medir: a resposta imune aos anticorpos e investigar um potencial sinal de eficácia precoce com melhora de pontuação na escala neurológica e dos resultados de testes de condução nervosa através da neurofisiologia. Os autores demonstraram que a administração de anticorpos foi bem tolerada e que a administração intratecal,

especialmente através de injeções em bolus, é um modo viável de infundir medicação na LM aguda. Houve pequenos ganhos funcionais dos pacientes ao longo de 12 meses de seguimento, mas em razão da amostra ser muito pequena, eles não podem ser necessariamente atribuídos à administração dos anticorpos, pois ganhos espontâneos são observados ao longo do tempo.

Szczepanik et al. (2020) avaliaram a eficácia e a segurança do tratamento intratecal com células autólogas regenerativas derivadas do tecido adiposo, em 6 indivíduos (crianças e adolescentes) com epilepsia autoimune refratária. As injeções intratecais foram realizadas por três vezes a cada três meses, para cada paciente, na coluna lombar. Durante 12 meses foram monitorados status neurológico, função cognitiva, ressonância magnética do cérebro e efeitos antiepilépticos. Como resultado os pesquisadores concluíram que a terapia parece ser segura e viável. Eles encontraram eficácia antiepiléptica variada, contudo algumas habilidades melhoraram em todas as crianças.

4. MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Local de execução

Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LETRAN – IOT - FMUSP).

4.2 Ética

Este protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – HC-FMUSP) (**Anexo A**).

4.3 Animais de experimentação

Foram selecionados 48 ratos, de modo a compor 8 indivíduos por grupo, número semelhante ao de estudos prévios (**Bahar et al., 1984; Yoshiyama; Groat, 2008; Amemori et al., 2015**), da raça Wistar machos oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com idade média de 20 semanas de vida e com peso entre 340g e 450g, todos de um

único fornecedor. Os ratos foram mantidos em gaiolas (40 x 60 cm) acondicionadas em estantes metabólicas com controle de temperatura, filtragem de ar e umidade, individualmente para evitar dominância entre machos (o que pode causar lesões dos animais), com fornecimento de água filtrada e ração *ad libitum*.

Foram adotados os seguintes critérios:

a) Critérios de inclusão:

Ratos da raça Wistar;
Machos adultos jovens;
Peso entre 340 g e 450 g inclusive;
Condição geral boa;
Motricidade inicial normal.

b) Critérios de exclusão:

Óbito após lesão medular experimental;
Infecção persistente após 10 dias de tratamento com antibioticoterapia;
Anomalias observadas macroscopicamente da região medular;
Autofagia ou mutilação;
Perda maior que 10% do peso corporal após a lesão.

4.4 Formação dos grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, com 8 animais cada:

- a) Grupo 1: Foi realizada laminectomia + introdução de cateter intradural;
- b) Grupo 2: Foi realizada laminectomia + introdução de cateter intradural + infusão de 0,1 ml de Solução Fisiológica;
- c) Grupo 3: Foi realizada laminectomia + contusão medular de 12,5 mm com NYU Impactor;
- d) Grupo 4: Foi realizada laminectomia + contusão medular de 12,5 mm com NYU Impactor + introdução de cateter intradural;
- e) Grupo 5: Foi realizada laminectomia + contusão medular de 12,5 mm com NYU Impactor + introdução de cateter intradural + infusão de 0,1 ml de Solução Fisiológica;
- f) Grupo 6: grupo controle (sham) em que foi realizada somente laminectomia no mesmo nível anatômico dos outros grupos.

Os grupos foram acompanhados por 6 semanas.

4.5 Modelo experimental de lesão medular

4.5.1 Protocolo de anestesia

Para a realização da lesão medular, os animais foram submetidos a injeção subcutânea de cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg e Pentabiótico na dose de 24.000 UI/Kg (**Grimm et al., 2015**).

Com o uso de uma caixa de acrílico, os animais foram induzidos à anestesia com isoflurano (1.5–2.0 vols.%) em 100% de oxigênio (**Figura 1**).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 1 - Indução anestésica de rato com o uso de uma caixa de acrílico e isoflurano (1.5–2.0 vols.%)

Após sedação leve, uma máscara foi colocada para cobrir todo o focinho do animal, obtendo-se um plano anestésico mais profundo. Na sequência, realizou-se a tricotomia e a limpeza da região dorsal (**Figura 2**).



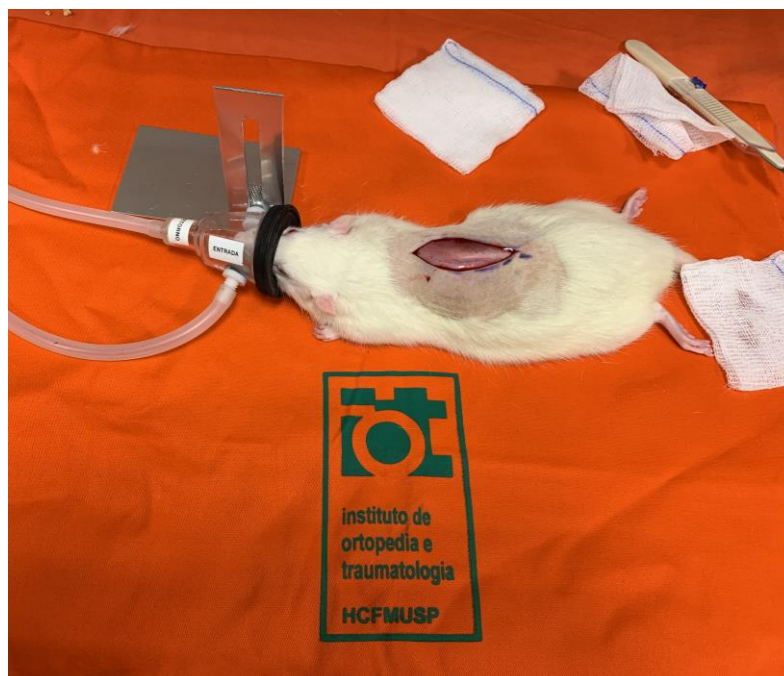
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 2 - Máscara cobrindo todo o focinho do animal, obtendo-se um plano anestésico mais profundo. Realização da tricotomia e da limpeza da região dorsal

O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda e patas traseiras (Santos et al., 2011).

4.5.2 Lesão medular

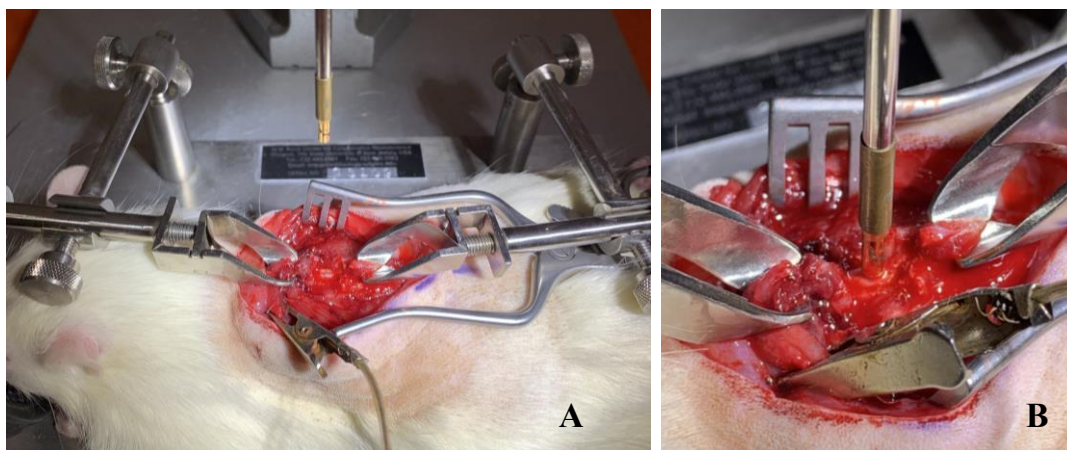
As lesões medulares foram feitas utilizando-se o NYU Impactor (New York University, 1993; Rodrigues et al., 2010; Santos et al., 2011) com queda do peso de 10 g de uma altura de 12,5 mm (lesão leve) em todos os ratos. Para tanto, foi feita uma laminectomia que expôs a medula espinhal de forma padronizada. Na linha média dorsal realizou-se uma incisão na pele para se expor T8 - T12 (Figura 3).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

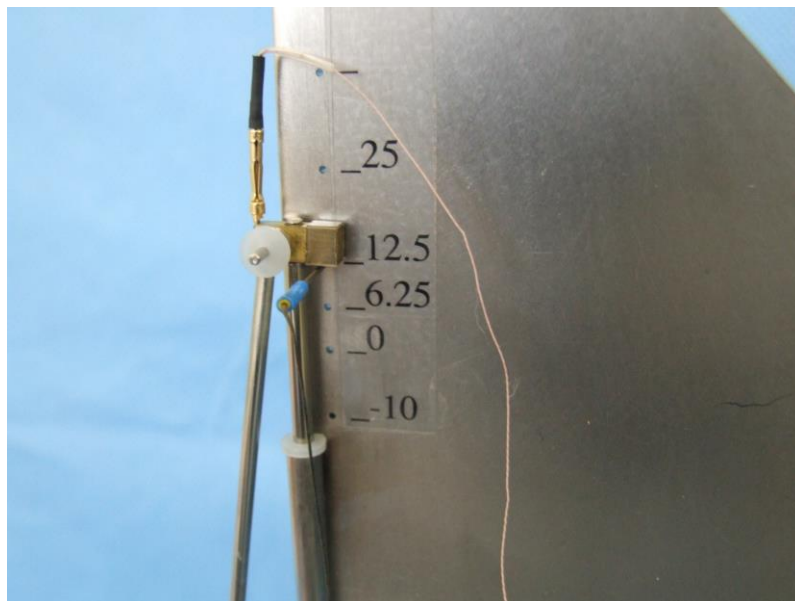
Figura 3 - Incisão da pele na linha média dorsal

Os músculos nos processos espinhosos de T10 –T11 foram afastados. Em caso de hemorragia foi utilizado um coagulador bipolar. Com um alicate removeram-se as lâminas e processos espinhosos de T9 e T10 começando pela borda caudal de T10 e retiraram-se pequenos fragmentos ao longo da lâmina de T10, com o alicate orientado cranialmente até T9. O processo espinhoso de T8 e a medula foram mantidos intactos. A abertura da lâmina foi a suficiente para acomodar a cabeça da haste de impacto do dispositivo e lesão, portanto possuía mais do que 2 mm de comprimento (Tian et al., 2013).



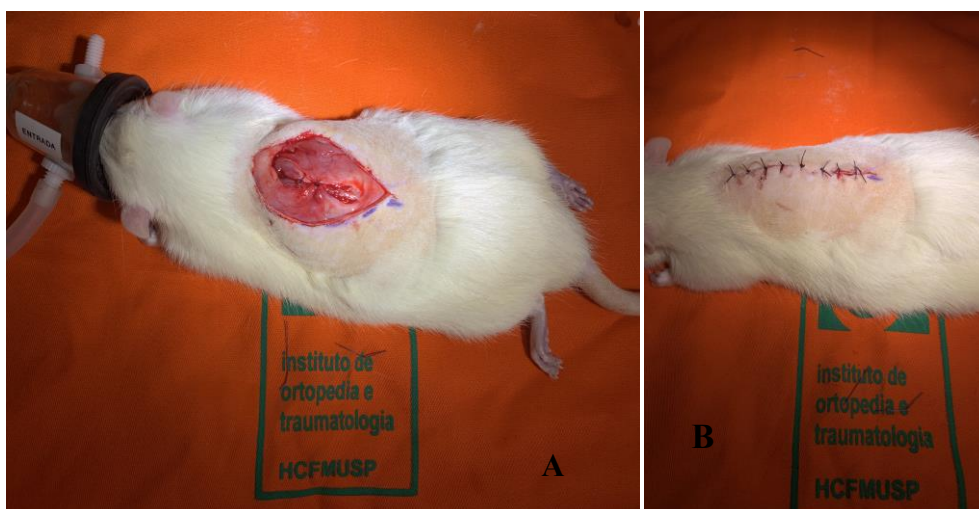
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 4 - A) exposição da medula após a dissecção muscular, afastamento e laminectomia da coluna torácica. B) cabeça da haste de impacto do dispositivo acomodada na região da laminectomia



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 5 - Posicionamento do peso na altura de 12,5 mm para a produção de lesão medular padronizada leve



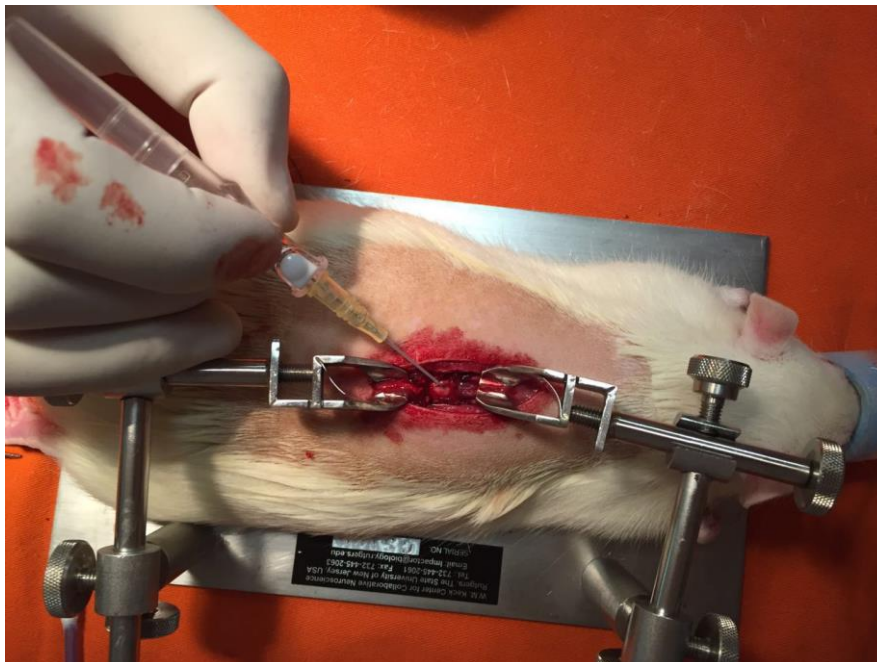
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 6 - Aproximação dos tecidos musculares e fechamento da pele após o término da lesão medular experimental

4.5.3 Protocolo de punção e injeção intradural

Com os ratos ainda anestesiados, após a lesão medular experimental, e com a região da laminectomia torácica ainda exposta, os animais dos grupos 1, 2, 4 e 5 foram submetidos à punção intradural e introdução de cateter intratecal.

A punção do saco dural foi realizada no local da contusão medular experimental, no centro da laminectomia feita. Para a punção foi utilizado o conjunto de agulha e cateter intravenoso periférico da empresa B. Braun (códigos Introcán® Safety™: 4251601-04). A agulha tinha tamanho (calibre) de 24G; e o cateter tinha comprimento de $\frac{3}{4}$ (três quartos) de polegada equivalente a 19 mm, com diâmetro de 0.7 mm; a vazão do cateter era de 22 ml/minuto ou 1320 ml/hora.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 7 - Punção do saco dural no centro da laminectomia, no local da contusão medular experimental

Após a realização da punção com a agulha, esta foi cuidadosamente recuada (retirada do saco dural) e com cautela foi introduzido o cateter de forma intradural por cerca de 5 mm dentro do espaço intratecal. Após confirmada a segurança do posicionamento do cateter, foi realizada a injeção intratecal de 0,1 ml de solução salina nos grupos experimentais 2 e 5.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 8 - Retirada da agulha e introdução intratecal do cateter em cerca de 5 mm de comprimento

Nos grupos 1, 2, 4 e 5 o cateter foi retirado após a sua introdução e observou-se nesse momento a regularidade e fechamento do defeito produzido no saco dural e a eventual saída de líquido pelo orifício de punção.

4.6 Protocolo pós-operatório

Após a limpeza da cicatriz cirúrgica, foi aplicada uma camada da pomada Fibrase (associação de fibrinolisa, desoxirribonuclease, cloranfenicol). Os animais foram submetidos à antibioticoprofilaxia para prevenir e/ou reduzir a infecção na ferida cirúrgica e nas vias urinárias. Administrou-se, intraperitonealmente, cefazolina sódica (antibiótico), com dose de 5 mg/kg, imediatamente após a lesão e uma vez ao dia durante os três dias seguintes. Caso a infecção persistisse, o uso do antibiótico era prolongado. Ração e água foram oferecidas logo que o animal ficou totalmente acordado.

Após a cirurgia, foram ministrados aos ratos cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg a cada 8 horas durante 5 dias, pentabiótico na dose 24.000 UI/kg a cada 12 horas durante 7 dias, meloxicam na dose 5 mg/kg 1 x ao dia durante 3 dias (**Flecknell, 2018**), para alívio da dor. Esses medicamentos também foram administrados aos animais do grupo controle, pelo mesmo período, para que não houvesse viés nas avaliações comportamentais.

Após a lesão medular, os animais perderam o reflexo de urinar, sendo necessário realizar o esvaziamento da bexiga. Este procedimento foi realizado por meio de uma manobra manual na região vesical, 2 vezes ao dia durante 5 dias (**Santos et al., 2011; Cristante et al., 2013; Paschon et al., 2019**). O esvaziamento foi realizado até que o animal recuperasse a função de urinar espontaneamente.

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem (40 x 60 cm), sendo mantidos isolados individualmente, nas mesmas condições ambientais (manejo, alimentação *ad libitum*, troca periódica da maravalha e limpeza da gaiola) até o final do experimento (por 42 dias), quando foram submetidos à eutanásia.

Durante o período de avaliação pela escala BBB (**Basso et al., 1995**), os ratos foram observados quanto a mutilações, infecções ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações).

4.7 Protocolo de avaliação da capacidade locomotora pela escala BBB

A recuperação da capacidade locomotora após lesão medular foi medida pela escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) de avaliação funcional (**Basso et al., 1995**). A BBB (**Basso et al., 1995, 1996**) é a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora em ratos com lesão medular em estudos realizados pelo MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study) (**Basso et al., 1995**) e foi adotada pelas instituições que integram o MASCIS e pelo LETRAN. O uso dessa escala foi padronizado em nosso laboratório por **Santos et al. em 2011**. Trata-se de uma escala de avaliação da recuperação locomotora em ratos com lesão medular nos níveis torácicos, baseada em critérios observacionais da movimentação do animal durante a marcha, e que atribui uma pontuação de 0 a 21 para graduar a gravidade de lesão neurológica. A escala BBB de avaliação funcional baseia-se em critérios observacionais específicos, definições simples e não ambíguas dos termos e permite uma rápida e precisa descrição do desempenho locomotor (**Anexos C e D**).

Todos os ratos dos grupos foram avaliados pela escala BBB no 2º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias após a lesão medular.

A avaliação consistiu em colocar o rato no centro de uma caixa de observação de 80 x 80 cm e borda com 17 cm de altura, forrada com um campo cirúrgico azul escuro para maior contraste com a pelagem clara dos ratos durante o período de observação (**Figura 9**).

Avaliou-se a capacidade locomotora do rato. As observações sobre o movimento das articulações da pata posterior (quadril, joelho e tornozelo) de cada lado, a posição do tronco, do abdome, o deslocamento da pata (fase de balanço da marcha) e o modo de contato da pata com o solo, a coordenação, os dedos, o contato e a liberação da pata com o solo, a instabilidade do tronco e a posição relativa da cauda, em relação ao lado direito e esquerdo, foram anotadas em formulário próprio. O formulário, formatado para uso nesta pesquisa, permitiu o registro da identidade, do número de dias após a lesão medular e dos comentários, e facilitou a descrição do movimento e a definição da pontuação.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 9 - Teste BBB em rato experimental

A avaliação de cada rato foi realizada por dois observadores simultaneamente, adequadamente treinados, sem conhecimento do grupo de origem do rato e cegos também quanto às avaliações dos colegas, de maneira a não interferir nos resultados um do outro. Caso houvesse discordância entre as avaliações, decidiu-se pela anotação da menor nota.

Caso o rato, posicionado no centro da caixa, permanecesse imóvel por 15 a 20 segundos, era estimulado a movimentar-se por meio de toques com um lápis. A avaliação da capacidade locomotora do rato durou entre quatro a cinco

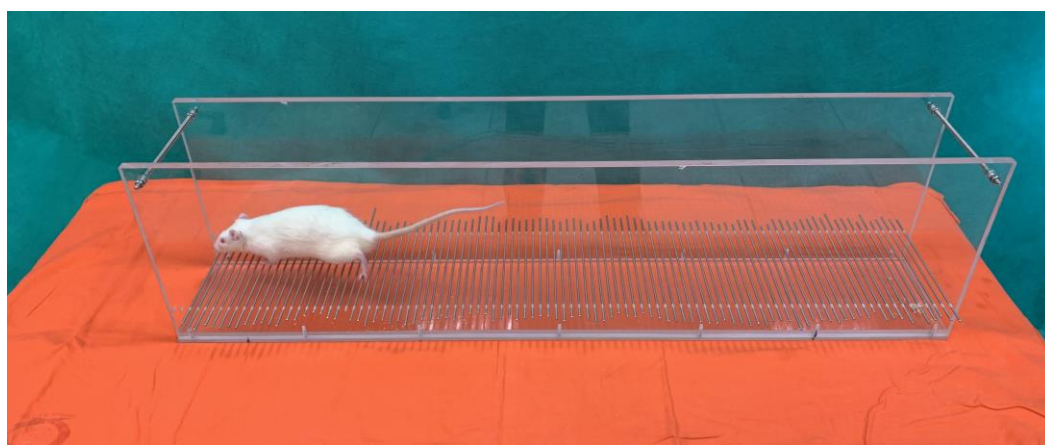
minutos, durante os quais foram anotadas as características do movimento executado, no respectivo formulário.

4.8 Avaliação comportamental sensório motora: plano horizontal

Uma escada horizontal (horizontal ladder) com 100 cm de comprimento, 35 cm de largura, suspensa a 46 cm do chão e com espaço fixo de 1,5 cm entre cada filete de ferro, foi utilizada para avaliar a função proprioceptiva dos animais (**Bolton et al., 2006; Erschbamer et al., 2006; Girgis et al., 2007**). Os animais foram primeiramente treinados a andar na escada por dois dias antes dos experimentos cirúrgicos, sendo necessária atravessá-la cinco vezes (**Figura 10**).

Para auxiliar no aprendizado, os animais foram estimulados com água e açúcar, que eram posicionados nas extremidades da pista.

Na avaliação pós operatória, os animais precisavam andar voluntariamente ao longo da escada e foi realizada a contagem de número de passos total, acertos, escorregadas e erros.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 10 - Treinamento pré-lesão na escada horizontal

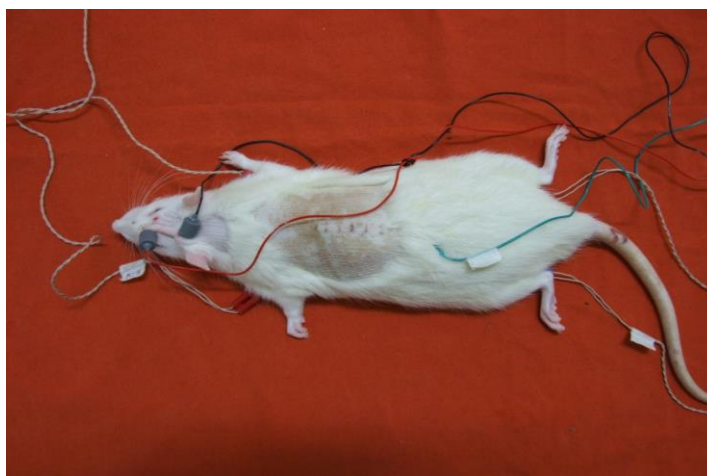
Os acertos consistiam em posicionamentos corretos das patas nos filetes de ferro (**Huot-Lavoie et al., 2019**). Eram consideradas como escorregadas o posicionamento das patas no filete de ferro, seguido da queda das mesmas entre os filetes. Dois tipos de erros foram considerados separadamente, sendo eles: o arrastar de membros posteriores ao longo da escada horizontal e o posicionamento das patas entre os filetes de ferro (**Sedy et al., 2008; Krajacic et al., 2010**). Os valores das três passagens pela escada horizontal foram obtidos para todos os tipos de respostas (acertos e erros) e foi feita a média deles (**Miranda et al., 2012; Marques et al., 2018; Tamakoshi et al., 2018**).

4.9 Análise por potencial evocado motor

No 42º dia pós-lesão, os ratos foram submetidos novamente ao procedimento anestésico com 10 mg/kg de xilazina e 50 mg/kg de quetamina por via intraperitoneal para realização do exame de potencial evocado motor, para registrar os valores de amplitude e latência de resposta nas patas após estímulo elétrico transcraniano (**Ferreira et al., 2005; Santos et al., 2011**).

A captação das respostas musculares foi realizada com o seguinte método: pares de eletrodos de agulha monopolar (captador e referência), com distância inter-eletrodos definida e fixa, são inseridos na musculatura proximal e anterior dos membros dianteiros e traseiros à direita e à esquerda. O eletrodo terra é colocado na região lombar através de um eletrodo de agulha monopolar. A estimulação elétrica transcraniana é realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha tipo saca-rolhas, na cabeça dos ratos, na região frontal (anodo) e occipital (catodo) na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea (**Figura 11**).

Após a colocação dos eletrodos no rato, inicia-se o equipamento e verifica-se a impedância dos eletrodos, para comprovar a boa adaptabilidade deles, a fim de obter respostas mais nítidas, seguras e fidedignas. A calibração do aparelho é feita em dois aspectos da captação das respostas musculares: varredura, janela de 20 ms; sensibilidade, 2 mV/div.; filtro de baixa frequência, 10 Hz, e filtro de alta frequência, 10 kHz, e a estimulação elétrica transcraniana é realizada por meio de estímulo único de 0,2 ms de duração.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 11 - Exame de potencial evocado motor em rato experimental

4.10 Protocolo de eutanásia

Ao final do período de experimentação (após 42 dias), todos os ratos foram submetidos à eutanásia conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (**COBEA, 1991**).

Todos os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca no 42º dia pós-lesão. Antes do procedimento, os animais foram colocados em uma câmara com halotano (5%) para promover uma leve sedação, seguida de dose letal de quetamina e xilazina, intraperitoneal. Além disso, foi administrada dose de 0,05 ml

de heparina sódica (100 UI/ml, pH 6,18) intraperitoneal, para prevenir a formação de coágulos. Apenas após a observação de anestesia profunda, por meio de fortes pinçadas na cauda, patas e esterno, sem que se observasse qualquer reação do animal, a perfusão foi iniciada. Em casos de demonstração de qualquer sensibilidade, foram aguardados aproximadamente cinco minutos e, caso a resposta persistisse, dose adicional de anestésico era aplicada e o procedimento, repetido.

O tórax foi aberto com tesoura de pontas arredondadas e uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo. Com uma tesoura pontiaguda, realizou-se leve corte no átrio direito e o animal foi então perfundido com solução tampão fosfato 0,2 M a 36 °C em pH 7,4 (necessária para remover o sangue, preservando ao máximo a estrutura dos vasos sanguíneos), seguido de solução de paraformaldeído (PFA) tamponado a 4%, em pH 7,4, 100 ml/100 g, (necessário para fixação das estruturas a serem coletadas).

Os animais foram submetidos à morte indolor induzida com tiopental, 65 mg/100 g, e cloreto de potássio por via endovenosa.

4.11 Exame necroscópico e anatomopatológico

O exame necroscópico dos ratos foi iniciado de modo a permitir a identificação macroscópica de possíveis alterações em relação ao padrão normal. Na inspeção externa, observou-se a presença de possíveis lesões associadas à autofagia ou mutilação.

A inspeção interna foi iniciada com a retirada da coluna vertebral, realizando-se nova incisão dorsal extensa. Após a exposição da coluna, cortou-se, com uma tesoura, um segmento desde TVIII até TXII (segmento de cerca de

2,5 cm, incluindo o foco de lesão). Com um micro saca-bocados, retiraram-se cuidadosamente todas as estruturas ósseas e de partes moles adjacentes à medula até expô-la completamente. Realizou-se avaliação visual macroscópica da medula no local da contusão para se verificar qualquer anomalia (critério de exclusão) (**Figura 12**).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 12 - Avaliação macroscópica da medula

Realizou-se incisão ventral, com toracotomia e laparotomia associadas. Os pulmões foram inspecionados para a identificação de possíveis alterações, como a presença de empiema ou condensação. No abdômen, focalizou-se a inspeção da bexiga, para a identificação de bexiga neurogênica flácida (com aumento importante do volume) ou de alterações sugestivas de infecção (hiperemia e hematúria). Os dados assim coletados foram listados para posterior análise estatística de complicações associadas.

4.12 Descarte das carcaças

As carcaças foram colocadas em sacos plásticos e devidamente identificadas, seguindo apostila de descarte de animais da FMUSP.

4.13 Avaliação histológica

O material da medula seccionada recebido para análise histológica foi previamente fixo linearmente em papel cartão com suas respectivas identificações topográficas. Principalmente onde se observavam os achados macroscópicos de contusão medular, esta era identificada como área “B”, sendo então também designadas as áreas craniais à lesão, como “A”, e as áreas caudais à lesão, como “C”. Depois de identificadas e acondicionadas, as medulas foram fixas em formalina a 10%.

Cada área previamente identificada como “A”, “B” e “C” foi seccionada no plano axial em intervalos de dois milímetros, partindo da área central da lesão. Todos os fragmentos foram submetidos aos processos histológicos que compreendem a desidratação em banhos de álcool, diafanização em xilol e a impregnação por parafina líquida. Cada fragmento foi blocado de forma padronizada em parafina e posteriormente identificado com a topografia do respectivo material.

Os blocos parafinados foram encaminhados para o processo de microtomia (cortes histológicos), no qual se obtêm cortes com cinco micras de espessura, utilizando-se um micrótomo (Leica RM 2055 – elétrico) e lâminas descartáveis.

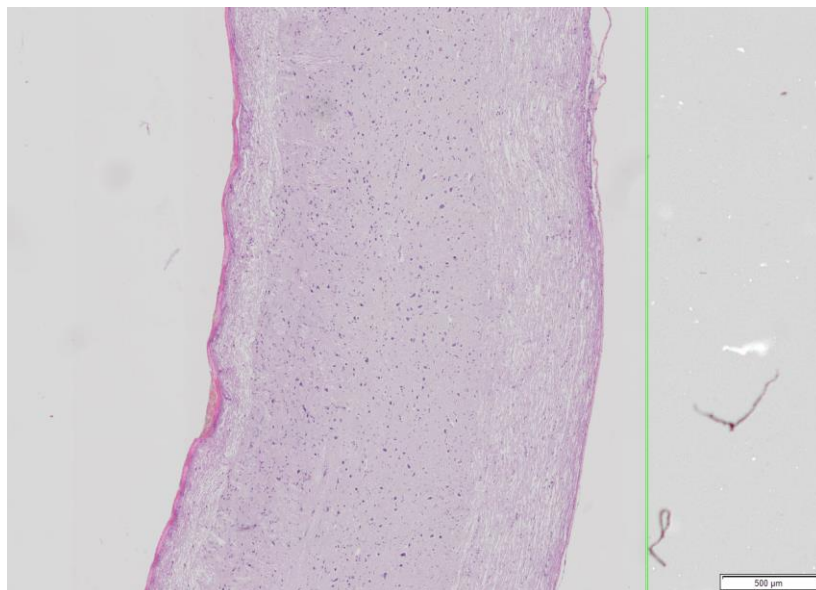
As lâminas de vidro utilizadas no processo receberam previamente um banho de silane, para se obter um melhor resultado na aderência dos materiais à sua superfície.

4.14 Avaliação histológica qualitativa

Cortes transversais e sagitais da medula no epicentro da lesão e regiões adjacentes foram realizados.

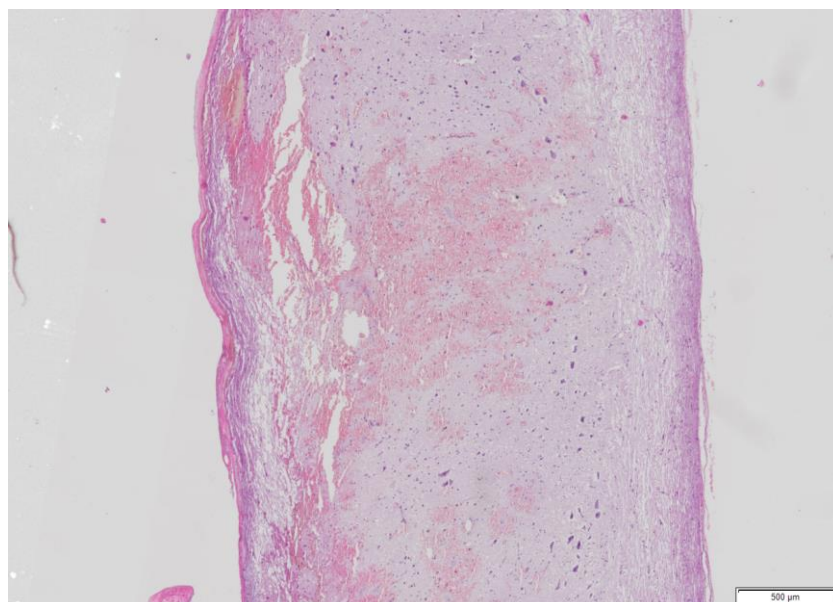
O protocolo para a coloração usada com a hematoxilina e a eosina consistiu no aquecimento dos segmentos cortados da medula espinhal a 45° C por 40 minutos. Em seguida, hidratação dos fragmentos em uma diluição seriada de álcool (100%, 80% e 70%) por 5 minutos cada e lavagem com água destilada por 7 minutos. As amostras foram imersas em solução de hematoxilina por 3 minutos e lavadas em água corrente por 3 minutos. Após essa etapa, as amostras foram coradas com solução de eosina por 7 minutos, e na sequência por lavagem em água corrente por 3 minutos. Finalmente, as secções de medula foram desidratadas e lavadas por duas vezes com xylol, por 5 e por 10 minutos.

Foram observadas as seguintes variáveis: hemorragia; alterações arquiteturais; necrose; infiltrado inflamatório celular. Para cada variável foi atribuída uma nota de 0 a 3 onde 0 é ausente, 1 é discreto, 2 é moderado e 3 é intenso a fim de permitir uma análise estatística (**Figuras 13, 14, 15, 16 e 17**).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 13 - Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 6 do Grupo 1, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico normal, neste caso com hemorragia (0), alterações arquiteturais (0), necrose (0) e infiltrado inflamatório (0). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x



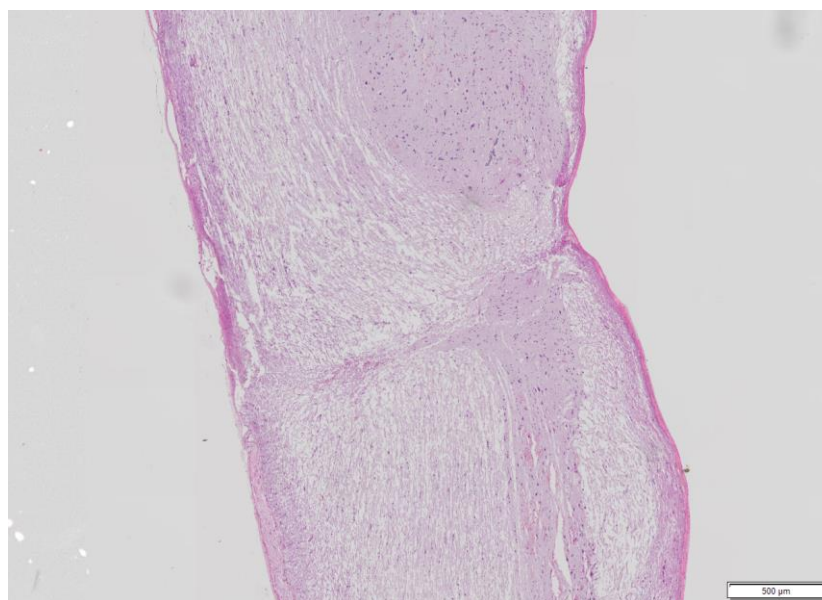
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 14 - Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 6 do Grupo 3, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com alterações arquiteturais difusas, hemorragia (3+), alterações arquiteturais (3+), necrose (3+) e infiltrado inflamatório (3+). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x



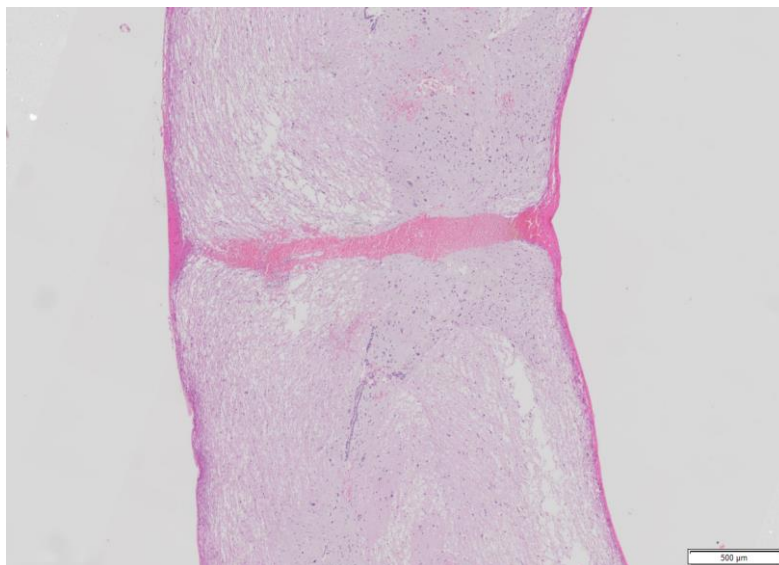
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 15 - Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 6 do Grupo 4, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com quase completa interrupção dos feixes neurais, hemorragia (3+), alterações arquiteturais (3+), necrose (3+) e infiltrado inflamatório (3+). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 16 - Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 7 do Grupo 4, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com quase completa interrupção dos feixes neurais, hemorragia (1+), alterações arquiteturais (3+), necrose (2+) e infiltrado inflamatório (1+). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 17 - Microscopia de corte sagital de fragmento da medula, do animal 8 do Grupo 5, corada por hematoxilina-eosina, mostrando aspecto histológico com quase completa interrupção dos feixes neurais, hemorragia (3+), alterações arquiteturais (3+), necrose (3+) e infiltrado inflamatório (0). Foto realizada no Scanner Olympus, modelo VS120, objetiva de 20x

4.15 Forma de análise de resultados

Para realização deste estudo foram avaliados 6 grupos de ratos, sendo que os grupos variaram entre lesão medular experimental na coluna ou apenas laminectomia, inserção do cateter e infusão de fluido. Os animais foram avaliados com testes motores durante 6 semanas de acompanhamento e conforme alguns parâmetros (histologia e potencial evocado) após o sacrifício (**Anexo E**).

O objetivo do estudo é avaliar diferenças entre os grupos nos parâmetros avaliados e ao longo do acompanhamento, quando aplicável.

Inicialmente, foi realizado um teste t para avaliar se as notas aplicadas (teste motor BBB) e os valores encontrados (potencial evocado) referentes às patas (direita e esquerda) pertencentes a um mesmo rato eram equivalentes. Pelo teste t evidenciou-se que as patas de cada rato apresentaram notas e valores similares. Deste modo, a nota ou valor de cada indivíduo foi incluído como aquele correspondente à média aritmética de suas patas.

As características avaliadas apenas em um momento, potencial evocado e histologia foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) (**Kirkwood; Sterne, 2006**) e comparadas entre os grupos com uso de análises de variâncias (ANOVA), passando na sequência por comparações múltiplas de Bonferroni quando significativas, ou por testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas de Dunn quando significativas (**Neter et al., 1996**).

Os testes motores e o peso dos animais foram descritos segundo grupos ao longo dos momentos de avaliação com uso de medidas resumo e comparados entre os grupos e momentos de avaliação. Para tanto, foram usadas equações de estimação generalizadas (EEG), com distribuição marginal normal e função de ligação identidade (**McCullagh; Nelder, 1989**), com matriz de correlações entre os momentos de avaliação auto-regressiva de primeira ordem. As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni quando significativas para identificar entre quais grupos ou momentos de avaliação ocorreram as diferenças.

As análises foram realizadas com uso do *software* IBM-SPSS for Windows versão 22.0, tabuladas com uso do *software* Microsoft-Excel 2010 e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

Tabela 1 - Descrição dos parâmetros do potencial evocado e da histologia segundo grupos e resultado das comparações

Variável	Grupo						P
	Laminectomia + Cateter	Laminectomia + Cateter + Infusão	Contusão medular	Contusão + Cateter	Contusão + Cateter + Infusão	Laminectomia	
Latência MS	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	0,010
média ± DP	4,85 ± 0,83	3,5 ± 1,11	5,08 ± 1,04	5,09 ± 0,45	4,81 ± 0,69	4,52 ± 0,79	
mediana (mín.; máx.)	4,8 (3,8; 6,3)	3,1 (2,5; 5,65)	4,82 (3,85; 7,05)	5,2 (4,4; 5,55)	4,9 (3,55; 5,55)	4,93 (3,15; 5,25)	
Latência MI	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	<0,001*
média ± DP	7,28 ± 1,15	10,52 ± 1,4	6,88 ± 1,44	8,02 ± 0,68	8,17 ± 1,3	4,14 ± 0,83	
mediana (mín.; máx.)	7,2 (5,7; 8,75)	10,25 (9,05; 12,9)	7,23 (4,35; 8,7)	8 (6,9; 8,8)	8,5 (6,45; 10,1)	4,05 (3,2; 5,6)	
Amplitude MS	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	0,078
média ± DP	3,63 ± 0,42	3,22 ± 0,69	3,8 ± 0,41	3,05 ± 1,25	3,41 ± 0,52	4,22 ± 1,04	
mediana (mín.; máx.)	3,47 (3,1; 4,42)	2,93 (2,41; 4,39)	3,67 (3,39; 4,52)	3,34 (1,61; 4,58)	3,45 (2,5; 4,17)	3,98 (2,84; 5,99)	
Amplitude MI	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	(N = 7)	(N = 7)	(N = 8)	<0,001*
média ± DP	1,15 ± 0,15	0,44 ± 0,09	0,4 ± 0,23	0,21 ± 0,07	0,16 ± 0,05	3,75 ± 0,44	
mediana (mín.; máx.)	1,1 (1; 1,35)	0,46 (0,31; 0,54)	0,28 (0,22; 0,77)	0,19 (0,15; 0,33)	0,15 (0,09; 0,23)	3,74 (2,95; 4,39)	
Hemorragia	(N = 6)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 6)	<0,001*
média ± DP	0,33 ± 0,82	0,5 ± 0,76	2,25 ± 0,89	1,75 ± 1,04	1,13 ± 1,36	0 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 2)	0 (0; 2)	2,5 (1; 3)	1 (1; 3)	0,5 (0; 3)	0 (0; 0)	
Alterações arquiteturais	(N = 6)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 6)	<0,001*
média ± DP	0,67 ± 1,21	0,38 ± 0,52	2,25 ± 0,71	2,5 ± 0,93	1,13 ± 0,99	0,17 ± 0,41	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 3)	0 (0; 1)	2 (1; 3)	3 (1; 3)	1 (0; 3)	0 (0; 1)	
Necrose	(N = 6)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 6)	<0,001*
média ± DP	0,33 ± 0,52	0,25 ± 0,46	1,63 ± 0,74	1,88 ± 0,84	0,75 ± 1,04	0,17 ± 0,41	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	1,5 (1; 3)	2 (1; 3)	0,5 (0; 3)	0 (0; 1)	
Infiltrado inflamatório	(N = 6)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 8)	(N = 6)	0,001*
média ± DP	0,17 ± 0,41	0,25 ± 0,46	1 ± 0,54	0,88 ± 0,35	0,38 ± 0,52	0 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	1 (0; 2)	1 (0; 1)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	

ANOVA; * Teste Kruskal-Wallis

A Tabela 1 mostra que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para quase todos os parâmetros do potencial evocado ($p < 0,05$), com exceção apenas da amplitude dos membros superiores (MS) ($p = 0,078$), e todos os parâmetros da histologia foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,001$).

Tabela 2 - Comparação dos parâmetros do potencial evocado entre os grupos dois a dois

Variável	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)		
					Inferior	Superior	
Latência MS	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	1,35	0,45	0,076	-0,07	2,77	
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	-0,23	0,44	>0,999	-1,61	1,15	
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	-0,24	0,45	>0,999	-1,67	1,18	
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,04	0,45	>0,999	-1,38	1,47	
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	0,33	0,44	>0,999	-1,05	1,71	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	-1,58	0,44	0,014	-2,96	-0,20	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	-1,59	0,45	0,018	-3,02	-0,17	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	-1,31	0,45	0,098	-2,73	0,12	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-1,02	0,44	0,390	-2,40	0,36	
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-0,01	0,44	>0,999	-1,39	1,37	
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	0,27	0,44	>0,999	-1,10	1,65	
	Contusão medular vs Laminectomia	0,56	0,42	>0,999	-0,77	1,89	
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,29	0,45	>0,999	-1,14	1,71	
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	0,57	0,44	>0,999	-0,80	1,95	
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	0,29	0,44	>0,999	-1,09	1,67	
	Latência MI	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	-3,24	0,63	<0,001	-5,20	-1,28
		Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	0,40	0,61	>0,999	-1,49	2,30
		Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	-0,74	0,63	>0,999	-2,70	1,22
Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		-0,89	0,63	>0,999	-2,85	1,06	
Laminectomia + Cateter vs Laminectomia		3,13	0,61	<0,001	1,24	5,03	
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular		3,65	0,61	<0,001	1,75	5,54	
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter		2,50	0,63	0,004	0,54	4,46	
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão		2,35	0,63	0,009	0,39	4,31	
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia		6,38	0,61	<0,001	4,48	8,27	
Contusão medular vs Contusão + Cateter		-1,15	0,61	0,989	-3,04	0,75	
Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão		-1,30	0,61	0,578	-3,19	0,60	
Contusão medular vs Laminectomia		2,73	0,58	0,001	0,90	4,56	
Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		-0,15	0,63	>0,999	-2,11	1,81	
Contusão + Cateter vs Laminectomia		3,88	0,61	<0,001	1,98	5,77	
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia		4,03	0,61	<0,001	2,13	5,93	
Amplitude MI		Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,70	0,12	<0,001	0,33	1,08
		Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	0,74	0,12	<0,001	0,38	1,11
		Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	0,93	0,12	<0,001	0,56	1,31
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,99	0,12	<0,001	0,61	1,37	
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-2,60	0,12	<0,001	-2,97	-2,24	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	0,04	0,12	>0,999	-0,33	0,40	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	0,23	0,12	0,963	-0,15	0,61	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	0,29	0,12	0,345	-0,09	0,66	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-3,31	0,12	<0,001	-3,67	-2,94	
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	0,19	0,12	>0,999	-0,18	0,55	
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	0,25	0,12	0,629	-0,12	0,61	
	Contusão medular vs Laminectomia	-3,35	0,11	<0,001	-3,70	-3,00	
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,06	0,12	>0,999	-0,32	0,43	
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-3,54	0,12	<0,001	-3,90	-3,17	
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-3,59	0,12	<0,001	-3,96	-3,23	

Comparações múltiplas de Bonferroni

A Tabela 2 mostra que a latência MS foi em média estatisticamente menor no grupo laminectomia + Cateter + Infusão do que nos grupos Contusão medular e Contusão + Cateter ($p = 0,014$ e $p = 0,018$ respectivamente), a latência dos membros inferiores (MI) foi em média maior no grupo Laminectomia + Cateter + Infusão que nos demais grupos ($p < 0,05$) e foi menor no grupo Laminectomia que nos demais grupos ($p < 0,05$), a amplitude dos MI foi em média estatisticamente maior no grupo Laminectomia + Cateter que nos demais grupos

($p < 0,001$), com exceção apenas do grupo Laminectomia, cuja amplitude MI foi em média estatisticamente maior que nos demais grupos ($p < 0,001$).

Tabela 3 - Comparação dos parâmetros histológicos entre os grupos dois a dois

Variável	Comparação	Valor Z	p
Hemorragia	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	-0,41	0,679
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	-3,01	0,003
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	-2,46	0,014
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	-1,23	0,220
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	0,52	0,605
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	-2,80	0,005
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	-2,21	0,027
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,88	0,381
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	0,97	0,333
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	0,59	0,557
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	1,92	0,055
	Contusão medular vs Laminectomia	3,56	<0,001
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	1,33	0,182
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	3,01	0,003
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	1,78	0,075	
Alterações arquiteturais	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,32	0,749
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	-2,51	0,012
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	-2,80	0,005
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,92	0,360
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	0,70	0,483
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	-3,06	0,002
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	-3,37	0,001
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	-1,33	0,182
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	0,43	0,667
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-0,31	0,757
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	1,72	0,085
	Contusão medular vs Laminectomia	3,26	0,001
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	2,03	0,042
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	3,55	<0,001
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	1,67	0,096	
Necrose	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,21	0,834
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	-2,54	0,011
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	-2,82	0,005
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,70	0,482
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	0,39	0,695
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	-2,97	0,003
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	-3,27	0,001
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,99	0,324
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	0,21	0,834
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-0,31	0,759
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	1,98	0,048
	Contusão medular vs Laminectomia	2,96	0,003
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	2,29	0,022
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	3,24	0,001
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	1,12	0,262	
Infiltrado inflamatório	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	-0,27	0,791
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	-2,43	0,015
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	-2,25	0,025
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,66	0,509
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	0,49	0,621
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	-2,34	0,019
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	-2,14	0,032
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,43	0,669
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	0,79	0,428
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	0,20	0,842
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	1,91	0,056
	Contusão medular vs Laminectomia	2,96	0,003
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	1,71	0,087
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	2,77	0,006
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	1,19	0,235	

Comparações múltiplas de Dunn

A Tabela 3 mostra que para todos os parâmetros histológicos avaliados, os grupos Contusão medular e Contusão + Cateter apresentaram estatisticamente maiores valores que os grupos Laminectomia, Laminectomia + Cateter e Laminectomia + Cateter + Infusão principalmente ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Descrição do peso, plano horizontal e escore BBB segundo grupos ao longo dos momentos avaliados e resultado das comparações

Variável/Momento	Grupo						P Grupo	P Momento	P Interação
	Laminectomia + Cateter	Laminectomia + Cateter + Infusão	Contusão medular	Contusão + Cateter	Contusão + Cateter + Infusão	Laminectomia			
Peso (g)							0,010	<0,001	<0,001
Inicial									
média ± DP	294,4 ± 16	290,4 ± 21,1	286 ± 14,3	300,6 ± 13,9	306,8 ± 22,6	303,3 ± 12			
mediana (mín.; máx.)	289,5 (277; 320)	289 (265; 322)	284 (266; 312)	299 (278; 322)	300,5 (277; 346)	303,5 (287; 319)			
Final									
média ± DP	326 ± 19,3	307,3 ± 23,9	299,6 ± 19,6	314,1 ± 20,5	314,4 ± 26,9	343,9 ± 15,8			
mediana (mín.; máx.)	323 (298; 356)	310,5 (277; 343)	302 (265; 320)	315,5 (278; 345)	319 (270; 349)	343,5 (312; 363)			
Plano horizontal							<0,001	<0,001	<0,001
Pré-op.									
média ± DP	97,1 ± 2,2	93,5 ± 3,8	98,2 ± 1,7	97 ± 2,6	96,5 ± 2,9	97 ± 2,3			
mediana (mín.; máx.)	96,9 (93,8; 100)	93,5 (86,4; 98)	98,1 (95,8; 100)	97,7 (93; 100)	96,6 (92,3; 100)	96,7 (93,8; 100)			
2 dias									
média ± DP	92,8 ± 4,4	92,7 ± 2,7	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	96,1 ± 2,9			
mediana (mín.; máx.)	92,3 (84,9; 98)	92,7 (89,3; 96,2)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	97,6 (92,1; 100)			
3 semanas									
média ± DP	90,8 ± 9,2	90,7 ± 7,8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	96,4 ± 3,1			
mediana (mín.; máx.)	94,3 (68,6; 96,1)	92,8 (74,5; 98,1)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	95,3 (92,7; 100)			
6 semanas									
média ± DP	96,5 ± 2,2	97,6 ± 2,1	78,8 ± 13,1	80,4 ± 7,5	71,7 ± 8,6	94,1 ± 3,3			
mediana (mín.; máx.)	96,2 (92,5; 100)	98,1 (93,8; 100)	83,3 (50; 92,9)	80,6 (68,4; 91,7)	72,1 (58,3; 84,6)	93,9 (88,6; 97,6)	<0,001	<0,001	<0,001
Escore BBB									
2 dias									
média ± DP	19,8 ± 1	19,6 ± 1,1	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,7	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	19,8 (18,5; 21)	20 (18; 21)	0,3 (0; 1)	0,3 (0; 1)	0 (0; 2)	21 (21; 21)			
1 semana									
média ± DP	20 ± 1,1	19,9 ± 1,2	0,3 ± 0,5	0,6 ± 0,8	1,3 ± 1,6	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	20,3 (18,5; 21)	20 (18; 21)	0 (0; 1,5)	0,5 (0; 2,5)	0,5 (0; 4)	21 (21; 21)			
2 semanas									
média ± DP	20,2 ± 1	20 ± 0,9	2,6 ± 1,5	2,8 ± 1,1	2,4 ± 2	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	20,5 (18,5; 21)	20 (19; 21)	2 (0; 5)	3 (1; 4)	3 (0; 5,5)	21 (21; 21)			
3 semanas									
média ± DP	20,8 ± 0,5	19,8 ± 0,8	5 ± 1,5	5,1 ± 1,5	2,8 ± 1,9	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	21 (20; 21)	19,8 (19; 21)	5,3 (2,5; 6,5)	5 (3; 7,5)	3 (0; 5)	21 (21; 21)			
4 semanas									
média ± DP	20,9 ± 0,4	20,5 ± 0,8	6,6 ± 1,9	5,6 ± 1,7	4,4 ± 2,3	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	21 (20; 21)	21 (19; 21)	6,8 (3,5; 9)	5,5 (3; 8)	5 (1; 7)	21 (21; 21)			
5 semanas									
média ± DP	21 ± 0	20,7 ± 0,5	6,7 ± 1,4	5,7 ± 1,7	4,9 ± 2,2	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	21 (21; 21)	21 (20; 21)	7 (4,5; 8)	6 (3; 8)	5,3 (1; 8)	21 (21; 21)			
6 semanas									
média ± DP	21 ± 0	20,8 ± 0,5	7,2 ± 1,4	6,6 ± 1,9	5,1 ± 2,1	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	21 (21; 21)	21 (20; 21)	7,5 (5; 9)	7,3 (3; 8,5)	5,3 (1,5; 8)	21 (21; 21)			

8 animais em cada grupo; EEG com distribuição normal e função de ligação identidade

A Tabela 4 mostra que o comportamento médio do peso, do teste de plano horizontal e do escore BBB foi em média estatisticamente diferente entre os grupos ao longo dos momentos avaliados ($p_{\text{Interação}} < 0,001$).

Tabela 5 - Resultado das comparações do peso dos animais entre grupos e momentos

Momento/Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)		
					Inferior	Superior	
Inicial	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	4,00	9,65	>0,999	-28,49	36,49	
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	8,38	9,65	>0,999	-24,12	40,87	
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	-6,25	9,65	>0,999	-38,74	26,24	
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	-12,38	9,65	>0,999	-44,87	20,12	
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-8,88	9,65	>0,999	-41,37	23,62	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	4,38	9,65	>0,999	-28,12	36,87	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	-10,25	9,65	>0,999	-42,74	22,24	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	-16,38	9,65	>0,999	-48,87	16,12	
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-12,88	9,65	>0,999	-45,37	19,62	
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-14,63	9,65	>0,999	-47,12	17,87	
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	-20,75	9,65	>0,999	-53,24	11,74	
	Contusão medular vs Laminectomia	-17,25	9,65	>0,999	-49,74	15,24	
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	-6,13	9,65	>0,999	-38,62	26,37	
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-2,63	9,65	>0,999	-35,12	29,87	
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	3,50	9,65	>0,999	-28,99	35,99	
	Final	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	18,75	9,65	>0,999	-13,74	51,24
		Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	26,38	9,65	0,413	-6,12	58,87
		Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	11,88	9,65	>0,999	-20,62	44,37
		Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	11,63	9,65	>0,999	-20,87	44,12
		Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-17,88	9,65	>0,999	-50,37	14,62
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular		7,63	9,65	>0,999	-24,87	40,12	
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter		-6,88	9,65	>0,999	-39,37	25,62	
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão		-7,13	9,65	>0,999	-39,62	25,37	
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia		-36,63	9,65	0,010	-69,12	-4,13	
Contusão medular vs Contusão + Cateter		-14,50	9,65	>0,999	-46,99	17,99	
Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão		-14,75	9,65	>0,999	-47,24	17,74	
Contusão medular vs Laminectomia		-44,25	9,65	<0,001	-76,74	-11,76	
Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		-0,25	9,65	>0,999	-32,74	32,24	
Contusão + Cateter vs Laminectomia		-29,75	9,65	0,135	-62,24	2,74	
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia		-29,50	9,65	0,147	-61,99	2,99	
Laminectomia + Cateter		Inicial vs Final	-31,63	5,95	<0,001	-51,68	-11,57
Laminectomia + Cateter + Infusão		Inicial vs Final	-16,88	5,95	0,303	-36,93	3,18
Contusão medular		Inicial vs Final	-13,63	5,95	>0,999	-33,68	6,43
Contusão + Cateter		Inicial vs Final	-13,50	5,95	>0,999	-33,55	6,55
Contusão + Cateter + Infusão		Inicial vs Final	-7,63	5,95	>0,999	-27,68	12,43
Laminectomia	Inicial vs Final	-40,63	5,95	<0,001	-60,68	-20,57	

Comparações múltiplas de Bonferroni

Pela Tabela 5, tem-se que ao final do acompanhamento, o peso médio dos animais do grupo Laminectomia foi estatisticamente maior que nos animais dos grupos Laminectomia + Cateter + Infusão ($p = 0,010$) e Contusão medular ($p < 0,001$), sendo que apenas nos grupos Laminectomia + Cateter e no grupo Laminectomia o peso aumentou em média estatisticamente do inicial para o final ($p < 0,001$).

Tabela 6 - Resultado das comparações do plano horizontal entre os grupos em cada momento avaliado

Momento/Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Pré-op.	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	3,59	2,41	>0,999	-5,42	12,61
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	-1,13	2,41	>0,999	-10,14	7,89
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	0,06	2,41	>0,999	-8,95	9,07
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,59	2,41	>0,999	-8,42	9,60
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	0,08	2,41	>0,999	-8,94	9,09
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	-4,72	2,41	>0,999	-13,73	4,29
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	-3,53	2,41	>0,999	-12,55	5,48
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	-3,00	2,41	>0,999	-12,02	6,01
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-3,52	2,41	>0,999	-12,53	5,50
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	1,19	2,41	>0,999	-7,83	10,20
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	1,72	2,41	>0,999	-7,30	10,73
	Contusão medular vs Laminectomia	1,20	2,41	>0,999	-7,81	10,22
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,53	2,41	>0,999	-8,49	9,54
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	0,02	2,41	>0,999	-9,00	9,03
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-0,51	2,41	>0,999	-9,53	8,50
	2 dias	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,10	2,41	>0,999	-8,92
Laminectomia + Cateter vs Contusão medular		92,82	2,41	<0,001	83,81	101,84
Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter		92,82	2,41	<0,001	83,81	101,84
Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		92,82	2,41	<0,001	83,81	101,84
Laminectomia + Cateter vs Laminectomia		-3,32	2,41	>0,999	-12,34	5,69
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular		92,73	2,41	<0,001	83,71	101,74
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter		92,73	2,41	<0,001	83,71	101,74
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão		92,73	2,41	<0,001	83,71	101,74
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia		-3,42	2,41	>0,999	-12,43	5,60
Contusão medular vs Contusão + Cateter		0,00	2,41	>0,999	-9,01	9,01
Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão		0,00	2,41	>0,999	-9,01	9,01
Contusão medular vs Laminectomia		-96,14	2,41	<0,001	-105,16	-87,13
Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		0,00	2,41	>0,999	-9,01	9,01
Contusão + Cateter vs Laminectomia		-96,14	2,41	<0,001	-105,16	-87,13
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia		-96,14	2,41	<0,001	-105,16	-87,13
3 semanas		Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,08	2,41	>0,999	-8,93
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	90,83	2,41	<0,001	81,81	99,84
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	90,83	2,41	<0,001	81,81	99,84
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	90,83	2,41	<0,001	81,81	99,84
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-5,58	2,41	>0,999	-14,60	3,43
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	90,74	2,41	<0,001	81,73	99,76
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	90,74	2,41	<0,001	81,73	99,76
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	90,74	2,41	<0,001	81,73	99,76
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-5,67	2,41	>0,999	-14,68	3,35
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	0,00	2,41	>0,999	-9,01	9,01
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	0,00	2,41	>0,999	-9,01	9,01
	Contusão medular vs Laminectomia	-96,41	2,41	<0,001	-105,42	-87,40
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,00	2,41	>0,999	-9,01	9,01
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-96,41	2,41	<0,001	-105,42	-87,40
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-96,41	2,41	<0,001	-105,42	-87,40
	6 semanas	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	-1,02	2,41	>0,999	-10,04
Laminectomia + Cateter vs Contusão medular		17,74	2,41	<0,001	8,72	26,75
Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter		16,11	2,41	<0,001	7,10	25,13
Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		24,81	2,41	<0,001	15,79	33,82
Laminectomia + Cateter vs Laminectomia		2,44	2,41	>0,999	-6,58	11,45
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular		18,76	2,41	<0,001	9,74	27,77
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter		17,13	2,41	<0,001	8,12	26,15
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão		25,83	2,41	<0,001	16,82	34,84
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia		3,46	2,41	>0,999	-5,56	12,47
Contusão medular vs Contusão + Cateter		-1,63	2,41	>0,999	-10,64	7,39
Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão		7,07	2,41	0,915	-1,94	16,08
Contusão medular vs Laminectomia		-15,30	2,41	<0,001	-24,32	-6,29
Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		8,70	2,41	0,084	-0,32	17,71
Contusão + Cateter vs Laminectomia		-13,68	2,41	<0,001	-22,69	-4,66
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia		-22,37	2,41	<0,001	-31,39	-13,36

Comparações múltiplas de Bonferroni

A Tabela 6 mostra que a partir de 2 dias o plano horizontal foi em média estatisticamente maior nos grupos Laminectomia, Laminectomia + Cateter e Laminectomia + Cateter + Infusão que nos grupos Contusão medular, Contusão

+ Cateter e Contusão + Cateter + Infusão ($p < 0,05$), formando dois agrupamentos de animais, os que sofreram contusão e os que não sofreram contusão.

Tabela 7 - Resultado das comparações do plano horizontal entre os momentos avaliados em cada grupo

Momento/Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Laminectomia + Cateter	Pré-op. vs 2 dias	4,28	2,40	>0,999	-4,70	13,27
	Pré-op. vs 3 semanas	6,28	2,41	>0,999	-2,74	15,29
	Pré-op. vs 6 semanas	0,56	2,41	>0,999	-8,45	9,58
	2 dias vs 3 semanas	2,00	2,40	>0,999	-6,99	10,98
	2 dias vs 6 semanas	-3,72	2,41	>0,999	-12,73	5,30
	3 semanas vs 6 semanas	-5,71	2,40	>0,999	-14,70	3,27
Laminectomia + Cateter + Infusão	Pré-op. vs 2 dias	0,78	2,40	>0,999	-8,20	9,77
	Pré-op. vs 3 semanas	2,77	2,41	>0,999	-6,25	11,78
	Pré-op. vs 6 semanas	-4,05	2,41	>0,999	-13,06	4,96
	2 dias vs 3 semanas	1,98	2,40	>0,999	-7,00	10,97
	2 dias vs 6 semanas	-4,83	2,41	>0,999	-13,85	4,18
	3 semanas vs 6 semanas	-6,82	2,40	>0,999	-15,80	2,17
Contusão medular	Pré-op. vs 2 dias	98,23	2,40	<0,001	89,24	107,21
	Pré-op. vs 3 semanas	98,23	2,41	<0,001	89,21	107,24
	Pré-op. vs 6 semanas	19,43	2,41	<0,001	10,41	28,44
	2 dias vs 3 semanas	0,00	2,40	>0,999	-8,99	8,99
	2 dias vs 6 semanas	-78,80	2,41	<0,001	-87,81	-69,79
	3 semanas vs 6 semanas	-78,80	2,40	<0,001	-87,79	-69,81
Contusão + Cateter	Pré-op. vs 2 dias	97,04	2,40	<0,001	88,06	106,03
	Pré-op. vs 3 semanas	97,04	2,41	<0,001	88,03	106,06
	Pré-op. vs 6 semanas	16,62	2,41	<0,001	7,60	25,63
	2 dias vs 3 semanas	0,00	2,40	>0,999	-8,99	8,99
	2 dias vs 6 semanas	-80,43	2,41	<0,001	-89,44	-71,41
	3 semanas vs 6 semanas	-80,43	2,40	<0,001	-89,41	-71,44
Contusão + Cateter + Infusão	Pré-op. vs 2 dias	96,51	2,40	<0,001	87,53	105,50
	Pré-op. vs 3 semanas	96,51	2,41	<0,001	87,50	105,53
	Pré-op. vs 6 semanas	24,78	2,41	<0,001	15,77	33,80
	2 dias vs 3 semanas	0,00	2,40	>0,999	-8,99	8,99
	2 dias vs 6 semanas	-71,73	2,41	<0,001	-80,74	-62,72
	3 semanas vs 6 semanas	-71,73	2,40	<0,001	-80,72	-62,74
Laminectomia	Pré-op. vs 2 dias	0,88	2,40	>0,999	-8,10	9,87
	Pré-op. vs 3 semanas	0,62	2,41	>0,999	-8,40	9,63
	Pré-op. vs 6 semanas	2,92	2,41	>0,999	-6,09	11,94
	2 dias vs 3 semanas	-0,27	2,40	>0,999	-9,25	8,72
	2 dias vs 6 semanas	2,04	2,41	>0,999	-6,97	11,05
	3 semanas vs 6 semanas	2,31	2,40	>0,999	-6,68	11,29

Comparações múltiplas de Bonferroni

A Tabela 7 mostra que nos grupos com contusão medular houve redução média dos valores do plano horizontal, na comparação do pré-op. para os demais momentos avaliados ($p < 0,001$). Nesses grupos, os valores voltaram a aumentar em média na avaliação com 6 semanas em relação à avaliação com 2 dias e 3 semanas ($p < 0,001$).

Tabela 8 - Resultado das comparações do escore BBB entre os grupos em cada momento avaliado

Momento/Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
2 dias	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,19	0,60	>0,999	-2,21	2,59
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	19,50	0,60	<0,001	17,10	21,90
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	19,38	0,60	<0,001	16,98	21,78
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	19,50	0,60	<0,001	17,10	21,90
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-1,19	0,60	>0,999	-3,59	1,21
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	19,31	0,60	<0,001	16,91	21,71
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	19,19	0,60	<0,001	16,79	21,59
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	19,31	0,60	<0,001	16,91	21,71
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-1,38	0,60	>0,999	-3,78	1,03
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-0,13	0,60	>0,999	-2,53	2,28
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	0,00	0,60	>0,999	-2,40	2,40
	Contusão medular vs Laminectomia	-20,69	0,60	<0,001	-23,09	-18,29
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,13	0,60	>0,999	-2,28	2,53
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-20,56	0,60	<0,001	-22,96	-18,16
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-20,69	0,60	<0,001	-23,09	-18,29
1 semana	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,13	0,60	>0,999	-2,28	2,53
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	19,69	0,60	<0,001	17,29	22,09
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	19,44	0,60	<0,001	17,04	21,84
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	18,75	0,60	<0,001	16,35	21,15
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-1,00	0,60	>0,999	-3,40	1,40
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	19,56	0,60	<0,001	17,16	21,96
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	19,31	0,60	<0,001	16,91	21,71
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	18,63	0,60	<0,001	16,23	21,03
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-1,13	0,60	>0,999	-3,53	1,28
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-0,25	0,60	>0,999	-2,65	2,15
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,94	0,60	>0,999	-3,34	1,46
	Contusão medular vs Laminectomia	-20,69	0,60	<0,001	-23,09	-18,29
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	-0,69	0,60	>0,999	-3,09	1,71
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-20,44	0,60	<0,001	-22,84	-18,04
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-19,75	0,60	<0,001	-22,15	-17,35
2 semanas	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,19	0,60	>0,999	-2,21	2,59
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	17,63	0,60	<0,001	15,23	20,03
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	17,38	0,60	<0,001	14,98	19,78
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	17,75	0,60	<0,001	15,35	20,15
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-0,81	0,60	>0,999	-3,21	1,59
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	17,44	0,60	<0,001	15,04	19,84
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	17,19	0,60	<0,001	14,79	19,59
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	17,56	0,60	<0,001	15,16	19,96
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-1,00	0,60	>0,999	-3,40	1,40
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-0,25	0,60	>0,999	-2,65	2,15
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	0,13	0,60	>0,999	-2,28	2,53
	Contusão medular vs Laminectomia	-18,44	0,60	<0,001	-20,84	-16,04
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	0,38	0,60	>0,999	-2,03	2,78
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-18,19	0,60	<0,001	-20,59	-15,79
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-18,56	0,60	<0,001	-20,96	-16,16
3 semanas	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	1,00	0,60	>0,999	-1,40	3,40
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	15,75	0,60	<0,001	13,35	18,15
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	15,69	0,60	<0,001	13,29	18,09
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	17,94	0,60	<0,001	15,54	20,34
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-0,25	0,60	>0,999	-2,65	2,15
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	14,75	0,60	<0,001	12,35	17,15
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	14,69	0,60	<0,001	12,29	17,09
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	16,94	0,60	<0,001	14,54	19,34
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-1,25	0,60	>0,999	-3,65	1,15
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	-0,06	0,60	>0,999	-2,46	2,34
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	2,19	0,60	0,214	-0,21	4,59
	Contusão medular vs Laminectomia	-16,00	0,60	<0,001	-18,40	-13,60
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	2,25	0,60	0,141	-0,15	4,65
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-15,94	0,60	<0,001	-18,34	-13,54
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-18,19	0,60	<0,001	-20,59	-15,79

continua

Resultados

continuação

Momento/Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
4 semanas	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,38	0,60	>0,999	-2,03	2,78
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	14,31	0,60	<0,001	11,91	16,71
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	15,31	0,60	<0,001	12,91	17,71
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	16,44	0,60	<0,001	14,04	18,84
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	-0,13	0,60	>0,999	-2,53	2,28
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	13,94	0,60	<0,001	11,54	16,34
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	14,94	0,60	<0,001	12,54	17,34
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	16,06	0,60	<0,001	13,66	18,46
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-0,50	0,60	>0,999	-2,90	1,90
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	1,00	0,60	>0,999	-1,40	3,40
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	2,13	0,60	0,320	-0,28	4,53
	Contusão medular vs Laminectomia	-14,44	0,60	<0,001	-16,84	-12,04
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	1,13	0,60	>0,999	-1,28	3,53
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-15,44	0,60	<0,001	-17,84	-13,04
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-16,56	0,60	<0,001	-18,96	-14,16
	5 semanas	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,31	0,60	>0,999	-2,09
Laminectomia + Cateter vs Contusão medular		14,31	0,60	<0,001	11,91	16,71
Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter		15,31	0,60	<0,001	12,91	17,71
Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		16,06	0,60	<0,001	13,66	18,46
Laminectomia + Cateter vs Laminectomia		0,00	0,60	>0,999	-2,40	2,40
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular		14,00	0,60	<0,001	11,60	16,40
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter		15,00	0,60	<0,001	12,60	17,40
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão		15,75	0,60	<0,001	13,35	18,15
Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia		-0,31	0,60	>0,999	-2,71	2,09
Contusão medular vs Contusão + Cateter		1,00	0,60	>0,999	-1,40	3,40
Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão		1,75	0,60	>0,999	-0,65	4,15
Contusão medular vs Laminectomia		-14,31	0,60	<0,001	-16,71	-11,91
Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão		0,75	0,60	>0,999	-1,65	3,15
Contusão + Cateter vs Laminectomia		-15,31	0,60	<0,001	-17,71	-12,91
Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia		-16,06	0,60	<0,001	-18,46	-13,66
6 semanas		Laminectomia + Cateter vs Laminectomia + Cateter + Infusão	0,25	0,60	>0,999	-2,15
	Laminectomia + Cateter vs Contusão medular	13,81	0,60	<0,001	11,41	16,21
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter	14,44	0,60	<0,001	12,04	16,84
	Laminectomia + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	15,94	0,60	<0,001	13,54	18,34
	Laminectomia + Cateter vs Laminectomia	0,00	0,60	>0,999	-2,40	2,40
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão medular	13,56	0,60	<0,001	11,16	15,96
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter	14,19	0,60	<0,001	11,79	16,59
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Contusão + Cateter + Infusão	15,69	0,60	<0,001	13,29	18,09
	Laminectomia + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-0,25	0,60	>0,999	-2,65	2,15
	Contusão medular vs Contusão + Cateter	0,63	0,60	>0,999	-1,78	3,03
	Contusão medular vs Contusão + Cateter + Infusão	2,13	0,60	0,320	-0,28	4,53
	Contusão medular vs Laminectomia	-13,81	0,60	<0,001	-16,21	-11,41
	Contusão + Cateter vs Contusão + Cateter + Infusão	1,50	0,60	>0,999	-0,90	3,90
	Contusão + Cateter vs Laminectomia	-14,44	0,60	<0,001	-16,84	-12,04
	Contusão + Cateter + Infusão vs Laminectomia	-15,94	0,60	<0,001	-18,34	-13,54

Comparações múltiplas de Bonferroni

conclusão

A Tabela 8 mostra que o escore BBB apresentou em média estatisticamente o mesmo comportamento que o plano horizontal, sendo que em todos os momentos avaliados os grupos sem contusão apresentaram em média estatisticamente maiores escores que os grupos com contusão ($p < 0,05$).

Tabela 9 - Resultado das comparações do escore BBB entre os momentos avaliados em cada grupo

Momento/Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Laminectomia + Cateter	2 dias vs 1 semana	-0,19	0,31	>0,999	-1,42	1,04
	2 dias vs 2 semanas	-0,38	0,40	>0,999	-2,00	1,25
	2 dias vs 3 semanas	-0,94	0,46	>0,999	-2,80	0,92
	2 dias vs 4 semanas	-1,06	0,50	>0,999	-3,08	0,95
	2 dias vs 5 semanas	-1,19	0,53	>0,999	-3,31	0,94
	2 dias vs 6 semanas	-1,19	0,55	>0,999	-3,39	1,01
	1 semana vs 2 semanas	-0,19	0,31	>0,999	-1,42	1,04
	1 semana vs 3 semanas	-0,75	0,40	>0,999	-2,37	0,87
	1 semana vs 4 semanas	-0,88	0,46	>0,999	-2,74	0,99
	1 semana vs 5 semanas	-1,00	0,50	>0,999	-3,02	1,02
	1 semana vs 6 semanas	-1,00	0,53	>0,999	-3,12	1,12
	2 semanas vs 3 semanas	-0,56	0,31	>0,999	-1,79	0,67
	2 semanas vs 4 semanas	-0,69	0,40	>0,999	-2,31	0,94
	2 semanas vs 5 semanas	-0,81	0,46	>0,999	-2,67	1,05
	2 semanas vs 6 semanas	-0,81	0,50	>0,999	-2,83	1,20
	3 semanas vs 4 semanas	-0,13	0,31	>0,999	-1,36	1,11
	3 semanas vs 5 semanas	-0,25	0,40	>0,999	-1,87	1,37
	3 semanas vs 6 semanas	-0,25	0,46	>0,999	-2,11	1,61
	4 semanas vs 5 semanas	-0,13	0,31	>0,999	-1,36	1,11
	4 semanas vs 6 semanas	-0,13	0,40	>0,999	-1,75	1,50
5 semanas vs 6 semanas	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23	
Laminectomia + Cateter + Infusão	2 dias vs 1 semana	-0,25	0,31	>0,999	-1,48	0,98
	2 dias vs 2 semanas	-0,38	0,40	>0,999	-2,00	1,25
	2 dias vs 3 semanas	-0,13	0,46	>0,999	-1,99	1,74
	2 dias vs 4 semanas	-0,88	0,50	>0,999	-2,89	1,14
	2 dias vs 5 semanas	-1,06	0,53	>0,999	-3,19	1,06
	2 dias vs 6 semanas	-1,13	0,55	>0,999	-3,33	1,08
	1 semana vs 2 semanas	-0,13	0,31	>0,999	-1,36	1,11
	1 semana vs 3 semanas	0,13	0,40	>0,999	-1,50	1,75
	1 semana vs 4 semanas	-0,63	0,46	>0,999	-2,49	1,24
	1 semana vs 5 semanas	-0,81	0,50	>0,999	-2,83	1,20
	1 semana vs 6 semanas	-0,88	0,53	>0,999	-3,00	1,25
	2 semanas vs 3 semanas	0,25	0,31	>0,999	-0,98	1,48
	2 semanas vs 4 semanas	-0,50	0,40	>0,999	-2,12	1,12
	2 semanas vs 5 semanas	-0,69	0,46	>0,999	-2,55	1,17
	2 semanas vs 6 semanas	-0,75	0,50	>0,999	-2,77	1,27
	3 semanas vs 4 semanas	-0,75	0,31	>0,999	-1,98	0,48
	3 semanas vs 5 semanas	-0,94	0,40	>0,999	-2,56	0,69
	3 semanas vs 6 semanas	-1,00	0,46	>0,999	-2,86	0,86
	4 semanas vs 5 semanas	-0,19	0,31	>0,999	-1,42	1,04
	4 semanas vs 6 semanas	-0,25	0,40	>0,999	-1,87	1,37
5 semanas vs 6 semanas	-0,06	0,31	>0,999	-1,29	1,17	
Contusão medular	2 dias vs 1 semana	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23
	2 dias vs 2 semanas	-2,25	0,40	<0,001	-3,87	-0,63
	2 dias vs 3 semanas	-4,69	0,46	<0,001	-6,55	-2,83
	2 dias vs 4 semanas	-6,25	0,50	<0,001	-8,27	-4,23
	2 dias vs 5 semanas	-6,38	0,53	<0,001	-8,50	-4,25
	2 dias vs 6 semanas	-6,88	0,55	<0,001	-9,08	-4,68
	1 semana vs 2 semanas	-2,25	0,31	<0,001	-3,48	-1,02
	1 semana vs 3 semanas	-4,69	0,40	<0,001	-6,31	-3,06
	1 semana vs 4 semanas	-6,25	0,46	<0,001	-8,11	-4,39
	1 semana vs 5 semanas	-6,38	0,50	<0,001	-8,39	-4,36
	1 semana vs 6 semanas	-6,88	0,53	<0,001	-9,00	-4,75
	2 semanas vs 3 semanas	-2,44	0,31	<0,001	-3,67	-1,21
	2 semanas vs 4 semanas	-4,00	0,40	<0,001	-5,62	-2,38
	2 semanas vs 5 semanas	-4,13	0,46	<0,001	-5,99	-2,27
	2 semanas vs 6 semanas	-4,63	0,50	<0,001	-6,64	-2,61
	3 semanas vs 4 semanas	-1,56	0,31	<0,001	-2,79	-0,33
	3 semanas vs 5 semanas	-1,69	0,40	0,025	-3,31	-0,06
	3 semanas vs 6 semanas	-2,19	0,46	0,002	-4,05	-0,33
	4 semanas vs 5 semanas	-0,13	0,31	>0,999	-1,36	1,11
	4 semanas vs 6 semanas	-0,63	0,40	>0,999	-2,25	1,00
5 semanas vs 6 semanas	-0,50	0,31	>0,999	-1,73	0,73	

continua

Resultados

continuação

Momento/Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Contusão + Cateter	2 dias vs 1 semana	-0,13	0,31	>0,999	-1,36	1,11
	2 dias vs 2 semanas	-2,38	0,40	<0,001	-4,00	-0,75
	2 dias vs 3 semanas	-4,63	0,46	<0,001	-6,49	-2,77
	2 dias vs 4 semanas	-5,13	0,50	<0,001	-7,14	-3,11
	2 dias vs 5 semanas	-5,25	0,53	<0,001	-7,37	-3,13
	2 dias vs 6 semanas	-6,13	0,55	<0,001	-8,33	-3,93
	1 semana vs 2 semanas	-2,25	0,31	<0,001	-3,48	-1,02
	1 semana vs 3 semanas	-4,50	0,40	<0,001	-6,12	-2,88
	1 semana vs 4 semanas	-5,00	0,46	<0,001	-6,86	-3,14
	1 semana vs 5 semanas	-5,13	0,50	<0,001	-7,14	-3,11
	1 semana vs 6 semanas	-6,00	0,53	<0,001	-8,12	-3,88
	2 semanas vs 3 semanas	-2,25	0,31	<0,001	-3,48	-1,02
	2 semanas vs 4 semanas	-2,75	0,40	<0,001	-4,37	-1,13
	2 semanas vs 5 semanas	-2,88	0,46	<0,001	-4,74	-1,02
	2 semanas vs 6 semanas	-3,75	0,50	<0,001	-5,77	-1,73
	3 semanas vs 4 semanas	-0,50	0,31	>0,999	-1,73	0,73
	3 semanas vs 5 semanas	-0,63	0,40	>0,999	-2,25	1,00
	3 semanas vs 6 semanas	-1,50	0,46	>0,999	-3,36	0,36
	4 semanas vs 5 semanas	-0,13	0,31	>0,999	-1,36	1,11
	4 semanas vs 6 semanas	-1,00	0,40	>0,999	-2,62	0,62
5 semanas vs 6 semanas	-0,88	0,31	>0,999	-2,11	0,36	
Contusão + Cateter + Infusão	2 dias vs 1 semana	-0,94	0,31	>0,999	-2,17	0,29
	2 dias vs 2 semanas	-2,13	0,40	<0,001	-3,75	-0,50
	2 dias vs 3 semanas	-2,50	0,46	<0,001	-4,36	-0,64
	2 dias vs 4 semanas	-4,13	0,50	<0,001	-6,14	-2,11
	2 dias vs 5 semanas	-4,63	0,53	<0,001	-6,75	-2,50
	2 dias vs 6 semanas	-4,75	0,55	<0,001	-6,95	-2,55
	1 semana vs 2 semanas	-1,19	0,31	0,092	-2,42	0,04
	1 semana vs 3 semanas	-1,56	0,40	0,094	-3,19	0,06
	1 semana vs 4 semanas	-3,19	0,46	<0,001	-5,05	-1,33
	1 semana vs 5 semanas	-3,69	0,50	<0,001	-5,70	-1,67
	1 semana vs 6 semanas	-3,81	0,53	<0,001	-5,94	-1,69
	2 semanas vs 3 semanas	-0,38	0,31	>0,999	-1,61	0,86
	2 semanas vs 4 semanas	-2,00	0,40	0,001	-3,62	-0,38
	2 semanas vs 5 semanas	-2,50	0,46	<0,001	-4,36	-0,64
	2 semanas vs 6 semanas	-2,63	0,50	<0,001	-4,64	-0,61
	3 semanas vs 4 semanas	-1,63	0,31	<0,001	-2,86	-0,39
	3 semanas vs 5 semanas	-2,13	0,40	<0,001	-3,75	-0,50
	3 semanas vs 6 semanas	-2,25	0,46	0,001	-4,11	-0,39
	4 semanas vs 5 semanas	-0,50	0,31	>0,999	-1,73	0,73
	4 semanas vs 6 semanas	-0,63	0,40	>0,999	-2,25	1,00
5 semanas vs 6 semanas	-0,13	0,31	>0,999	-1,36	1,11	
Laminectomia	2 dias vs 1 semana	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23
	2 dias vs 2 semanas	0,00	0,40	>0,999	-1,62	1,62
	2 dias vs 3 semanas	0,00	0,46	>0,999	-1,86	1,86
	2 dias vs 4 semanas	0,00	0,50	>0,999	-2,02	2,02
	2 dias vs 5 semanas	0,00	0,53	>0,999	-2,12	2,12
	2 dias vs 6 semanas	0,00	0,55	>0,999	-2,20	2,20
	1 semana vs 2 semanas	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23
	1 semana vs 3 semanas	0,00	0,40	>0,999	-1,62	1,62
	1 semana vs 4 semanas	0,00	0,46	>0,999	-1,86	1,86
	1 semana vs 5 semanas	0,00	0,50	>0,999	-2,02	2,02
	1 semana vs 6 semanas	0,00	0,53	>0,999	-2,12	2,12
	2 semanas vs 3 semanas	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23
	2 semanas vs 4 semanas	0,00	0,40	>0,999	-1,62	1,62
	2 semanas vs 5 semanas	0,00	0,46	>0,999	-1,86	1,86
	2 semanas vs 6 semanas	0,00	0,50	>0,999	-2,02	2,02
	3 semanas vs 4 semanas	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23
	3 semanas vs 5 semanas	0,00	0,40	>0,999	-1,62	1,62
	3 semanas vs 6 semanas	0,00	0,46	>0,999	-1,86	1,86
	4 semanas vs 5 semanas	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23
	4 semanas vs 6 semanas	0,00	0,40	>0,999	-1,62	1,62
5 semanas vs 6 semanas	0,00	0,31	>0,999	-1,23	1,23	

Comparações múltiplas de Bonferroni

conclusão

A Tabela 9 mostra que apenas nos grupos com contusão houve alteração média estatisticamente significativa do escore BBB entre os momentos avaliados ($p < 0,05$), sendo que o escore BBB foi aumentando em média com o passar do tempo nos grupos com contusão medular.

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este trabalho tem fundamentalmente dois objetivos: avaliar o efeito da injeção e da administração de volume de solução intradurais na lesão medular contusa em ratos Wistar; e padronizar este modelo experimental, por meio da análise de sua segurança e reprodutibilidade.

O desenho desta pesquisa visa demonstrar que o possível trauma tecidual causado pela colocação da agulha no espaço intradural, em conjunto ou não com a administração de volume controlado de solução fisiológica, não é um fator independente de interferência negativa nos resultados dos efeitos histológicos e de desempenho funcional, seja motor ou eletrofisiológico, dos indivíduos. A amostra experimental é formada por 48 ratos, de modo a compor oito indivíduos por grupo, número semelhante ao de trabalhos prévios (**Bahar et al., 1984; Yoshiyama, Groat, 2008; Cheng et al., 2012; Amemori et al., 2015**) e suficiente para conferir poder de estudo à análise dos resultados. A divisão dos animais em 06 grupos visa justamente isolar experimentalmente os efeitos da injeção (punção) e da administração de volume de solução intratecais, dos efeitos já conhecidos e amplamente estudados da lesão medular contusa experimental (**Rodrigues et al., 2010; Santos et al., 2011**).

A Tabela 1 descreve os parâmetros do potencial evocado e da histologia segundo grupos e o resultado das comparações. Ela mostra que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para quase todos os parâmetros do potencial evocado ($p < 0,05$), com exceção apenas da amplitude MS ($p = 0,078$), e todos os parâmetros da histologia foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,001$). Em se tratando de contusão medular provocada ao nível anatômico da medula torácica, seria de se esperar que tanto amplitude quanto latência de MS fossem equivalentes em todos os indivíduos. A monitorização dos MS funciona nessa situação como controle de eficácia da própria monitorização. Também seria resultado esperado que nos grupos 1,2 e

6 as latências dos MI fossem menores que nos outros grupos e as amplitudes dos MI maiores que nos outros grupos. Contudo, especialmente o grupo 2, que não sofreu contusão medular, apresenta valores elevados de latência e baixos de amplitude. O comportamento eletrofisiológico do grupo 2 condiz mais com um grupo que sofreu lesão medular, uma vez que essa contusão afeta o bom funcionamento medular. Uma possível explicação para os resultados encontrados pode ser o fato de que o potencial evocado depende muito do plano anestésico (mais aprofundado ou não) em que se encontra o indivíduo. Deste modo, é de se supor que, no momento do exame pelo potencial evocado, os ratos do grupo 2 encontravam-se em plano anestésico mais profundo que os ratos dos grupos 1 e 6. Já os resultados histológicos mostram que os efeitos mais danosos aos parâmetros histológicos estudados foram encontrados nos indivíduos submetidos à contusão medular experimental.

A Tabela 2 disponibiliza a comparação dos parâmetros do potencial evocado entre os grupos dois a dois. Ela mostra que a latência MS foi em média estatisticamente menor no grupo laminectomia + Cateter + Infusão do que nos grupos Contusão medular e Contusão + Cateter ($p = 0,014$ e $p = 0,018$ respectivamente), a latência MI foi em média maior no grupo Laminectomia + Cateter + Infusão que nos demais grupos ($p < 0,05$) e foi menor no grupo Laminectomia que nos demais grupos ($p < 0,05$), a amplitude dos membros inferiores (MI) foi em média estatisticamente maior no grupo Laminectomia + Cateter que nos demais grupos ($p < 0,001$), com exceção apenas do grupo Laminectomia, cuja amplitude MI foi em média estatisticamente maior que nos demais grupos ($p < 0,001$). As melhores respostas eletrofisiológicas que podem ser encontradas no exame do potencial evocado correspondem a achados de alto valor de amplitude e baixa latência. O funcionamento dos MI é o interesse efetivo da pesquisa, já que eles são diretamente afetados por eventos traumáticos causados na região da medula torácica. Os MS servem como controle do próprio indivíduo durante o exame. Na análise pormenorizada dos resultados do potencial evocado, observa-se um achado esperado bastante coerente que é o melhor desempenho do grupo 6 (grupo controle). Os resultados que destoam um pouco do esperado são os do grupo 2, no qual se esperaria

boas respostas tanto dos MS quanto dos MI, já que não houve contusão medular. Contudo, no grupo 2, a latência dos MI está aumentada. Este achado pode ser interpretado como originário de fator anestésico ou técnico. Nos grupos 3, 4 e 5, que sofreram lesão medular, observam-se nos MI latência aumentada e amplitude reduzida. Nota-se também que os resultados encontrados para o grupo 1 foram levemente inferiores aos resultados do grupo 6 (controle), indicando possivelmente que a introdução da agulha intradural no local da laminectomia pode ter sido causa de perturbação no funcionamento eletrofisiológico medular, ainda que de forma leve. Contudo, na comparação entre os grupos que sofreram lesão medular, a punção com agulha, introdução de cateter intradural e injeção de solução não pioraram estatisticamente os resultados quando comparados ao grupo que sofreu apenas lesão medular. Infere-se, portanto, que nem a punção nem a injeção de solução intratecais agravaram os efeitos da lesão medular contusa experimental isolada.

Na Tabela 3 encontra-se a comparação dos parâmetros histológicos entre os grupos dois a dois. Ela mostra que para todos os parâmetros histológicos avaliados, os grupos Contusão medular e Contusão + Cateter apresentaram valores estatisticamente maiores do que principalmente os grupos Laminectomia, Laminectomia + Cateter e Laminectomia + Cateter + Infusão ($p < 0,05$). Para os parâmetros histológicos avaliados (hemorragia, alterações arquiteturais, necrose e infiltrado inflamatório), quanto maior for a pontuação, maior é o dano tecidual encontrado. Deste modo, identifica-se que a lesão medular de fato causa perturbações teciduais perceptíveis ao exame histológico, muito embora os valores encontrados para o grupo 5 não sejam tão altos como o esperado, inclusive sem diferença estatística para os grupos sem contusão medular. Neste grupo 5, tampouco há diferença com os outros dois grupos que sofreram contusão medular. Uma possível explicação para essa aparente discrepância é que os resultados observados neste grupo sejam oriundos de uma seleção de amostra tecidual próxima ao epicentro da lesão medular, mas não exatamente do epicentro. Destacam-se os resultados obtidos nos grupos 1 e 2 quando comparados ao grupo 6 controle. Nesta comparação, não houve diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros histológicos

avaliados, o que significa que após 6 semanas de introdução da agulha no espaço intradural, não houve ou não se mantiveram alterações histológicas significativas.

A Tabela 4 mostra a descrição do peso, plano horizontal e escore BBB segundo grupos ao longo dos momentos avaliados e resultado das comparações. Mostra também que os comportamentos médios do peso, do teste de plano horizontal e do escore BBB foram em média estatisticamente diferentes entre os grupos ao longo dos momentos avaliados ($p_{\text{Interação}} < 0,001$). Essa tabela somente reforça a importância do acompanhamento dos animais ao longo das 6 semanas de pesquisa, já que o desempenho motor pode ser dinâmico. O peso é um reflexo indireto da saúde dos animais.

Na Tabela 5 encontra-se o resultado das comparações do peso dos animais entre grupos e momentos. Pela Tabela 5, tem-se que ao final do acompanhamento, o peso médio dos animais do grupo Laminectomia foi estatisticamente maior que nos animais dos grupos Laminectomia + Cateter + Infusão ($p = 0,010$) e Contusão medular ($p < 0,001$), sendo que apenas nos grupos Laminectomia + Cateter e no grupo Laminectomia o peso aumentou em média estatisticamente do inicial para o final ($p < 0,001$). É válido apontar que, em valores absolutos, todos os grupos tiveram aumento médio do peso ao final da sexta semana de experimentação, ainda que em termos estatísticos o aumento não tenha sido significativo para todos os grupos. Os grupos que sofreram contusão medular tiveram menor aumento médio estatístico, que talvez possa ser explicado pela maior debilidade orgânica causada pela lesão medular.

Nas tabelas 6 e 7 estão detalhados os resultados encontrados para a avaliação motora do plano horizontal. A Tabela 6 expõe o resultado das comparações do plano horizontal entre os grupos em cada momento avaliado. Ela mostra que a partir de 2 dias, os valores obtidos no plano horizontal foram em média estatisticamente maiores nos grupos Laminectomia, Laminectomia + Cateter e Laminectomia + Cateter + Infusão do que nos grupos Contusão medular, Contusão + Cateter e Contusão + Cateter + Infusão ($p < 0,05$),

formando então deste modo dois agrupamentos de animais, os que sofreram contusão e os que não sofreram contusão. Essa diferença de desempenho motor no plano horizontal permanece, entre os ratos que sofreram ou não a contusão medular experimental, da primeira (2 dias pós lesão) à última (6 semanas pós lesão) avaliação. Observa-se desta forma que a lesão medular foi experimentalmente efetiva em gerar a repercussão motora esperada. É também possível extrair a interpretação de que nos grupos de animais sem contusão medular, mas com realização da injeção intratecal, associada ou não à administração de solução, quando comparados ao grupo controle (somente laminectomia), não houve diferença estatística significativa em nenhum momento da avaliação motora. Esse achado significa que a punção por agulha do espaço intradural e a administração de solução intratecal não causaram repercussões motoras significativas, nem aguda (2 dias) e nem cronicamente (6 semanas). A Tabela 7 descreve o resultado das comparações do plano horizontal entre os momentos avaliados dentro de cada grupo. Esta tabela mostra que nos grupos com contusão medular houve redução média dos valores encontrados ao longo de toda a experimentação em relação aos valores iniciais pré-operatórios (antes da intervenção experimental) ($p < 0,001$). Contudo, nestes mesmos grupos com contusão medular, os valores obtidos em média no teste voltaram a aumentar 6 semanas após a lesão experimental comparativamente em relação a 2 dias e 3 semanas ($p < 0,001$). A melhora tardia observada pode ser explicada por áreas da medula contusa que se recuperaram ao longo do tempo, gerando algum grau de recuperação motora, como já observado por **Cristante et al., 2013**, e **Letaif et al., 2015**.

Nas tabelas 8 e 9 são apresentados os resultados encontrados para a avaliação motora do teste BBB. A Tabela 8 descreve o resultado das comparações do escore BBB entre os grupos em cada momento avaliado. Esta tabela mostra que o escore BBB apresentou em média estatisticamente o mesmo comportamento que o plano horizontal, sendo que em todos os momentos avaliados os grupos sem contusão medular apresentaram em média estatisticamente maiores escores que os grupos com contusão ($p < 0,05$). De forma semelhante aos resultados do plano horizontal, a diferença de

desempenho motor no teste BBB permaneceu, entre os ratos que sofreram ou não a contusão medular experimental, do primeiro (2 dias pós lesão) ao último (6 semanas pós lesão) teste. Juntamente com o teste do plano horizontal, o teste BBB indicou que a lesão medular foi experimentalmente efetiva em gerar a repercussão motora esperada. Novamente observou-se que nos grupos de animais sem contusão medular, mas com realização da injeção intratecal, associada ou não à administração de solução, quando comparados ao grupo controle (somente laminectomia), não houve diferença estatística significativa em nenhum momento da avaliação motora. Esse comportamento reforça a observação de que o trauma tecidual da punção por agulha do espaço intradural e a administração de solução intratecal não causam repercussões motoras significativas, nem aguda (2 dias) e nem cronicamente (6 semanas). A Tabela 9 mostra o resultado das comparações do escore BBB entre os momentos avaliados dentro de cada grupo. Esta tabela indica que apenas nos grupos com contusão medular houve alteração média estatisticamente significativa do escore BBB entre os momentos avaliados ($p < 0,05$), sendo que este escore foi aumentando em média com o passar do tempo, nestes grupos. A melhora tardia dos resultados do teste BBB, nos indivíduos com contusão medular, já foi anteriormente descrita por **Cristante et al., 2013**, e **Letaif et al., 2015**. Acredita-se que áreas da medula contusa (zonas de má oxigenação e perfusão) possam apresentar recuperação ao longo do tempo, levando à melhora do desempenho motor.

Durante a avaliação do uso da via intratecal, são dois os principais pontos de dúvida e possível confusão na interpretação dos resultados experimentais. O primeiro deles diz respeito à lesão tecidual causada pela agulha na punção da meninge e na introdução do cateter intradural. É necessário ter certeza que o trauma isolado causado pela agulha ou pelo cateter não é suficiente para gerar repercussões funcionais que interfiram na análise objetiva daquilo (substância, droga, tipos celulares e outros) que está sendo primariamente avaliado (**Bahar et al., 1984; Mothe et al. 2011; Hama, Sagen, 2012**). O segundo ponto refere-se à administração de determinado volume de solução intratecal. Deve-se assegurar que o volume de solução infundido não seja, de forma independente,

deletério para a função dos indivíduos, seja essa interferência causada por efeito mecânico, inflamatório ou tóxico no tecido medular (**Gradert et al., 2003; Johansen et al., 2004; Roh et al., 2010; Mamet et al., 2017**). É importante que esses dois pontos sejam absolutamente seguros e não levem a alterações de desfecho, principalmente quando está se testando o modelo de lesão medular experimental (**Horiuchi et al., 2003; Yoshiyama; Groat, 2008; Schira et al. 2012; Kim et al., 2015; Pakulska et al., 2017**). A lesão medular causa, por si só, repercussões motoras, funcionais e histológicas conhecidas (**Rodrigues et al., 2010; Santos et al., 2011**) e, portanto, é de suma importância que os únicos efeitos que gerem alteração na evolução funcional, motora ou histológica sejam aqueles diretamente relacionados à intervenção terapêutica experimental (substância, droga, tipos celulares e outros) avaliada.

Diferentemente de estudos precusores com cateterização crônica do espaço intratecal (**Yaksh; Rudy, 1976; Martin et al., 1984; Jasmin; Ohara, 2001; Kratzsch et al., 2015; Mazur et al., 2017**), o presente estudo utilizou o cateter apenas durante o momento da administração da solução intradural. Neste trabalho, como descrito por **Storkson et al. (1996)**, o cateter foi introduzido por punção de agulha. A desvantagem da remoção do cateter após o uso agudo e único é que não há a possibilidade de realizar administração de solução medicamentosa ou de terapia celular em diferentes momentos da experimentação. A remoção precoce do cateter não permite comparação de efeitos funcionais e histológicos agudos ou crônicos da infusão de substâncias no espaço intratecal. Por outro lado, evitar a manutenção do cateter dentro do espaço intradural elimina o fator de interferência direta da presença do cateter sobre os desfechos funcionais e histológicos. Desta forma, o emprego único e imediato do cateter para a infusão, isenta-o de ser considerado fator de confusão na interpretação dos resultados ao longo dos períodos de experimentação e testes.

Os resultados experimentais encontrados neste presente estudo reforçam achados de estudos prévios (**Stokes et al., 2011; Martini et al., 2016; Gao et al., 2016; Sang et al., 2016; Mamet et al., 2017; Murai et al., 2017; Ozkunt et**

al., 2017; Rong et al., 2017), que mostram a segurança e reprodutibilidade da via intratecal para pesquisa. Entretanto, esses estudos prévios não avaliaram individualmente a via intratecal em sua integralidade, considerando-se aspectos motores, funcionais e histológicos no mesmo ensaio. Em trabalhos metodologicamente semelhantes ao presente estudo como, por exemplo: trabalho de **Tian et al. (2013)** foram realizados dois testes motores (BBB e plano inclinado) e teste imunohistoquímico, mas não foi feita a avaliação funcional por potencial evocado; no trabalho de **Cheng et al. (2012)** foram somente realizados o teste BBB e a avaliação histológica; no trabalho de **Martini et al. (2016)** foram realizados apenas um único teste motor (BBB), teste imunohistoquímico, e avaliação histológica; **Kanekiyo et al. (2018)** fizeram somente teste BBB e avaliação histológica. Neste sentido, o presente estudo é pioneiro na análise conjunta de dois diferentes testes funcionais motores, potencial evocado e avaliação histológica em modelo animal de lesão medular associada à injeção intratecal.

Todos os estudos científicos apresentam algum grau de limitação científica, seja em sua metodologia, número de análises, quantidade de testes realizados, resultados ou conclusões. Também no presente trabalho, que não foge à regra, encontram-se limitações. Uma das limitações identificadas é que este presente trabalho não avaliou as alterações histológicas agudas causadas pela introdução de agulha, cateter e solução intradurais. Possíveis diferenças agudas encontradas nas amostras teciduais entre o grupo controle e os grupos que sofreram a punção intratecal poderão ser mais bem estudadas com um desenho de estudo em que o sacrifício dos animais ocorra mais precocemente, como realizado por **Führmann et al. (2018)**, por exemplo, e deste modo uma análise histológica precoce possa ser conduzida. Ainda com relação ao intervalo temporal na experimentação, o trabalho atual tampouco fez como os estudos de **Cheng et al. (2017)** e **Führmann et al. (2018)** que realizaram punções intradurais em diferentes fases temporais após a lesão medular experimental. É possível que a punção intradural tenha diferentes repercussões histológicas e funcionais conforme a fase inflamatória temporal em que se encontre a medula contusa. Outra limitação do presente estudo é a não realização da avaliação

imunohistoquímica, como feito por **Tian et al. (2013)**, **Martini et al. (2016)** e **Rong et al. (2017)**. Os autores **Rong et al. (2017)**, inclusive, também fizeram, além da avaliação imunohistoquímica, PCR, Western Blot e ensaio imunoenzimático. O conjunto dessas avaliações permite melhor análise da resposta inflamatória tecidual. No presente estudo a única avaliação direta da inflamação foi a análise histológica do tecido medular. Pode-se ainda considerar como limitação deste estudo o fato de a punção intradural ter sido realizada somente na área do epicentro da lesão medular (LM), a exemplo do que foi publicado por **Ozkunt et al. (2017)**, mas diferentemente do que foi realizado por **Cheng et al. (2016)**. Inclusive **Cheng et al. (2016)** demonstraram melhor recuperação funcional nos ratos que receberam células tronco por injeção intratecal distalmente ao local anatômico da LM. **Führmann et al. (2018)** também fizeram punções craniais e distais ao epicentro da LM para ampliar a sua investigação.

Este presente estudo padroniza o uso da via intratecal em ratos submetidos à lesão medular controlada, experimental, por queda de peso. Ele também realiza a mensuração dos efeitos funcionais e histológicos oriundos da punção e da infusão de líquido no espaço intradural no local do tecido medular contuso. Desse modo, este estudo inaugura uma linha de pesquisa inédita em nossa instituição, com futuro promissor. Há grande interesse, em nosso meio acadêmico e institucional, em que o já consagrado modelo animal de lesão medular experimental em ratos (**Rodrigues et al., 2010; Santos et al., 2011**) possa ter o seu emprego ampliado utilizando-se a via intratecal para a administração de drogas, substâncias e no estudo da terapia celular. O domínio da técnica da via intratecal fornece, junto com a demonstração de segurança e reprodutibilidade em seu emprego, a possibilidade de expansão dos protocolos de pesquisa e da gama de intervenções terapêuticas experimentais (**Schubert et al., 2011; Jones et al., 2012a; Jones et al., 2012b; Kucher et al., 2018**).

7. CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho padroniza o modelo experimental da injeção intradural na lesão medular contusa em ratos. Este modelo demonstra, por meio da avaliação de parâmetros funcionais motores, potencial evocado e histologia, a reprodutibilidade e, fundamentalmente, a segurança da punção e injeção de solução intradurais, mesmo quando associadas à contusão medular experimental padronizada. A punção e injeção de solução intratecais não causaram, de modo independente, alterações funcionais ou histológicas significativas nos animais do estudo.

8. ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Padronização do Modelo Experimental de Injeção Intradural em ratos**”, registrada com o nº 001/17, sob a responsabilidade de **Tarcísio E.P. Barros Filho e Olavo Biraghi Letaif**, apresentada pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 05.04.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 28-11-2016 Término: 26-11-2018
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	48
Peso/Idade	12 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério do ICB

CEUA-FMUSP, 05 de Abril de 2017

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

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

ANEXO B – Ficha Janus do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

5140 - 3108919/3 - Olavo Biraghi Letaif

Email:	olavo.letaif@hc.fm.usp.br
Data de Nascimento:	12/03/1980
Cédula de Identidade:	RG - 32.033.384-X - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Médico - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2004
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Ortopedia e Traumatologia - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014
Curso:	Doutorado
Programa:	Ciências do Sistema Musculoesquelético
Data de Matrícula:	30/11/2016
Início da Contagem de Prazo:	30/11/2016
Data Limite para o Depósito:	30/11/2020
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Tarcisio Eloy Pessoa de Barros Filho - 30/11/2016 até o presente. Email: pebarros@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 30/11/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 08/01/2019
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 30/11/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Impresso em: 10/09/2020 15:43:12

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

5140 - 3108919/3 - Olavo Biraghi Letaif

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MPT5740-5/4	Telemedicina	07/04/2017	01/06/2017	120	8	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	5	8	8
Estágios:			
Total:	5	8	8

Créditos Atribuídos à Tese: 176

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Impresso em: 10/09/2020 15:43:12

ANEXO C - Escala BBB de avaliação funcional (Basso et al., 1995)

Movimento do membro posterior						Posição do tronco				Abdome	Movimento da pata dianteira				Pisada				Coordenação	Liberação dos dedos				Posição predominante da pata				Instabilidade do tronco	Cauda
Quadri		Joelho		Tornoz		Lado		Apoio			Balanço	Apoio da pata				Dorsal		Plantar		E	D	Contato inicial		Elevação					
E	D	E	D	E	D	E	D	E	D			Sem suporte e de peso	Com suporte e de peso	E	D	E	D	E				D	E	D	E	D	E		
0	0	0	0	0	0	E	D	E	D	Arrasta	E	D	E	D	E	D	0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I	Para cima (elevada)	
S	S	S	S	S	S												O	O	O	O	O	O	O	O	E	E	E		E
E	E	E	E	E	E	Central				Paralel							F	F	F+	F+	F	F**	F**	P	P	P	P	Para baixo (abaixada)	
											Alt							C	C	C	C	C	C	C	C				

Comentários: _____

Movimento

0 = Nenhum; S = Suave (discreto); E = Extenso; + = Pisada dorsal > 4 passos da pata posterior; * = Liberação < 50%; ** = Dedos arrastando > 4 passos da pata posterior; 0 = Nunca (0%); O = Ocasional (< 50%); F = Frequente (51-94%); C = Consistente (95-100%); I = Rotação interna; E = Rotação externa; P = Paralelo.

ANEXO D - Escala BBB de avaliação funcional de 21 pontos de Basso et al. (1995)

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) <u>ou</u> passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de piso frequente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.

continua

continuação

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
13	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.

continua

continuação

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.

conclusão

Definições	
Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente se inclina lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para a frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.
Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, $\leq 50\%$.
Frequente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51- 94%.
Consistente	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%.
Instabilidade do tronco	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco.

ANEXO E - Tabelas com os resultados de todos os testes e análises realizados sem o tratamento estatístico (as tabelas com estatística são apresentadas na seção dos Resultados).

Avaliação funcional teste BBB

Tabela 10 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 1

Grupo 1	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
Rato 1	18	19	18	19	18	19	19	21	21	21	21	21	21	21
Rato 2	20	21	21	21	20	20	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 3	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 4	20	19	21	21	18	21	21	21	19	21	21	21	21	21
Rato 5	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 6	18	19	18	19	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 7	20	20	19	20	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 8	19	20	20	19	19	20	21	19	21	21	21	21	21	21

E: esquerda; D: direita

Tabela 11 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 2

Grupo 2	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
Rato 1	18	18	18	18	18	20	18	21	18	20	20	20	21	21
Rato 2	20	20	19	20	20	20	20	20	21	21	21	21	21	21
Rato 3	18	19	19	19	19	19	19	19	19	20	21	20	20	20
Rato 4	18	19	19	19	19	21	19	21	21	21	21	21	21	21
Rato 5	19	21	21	21	21	21	19	19	21	21	21	21	21	21
Rato 6	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 7	20	21	21	21	19	19	19	19	20	21	20	20	19	21
Rato 8	20	21	21	20	21	21	21	20	21	21	21	21	21	21

E: esquerda; D: direita

Tabela 12 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 3

Grupo 3	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
Rato 1	0	1	0	0	0	0	7	6	8	8	8	8	9	9
Rato 2	0	0	0	0	2	2	3	3	5	5	7	7	7	7
Rato 3	1	0	0	1	4	3	5	5	5	5	5	5	5	6
Rato 4	2	0	3	0	5	5	6	7	6	7	5	7	7	7
Rato 5	0	0	0	0	2	2	5	5	7	7	7	7	8	8
Rato 6	0	0	1	0	2	2	3	2	3	4	5	4	3	7
Rato 7	0	0	0	0	4	4	6	6	9	9	7	9	7	9
Rato 8	0	1	0	0	2	2	5	6	9	8	8	8	8	8

E: esquerda; D: direita

Tabela 13 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 4

Grupo 4	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
Rato 1	0	2	0	1	1	1	8	7	7	7	6	6	8	9
Rato 2	0	0	1	0	2	2	4	4	4	5	7	8	7	9
Rato 3	1	1	0	1	3	3	6	6	6	5	5	5	6	5
Rato 4	2	0	1	0	4	3	4	4	4	4	4	4	5	5
Rato 5	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Rato 6	0	0	1	4	4	4	6	5	6	5	6	6	6	7
Rato 7	0	0	0	0	4	4	6	6	8	8	7	9	7	9
Rato 8	0	1	0	0	2	2	5	4	7	7	6	6	8	8

Tabela 14 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 5

Grupo 5	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
Rato 1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	5
Rato 2	0	0	0	0	3	3	3	3	6	7	8	8	8	8
Rato 3	2	2	4	4	4	4	5	5	5	7	6	6	6	6
Rato 4	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	1	1	2
Rato 5	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3
Rato 6	0	0	2	2	6	5	5	5	5	5	6	5	6	5
Rato 7	0	0	3	3	3	3	3	3	7	7	7	7	7	7
Rato 8	0	0	0	0	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5

Tabela 15 - Pontuação do teste BBB para cada um dos indivíduos do grupo 6

Grupo 6	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
Rato 1	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 2	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 3	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 4	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 5	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 6	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 7	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Rato 8	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21

Avaliação funcional teste plano horizontal
Pré-operatório

Tabela 16 - Pontuação do teste do plano horizontal, pré lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
1	1	48	45	3	
	2	43	41	2	
	3	45	45	0	
	4	44	43	1	
	5	50	48	2	
	6	47	47	0	
	7	48	47	1	
	8	51	49	2	
2	1	43	39	4	
	2	45	42	3	
	3	48	47	1	
	4	44	38	4	

continua

continuação

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
	5	49	48	1	
	6	40	38	2	
	7	44	41	3	
	8	47	44	3	
	1	51	49	2	
	2	49	49	0	
	3	52	51	1	
3	4	53	52	1	
	5	46	46	0	
	6	48	46	2	
	7	44	43	1	
	8	39	39	0	
	1	45	45	0	
	2	43	42	1	
	3	45	44	1	
4	4	43	40	3	
	5	50	49	1	
	6	51	48	3	
	7	49	49	0	
	8	47	45	2	
	1	48	48	0	
	2	44	42	2	
5	3	40	39	1	
	4	39	36	3	

continua

					continuação
Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
	5	44	41	2	
	6	47	45	2	
	7	48	47	1	
	8	45	45	0	
6	1	47	47	0	
	2	45	43	2	
	3	39	39	0	
	4	45	43	2	
	5	46	45	1	
	6	48	45	3	
	7	46	44	2	
	8	47	46	1	
					conclusão

2º dia pós-operatório

Tabela 17 - Pontuação do teste do plano horizontal, após 48 horas de lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
1	1	51	46	5	
	2	48	47	1	
	3	49	45	4	
	4	53	45	8	
	5	55	50	5	
	6	51	49	2	
	7	55	51	4	
	8	50	49	1	
2	1	55	51	3	
	2	56	50	6	
	3	49	44	5	
	4	52	50	2	
	5	51	48	3	
	6	55	50	5	
	7	54	50	4	
	8	53	51	2	
3	1	0	0	0	
	2	0	0	0	

continua

continuação						
Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal	
	3	0	0	0		
	4	0	0	0		
	5	0	0	0		
	6	0	0	0		
	7	0	0	0		
	8	0	0	0		
4	1	0	0	0		
	2	0	0	0		
	3	0	0	0		
	4	0	0	0		
	5	0	0	0		
	6	0	0	0		
	7	0	0	0		
	8	0	0	0		
5	1	0	0	0		
	2	0	0	0		
	3	0	0	0		
	4	0	0	0		
	5	0	0	0		
	6	0	0	0		
	7	0	0	0		
	8	0	0	0		
6	1	43	43	0	0	
	2	44	41	3	0	

continua

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	continuação
					Pisada dorsal
	3	38	35	3	0
	4	44	43	1	0
	5	45	44	1	0
	6	39	38	1	0
	7	44	41	3	0
	8	44	43	1	0

conclusão

21° dia pós-operatório

Tabela 18 - Pontuação do teste do plano horizontal, após 21 dias de lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
1	1	53	50	2	1
	2	47	45	2	1
	3	50	48	1	1
	4	51	49	2	0
	5	53	50	2	1
	6	51	35	3	3
	7	55	50	3	2
	8	53	48	2	3
2	1	54	53	1	
	2	55	41	4	
	3	52	44	7	
	4	55	53	2	
	5	53	48	5	
	6	55	50	5	
	7	56	53	3	
	8	52	50	1	1
3	1	0	0	0	
	2	0	0	0	

continua

continuação

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
	3	0	0	0	
	4	0	0	0	
	5	0	0	0	
	6	0	0	0	
	7	0	0	0	
	8	0	0	0	
4	1	0	0	0	
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
	4	0	0	0	
	5	0	0	0	
	6	0	0	0	
	7	0	0	0	
	8	0	0	0	
5	1	0	0	0	
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
	4	0	0	0	
	5	0	0	0	
	6	0	0	0	
	7	0	0	0	
	8	0	0	0	
6	1	39	39	0	
	2	38	36	2	

continua

continuação

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
	3	41	39	2	
	4	41	38	3	
	5	44	41	3	
	7	41	41	0	
	8	45	43	2	

conclusão

42° dia pós-operatório
Tabela 19 - Pontuação do teste do plano horizontal, após 42 dias de lesão medular experimental, para cada um dos indivíduos do grupo 1 ao grupo 6

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
1	1	48	46	2	0
	2	44	44	0	0
	3	49	48	0	1
	4	53	49	2	2
	5	48	46	1	1
	6	52	50	0	2
	7	48	47	1	0
	8	52	50	1	1
2	1	48	47	1	0
	2	54	52	2	0
	3	51	49	1	1
	4	53	53	0	0
	5	48	45	2	1
	6	56	55	1	0
	7	56	55	1	0
	8	50	50	0	0
3	1	12	10	1	1
	2	8	4	2	2
	3	9	7	1	1
	4	12	10	1	1

continua

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	continuação
					Pisada dorsal
	5	18	13	3	2
	6	19	16	1	2
	7	14	13	0	1
	8	15	13	1	1
4	1	12	11	0	1
	2	14	11	1	2
	3	15	12	2	1
	4	16	13	2	1
	5	18	13	2	3
	6	19	13	4	2
	7	13	11	2	0
	8	15	13	2	0
5	1	8	6	2	0
	2	11	8	3	1
	3	12	7	2	3
	4	7	5	1	1
	5	8	5	3	0
	6	13	9	2	2
	7	13	11	1	1
	8	10	8	1	1
6	1	38	37	1	0
	2	40	39	1	0
	3	41	38	3	0
	4	37	35	3	0
	5	42	41	1	0

continua

Grupo	Rato	Passos	Acertos	Escorregadas	Pisada dorsal
	7	44	41	3	0
	8	46	42	2	0

conclusão

Avaliação potencial evocado

Grupo 1

Tabela 20 - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 1

Rato	Latência (ms)				Amplitude (mv)			
	MSE	MSD	MIE	MID	MSE	MSD	MIE	MID
1	3,5	4,1	6,3	6,8	3.889	3.788	1002	1202
2	4,1	4,2	7,6	7,5	3.788	3.665	1252	1.423
3	6,2	6,4	4,1	7,3	4.632	4.215	1052	985
4	3,9	5,1	4,6	8,4	3.652	2.553	989	1025
5	5,8	4,3	8,1	9,3	4.663	2.225	1320	1110
6	4,7	4,9	7,3	10,2	3.285	3.662	1452	1254
7	Dados não passíveis de obtenção por depressão pós-anestésica do animal							
8	5,1	5,6	6,3	8,1	3.256	3.546	998	1.001

MSD: Membro superior direito; MSE: Membro superior esquerdo; MID: Membro inferior direito; MIE: Membro inferior esquerdo; ms: milissegundo; mv: milivolt

Grupo 2**Tabela 21** - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 2

Rato	Latência (ms)				Amplitude (mv)			
	MSE	MSD	MIE	MID	MSE	MSD	MIE	MID
1	2,1	2,9	10,1	11,3	3.456	3.451	523	536
2	4,9	3,4	11	8,2	3.652	3.874	623	456
3	Dados não passíveis de obtenção por depressão pós-anestésica do animal							
4	5,2	6,1	12,3	11,3	4.256	4.525	262	365
5	3,3	2,1	9,6	8,5	2.365	2.452	245	542
6	2,5	3,7	8,2	12,3	3.652	2.151	458	245
7	2,1	3,5	7,3	11,4	3.333	2.522	699	345
8	4,6	2,6	9,5	16,3	3.252	2.152	256	663

MSD: Membro superior direito; MSE: Membro superior esquerdo; MID: Membro inferior direito; MIE: Membro inferior esquerdo; ms: milissegundo; mv: milivolt

Grupo 3**Tabela 22** - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 3

Rato	Latência (ms)				Amplitude (mv)			
	MSE	MSD	MIE	MID	MSE	MSD	MIE	MID
1	5,3	4,8	8,9	7,4	4.888	3.622	774	655
2	3,5	4,2	6,9	6,5	3.987	3.256	854	684
3	4,6	4,8	7,3	7,1	4.775	4.256	554	452
4	5,8	4,1	8,1	9,3	3.555	3.225	225	215
5	7,3	6,8	4,9	5,6	4.522	2.445	223	322
6	6,2	6,1	5,2	3,5	4.578	2.336	252	335
7	4,5	4,1	5,7	9,1	3.652	4.225	260	215
8	5,3	3,9	6,9	7,6	4.295	3.125	225	225

MSD: Membro superior direito; MSE: Membro superior esquerdo; MID: Membro inferior direito; MIE: Membro inferior esquerdo; ms: milissegundo; mv: milivolt

Grupo 4**Tabela 23** - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 4

Rato	Latência (ms)				Amplitude (mv)			
	MSE	MSD	MIE	MID	MSE	MSD	MIE	MID
1	5,8	5,2	7	9	4,662	4122	198	256
2	Dados não passíveis de obtenção por depressão pós-anestésica do animal							
3	5	5,4	8	8,6	4.622	4.532	335	225
4	5	3,8	7,3	6,5	4.221	4.555	145	154
5	4	5,8	6,4	8,6	3.222	4.122	122	255
6	5,5	5,6	7,9	7,9	1.222	2.005	125	225
7	6,1	4,8	7,6	10	1775	1665	122	178
8	4,6	4,7	8,6	8,9	3.222	3.451	298	369

MSD: Membro superior direito; MSE: Membro superior esquerdo; MID: Membro inferior direito; MIE: Membro inferior esquerdo; ms: milissegundo; mv: milivolt

Grupo 5**Tabela 24** - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 5

Rato	Latência (ms)				Amplitude (mv)			
	MSE	MSD	MIE	MID	MSE	MSD	MIE	MID
1	3,3	3,8	6,9	6,2	4,112	4.999	122	156
2	Dados não passíveis de obtenção por depressão pós-anestésica do animal							
3	4,7	5,6	8,7	9,12	3.333	3.765	224	226
4	5	3,8	5,9	7	3.998	3.454	221	198
5	4	5,8	7,7	8,4	4.004	4.333	89	90
6	5,5	5,6	8,3	9	3.899	3.001	112	134
7	6,1	4,8	6,9	10,1	3.223	2.989	134	165
8	4,6	4,7	8,9	11,3	3.455	3.220	156	200

MSD: Membro superior direito; MSE: Membro superior esquerdo; MID: Membro inferior direito; MIE: Membro inferior esquerdo; ms: milissegundo; mv: milivolt

Grupo 6**Tabela 25** - Valores obtidos no potencial evocado (realizado após 42 dias de lesão medular experimental) para cada um dos indivíduos do grupo 6

Rato	Latência (ms)				Amplitude (mv)			
	MSE	MSD	MIE	MID	MSE	MSD	MIE	MID
1	3,2	3,1	4,3	3,7	3.588	3.545	3.658	3.478
2	3,8	3,7	3,6	3,5	3.214	3.652	2.895	3.001
3	4,8	5,2	4,3	3,9	4.552	3.999	3.558	3.625
4	4,7	3,2	5,1	4,8	6.333	5.645	4.251	4.521
5	5,6	4,1	2,6	3,8	2.556	3.125	3.555	3.569
6	5,1	5,1	3,9	2,7	3.698	3.665	4.251	3.875
7	4,9	5,6	4,3	4,6	6.528	3.652	4.362	3.658
8	5,3	4,9	6,1	5,1	5.468	4.325	3.652	4.125

MSD: Membro superior direito; MSE: Membro superior esquerdo; MID: Membro inferior direito; MIE: Membro inferior esquerdo; ms: milissegundo; mv: milivolt

9. REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999;44(5):1027-40.

Amemori T, Ruzicka J, Romanyuk N, Jhanwar-Uniyal M, Sykova E, Jendelova P. Comparison of intraspinal and intrathecal implantation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors for the treatment of spinal cord injury in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:257.

Bahar M, Rosen M, Vickers MD. Chronic cannulation of the intradural or extradural space in the rat. *Br J Anaesth*. 1984;56(4):405-10.

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

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

Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17(10):915-25.

Bolton DA, Tse AD, Ballermann M, Misiaszek JE, Fouad K. Task specific adaptations in rat locomotion: runway versus horizontal ladder. *Behav Brain Res*. 2006;168(2):272-9.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon JC, Marshall LF. Methylprednisolone or

naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1- year follow-up: results of the second national acute spinal cord injury study. *J Neurosurg.* 1992;76(1):23-31.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial national acute spinal cord injury study. *JAMA.* 1997;277(20):1597-604.

Chen JJ, Dai L, Zhao LX, Zhu X, Cao S, Gao YJ. Intrathecal curcumin attenuates pain hypersensitivity and decreases spinal neuroinflammation in rat model of monoarthritis. *Sci Rep.* 2015;5:10278.

Cheng I, Mayle RE, Cox CA, Park DY, Smith RL, Corcoran-Schwartz I, Ponnusamy KE, Oshtory R, Smuck MW, Mitra R, Kharazi AI, Carragee EJ. Functional assessment of the acute local and distal transplantation of human neural stem cells after spinal cord injury. *Spine J.* 2012;12(11):1040-4.

Cheng I, Githens M, Smith RL, Johnston TR, Park DY, Stauff MP, Salari N, Tileston KR, Kharazi AI. Local versus distal transplantation of human neural stem cells following chronic spinal cord injury. *Spine J.* 2016;16(6):764-9.

Cheng I, Park DY, Mayle RE, Githens M, Smith RL, Park HY, Hu SS, Alamin TF, Wood KB, Kharazi AI. Does timing of transplantation of neural stem cells following spinal cord injury affect outcomes in an animal model? *J Spine Surg.* 2017;3(4):567-71.

Chotivichit A, Ruangchainikom M, Chiewvit P, Wongkajornsilp A, Sujirattanawimol K. Chronic spinal cord injury treated with transplanted autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells tracked by magnetic resonance imaging: a case report. *J Med Case Rep.* 2015;9:79.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: COBEA; 1991.

Coronel MF, Raggio MC, Adler NS, De Nicola AF, Labombarda F, González SL. Progesterone modulates pro-inflammatory cytokine expression profile after spinal cord injury: implications for neuropathic pain. *J Neuroimmunol.* 2016;292:85-92.

Costa DD, Beghi E, Carignano P, Pagliacci C, Faccioli F, Pupillo E, Messina P, Gorio A, Redaelli T. Tolerability and efficacy of erythropoietin (EPO) treatment in traumatic spinal cord injury: a preliminary randomized comparative trial vs. methylprednisolone (MP). *Neurol Sci.* 2015;36(9):1567-74.

Cristante AF, Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord.* 2013;51(6):501-7.

Ding WX, Shen HM, Ong CN. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2000;32(3):547-55.

Erschbamer MK, Pham TM, Zwart MC, Baumans V, Olson L. Neither environmental enrichment nor voluntary wheel running enhances recovery from incomplete spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2006;201(1):154-64.

Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y. Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis. *J Neurotrauma.* 1996;13(9):537-48.

Feng T, Yin Q, Weng ZL, Zhang JC, Wang KF, Yuan SY, Cheng W. Rapamycin ameliorates neuropathic pain by activating autophagy and inhibiting interleukin-1 β in the rat spinal cord. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2014;34(6):830-7.

Ferreira R, Oliveira AR, Barros Filho TEP. Standardization of motor evoked potential captivation technique in rats through transcranial electric stimulus. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(3):112-4.

Flecknell PA. Analgesia of small mammals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2018;21(1):83-103.

Fu ES, Tummala RP. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma. *Current Opin Anaesthesiol.* 2005;18(2):181-7.

Führmann T, Anandakumaran PN, Payne SL, Pakulska MM, Varga BV, Nagy A, Tator C, Shoichet MS. Combined delivery of chondroitinase ABC and human induced pluripotent stem cell-derived neuroepithelial cells promote tissue repair in an animal model of spinal cord injury. *Biomed Mater.* 2018;13(2):024103.

Gao J, You J, Chen P. Effect of intrathecal anti-fibroblast growth factor-2 antibodies on the mechanical allodynia and activation of spinal cord astrocytes in rats. *Turk Neurosurg.* 2016;26(4):582-5.

Girgis J, Merrett D, Kirkland S, Metz GAS, Verge V, Fouad K. Reaching training in rats with spinal cord injury promotes plasticity and task specific recovery. *Brain.* 2007;130(Pt 11):2993-3003.

Gradert TL, Baze WB, Satterfield WC, Hildebrand KR, Johansen MJ, Hassenbusch SJ. Safety of chronic intrathecal morphine infusion in a sheep model. *Anesthesiology.* 2003;99(1):188-98.

Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA, editors. *Veterinary anesthesia and analgesia: the fifth edition of lumb and Jones.* Hoboken: John Wiley & Sons; 2015.

Hama A, Sagen J. Combinations of intrathecal gamma-amino-butyrate receptor agonists and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Eur J Pharmacol.* 2012;683(1-3):101-8.

Horiuchi H, Ogata T, Morino T, Chuai M, Yamamoto H. Continuous intrathecal infusion of SB203580, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces the damage of hind-limb function after thoracic spinal cord injury in rat. *Neurosci Res.* 2003;47(2):209-17.

Hosseini M, Karami Z, Yousefifard M, Janzadeh A, Zamani E, Nasirinezhad F. Simultaneous intrathecal injection of muscimol and endomorphin-1 alleviates neuropathic pain in rat model of spinal cord injury. *Brain Behav.* 2020;10(5):e01576.

Huot-Lavoie M, Ting WK, Demers M, Mercier C, Ethier C. Impaired motor learning following a pain episode in intact rats. *Front Neurol.* 2019;27;10:927.

Hurlbert R.J. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg.* 2000;93(1 Suppl):1-7.

Jasmin L, Ohara PT. Long-term intrathecal catheterization in the rat. *J Neurosci Methods.* 2001;110(1-2):81-9.

Johansen MJ, Satterfield WC, Baze WB, Hildebrand KR, Gradert TL, Hassenbusch SJ. Continuous intrathecal infusion of hydromorphone: safety in the sheep model and clinical implications. *Pain Med.* 2004;5(1):14-25.

Jones CF, Lee JH, Kwon BK, Cripton PA. Development of a large-animal model to measure dynamic cerebrospinal fluid pressure during spinal cord injury: laboratory investigation. *J Neurosurg Spine.* 2012a;16(6):624-35.

Jones CF, Newell RS, Lee JH, Cripton PA, Kwon BK. The pressure distribution of cerebrospinal fluid responds to residual compression and decompression in

an animal model of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012b;37(23):E1422-31.

Kanekiyo K, Wakabayashi T, Nakano N, Yamada Y, Tamachi M, Suzuki Y, Fukushima M, Saito F, Abe S, Tsukagoshi C, Miyamoto C, Ide C. Effects of intrathecal injection of the conditioned medium from bone marrow stromal cells on spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2018;35(3):521-32.

Kim KT, Kim HJ, Cho DC, Bae JS, Park SW. Substance P stimulates proliferation of spinal neural stem cells in spinal cord injury via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Spine J*. 2015;15(9):2055-65.

Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts; 2006.

Krajacic A, Weishaupt N, Girgis J, Tetzlaff W, Foud K. Training-induced plasticity in rats with cervical spinal cord injury: effects and side effects. *Behav Brain Res*. 2010;214(2):323-31.

Kratzsch T, Stienen MN, Reck T, Hildebrandt G, Hoederath P. Catheter-tip granulomas associated with intrathecal drug delivery--a two-center experience identifying 13 cases. *Pain Physician*. 2015;18(5):E831-40.

Kucher K, Johns D, Maier D, Abel R, Badke A, Baron H, Thietje R, Casha S, Meindl R, Gomez-Mancilla B, Pfister C, Rupp R, Weidner N, Mir A, Schwab ME, Curt A. First-in-man intrathecal application of neurite growth-promoting Anti-Nogo-A antibodies in acute spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*. 2018;32(6-7):578-89.

Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*. 2014;52(2):110-6.

Letaif OB, Cristante AF, Barros Filho TE, Ferreira R, Santos GB, Rocha ID, Marcon RM. Effects of estrogen on functional and neurological recovery after spinal cord injury: an experimental study with rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(10):700-5.

Mamet J, Yeomans DC, Yaksh TL, Manning DC, Harris S. Editor's highlight: formulation and toxicology evaluation of the intrathecal AYX1 DNA-DECOY in sprague dawley rats. *Toxicol Sci*. 2017;159(1):76-85.

Marques MR, Nicola FC, Sanches EF, Arcego DM, Durán-Carabali LE, Aristimunha D, Dalmaz C, Netto CA. Locomotor training promotes time-dependent functional recovery after experimental spinal cord contusion. *Neuroscience*. 2018;392:258-69.

Martin H, Kocher L, Chery-Croze S. Chronic lumbar intrathecal catheterization in the rat with reduced-length spinal compression. *Physiol Behav*. 1984;33(1):159-61.

Martini AC, Forner S, Koepp J, Rae GA. Inhibition of spinal c-Jun-NH2-terminal kinase (JNK) improves locomotor activity of spinal cord injured rats. *Neurosci Lett*. 2016;621:54-61.

Masini M. Estimativa da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. *J Bras Neurocirurg*. 2001;12(2):97-100.

Mazur C, Fitzsimmons B, Kamme F, Nichols B, Powers B, Wancewicz E. Development of a simple, rapid, and robust intrathecal catheterization method in the rat. *J Neurosci Methods*. 2017;280:36-46.

McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 1989.

McDowell ML, Das A, Smith JA, Varma AK, Ray SK, Banik NL. Neuroprotective effects of genistein in VSC4.1 motoneurons exposed to activated microglial cytokines. *Neurochem Int.* 2011;59(2):175-84.

Miranda TAB, Vicente JMY, Marcon RM, Cristante AF, Morya E, Valle AC. Time-related effects of general functional training in spinal cord-injured rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(7):799-804.

Miyazato M, Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashimine S, Ogawa Y. Intrathecal or dietary glycine inhibits bladder and urethral activity in rats with spinal cord injury. *J Urol.* 2005;174(6):2397-400.

Mothe AJ, Bozkurt G, Catapano J, Zabojska J, Wang X, Keating A, Tator CH. Intrathecal transplantation of stem cells by lumbar puncture for thoracic spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord.* 2011;49(9):967-73.

Murai N, Hiyama H, Kiso T, Sekizawa T, Watabiki T, Oka H, Aoki T. Analgesic effects of novel lysophosphatidic acid receptor 5 antagonist AS2717638 in rodents. *Neuropharmacology.* 2017;126:97-107.

Neter J, Kutner M, Wasserman W, Nachtsheim C. *Applied linear statistical models.* 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1996.

Neuhuber B, Barshinger AL, Paul C, Shumsky JS, Mitsui T, Fischer I. Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. *J Neurosurg Spine.* 2008;9(4):390-9.

New York University, Medical Center. Impactor. NYU Spinal cord contusion system. Operation manual. *Impactor software version 7.0.* New York; 1993.

Ozkunt O, Sariyilmaz K, Gemalmaz HC, Gürgen SG, Yener U, Dikici F. Investigation of efficacy of treatment in spinal cord injury: erythropoietin versus

methylprednisolone. *J Orthop Surg* (Hong Kong). 2017;25(3):2309499017739481.

Pakulska MM, Tator CH, Shoichet MS. Local delivery of chondroitinase ABC with or without stromal cell-derived factor 1 α promotes functional repair in the injured rat spinal cord. *Biomaterials*. 2017;134:13-21.

Paschon V, Morena BC, Correia FF, Beltrame GR, Santos GB, Cristante AF, Kihara AH. VDAC1 is essential for neurite maintenance and the inhibition of its oligomerization protects spinal cord from demyelination and facilitates locomotor function recovery after spinal cord injury. *Scientific Reports*. 2019;9(1):14063.

Pleticha J, Maus TP, Jeng-Singh C, Marsh MP, Al-Saiegh F, Christner JA, Lee KH, Beutler AS. Pig lumbar spine anatomy and imaging-guided lateral lumbar puncture: a new large animal model for intrathecal drug delivery. *J Neurosci Methods*. 2013;216(1):10-5.

Protopapas MG, Bundock E, Westmoreland S, Nero C, Graham WA, Nesathurai S. The complications of scar formation associated with intrathecal pump placement. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007;88(3):389-90.

Ray SK, Matzelle DD, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Cell death in spinal cord injury (SCI) requires de novo protein synthesis. Calpain inhibitor E-64-d provides neuroprotection in SCI lesion and penumbra. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:436-49.

Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Standardization of spinal cord injury in wistar rats. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(4):182-6.

Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of

below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2010;224(1):123-32.

Rong H, Zhao Z, Feng J, Lei Y, Wu H, Sun R, Zhang Z, Hou B, Zhang W, Sun Y, Gu X, Ma Z, Liu Y. The effects of dexmedetomidine pretreatment on the pro- and anti-inflammation systems after spinal cord injury in rats. *Brain Behav Immun*. 2017;64:195-207.

Sang CN, Barnabe KJ, Kern SE. Phase IA clinical trial evaluating the tolerability, pharmacokinetics, and analgesic efficacy of an intrathecally administered neurotensin a analogue in central neuropathic pain following spinal cord injury. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2016;5(4):250-8.

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

Schira J, Gasis M, Estrada V, Hendricks M, Schmitz C, Trapp T, Kruse F, Kögler G, Wernet P, Hartung HP, Müller HW. Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood. *Brain*. 2012;135(Pt 2):431-46.

Schroeter M, Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *Neuromolecular Med*. 2005;7(3):183-95.

Schubert GA, Schmieder K, Seiz-Rosenhagen M, Thomé C. ICG videography facilitates interpretation of vascular supply and anatomical landmarks in intramedullary spinal lesions: two case reports. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(12):E811-3.

Sedy J, Urdzíkova L, Jendelová P, Syková E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(3):550-80.

Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 Suppl):S2-12.

Sharma HS, Olsson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience*. 1993;57(2):443-9.

Short D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr Opin Neurol*. 2001;14(6):759-63.

Stokes JA, Corr M, Yaksh TL. Transient tactile allodynia following intrathecal puncture in mouse: contributions of Toll-like receptor signaling. *Neurosci Lett*. 2011;504(3):215-8.

Storkson RV, Kjørsvik A, Tjølsen A, Hole K. Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. *J Neurosci Methods*. 1996;65(2):167-72.

Szczepanik E, Mierzewska H, Antczak-Marach D, Figiel-Dabrowska A, Terczynska I, Tryfon J, Krzesniak N, Noszczyk BH, Sawicka E, Domanska-Janik K, Sarnowska A. Intrathecal infusion of autologous adipose-derived regenerative cells in autoimmune refractory epilepsy: evaluation of safety and efficacy. *Stem Cells Int*. 2020;2020:7104243.

Tamakoshi K, Ishida K, Hayao K, Takahashi H, Tamaki H. Behavioral effect of short- and long-term exercise on motor functional recovery after intracerebral hemorrhage in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(12):3630-5.

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

Tian W, Han XG, Liu YJ, Tang GQ, Liu B, Wang YQ, Xiao B, Xu YF. Intrathecal epigallocatechin gallate treatment improves functional recovery after spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF. *Neurochem Res.* 2013;38(4):772-9.

Ughratdar I, Muquit S, Ingale H, Moussa A, Ammar A, Vloeberghs M. Cervical implantation of intrathecal baclofen pump catheter in children with severe scoliosis. *J Neurosurg Pediatr.* 2012;10(1):34-8.

Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 1976;17(6):1031-6.

Yoshiyama M, de Groat WC. Effects of intrathecal administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on lower urinary tract functions in rats with intact or transected spinal cords. *Exp Neurol.* 2008;211(2):449-55.