

Paula Mayer Costa

**Avaliação anátomo-clínica do dantroleno sódico no trauma medular agudo
experimental
em ratos por período prolongado**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária**

À minha mãe-Tereza sempre presente, às minhas tias-mães
e tios-pais, e ao Carlos pelo apoio e carinho
Aos animais, motivo de meu esforço e estudo

“Queria muito que você continuasse estudando...”

Tereza Emília Mayer

“Mais que objetivo, nossas realizações”

Paula Mayer Costa

Agradecimentos

Agradeço a Deus sempre presente em minha vida, obrigada novamente por mais uma etapa concluída.

Minha querida mãe-Tereza por enviar luz e conforto no coração, sendo minha inspiração para lutar pela vida, para conquistar os objetivos.

Aos meus familiares por me apoiarem e incentivarem na minha profissão. Às palavras delicadas nos momentos mais frágeis. Especialmente mãe-Eloiza, Tia Beth, Tia Elaine e Tia Ericka que na verdade são todas minhas mães.

Ao Carlos pela compreensão, carinho, amor e especialmente por ter contribuído para a realização dessa pesquisa. Amor que conforta, que traz palavras de incentivo buscando minha felicidade, não somente na medicina veterinária, mas para todo o cotidiano, me ensinando a viver melhor. Amor que retrata preocupação e carinho, até mesmo no dia mais esperado, a defesa, não só a presença, mas estar ali por acreditar na minha dedicação, na minha profissão e na importância da realização do mestrado.

Agradeço aos amigos, principalmente Marina Caldeira, Luiz Carlos e Antônio pela companhia em todos os momentos durante esses dois anos. Exemplos de dedicação à nossa profissão, nossa paixão, sempre buscando melhor qualidade de vida para nossos pacientes.

Agradecimento aos mestres desde a graduação, residência e os que atuaram ativamente durante o mestrado, que contribuíram para o desempenho dessas etapas. Especialmente o Dr. Alysson Rodrigo Lamounier, Dr. Rubens Antônio Carneiro, Dra. Gleidice Eunice Lavalle e Dr. Álvaro Falcão.

Dra. Rogéria Serakides e Dra. Andréa Pacheco registro aqui meus agradecimentos por acrescentarem conhecimento essencial para essa pesquisa e por aceitarem a participar da minha banca de defesa.

À Profa. Dra. Eliane Gonçalves Melo por me receber no mestrado com muito carinho, “de braços abertos”, depositando confiança para realização dessa pesquisa. As etapas foram árduas, muitas vezes uma grande barreira a ser ultrapassada, mas tudo valeu muito à pena. Os esforços foram recompensados, hoje tenho os frutos, a sabedoria e a aplicação dessa, o trabalho. Não posso deixar de discorrer sobre nossos momentos de descontração, foram ótimos, as festas juninas organizadas, saídas, cafés e aniversários.

Aos amigos e colaboradores meu agradecimento especial por serem peças principais dessa pesquisa, construindo juntos a ciência. Profa. Eliane Gonçalves de Melo, Fátima Caldeira, Fabíola Fukushima, Bruno Lapertosa, Juneo Freitas, Jankerle Boeloni, Profa. Rogéria Serakides, Isabel Rosado, Carla Osório, Karen Maciel, Mário Lavor, Rose, Samanta, Ana Luíza, Guilherme e Laís, agradecimentos eternos por me ajudarem a construir essa pesquisa, assim fazendo parte dela, sem vocês essa não se realizaria.

Agradecimento especial à empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (SP) por ter fornecido o principal fármaco do trabalho, o dantrolene sódico, contribuindo para construção da ciência.

À FAPEMIG pela grande contribuição financeira para custeio de parte desse experimento em prol do desenvolvimento científico.

Finalmente, agradeço aos animais de laboratório por “doarem” suas vidas para o avanço da medicina humana e veterinária.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 – INTRODUÇÃO	13
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 – Isquemia e o desequilíbrio da homeostase intracelular de cálcio	14
2.2 - Resposta inflamatória.....	15
2.3 – Glutamato	16
2.4 – Características anatomoistopatológicas e imunoistoquímicas da medula espinhal	17
2.5 – Dantroleno sódico.....	19
2.6 – Modelos de trauma medular.....	20
2.7 – Avaliações comportamentais	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 – Animais.....	23
3.2 - Procedimento cirúrgico e trauma medular agudo	24
3.3 – Tratamentos.....	25
3.5 – Avaliação anatomo-patológica da medula espinhal	30
3.6 – Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal	30
4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 – Procedimento cirúrgico e trauma medular agudo.....	31
5.2 - Avaliações comportamentais	32
5.2.1 – Teste Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).....	32
5.2.2 – Sensibilidade dolorosa (SD).....	35
5.2.3 - Capacidade motora (CM).....	37
5.2.4 - Posicionamento proprioceptivo (PP)	39
5.2.5 – Posicionamento tátil (PT).....	42
5.2.6 – Plano inclinado (PI)	42
5.3 - Avaliação anatomoistopatológica da medula espinhal	44
5.4 – Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal	47
6 - CONCLUSÕES	48

7 – PERSPECTIVAS.....	48
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9 – ANEXO.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Discriminação dos grupos G1, G2 e G3.....	24
Tabela 2 – Discriminação dos escores da avaliação neurológica.	26
Tabela 3 – BBB – Discriminação dos escores do teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e classificação das fases de recuperação.....	27
Tabela 4 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB).	33
Tabela 5 – Diferenças encontradas entre os dias do G2 (controle positivo) ao comparar os valores de p no teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).	34
Tabela 6 – Diferenças encontradas entre os dias do G3 (dantroleno) ao comparar os valores de p no teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).	34
Tabela 7 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de sensibilidade dolorosa (SD).	36
Tabela 8 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de capacidade motora (CM).	37
Tabela 9 – Diferenças encontradas entre os dias do G2 (controle positivo) ao comparar os valores de p do teste capacidade motora (CM).	38
Tabela 10 – Diferenças encontradas entre os dias do G3 (dantroleno) ao comparar os valores de p do teste de capacidade motora (CM).	39
Tabela 11 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de posicionamento proprioceptivo (PP).	40
Tabela 12 – Diferenças encontradas entre os dias do G2 (controle positivo) ao comparar os valores de p do teste de posicionamento proprioceptivo (PP).	40
Tabela 13 – Diferenças encontradas entre os dias do G3 (dantroleno) ao comparar os valores de p do teste de posicionamento proprioceptivo (PP).	40
Tabela 14 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de plano inclinado (PI).	42
Tabela 15 – Médias obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) na quantificação de neurônios com anticorpo Anti-NeuN.	47
Tabela 16 – Valores de p em relação ao número de neurônios íntegros obtidos de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno).	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografias do procedimento cirúrgico e dos testes comportamentais: (A) Laminectomia com exposição da medula espinhal (seta); (B) Compressão da medula espinhal com aparelho estereotáxico; (C) Capacidade motora (CM), deambulação em barra, observar posicionamento dos membros, animal do G1 (laminectomia) (D) Teste de posicionamento tátil (PT), animal do G2 (trauma medular e placebo); (E) Teste de posicionamento proprioceptivo (PP), animal do G3 (trauma medular e dantroleno sódico); (F) Teste de plano inclinado (PI), animal do G2 (trauma medular e placebo).	29
Figura 2 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB).	33
Figura 3 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de sensibilidade dolorosa SD.	36
Figura 4 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de capacidade motora (CM).	38
Figura 5 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de posicionamento proprioceptivo (PP).	41
Figura 6 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de plano inclinado (PI).	43
Figura 7 – Fotomicrografias de seções transversais histológicas e imunoistoquímicas da medula espinhal. (A), (B), (C) Substância cinzenta. (A) HE, 300X. Grupo dantroleno sódico (G3), neurônios íntegros, corpúsculos de Nissl (seta). (B) Anti-NeuN, 430X. Grupo dantroleno sódico (G3), neurônios íntegros. (C) HE, 500X. Grupo controle positivo (G2), degeneração neuronal (seta fina) e morte neuronal (seta grossa). (D), (E) Substância branca. (D) HE, 360X. Grupo controle negativo (G1), substância branca íntegra, axônio (seta). (E) HE, 220X. Grupo controle positivo (G2), degeneração Walleriana: tumefação axonal (seta fina) e câmara de digestão (seta grossa). (F) HE, 220X. Grupo controle positivo (G2), Epicentro, malácia, cicatriz glial (seta fina) e células de Gitter (seta grossa).	46
Figura 8 – Média de número de neurônios íntegros e reespectivos desvios padrões obtidos de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) na avaliação imunoistoquímica com anticorpo Anti-NeuN.	48

RESUMO

Objetivou-se avaliar, por período prolongado, o efeito de dose única de dantroleno sódico no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular espinhal agudo. Para tanto, foram utilizados 21 *Rattus norvegicus*, distribuídos igualmente em 3 grupos. O G1, controle negativo, foi submetido à laminectomia dorsal da vértebra T13 e recebeu o diluente do medicamento, por via intraperitoneal (IP). Nos demais grupos, além da laminectomia, os animais foram submetidos ao trauma medular compressivo (TMC). O G2, controle positivo, recebeu o diluente do medicamento, e o G3, 10mg/kg de dantroleno sódico, ambos por via IP em dose única, uma hora após o TMC. Os animais foram avaliados clinicamente empregando-se os seguintes testes: deambulação em campo aberto (teste BBB) e em barras (capacidade motora), sensibilidade dolorosa (SD), posicionamentos proprioceptivo (PP) e tátil (PT), e plano inclinado (PI). Os animais foram eutanasiados após 31 dias do procedimento cirúrgico, as medulas espinhais foram colhidas, sendo obtidas as secções craniais e caudais ao epicentro para avaliação morfológica (HE), e as craniais para avaliação imunoistoquímica com anticorpo Anti-NeuN. O grupo G3 obteve recuperação clínica mais precoce determinada pelos testes BBB, CM, SD, e PI em relação ao G2, devido à maior integridade neuronal observada na morfologia e à maior quantidade de neurônios íntegros marcados com anticorpo Anti-NeuN. Deste modo, conclui-se que o dantroleno sódico, em única administração intraperitoneal, na dose de 10mg/kg, diminui a intensidade das lesões desencadeadas pelo trauma medular agudo e preserva a integridade neuronal aos 30 dias pós-trauma.

Palavras-chave: dantroleno sódico, trauma medular, tratamento, ratos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate for a long period the effect of a single dose of dantrolene sodium in the treatment of rats subjected to acute spinal cord injury. Therefore, 21 *Rattus norvegicus* were equally distributed into three groups. In G1, the negative control group, the animals were submitted to dorsal laminectomy of the T13 vertebra and received the diluent of the drug intraperitoneally (IP). In the other groups, in addition to laminectomy, the animals were subjected to compressive spinal cord injury (SCI). G2, the positive control group, received the diluent for the drug, and G3, 10mg/kg of dantrolene sodium, both intraperitoneally in a single dose, one hour after the SCI. The animals were clinically evaluated using the following tests: deambulation in open field (BBB test) and beam walking test (motor capacity), pain sensitivity (PS), proprioceptive (PP) and tactile positioning (PT), and inclined plane (IP). The animals were euthanized 31 days after injury and the spinal cords were collected. □Sections cranial and caudal to the epicenter were obtained for morphological (HE) evaluation, and cranial sections, for immunohistochemical staining with Anti-NeuN antibody. The G3 had earlier clinical recovery determined by the tests BBB, motor capacity, PS, and IP as compared to G2, due to increased neuronal integrity observed in the morphology and the greater amount of intact neurons stained with Anti-NeuN antibody. Concluding, dantrolene sodium, in a single intraperitoneal administration, at a dose of 10 mg/kg, reduced the severity of injuries triggered by acute spinal cord injury and preserves neuronal integrity at 30 days post-trauma.

Keywords: dantrolene sodium, spinal cord injury, treatment, rats.

1 – INTRODUÇÃO

A lesão medular dependendo do grau de acometimento do sistema nervoso central pode inferir em graves alterações neurológicas devido aos danos axonais, à morte neuronal e glial, bem como à desmielinização que podem permanecer, gerando seqüelas (Wrathall et al.; 1994; Aslan et al., 2009). Na medicina veterinária os animais são encaminhados por apresentarem dor, déficits de locomoção e alterações em outras funções como na micção e na defecação. Esses distúrbios em conjunto podem desencadear complicações como, anorexia, escaras de decúbito, alterações pulmonares, retenção urinária, comprometimento renal (De Groat et al., 1998; Silveri et al., 21313006; Wuermsler et al., 2007), constipação, e também incontinência urinária e fecal dependendo da localização da lesão, que geralmente comprometem a qualidade de vida dos pacientes (Das et al., 1989; Wuermsler et al., 2007).

Os indivíduos acometidos, independentemente da espécie, estão sujeitos a dois tipos de trauma medular, o intrínseco e o extrínseco. A lesão intrínseca pode ocorrer devido à herniação de discos intervertebrais, ao espessamento de ligamentos, a má-formação vertebral, bem como decorrente de massas adjacentes a medula espinhal. Fraturas, luxações e subluxações decorrentes de atropelamentos, quedas ou acidente por projétil compõem o tipo extrínseco, sendo geralmente de natureza mais grave (Bagley et al., 1999).

A contusão, concussão e laceração decorrentes do trauma medular provocam compressão e secção do tecido nervoso, assim como alteração vascular direta, e constituem a lesão primária, geralmente irreversível (Wrathall et al.; 1994; Alatorre et al., 2007; Aslan et al., 2009). Adicionalmente, ocorrem os eventos secundários, que podem permanecer por horas, dias ou meses e que se caracterizam principalmente pela isquemia e por suas conseqüências como, acúmulo intracelular de cálcio, redução da energia metabólica, inflamação e produção de radicais livres

(Wrathall et al.; 1994; Liu et al., 1997; Faulkner et al.; 2004; Alatorre et al., 2007; Mattson, 2007; Aslan et al., 2009; Simon et al., 2009). Essas alterações podem induzir a morte celular por necrose ou apoptose, principalmente do tecido circunjacente normal. Mas, apesar disso, essas lesões secundárias podem ser manipuladas através de tratamentos, devido a sua potencial reversibilidade (Mautes et al., 2000; Alatorre et al., 2007; Mattson, 2007; Mitchell e Lee, 2008; Çolak et al., 2009).

Contudo, visando impedir ou reduzir a perda celular e conseqüentes déficits neurológicos permanentes, existem hoje várias pesquisas em torno da patogenia e tratamento do trauma medular agudo. Vários medicamentos com capacidade de reduzir as alterações bioquímicas secundárias que desencadeiam a apoptose têm sido testados com resultados positivos, confirmando a importância da lesão secundária para o agravamento do trauma mecânico primário (Çolak et al., 2009). Torres (2008) verificou que o dantroleno sódico foi capaz de reduzir a perda neuronal pela redução da apoptose, mas devido ao período de avaliação composto por oito dias, não foi possível presenciar a recuperação clínica associada, somente uma tendência de melhora da sensibilidade dolorosa.

Em virtude dos resultados obtidos por Torres (2008) e devido à escassez de investigações científicas em relação ao uso do dantroleno sódico no trauma medular agudo, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a existência do efeito terapêutico deste fármaco através da preservação do tecido nervoso, porém com avaliação clínica por período mais longo. Para verificar essa hipótese, instituiu-se a comparação entre três grupos, controle negativo (animais não submetidos ao trauma), controle positivo (animais submetidos ao trauma e tratados com placebo) e grupo dantroleno sódico (animais submetidos ao trauma e tratados com dantroleno sódico) para verificar a presença de neuroproteção promovida pelo tratamento através da avaliação clínica composta por 31 dias, avaliação histológica e imunoistoquímica.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Isquemia e o desequilíbrio da homeostase intracelular de cálcio

A fisiopatogenia do trauma medular agudo, assim como a fisiologia do sistema nervoso central são extremamente complexas e, ainda não se tem uma informação completa sobre as mesmas (Çolak et al., 2009). Portanto, para compreensão sobre o modo de ação dos medicamentos é necessário conhecer sobre as alterações intracelulares decorrentes do trauma e sobre as funções celulares, que juntas formam uma rede interconectada (Lee, et al., 2008).

No momento da lesão medular, ocorre transferência da força mecânica para as células da medula espinhal, o que pode determinar o rompimento das membranas plasmáticas. Isso compromete a manutenção da homeostase intracelular, acarretando em alteração na propagação dos impulsos neuronais. Dependendo da intensidade do distúrbio, as células podem morrer por necrose ou apoptose (Simon et al., 2009).

A lesão primária também compromete os vasos da medula espinhal, principalmente os da substância cinzenta (Mauter et al., 2000; Kwon et al., 2004). Essa alteração culmina com hemorragia em diferentes compartimentos, como nos espaços epidural e subaracnóide, bem como no próprio tecido. A presença de hemácias no espaço extravascular ativa células fagocíticas, que por sua vez liberam íons determinando a produção de radicais livres (Mauter et al., 2000; Kwon et al., 2004; Çolak et al., 2009). Além disso, há extravasamento de glutamato, liberação de substâncias vasoativas e formação de edema. Esses fatores determinam a redução da perfusão e o desenvolvimento de alterações secundárias (Mauter et al., 2000; Kwon et al., 2004).

A isquemia decorrente da lesão vascular ocasiona redução do fornecimento de oxigênio e de nutrientes para as células do tecido nervoso, o que pode provocar degeneração ou morte (Kwon et al., 2004). A hipóxia inibe a utilização de O₂ na respiração celular induzindo

modificações no metabolismo (Madjo e Joris, 1995; Kwon et al., 2004; Mattson, 2007; Mitchell e Lee, 2008). A energia remanescente na forma de ATP é redirecionada para as bombas iônicas e para a síntese proteica. Com a redução da produção de ATP pelas mitocôndrias ocorre glicólise anaeróbica com síntese de ATP no citosol, o que induz o consumo de NAD e geração de NADH₂. Essa molécula reage com o ácido pirúvico favorecendo a síntese de ácido láctico que por sua vez provoca redução do pH celular (Madjo e Joris, 1995; Pereira, 2006; Mattson, 2007; Mitchell e Lee, 2008).

Devido a síntese menos eficiente de ATP, ocorre também redução da atividade das bombas iônicas dependentes deste substrato, como a Na⁺/K⁺ ATPase presente na membrana plasmática e Ca²⁺ ATPase encontrada na membrana do retículo endoplasmático (RE), cujos funcionamentos estão associados ao elevado consumo de energia (Madjo e Joris, 1997; Mattson, 2007; Mitchell e Lee, 2008). O comprometimento da atividade das bombas iônicas induz o aumento do sódio no citosol e nas organelas, provocando despolarização neuronal e degeneração hidrópica (Kwon et al., 2004).

Com a progressão da hipóxia a célula perde a capacidade de controlar a homeostase do cálcio, favorecendo seu excesso no meio intracelular. Essa elevação pode ocorrer devido a dois mecanismos, incluindo o influxo pelos canais permeáveis ao íon situados na membrana plasmática e/ou pelos estoques contidos nas organelas. Portanto, há liberação do cálcio para o citoplasma através da estimulação dos receptores rianodinos e inositol trifosfato (IP₃) presentes na membrana do RE, a principal organela para estoque do mesmo (Ogawa et al., 2000; Gepdiremen et al., 2002; Thorell et al., 2002; Mattson, 2007; Chen et al., 2008; Huang et al., 2008; Roy e Hajnóczky, 2008; Gemes et al., 2009; Muehlschlegel e Sims, 2009).

Fisiologicamente, o íon Ca²⁺ um dos principais mensageiros intracelulares é o responsável pelas respostas neuronais aos estímulos químicos e elétricos. Assim, o influxo de cálcio através de CDVC (canais dependentes de voltagem para cálcio) e a ligação desse cátion na membrana plasmática determina a liberação de neurotransmissores no terminal pré-sináptico

(Mattson, 2007; Huang et al., 2008). Durante essas atividades fisiológicas, a concentração intracelular do íon permanece discretamente elevada durante segundos, sem acarretar efeitos deletérios para as células (Mattson, 2007).

Outra organela especialmente importante na manutenção da homeostase do cálcio é a mitocôndria (MT), que em condições como as observadas no trauma têm seu funcionamento comprometido. Assim, a intensidade da injúria e a capacidade energética da mitocôndria em conjunto determinam o tipo de alteração celular, que pode variar de degeneração a morte celular, esta por apoptose ou por necrose (Kwon et al., 2004; Pereira, 2006; Mattson, 2007; Gwak et al., 2008).

A apoptose pode ocorrer quando há alterações precoces das mitocôndrias (MTs), sendo com isso liberadas calpaínas e caspases que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial o que provoca edema na própria organela (Wrathall et al., 1994; Popescu et al., 2002; Pereira, 2006; Mattson, 2007; Gwak et al., 2008; Roy e Hajnóczky, 2008). A alteração no funcionamento dessa membrana induz a morte de neurônios e células da glia através da liberação de fatores promotores da apoptose como citocromo-c, pró-caspases e caspases (Takuma et al., 2004; Huerta et al., 2007; Roy e Hajnóczky, 2008).

Alternativamente na necrose, a célula apresenta membranas mais frágeis devido à redução da síntese de seus componentes e às alterações eletrolíticas (Budd e Lipton, 1998; Popescu et al., 2002; Kwon et al., 2004), sendo que o aumento da concentração de cálcio no citosol contribui para essa fragilidade, pois esse íon ativa fosfolipases que degradam a membrana plasmática formando o ácido aracdônico (Kwon et al., 2004).

2.2 - Resposta inflamatória

O processo inflamatório possui especial importância para o desenvolvimento da lesão secundária e não se restringe ao período agudo, sendo também responsável pela degeneração da substância branca na fase tardia (Batchelor et al., 2008; Mautes et al., 2000). A resposta inflamatória também se desenvolve após a lesão primária, sendo desencadeada pela dispersão de

estruturas intracelulares decorrentes do processo de necrose (Kwon et al., 2004). Com isso, há a estimulação da matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), uma protease presente nas células da glia e na micróglia. Essa enzima degrada a parede dos vasos causando desintegração da barreira hemato-espinhal, o que favorece influxo de células inflamatórias, hemácias e proteínas, inclusive de neurotransmissores como o glutamato (Noble et al., 2002).

O recrutamento dos neutrófilos ocorre principalmente nas primeiras 24 horas após a lesão, ocorrendo redução dessas células no terceiro dia (Mautes et al., 2000; Kwon et al., 2004). Com esse declínio, as células da micróglia são rapidamente recrutadas e ativadas, ocorrendo também migração de macrófagos séricos para o tecido, que juntos fagocitam os debris decorrentes da injúria medular. Aproximadamente no sétimo dia, é observado elevado número dessas células, que de forma gradual são substituídas por linfócitos (Mautes et al., 2000; Batchelor et al., 2008). Estas células agravam o processo inflamatório através da liberação de citocinas e com isso causam lesões axonais, morte de oligodendrócitos e de neurônios (Matute, 2007; Batchelor et al., 2008; Mitchell e Lee, 2008; Baloui et al., 2009).

Assim, tanto as células inflamatórias provocam degeneração da mielina e peroxidação lipídica através da geração de espécies reativas derivadas do oxigênio (ERDO), radicais livres e citocinas (Mautes et al., 2000; Noble et al., 2002; Batchelor et al., 2008). Algumas das citocinas produzidas induzem a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) que atua no ácido aracdônico e com isso são formadas as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Essas substâncias possuem características vasoativas promovendo aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e vasoespasmo (Kwon et al., 2004).

Após o evento isquêmico, os tecidos são reoxigenados e a própria reperfusão provoca alterações celulares agravando o trauma primário (Takuma et al., 2004). A lesão de reperfusão não é somente caracterizada pela indução do estresse oxidativo, sendo também visualizada uma maior captação de cálcio pelas células após reestabelecimento da circulação e a súbita presença de plasma na superfície da

membrana plasmática permeável induz edema com subsequente ruptura celular (Takuma et al. 2004; Pereira, 2006).

Na hipóxia o tecido isquêmico sintetiza xantina oxidase e após a reorganização vascular essa enzima converte as moléculas de O₂ em superóxido do qual se originam outros radicais capazes de danificar as membranas (Pereira, 2006). Essas substâncias causam elevado consumo de enzimas anti-oxidantes o que leva a insuficiência desse mecanismo protetor. O sistema nervoso é particularmente sensível ao estresse oxidativo, por possuir células cujas membranas são ricas em ácidos graxos polissaturados e por conter quantidade reduzida destas enzimas (Mauter et al., 2000; Şentürk et al., 2008; Aslan et al., 2009).

O excesso de cálcio no meio intracelular também participa da oxidação interferindo no ácido aracdônico. Esse processo provoca retro-alimentação positiva com conseqüentemente formação das ERDO, como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil que também atuam sobre as membranas (Mattson, 2007). A óxido nítrico sintetase calmodulina-dependente (ON) é uma importante enzima ativada pelo cálcio, que resulta na formação de óxido nítrico (Popescu et al., 2002; Gwak et al., 2008; Muehlschlegel e Sims, 2009). Essa ERDO reage com superóxido, formando peroxinitrito, e ambos óxido nítrico e o peroxinitrito provocam fragmentação do DNA (Gepdiremen et al., 2002; Muehlschlegel e Sims, 2009).

A oxidação provocada pelas ERDO e pelos radicais livres associada às membranas prejudica a função das bombas iônicas Na⁺/K⁺ ATPase e Ca²⁺ATPase o que resulta reespectivamente na permanência de sódio e liberação de mais íons cálcio do RE para o citosol (Wei et al., 2000; Gepdiremen et al., 2002; Mattson, 2007). Essas substâncias oxidantes atuam sobre a mitocôndria reduzindo a síntese de ATP (Gepdiremen et al., 2002) e também favorecem a formação dos poros de permeabilidade transicionais (PPT), com conseqüente liberação de citocromo-c e ativação das caspases, induzindo apoptose (Popescu et al., 2002; Gwak et al., 2008).

2.3 – Glutamato

O excesso de cálcio no citosol também ocasiona o aumento da liberação de neurotransmissores, como o glutamato (Huang et al., 2008; Muehlschlegel e Sims, 2009). Este é um aminoácido excitatório que promove acentuada despolarização de membrana celular, induzindo excitotoxicidade, depleção energética (Wrathall et al., 1994; Popescu et al., 2002; Kwon et al., 2004; Mattson, 2007; Mitchell e Lee, 2008; Muehlschlegel e Sims, 2009) e morte neuronal por apoptose ou necrose (Wrathall et al., 1994; Popescu et al., 2002; Mitchell e Lee, 2008; Muehlschlegel e Sims, 2009). Entretanto, o glutamato possui funções cruciais para o adequado funcionamento do sistema nervoso (Popescu et al., 2002).

Esse neurotransmissor exerce suas funções ao se ligar aos receptores de membrana ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e kainato (KA), dispostos em canais para cálcio. Os receptores NMDA são responsáveis pela excitotoxicidade aguda, mediada pelo rápido influxo dos íons cálcio e sódio, já a crônica é determinada pelos receptores AMPA/kainato, cujo influxo é lento (Wrathall et al., 1994). A estimulação destes receptores promove a entrada do cálcio contido no espaço extracelular para o citosol (Düzenli et al., 2005; Mattson, 2007; Huang et al., 2008; Muehlschlegel e Sims, 2009). A liberação de glutamato pelo receptor KA além de provocar a excitotoxicidade, induz a ativação de várias caspases (Popescu et al., 2002).

Essa presença de cálcio no citosol proveniente do meio extracelular estimula o efluxo do íon contido nos RE e MT em outras células (Wrathall et al., 1994; Huang et al., 2008; Muehlschlegel e Sims, 2009), induzindo a liberação de glutamato na sinapse, estimulando novos receptores (Chen et al., 2008). Além disso, o excesso do cátion reduz a atividade dos transportadores do glutamato, aumentando sua presença na fenda sináptica, exacerbando sua função (Mattson, 2007).

2.4 – Características anatomoistopatológicas e imunoistoquímicas da medula espinhal

Morfologicamente, na região mais central da medula espinhal (ME) está presente a substância cinzenta que contém corpos neuronais, células da macróglia (astrócitos e oligodendrócitos) e micróglia. Mais ao centro delimitado pelas células endimárias epiteliais colunares ciliadas está o canal central ou endimário por onde circula o líquido cérebro-espinhal ou líquor. A substância branca disposta externamente à cinzenta é composta principalmente de axônios mielinizados e oligodendrócitos. Todo tecido medular é revestido por uma membrana externa, a pia-máter (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007).

O neurônio é uma célula de tamanho e forma variáveis, podendo ser esférico, piriforme ou anguloso. Essas células possuem um grande núcleo com nucléolo evidente e citoplasma com corpúsculos de Nissl. Esses corpúsculos, geralmente encontrados em maior quantidade nos neurônios motores, são visualizados como estruturas basofílicas dispersas, cuja constituição é retículo endoplasmático e ribossomos. Cada neurônio origina apenas um axônio com comprimento e diâmetro variáveis. Os axônios e dendritos dispostos ao redor das células da substância cinzenta formam uma estrutura eosinofílica denominada neurópia (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007).

Os astrócitos e oligodendrócitos possuem somente o núcleo visível, basofílico, porém os primeiros são maiores e menos corados em função da frouxidão da cromatina (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007). Os astrócitos atuam na manutenção de um ambiente adequado para funcionamento do sistema nervoso, que pode ser observado pela nutrição dos neurônios (Takuma et al., 2004; Ito et al., 2009) através da sua comunicação com capilares e também pela atuação de seus neurotransmissores reguladores da função neuronal. Além de serem responsáveis pela sustentação do tecido nervoso, estas células possuem ação fagocitária e participam na

formação da barreira hemato-espinhal (Ito et al., 2009).

Os astrócitos também limitam a ação do glutamato em decorrência da captação desse neurotransmissor na fenda sináptica, protegendo os neurônios desse tipo de excitotoxicidade. Essas células da glia sintetizam fatores ou neurotrofinas que promovem a sobrevivência neuronal, como por exemplo, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (Takuma et al., 2004).

Os oligodendrócitos, principais células da substância branca formam a bainha de mielina que envolve os axônios e facilita a propagação do impulso neuronal. A mielinização, um processo complexo, é mediada pela ação de fatores tróficos e neurotransmissores em receptores presentes nos oligodendrócitos. A neurotransmissão dependente de cálcio promove um mecanismo pelo qual a atividade neuronal acaba por regular o desenvolvimento das células mielinizadoras (Butt, 2006).

No tecido nervoso encontram-se células com núcleo pequeno, alongado e basofílico, as células da micróglia, observadas com maior frequência na substância cinzenta e ao redor dos vasos (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007).

Após lesão medular traumática os neurônios desenvolvem alterações histológicas características de degeneração, necrose ou apoptose (Pereira, 2006). Na degeneração neuronal observa-se marginalização nuclear, edema e degeneração dos corpúsculos de Nissl ou cromatólise. Associada a estas alterações ocorre também proliferação e aumento do tamanho das células da glia, ou seja, gliose (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007).

Os principais achados da necrose celular são alterações nucleares caracterizadas por intensa contração e condensação da cromatina, tornando o núcleo intensamente basófilo, homogêneo e bem menor que o normal, processo denominado picnose nuclear. Outras alterações são a cariólise, digestão da cromatina e fragmentação do núcleo ou cariorrexe (Madjo e Joris, 1997). Esses três eventos são decorrentes da redução do pH e da ação das proteases que determinam a condensação e a digestão da cromatina (Pereira,

2006). Após o processo de necrose ocorre a neuroniofagia, que se caracteriza pela remoção de fragmentos neuronais, por macrófagos, células de Gitter e oligodendrócitos (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007).

Na apoptose, assim como na necrose, observa-se picnose nuclear e retração citoplasmática, devido a desnaturação protéica induzida pelo acúmulo de cálcio. O núcleo se desloca para periferia e adquire formato de “meia lua” ou de “foice”. Há também a cariorrhexe, contudo a célula emite processos contendo partículas nucleares, que se fragmentam formando corpos apoptóticos. Estes são fagocitados por células vizinhas ou macrófagos (Madjo e Joris, 1995).

As lesões neuronais observadas na morfologia através da coloração por hematoxilina e eosina podem ser quantificadas através de técnicas de imunoistoquímica como o anticorpo monoclonal *Neuronal Nuclei* (Anti-NeuN). Esse detecta a proteína nuclear específica dos neurônios de animais vertebrados denominada NeuN (Chemicon International Inc., Lutherville, MD) (Mullen et al., 1992; Jongen-Rêlo e Feldon, 2002; Casella et al, 2004; Collombet et al., 2006; Kumar e Buckmaster, 2007), tornando-se um excelente método de diferenciação das demais células do sistema nervoso (Mullen et al., 1992; Jongen-Rêlo e Feldon, 2002; Collombet et al., 2006; Kumar e Buckmaster, 2007).

Autores sugerem que a proteína NeuN pode ser sintetizada no citoplasma e migrar para o núcleo neuronal (Mullen et al., 1992; Jongen-Rêlo e Feldon, 2002; Portiansky et al., 2006; Kumar e Buckmaster, 2007), portanto ao utilizar o anticorpo para marcá-la, observa-se coloração citoplasmática e nuclear, essa última mais proeminente. E ainda, esse anticorpo produz marcação satisfatória em todos tamanhos de neurônios e não atua somente em grandes corpos neuronais como o anticorpo para a enosale neuronal específica (Jongen-Rêlo e Feldon, 2002; Casella et al, 2004). As funções da proteína NeuN também não estão completamente esclarecidas, mas parece exercer ações regulatórias no núcleo neuronal (Mullen et al., 1992; Gill et al., 2005) e ainda no citoplasma (Mullen et al., 1992; Jongen-Rêlo e Feldon, 2002; Portiansky et al., 2006; Kumar e Buckmaster, 2007).

Quando ocorre trauma mecânico e a hipoxia há redução da expressão dessa proteína (Jongen-Rêlo e Feldon, 2002; Collombet et al., 2006; Kumar e Buckmaster, 2007), redução de sua antigeneidade ou depleção nas células neuronais (Collombet et al., 2006). Portanto, a ausência de marcação para proteína NeuN indica redução da funcionalidade do neurônio, ou seja, degeneração ou morte neuronal (Mullen et al., 1992, Sun et al., 2009). A utilização desse anticorpo promove delimitação mais precisa real da lesão neuronal em relação à avaliação morfológica e está relacionado com grau de alteração clínicas (Jongen-Rêlo e Feldon, 2002).

De acordo com Collombet et al. (2006) a redução da antigeneidade da proteína NeuN é devido a sua ligação às proteínas de choque, que são produzidas em decorrência de lesões neurológicas. Essas células neuronais não marcadas podem não apresentar outras características de degeneração ou necrose, mas essas posteriormente evoluem para morte neuronal semanas após.

Usualmente após o trauma são observados na substância branca dilatação dos tubos de mielina, contendo axônios edemaciados ou fragmentados, o que gera aparência de rarefação tecidual ou de esponja, determinando a degeneração Walleriana. A dilatação dos tubos de mielina pode conter axônios degenerados e células fagocíticas, indicando processo de remoção de ambos, cuja alteração denomina-se câmara de digestão. Associada a essa degeneração pode haver proliferação e maior reatividade das células da glia (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007).

Os astrócitos tornam-se hipertrofiados e se multiplicam (Summers, 1994; Faulkner et al., 2004; Baloui et al., 2009; Ito et al., 2009). Além disso, essas células também aumentam a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), formando uma rede de processos gliais que se estendem da lesão primária para a periferia em resposta as alterações dos neurônios e oligodendrócitos (Summers et al., 1994; Faulkner et al., 2004, Ito et al., 2009).

A ativação de astrócitos no estágio inicial após lesão do sistema nervoso central é benéfica para os neurônios. A astrogliose tenta propiciar a

regulação extracelular de íons, controlar a liberação de neurotransmissores e permitir reparação da matriz. Estes são processos biológicos necessários para que não ocorra a progressão da lesão inicial (Takuma et al., 2004). Entretanto, existem inibidores potentes da regeneração axonal e da plasticidade neuronal, incluindo moléculas que são expressas na matriz extracelular constituída de proteoglicanos (sulfato de condroitina) e na cicatriz glial (García-Alfás et al., 2009; Ito et al., 2009).

Mais tardiamente, no epicentro da lesão há presença de cavidade cística resultante da morte celular, principalmente de neurônios, acompanhada por infiltração de macrófagos e por células da micróglia ativadas que passam a ser denominadas células de Gitter, podendo permanecer no local por tempo prolongado (Summers et al., 1994; Basso et al., 1995; Maxie e Youssef, 2007; Batchelor et al., 2008; Chen et al., 2009). As células de Gitter possuem núcleo periférico, picnótico, já o citoplasma apresenta-se pouco corado devido ao vacúolo lipídico (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007). Nessa fase também podem ser observadas adesões entre as meninges ou entre a dura-máter e o perióstio (Maxie e Youssef, 2007). Em conjunto, a presença da cavidade cística no local da lesão associada à gliose formam uma barreira física (cicatriz glial) contra a regeneração axonal (Chen et al., 2009). Portanto, para que ocorra plasticidade, os axônios têm que ultrapassar essa barreira e alcançar as fibras da outra extremidade (Bareyre et al., 2004; Chen et al., 2009).

2.5 – Dantroleno sódico

O dantroleno sódico é um medicamento que tem sido estudado para o tratamento do trauma medular agudo, assim como encefálico. Esse fármaco foi originalmente sintetizado por Snyder et al. em 1967, os quais observaram propriedade relaxante dos músculos esqueléticos após administração intravenosa em animais, ação decorrente da depressão na contração muscular (Krause et al., 2004).

Em seguida, verificou-se que determinadas raças de suínos apresentavam uma síndrome

devida à espasticidade muscular provocada por agentes anestésicos inalatórios halogenados, semelhante à hipertermia maligna dos humanos. Esses dados serviram de modelo experimental para o estudo da patofisiologia dessa doença e da terapia com o dantroleno sódico, quando em 1975 houve o primeiro relato da eficácia do mesmo. A ocorrência da hipertermia maligna foi associada com metabolismo anormal do cálcio na musculatura esquelética, provocado pelo aumento da duração do estímulo aos receptores rianodinos (RIR) presentes no RE (Protasi, 2002; Thorell et al., 2002; Gwak et al., 2008). A ação farmacológica do dantroleno sódico ocorre através da redução da permeabilidade da membrana do RE, a partir do bloqueio dos RIR com conseqüente diminuição da liberação de cálcio para o citosol. Portanto, sua utilização pode ser promissora para tratar doenças neurológicas que cursam com o desequilíbrio da homeostase do cálcio (Sutko e Airey, 1993; Salomone et al., 2009).

Existem três isoformas dos receptores RIR nos mamíferos e sua expressão parece não ser específica dos tecidos. O RIR-1 é a isoforma mais presente na musculatura esquelética, RIR-2 no miocárdio, mas também pode ser encontrada em pequenas quantidades no encefalo e a isoforma RIR-3 é distribuído pelo tecido nervoso (Giannini et al., 1995; Salomone et al., 2009). O receptor RIR-3 pode ser ativado indiretamente pela ligação com o cálcio ou diretamente, liberando o cálcio como resposta, cujo fenômeno é denominado indução pelo cálcio e liberação de cálcio (ICLC) (Ogawa et al., 2000).

O dantroleno sódico age diretamente nos receptores RIR-1 (Fruen et al., 1997; Zhao et al., 2001) e 3 (Zhao et al., 2001), reduzindo a ativação dos canais para cálcio e a sensibilidade de receptores estimulados por esse íon (Fruen et al., 1997; Zhao et al., 2001). Pode ter ação direta sobre o receptor inositol trifosfato ou sua ação no receptor rianodino minimiza a ação do inositol trifosfato, o medicamento diminui a morte neuronal (Popescu et al., 2002; Chen et al., 2008).

Esse medicamento, assim como os demais bloqueadores de canais para cálcio, pode promover neuroproteção contra o glutamato, pois impede a liberação exacerbada deste

neurotransmissor e com isso reduz a morte celular (Wei et al., 2000; Gepdiremen et al., 2002; Gwak et al., 2008). Outra ação importante é a de inibir a produção de superóxido e óxido nítrico, minimizando assim o estresse oxidativo após reperfusão tissular (Wei et al., 2000; Aslan et al., 2009).

A neuroproteção proporcionada pelo medicamento também foi associada com sua ação anti-apoptótica decorrente do aumento da expressão da proteína Bcl-2, presente em diferentes organelas, como MT e RE e que impede a ativação da cascata das caspases (Wei et al., 2000; Kim et al., 2002).

Torres (2008) verificou que o medicamento foi capaz de reduzir a morte neuronal na medula espinhal submetida ao trauma agudo, assim como Aslan et al. (2009), evidenciando sua ação benéfica para tratamento desse distúrbio.

O dantroleno sódico é composto por 1-(((5-(4-nitrofenil)-2-furânil)-metileno)amino)-2,4-imidazolidino dionio sal de sódio, uma pequena molécula com alta afinidade lipídica e com restrita solubilidade em água. Apesar de ser um derivado da hidantoína semelhante a alguns anestésicos locais, não possui tais propriedades (Krause et al., 2004; Aslan et al., 2009).

O efeito do dantroleno sódico é dose-dependente (Düzenli et al., 2005), não devendo ultrapassar a DL 50 que é maior ou igual a 500mg/kg para ratos (Borowicz et al., 1997). Em contrapartida, Chen et al. (2008) relataram toxicidade e óbito quando doses parenterais iguais ou superiores a 25-50mg/kg foram administradas nessa espécie. Na administração intravenosa a dose terapêutica do dantroleno é mantida por cinco horas e a meia-vida é verificada em 12 horas (Flewellen, et al., 1983).

O medicamento demonstra dificuldades em penetrar a barreira hemato-encefálica, entretanto, devido sua alta lipossolubilidade a substância se acumula nas membranas plasmáticas, atingindo concentrações suficientes para bloquear os receptores rianodinos (Chen et al., 2008). A eliminação do dantroleno sódico ocorre pela urina e bile, posteriormente a metabolização microsomal hepática (Lietman, et al., 1974).

A administração oral pode provocar diarreia e quando prolongada é associada com hepatotoxicidade (Krause et al., 2004; Chan, 1990). Esse efeito deletério não foi observado por Flewellen et al. (1983), Krause et al. (2004), Chen et al. (2008) e Torres (2008). Exemplo disso foi demonstrado por Chen et al. (2008) que ao utilizarem 5mg/kg duas vezes por semana, durante dez meses, em ratos, não verificaram efeitos colaterais. Paralelamente, o dantroleno sódico apresentou propriedades hepatoprotetoras nessa espécie (Yamagishi, et al., 1993).

Outros efeitos colaterais incomuns podem ser observados com a administração prolongada, como anorexia, gastrite, cólica abdominal, constipação, disfagia, distúrbios visuais e acne (Krause et al., 2004; Mowbray et al., 2008; Muehlschlegel e Sims, 2009).

2.6 – Modelos de trauma medular

Com intuito de favorecer a realização de pesquisas na área de trauma medular vários tipos de equipamentos têm sido utilizados para desenvolver trauma ou alterações isquêmicas medulares em animais de laboratório, principalmente em ratos (Von Euler et al., 1996; Mauter et al., 2000; Kwon et al., 2004; Aslan et al., 2009).

Os modelos de trauma medular utilizados inicialmente eram induzidos por agentes foto-químicos, posteriormente utilizou-se secção de medula e técnicas de obliteração de vasos (Von Euler et al., 1996; Mauter et al., 2000). Entretanto, esses modelos não correspondem ao tipo de lesão decorrente do trauma mecânico, seja ele intrínseco ou extrínseco, que normalmente se desenvolve nos seres humanos e animais (Kwon et al., 2004). A utilização de cateter-balão para angioplastia (Kwon et al., 2004; Aslan et al., 2009) e pinças compressivas também são empregados para mimetizar o trauma (Kwon et al., 2004), sendo contudo a aplicação de peso sobre a medula espinhal exposta a forma mais precisa de lesão contusiva/compressiva (Mauter et al., 2000). Para tanto, foram confeccionados diferentes tipos de aparelhos esterotáticos, como os realizados por Gruner em 1992, Farooque em 2000, Noble et al., 2002 e o da Escola de

Veterinária (EV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por Torres et al. (2010).

2.7 – Avaliações comportamentais

Os testes comportamentais são fundamentais para análise do efeito dos tratamentos sobre a lesão medular e até mesmo da recuperação clínica espontânea (Basso et al., 1995; Von Euler et al., 1996). Com este intuito, foram elaboradas avaliações, sendo relatado por Tarlov e Klinger o primeiro modelo de avaliação. Inicialmente, os testes eram descritos como simples formas qualitativas com sensibilidade reduzida, até alcançar formas mais complexas que tenderam a quantificar a recuperação neurológica e correlacioná-la com a quantidade de tecido nervoso preservado (Basso et al., 1995; Basso, 2004).

O objetivo das avaliações comportamentais é verificar o grau de déficit sensorial, motor e até mesmo as disfunções autonômicas provocadas pela lesão medular experimental (Šedý et al., 2008). Contudo, esses exames devem requerer pouco treinamento, não provocar estresse para o animal e fornecer avaliação clínica compatível com o grau de lesão instalada (Von Euler et al., 1996). Por não existir um método de avaliação ideal torna-se necessária a associação de diferentes técnicas de avaliação, como sensibilidade dolorosa (SD), posicionamento tátil (PT), plano inclinado (PI) (Von Euler et al., 1996; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010), posicionamento proprioceptivo (PP) (Silva et al., 2008; Torres et al., 2010), bem como a deambulação em barras (Chen et al., 2008; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010) além do teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995).

A avaliação do PP pode ser realizada pela flexão da articulação tíbio-társica-metatarsica com o objetivo de apoiar a face dorsal dos metatarsos em uma superfície plana para que seja verificada a velocidade e precisão em retornar o membro para posição normal (Torres et al., 2008). O posicionamento tátil é avaliado ao manter o animal suspenso para que possa tocar a face dorsal e lateral dos pés em uma borda de mesa, considerando-se a velocidade e precisão em reposicionar o membro sobre o

obstáculo (Kunkel e Bregman, 1993; Metz et al., 2000).

O exame do plano inclinado avalia a habilidade do animal em se manter posicionado sobre uma rampa com superfície anti-derrapante, colocada em vários ângulos. A inclinação é aumentada gradualmente para posição vertical até atingir o ângulo em que o animal não consegue se manter, sendo considerado como escore o maior ângulo alcançado. Os ratos podem ser testados com a cabeça para cima, para baixo, com lado direito ou esquerdo, sendo observados nestas posições durante 5 segundos (Fehlings e Tator, 1995; Von Euler et al., 1996).

A sensibilidade dolorosa mensura o grau de integridade da comunicação aferente entre medula espinhal e encéfalo, podendo ser realizada através de pressão aplicada na prega interdigital do animal, que normalmente induz nocicepção visualizada pela retirada do membro e vocalização (Gale et al., 1985; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010).

A deambulação do animal em um campo aberto é comumente realizada nas diferentes avaliações comportamentais. Situações em que o animal apresenta discreta alteração da locomoção é acompanhada da avaliação em barras suspensas, como proposto por Silva et al. (2008) e Torres et al. (2010). Essas barras apresentam 7,7 a 1,7 cm de largura, sendo interessante o seu emprego para quantificar o déficit sensorio-motor através do equilíbrio (Tab. 2). Além disso, a deambulação pode ser observada a partir da marcação das patas dos membros torácicos e pélvicos com tinta atóxica de cor diferente entre ambos, sendo então avaliados o comprimento e a existência de passos sobrepostos (Chen et al., 2008).

Existem outros exames que podem ser aplicados como avaliação da movimentação na água, testes de extensão do membro e sensibilidade ao calor (Wrathall et al., 1994).

O escore de deambulação desenvolvido por Basso, Beattie e Bresnahan, assim denominado de teste BBB, aperfeiçoou a escala de Tarlov. O teste BBB contém 22 escores em ordem crescente (0-21), elaborados a partir da recuperação de ratos submetidos ao trauma medular agudo, capazes de diferenciar graus de

lesão neurológica, aumentando assim, a sensibilidade e confiabilidade do teste. A recuperação é organizada pela escala em três fases, inicial, intermediária e tardia. Na fase inicial são observados movimentos discretos de uma ou duas articulações do membro pélvico. Ao final dessa fase os animais conseguem fazer movimentos extensos e simultâneos das articulações coxo-femoral, fêmoro-tíbio-patelar e tíbio-társica. A partir da observação desses movimentos é escolhido escore correspondente que varia de 0 a 7 (Tab. 3) (Basso et al., 1995).

A fase intermediária de recuperação é caracterizada pelo tipo de posicionamento da pata e pelo grau de coordenação entre os membros torácicos e pélvicos, sendo subdividida nos escores de 8 a 13. Nessa fase, o posicionamento da pata pode variar durante o apoio de peso, com a superfície dorsal e plantar, sendo que a primeira geralmente precede a segunda. As passadas dos membros pélvicos ocorrem inicialmente em menor número em relação as dos membros torácicos, mas eventualmente podem ser sincronizadas. Essa coordenação entre os membros torácicos e pélvicos é classificada em ausente, ocasional (frequência $\leq 50\%$), freqüente (frequência 51-94%) ou consistente (frequência 95-100%). Nessa fase, o animal passa a apresentar apoio de peso, sendo visualizado como contração dos músculos do membro pélvico e bem como pela elevação da pelve. A cauda geralmente permanece em contato com o piso, funcionando como apoio adicional (Tab. 3) (Basso et al., 1995).

Na última fase de recuperação são descritos os escores 14 ao 21, sendo visualizados aspectos de aprimoramento dos detalhes da locomoção, como posicionamento da pata paralela ao tronco, elevação dos dedos durante as passadas, estabilidade de tronco e elevação da cauda (Tab. 3) (Basso et al., 1995).

Portanto, o teste BBB possui propriedades de reduzir a variação entre os avaliadores, através da descrição minuciosa dos padrões de deambulação (Basso, 2004) e o treinamento desses minimiza a subjetividade do exame (Šedý et al., 2008). Para aumentar a sensibilidade dessa escala podem ser feitos subescores, uma vez que alguns atributos podem melhorar, mas, não corresponder ao escore determinado (Basso, 2004).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) avaliou e aprovou a execução do projeto, cujo protocolo foi 011/2009 (Anexo).

3.1 – Animais

Foram utilizados 21 ratos da espécie *Rattus norvegicus* variedade Wistar, com quatro meses de idade e peso médio de 356g. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos de sete animais (Tab. 1) e acomodados em caixas plásticas com três ou quatro animais por caixa. Foram mantidos por 14 dias no Biotério do CEPA (Centro Experimental de Pequenos Animais) para aclimação e durante todo o experimento. Esse ambiente fornecia condições de controle da luminosidade, com ciclos de 12 horas alternadas por claro e escuro. O recinto também foi monitorado por termômetro ambiental e mantido na temperatura média de 25°C. Quando o ambiente interno encontrava-se abaixo de 20°C, os aquecedores ambientais eram utilizados para elevar a temperatura do local, prevenindo assim, a hipotermia dos animais. Os ratos receberam água e ração comercial¹ à vontade. Desverminação foi realizada com tiabendazol² na dosagem de 100mg/kg/VO, em duas doses intervaladas de 14 dias. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais três dias antes da cirurgia com o intuito de adaptá-los às avaliações, reduzindo assim o estresse e o medo.

Os grupos foram caracterizados em G1 (controle negativo): os animais foram submetidos à laminectomia dorsal e receberam placebo; G2 (controle positivo): os animais foram submetidos à laminectomia, ao trauma compressivo de medula e receberam placebo;

G3 (dantroleno sódico³): os animais foram submetidos à laminectomia, ao trauma compressivo de medula e receberam dantroleno sódico (Tab. 1). O placebo foi constituído da água para injetáveis sem conservantes, específica para diluição do dantroleno sódico. As administrações do dantroleno sódico e do placebo foram feitas pela via intraperitoneal, uma hora após o trauma medular.

¹ Nuvilab CR-1®, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, Paraná, Brasil.

² Thiaben®- UCI Farma, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.

³ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Tabela 1 – Discriminação dos grupos G1, G2 e G3.

Grupos	Discriminação
G1 – Controle negativo (n=7)	Animais submetidos à laminectomia dorsal e administração de placebo.
G2 – Controle positivo (n=7)	Animais submetidos à laminectomia dorsal, ao trauma medular compressivo e à administração de placebo.
G3 – Dantroleno sódico (n=7)	Animais submetidos à laminectomia dorsal, ao trauma medular compressivo e administração de dantroleno sódico.

3.2 - Procedimento cirúrgico e trauma medular agudo

Os animais foram premedicados com cloridrato de tramadol⁴ na dose de 2mg/kg/SC, e a antibioticoterapia profilática foi realizada com administração de cefalotina sódica⁵ na dose de 30mg/kg/IV. Foram depilados entre as regiões vertebrais T1-L6, fixados em placa de vidro e, posteriormente colocados sobre a mesa cirúrgica. Uma bolsa térmica aquecida a 80°C foi colocada sob a mesa cirúrgica, permitindo a transferência de calor para o animal evitando assim, hipotermia. A antisepsia do campo cirúrgico foi realizada com iodopovidona degermante e álcool iodado.

A anestesia cirúrgica foi induzida e mantida com isoflurano⁶ através de câmara fechada e mantida por meio de máscaras adaptadas para ratos, com concentração aproximada de 3 vol. %.

⁴ Pfizer Saúde Animal, Chácara Santo Antônio, São Paulo, SP, Brasil.

⁵ ABL Antibióticos do Brasil, Cosmópolis, SP, Brasil.

⁶ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda São Paulo, São Paulo, Brasil.

A incisão paraespinal entre T8 e L4 foi realizada englobando pele e tecido subcutâneo e as inserções dos músculos epaxiais foram seccionadas e esses afastados. O processo espinhoso da vértebra torácica 13 (T13) foi removido com pinça hemostática de Kocher. A lâmina dorsal dessa vértebra foi retirada com o emprego de *drill* pneumático neurológico⁷ e auxílio de microscópio cirúrgico⁸, até visualização dos vasos espinhais dorsais, ou seja, até permanência de delicada lâmina óssea semi-transparente. Essa delgada lâmina óssea foi removida com a utilização de uma pinça hemostática mosquito e, após sua remoção foi possível visualizar parte da medula espinhal intacta (Fig. 1A).

Construído o defeito ósseo sem danificação da pia-máter com aproximadamente 0,5cm de diâmetro, o aparelho estereotáxico adaptado ao descrito por Silva et al. (2008) e Torres et al. (2010), foi posicionado. Assim, uma haste previamente esterilizada foi acoplada ao aparelho e cuidadosamente colocada sobre a medula. Finalmente um peso de 72g foi liberado a 0,5cm de distância sobre a haste, onde

⁷ With ECCOS® Aesculap - Laboratórios B. Braun S.A.

⁸ Opto Science in Sight – F104.

permaneceu durante cinco minutos (Fig. 1B). Após isso, visualizou-se formação de grande coágulo e ausência da arquitetura macroscópica do vaso espinhal dorsal. Após realização do trauma, realizou-se a sutura da musculatura com padrão Riverdin com fio polipropileno 3-0, no subcutâneo empregou-se sutura simples contínua utilizando o mesmo tipo de fio, assim como na dermorrafia com padrão simples separado. Subseqüentemente, no período de recuperação anestésica os animais foram mantidos em oxigenioterapia e aquecimento até observar o retorno da consciência, sendo então devolvidos para caixa de procedência. O cloridrato de tramadol⁹ foi administrado no período pós-operatório, durante três dias, na dosagem de 2mg/kg/VO/BID durante três dias. Os animais do grupo G2 e G3 (traumatizados) foram monitorados quanto às retenções fecais e urinárias e submetidos à massagem abdominal três vezes ao dia.

3.3 – Tratamentos

Após uma hora do término do trauma os animais dos grupos G1 e G2 receberam o placebo na mesma quantidade equivalente ao dantroleno sódico diluído pela via intraperitoneal em dose única. O dantroleno sódico foi administrado na dosagem de 10mg/kg por via intraperitoneal em dose única (Tab. 1), da mesma forma que Torres e colaboradores (2008). Os animais foram pesados imediatamente antes da cirurgia para cálculo das doses.

3.4 – Avaliações comportamentais

A avaliação comportamental iniciou-se 24 horas após o procedimento cirúrgico e realizada em estudo cego, pela mesma pessoa. Foram adotados as seguintes avaliações comportamentais, teste de Basso Beattie Bresnahan (BBB), sensibilidade dolorosa (SD), capacidade motora (CM), posicionamento proprioceptivo (PP), posicionamento tátil (PT) e plano inclinado (PI).

Para realizar o exame Basso Beattie Bresnahan (BBB), o animal foi colocado em superfície

plana de um metro de diâmetro e filmado durante dois minutos e meio. O objetivo do exame foi visualizar o padrão de deambulação (Tab.3), mas o estado mental também foi observado. Após a captação das imagens, a deambulação dos animais foi avaliada através da escala de Basso et al. (BBB) (1995) (Tab. 3).

O teste de capacidade motora (CM) foi realizado na mesma superfície descrita acima. E aqueles animais que não apresentaram déficit ou demonstraram discretas alterações na deambulação, foram colocados em barras de madeira acomodadas sobre cavaletes de 60cm de altura. Essas barras apresentavam largura de 7,7 a 1,7cm, com diferença entre elas de um centímetro. Primeiramente o animal foi colocado para deambular na barra mais larga e subseqüentemente em ordem decrescente nas demais. E para a determinação do escore foi considerada a última barra em que o animal conseguiu caminhar com apoio dos quatro membros, sem se desequilibrar (Tab. 2) (Fig. 1C).

⁹ Pfizer, Guarulhos, São Paulo, Brasil.

Tabela 2 – Discriminação dos escores da avaliação neurológica.

ESCORE	AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA
	SENSIBILIDADE DOLOROSA (SD)
0	Ausente.
1	Diminuída.
2	Normal.
	CAPACIDADE MOTORA (CM)
0	Ausência de movimento nos membros pélvicos, sem apoio de peso.
1	Movimento sutil, desconexo dos membros pélvicos, sem apoio de peso.
2	Movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso.
3	Apoio de peso nos membros pélvicos, deambulação com déficit acentuado.
4	Deambulação com déficit moderado
5	Deambulação com déficit discreto e não consegue andar na barra de 7,7cm.
6	Deambulação normal ou com déficit discreto e consegue andar na barra de 7,7cm.
7	Consegue deambular na barra de 6,7cm.
8	Consegue deambular na barra de 5,7cm.
9	Consegue deambular na barra de 4,7cm.
10	Consegue deambular na barra de 3,7cm.
11	Consegue deambular na barra de 2,7cm.
12	Consegue deambular na barra de 1,7cm.
	POSICIONAMENTO PROPRIOCEPTIVO (PP)
0	Ausente.
1	Diminuído.
2	Normal.
	POSICIONAMENTO TÁTIL (PT)
0	Ausente.
1	Normal.
	PLANO INCLINADO (PI)
1	Consegue ficar em ângulo 10°.
2	Consegue ficar em ângulo 20°.
3	Consegue ficar em ângulo 30°.
4	Consegue ficar em ângulo de 40°.
5	Consegue ficar em ângulo de 50°.
6	Consegue ficar em ângulo de 60°.
7	Consegue ficar em ângulo de 70°.
8	Consegue ficar em ângulo de 80°.
9	Consegue ficar em ângulo de 90°.

(Adaptado de Silva et al., 2008)

Tabela 3 – BBB – Discriminação dos escores do teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e classificação das fases de recuperação.

ESCORE	DEFINIÇÃO
0	Nenhum movimento observável dos membros.
1	Movimento discreto de uma ou duas articulações, geralmente coxo-femoral e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação OU Movimento extenso de uma articulação e discreto de outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto das três articulações.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações.
8	Pedalada sem suporte de peso OU Apoio plantar sem suporte de peso.
9	Apoio plantar com suporte de peso na fase de apoio OU Passada dorsal com suporte de peso ocasional, freqüente ou consistente ou Ausência de passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e ausência de coordenação entre membros torácicos e pélvicos.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e ausência de coordenação.
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente.
14	Passo plantar com suporte de peso e coordenação consistentes. Com rotação externa OU interna da pata no contato inicial com piso e antes de elevar a cauda (final da fase de apoio). OU passo plantar freqüente, coordenação consistente e passos dorsais ocasionais.
14	Passo plantar com suporte de peso e coordenação consistentes. Com rotação externa ou interna da pata no contato inicial com piso e antes de liberar os dedos (final da fase de apoio). OU passo plantar freqüente, coordenação consistente e passos dorsais ocasionais.
15	Passo plantar e coordenação consistentes e dedos encostam constantemente ou freqüentemente no piso durante a elevação do membro. A pata está predominantemente paralela ao corpo no contato inicial.
16	Passo plantar e coordenação consistentes e os dedos encostam ocasionalmente durante o avanço do passo. A pata está predominantemente paralela no contato inicial e rotacionada quando se eleva durante o avançar do passo.
17	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos encostam ocasionalmente no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança.
18	Passo plantar e coordenação consistentes, os dedos praticamente não encostam mais na superfície. A pata está paralela no contato inicial e rotacionada no momento de elevação da pata.
19	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está baixa parte ou todo tempo.
20	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima, porém há instabilidade do tronco.
21	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima e há estabilidade do tronco.

Fase inicial de recuperação	Fase intermediária de recuperação	Fase tardia de recuperação
-----------------------------	-----------------------------------	----------------------------

(Basso et al., 1995).

Para realização dos exames de sensibilidade dolorosa (SD), posicionamento proprioceptivo (PP), posicionamento tátil (PT) e plano inclinado (PI) os animais foram avaliados nos dias zero, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, e os testes BBB e capacidade motora (CM) foram analisados nos dias zero, 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29 e 31. Além disso, foi obtido para escore o membro mais alterado nas primeiras 24 horas após o trauma medular.

A sensibilidade dolorosa (SD) dos animais foi avaliada através da compressão digital do avaliador no espaço interdigital do animal, o grau de vocalização e o desconforto foram obtidos como parâmetros e classificados em escores, ausente, reduzido e normal.

O posicionamento proprioceptivo (PP) foi testado através da flexão da articulação tibiotalársica induzindo apoio dorsal dos metatarsos

em uma superfície plana (Fig. 1E). Foram observadas velocidade e precisão com que o animal retornou a pata para posição normal, denotando os escores ausente, reduzido ou normal. O posicionamento tátil foi realizado através da suspensão do animal e toque da face dorsal dos metatarsos em uma superfície plana. O exame foi avaliado pela presença ou ausência da tentativa de retorno da superfície plantar em cima da mesa (Fig. 1D).

O teste de plano inclinado (PI) foi realizado em superfície emborrachada anti-derrapante que apresentava graus de inclinação variáveis de 10° a 90°, portanto, o grau obtido para transformação em escore foi o maior ângulo em que o animal conseguiu permanecer por cinco segundos em uma única posição, com o sentido da cabeça para cima (Fig. 1F).

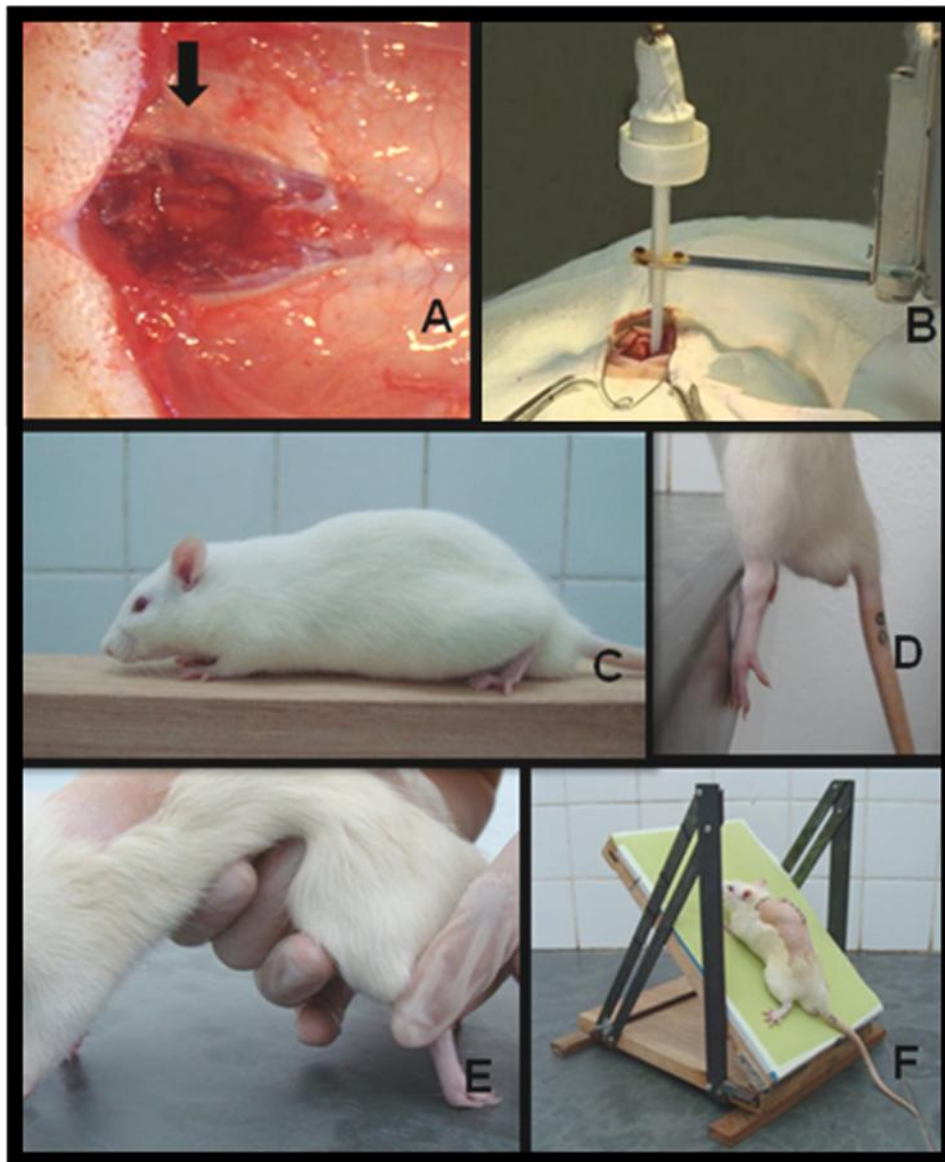


Figura 1 – Fotografias do procedimento cirúrgico e dos testes comportamentais: (A) Laminectomia com exposição da medula espinhal (seta); (B) Compressão da medula espinhal com aparelho estereotáxico; (C) Capacidade motora (CM), deambulação em barra, observar posicionamento dos membros, animal do G1 (laminectomia) (D) Teste de posicionamento tátil (PT), animal do G2 (trauma medular e placebo); (E) Teste de posicionamento proprioceptivo (PP), animal do G3 (trauma medular e dantroleno sódico); (F) Teste de plano inclinado (PI), animal do G2 (trauma medular e placebo).

3.5 – Avaliação anatomo-patológica da medula espinhal

No trigésimo primeiro dia após o trauma, os animais foram eutanasiados com sobredose de isoflurano, seguido de punção cardíaca com finalidade de provocar hipovolemia. Posteriormente, foi administrado cloridrato de xilazina¹⁰ por via intraperitoneal e o isoflurano foi mantido até observação de falência cardíaco-respiratória. Foi coletada a coluna vertebral contendo a medula espinhal de todos os animais. O material foi fixado em formaldeído tamponado a 10% e a medula dissecada, sendo dividida em três cortes transversais de 0,5cm cada, formados pelo epicentro, segmentos cranial e caudal a ele. Posteriormente, todas as secções foram incluídas em parafina pela técnica de rotina e, secções de 4-5 micrometros foram obtidas e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina.

Avaliação morfológica da medula espinhal foi realizada através do microscópio óptico com ocular de 10X e objetiva de 40X, nas porções cranial e caudal ao epicentro para visualização do grau e extensão da lesão nas substâncias branca e cinzenta.

3.6 – Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal

Para carácter quantitativo das lesões neuronais foi realizada a técnica de imunoistoquímica em secções craniais subseqüentes através do anticorpo Anti-NeuN¹¹. A técnica foi realizada da seguinte forma: (1) secções de 4-5 micrometros foram obtidas em lâminas silanizadas¹², colocadas por 15 minutos na estufa a 65°C; (2) secções mantidas em estufa a 37°C foram colocadas em xileno xilol por uma hora; (3) três banhos de álcool absoluto, com duração de 5 minutos cada; (4) banho de álcool

90%; (5) banho de álcool 80%; (6) banho de álcool 70% durante 5 minutos; (7) banho de água durante 5 minutos; (8) recuperação antigênica - lâminas imersas em solução tamponada (NaOH - pH 5,9-6.1) de ácido cítrico 0,21% (solução retriever), colocados em banho maria à 98°C, durante 30 minutos; (9) Resfriamento em temperatura ambiente durante 10 minutos; (10) Três banhos de PBS com duração de 5 minutos cada; (11) bloqueio das peroxidases endógenas com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (3%) durante 30 minutos, em câmara escura; (12) Três banhos de PBS; (13) bloqueio de ligações inespecíficas com soro bloqueio¹³ em câmara escura úmida durante 30 minutos; (14) retirada do excesso de soro bloqueio e anticorpo primário (Anti-NeuN) na diluição de 1:800, overnight em câmara escura e úmida; (15) três banhos de PBS; (16) anticorpo secundário¹⁴ durante 45 minutos em câmara escura e úmida; (17) estreptovidina-peroxidase¹⁵ durante 30 minutos em câmara escura e úmida; (18) Três banhos de PBS; (19) Revelação com 3-3' diaminobenzina peroxidase (DAB)¹⁶ durante 90 segundos; (20) banho de água corrente durante 10 minutos; (21) contra-coloração com hematoxilina durante 4 segundos; (22) banho de água corrente durante 10 minutos; (23) banho em álcool 70% durante 3 minutos; (24) banho em álcool 80% durante 3 minutos; (25) banho em álcool 90% durante 3 minutos; (26) três banhos em álcool absoluto durante 10 minutos cada; (27) banho de xileno xilol durante 30 minutos; (28) montagem das lâminas com bálsamo. Em todas as baterias dessa reação foram utilizados controles positivo e negativo.

As secções foram avaliadas em microscópio óptico em ocular 10X e objetiva de 40X, com auxílio de grátula de 121 pontos e em estudo cego. As células neuronais que exibiram marcação marrom (DAB) foram consideradas íntegras e, portanto quantificadas. Foram considerados oito campos de cada secção da substância cinzenta/animal por ser o número mínimo de campos obtidos em todas as secções, e então a média obtida. A exclusão dos campos

¹⁰ Bayer Schering Pharma Brasil® - Santo Amaro - São Paulo – SP – Brasil.

¹¹ Anti-NeuN, clone A60, monoclonal antibody, cat. MAB377, Lot. LV1634819, Milipore (Chemicon Temecula), EUA.

¹² (3-Aminopropyl) triethoxysilane, Sigma-Aldrich, EUA.

¹³ Protein Block (Serum Free), DAKO, EUA.

¹⁴ LSAB™, Link for AP/HRP, DAKO, EUA.

¹⁵ LSAB™, Streptavidin/HRP, DAKO, EUA.

¹⁶ DAB, DAKO, EUA

excedentes foi realizada através de sorteio englobando todos os campos.

4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os dias através do método de Friedman e entre os grupos pelo Kruskal-Wallis. As secções medulares foram submetidas à análise morfológica em microscópio óptico e à técnica de imunoistoquímica com o anticorpo Anti-NeuN, cuja análise paramétrica entre grupos foi obtida pelo método de Tukey. Adotou-se 95% como nível de significância (p-valor <0,05) para indicar diferença mínima entre dados. Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad InStat, versão 3.10.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Procedimento cirúrgico e trauma medular agudo

A laminectomia foi minuciosamente realizada com auxílio de microscópio cirúrgico, o que permitiu delicado desgaste das lâminas dorsais vertebrais e não provocou lesão à medula, o que pode ser confirmado na observação clínica do grupo G1 (controle negativo) que não apresentou diferença entre os 31 dias de avaliação nos testes de sensibilidade dolorosa (SD), de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), capacidade motora (CM), posicionamento proprioceptivo (PP) e posicionamento tátil (PT), assim como na histologia.

Os animais não apresentaram hiperalgesia no período pós-operatório, sendo bem controlada com cloridrato de tramadol administrado como medicação pré-anestésica e no pós-cirúrgico.

O modelo experimental de trauma compressivo utilizado foi capaz de determinar alterações clínicas caracterizadas por paraparesia não deambulatória, ausência do PP e do PT, redução ou ausência da SD nos membros pélvicos e permanência em ângulo de 50° no teste PI, além de alterações histológicas graves. Essas alterações também foram observadas por Torres

et al. (2010), porém com maior gravidade observada pela perda total de sensibilidade dolorosa e paraplegia 24 horas após a realização do trauma. Esta diferença entre os resultados pode ser devido à modificação do modelo do aparelho estereotáxico empregado por Torres et al. (2010).

A administração de 10mg/kg de dantroleno sódico em dose única por via intraperitoneal não provocou alterações ao exame físico, estando de acordo com as observações clínicas e laboratoriais (uréia, creatinina, ALT, AST, albumina, proteínas totais e bilirrubina) realizadas por Torres (2008), sendo nessa dosagem um medicamento seguro.

As retenções urinária e fecal ocorreram nos animais traumatizados secundariamente à disfunção neurológica, o que também foi verificado por Rivlin e Tator (1977), Wrathall et al. (1994) e Torres (2008). Havia grande pressão vesical ao tentar realizar massagem, sugerindo aumento de tônus do esfíncter uretral. Algumas vezes essas alterações estavam associadas com coágulos na urina e, posteriormente, ela permanecia límpida. Observou-se que a realização de massagem vesical foi essencial para a normalização dessas funções, prevenindo o desenvolvimento de cistite bacteriana, pielonefrite, septicemia e uremia. Estas considerações também foram ressaltadas por Coates (2000) e Meyer et al. (2003).

A retenção urinária após lesão medular ocorre devido à dissinergia vesico-uretral, determinada pela ausência de sincronização entre a contração do músculo detrusor da bexiga e o relaxamento simultâneo de ambos os esfíncteres interno e externo da uretra (Lane, 2000).

5.2 - Avaliações comportamentais

5.2.1 – Teste Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

A realização do teste BBB exige treinamento prévio dos avaliadores, pois se trata de uma escala complexa e detalhada.

Os animais foram filmados para posterior aplicação do teste BBB, o que permitiu maior qualidade para sua realização. Com isso pode-se realizar treinamento dos avaliadores e o aplicar o teste duas vezes para alcançar um resultado final fidedigno.

Os animais do grupo controle negativo G1 deambulavam com rapidez apoiando os quatro membros, sem arrastá-los, com coordenação visualizada pela associação da passada do membro torácico seguida pelo membro pélvico do mesmo lado. Ainda, durante a deambulação esses animais erguiam completamente a cauda e apresentavam também estabilidade de tronco, visualizada por permanecerem somente com apoio dos membros pélvicos e da cauda sobre a superfície, explorando o ambiente.

Os ratos do grupo controle positivo G2 e dantroleno sódico G3 logo após o trauma apresentaram paraparesia não deambulatória, demonstrando déficits neurológicos moderados a graves. Esses animais apresentaram recuperação rápida até aproximadamente o quinto dia, mas ainda caracterizada por paraparesia não deambulatória, porém com movimentação evidente das três articulações. Posteriormente, ao longo dos 26 dias restantes, evidenciou-se recuperação lenta, mas, havia evolução para paraparesia deambulatória.

Ao realizar teste BBB observou-se que os grupos traumatizados G2 e G3 apresentaram semelhantes entre si e diferentes do grupo controle negativo G1, o que já se esperava, uma vez que esse último não foi submetido ao trauma medular. Esta diferença permaneceu por toda avaliação, denotando que os animais não recuperaram totalmente função motora mesmo 31 dias após o trauma (Tab. 4).

Quando se verifica a probabilidade encontrada na comparação com o grupo G1 no 1º dia após

o trauma, observa-se que o G3 obteve pior escore do que G2. Isto é, considerando a função motora, os animais do grupo dantroleno estavam clinicamente piores logo após o trauma, o que também é evidenciado pelo gráfico (Fig. 2).

Entretanto, ao final de 31 dias esses grupos denotaram recuperação parcial da função (Tab.4) (Fig. 2), apresentando déficit motor e proprioceptivo classificados de acordo com a tabela BBB como 9,5 e 10. Esses escores demonstraram deambulação caracterizada por passo plantar com suporte de peso durante o apoio ou passada dorsal com suporte de peso, e passo plantar com suporte de peso ocasional (frequência $\leq 50\%$), ainda com incoordenação entre membros pélvicos e torácicos.

Tabela 4 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB).

Dias	Grupos		
	G1	G2	G3
0	21 ^a	21 ^a	21 ^a
1	21 ^a	5,5 ^{b*}	1 ^{b**}
5	21 ^a	7 ^b	6 ^b
9	21 ^a	9 ^b	8 ^b
13	21 ^a	11 ^b	9 ^b
17	21 ^a	10,5 ^b	9 ^b
21	21 ^a	9 ^b	9 ^b
25	21 ^a	9 ^b	9 ^b
29	21 ^a	11,5 ^b	9 ^b
31	21 ^a	10 ^b	9,5 ^b

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

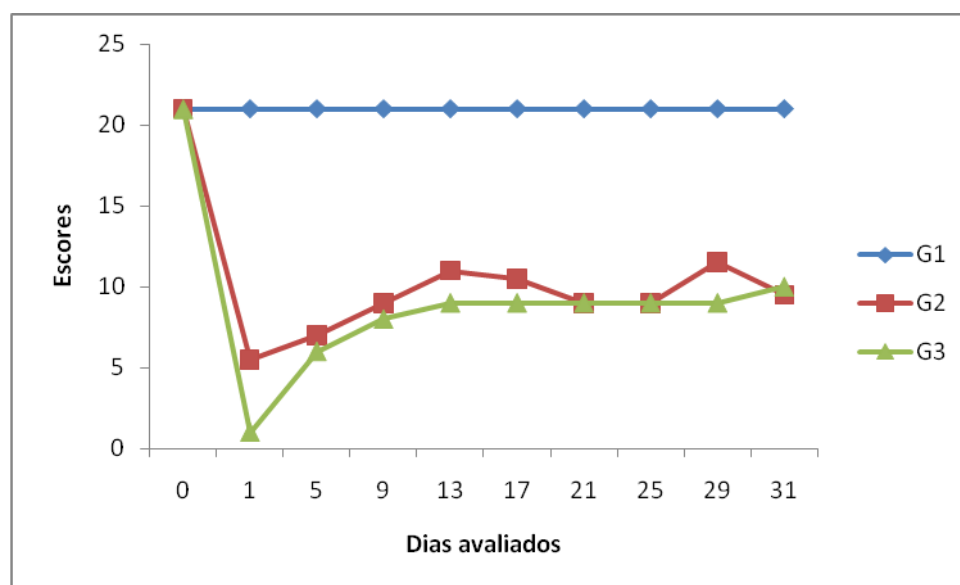


Figura 2 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB).

Ao comparar os animais de cada grupo em relação aos dias de avaliação dentro do grupo, observou-se que o grupo G3 apresentou início da recuperação motora no 9º dia após o trauma, permanecendo durante todo o período de avaliação (Tab. 6). Já no grupo G2, essa

melhora clínica ocorreu mais tardiamente, no 13º dia, permanecendo também por todo o período (Tab. 5). Portanto, a melhora clínica foi mais precoce no grupo G3, cujos animais foram tratados com dantroleno sódico.

Tabela 5 – Diferenças encontradas entre os dias do G2 (controle positivo) ao comparar os valores de p no teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).

Grupo G2	
Dias	Escore
0 x 1	21 ^a x 5,5 ^b
0 x 5	21 ^a x 7 ^b
0 x 9	21 ^a x 9 ^b
0 x 13	21 ^a e 11 ^a

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p>0,05).

Tabela 6 – Diferenças encontradas entre os dias do G3 (dantroleno) ao comparar os valores de p no teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).

Grupo G3	
Dias	Escore
0 x 1	21 ^a x 1 ^b
0 x 5	21 ^a x 6 ^b
0 x 9	21 ^a x 8 ^a

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p>0,05).

Esse teste avalia o conjunto da função neurológica que atua na elaboração da deambulação, ou seja, tanto a propriocepção quanto a função motora (Basso et al., 1995). A propriocepção, dor, temperatura, pressão e tato são informações periféricas que são formadas pelas vias sensitivas. Esses neurônios sensitivos localizados na coluna dorsal da medula espinhal recebem informações periféricas e originam as fibras ascendentes, responsáveis por transportá-las às estruturas nervosas supra-espinhais (Cosenza, 2005).

A motricidade somática resulta do funcionamento integrado de diferentes regiões do sistema nervoso central. As vias eferentes

oriundas do encéfalo alcançam os neurônios motores na medula espinhal através do núcleo rubro, que envia fibras denominadas trato rubro-espinhal situadas no funículo lateral. Os núcleos vestibulares e da formação reticular também são integrantes da função motora e enviam fibras eferentes denominadas trato vestibulo-espinhal e retículo-espinhal reespectivamente. Esses dois tratos alcançam os neurônios motores através do funículo dorsal (Cosenza, 2005).

Já o córtex cerebral dá origem ao trato córtico-espinhal que parte sofre decussação e alcança os neurônios motores pelo funículo lateral e a outra parte pelo funículo dorsal. Entre o córtex, tronco encefálico e cerebelo há a intercomunicação

necessária para elaboração dos movimentos. Portanto, lesões medulares dependendo da sua gravidade podem acarretar em déficits motores devido à interrupção dessa comunicação, como foram verificados em todos os animais submetidos ao trauma nesse experimento (Cosenza, 2005).

5.2.2 – Sensibilidade dolorosa (SD)

O teste de sensibilidade dolorosa não exige treinamento prévio e é simples de ser obtido. Para realizar o teste foi necessária a contenção física do animal para erguê-lo gerando certo grau de estresse. Ao aplicar o estímulo nociceptivo através da pressão digital na prega interdígital do animal são testadas as vias sensoriais compostas pelos neurônios sensitivos presentes no corno dorsal e o trato espinotalâmico lateral que envia o estímulo para regiões talâmicas e conseqüentemente para as corticais (Cosenza, 2005).

Ao exame da sensibilidade dolorosa observou-se que no 1º dia o grupo G2 apresentou-se diferente ao G1e semelhante a G3. Este resultado era esperado uma vez que se tratava de animais com lesões medulares. Porém, constatou-se semelhança do grupo G3 em relação ao G1 ($p>0,05$), também no 1º dia (Tab. 7) (Fig. 3). Este resultado sugere um possível efeito do dantroleno já nas primeiras horas após o trauma, o que poderia ter preservado a integridade dos neurônios e das fibras

relacionadas a esta função no local do trauma. Aslan e colaboradores (2009) ao realizar um estudo do medicamento na mesma dosagem em coelhos, também observaram melhora clínica constatada pela escala de Tarlov, 24 horas após trauma. Essa recuperação foi associada à redução do número de células apoptóticas avaliadas pela técnica de TUNEL.

Interessante observar que, ainda para a sensibilidade dolorosa, o grupo G3 apresentou piora de seu escore no 5º dia ($G3 p<0,05$) e que apesar disso permaneceu com melhor probabilidade, mesmo sendo semelhante ao grupo G2. Isso pode ser explicado considerando as conseqüências progressivas da lesão secundária decorrente do trauma medular. No 15º dia, observou-se que G3 já era semelhante ao G1, enquanto que o G2 se manteve diferente e, somente no 20º dia, tornou-se semelhante aos demais grupos (Tab. 7) (Fig. 3).

A recuperação mais precoce dos animais do grupo G3 pode ser explicada pela maior integridade das fibras decorrentes talvez da redução da morte celular, já observada desde o 1º dia (Tab. 7) (Fig. 3). E, o retorno total da sensibilidade dolorosa em ambos os grupos se deveu, provavelmente pela plasticidade neuronal, pois nos primeiros três meses após lesão medular ocorre significativa recuperação clínica em ratos. Grande parte dessa evolução é decorrente de novos brotamentos e regeneração axonais e ainda por alterações na qualidade das sinapses (Bareyre et al. 2004; Batchelor et al., 2008; García-Alías et al., 2009).

Tabela 7 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de sensibilidade dolorosa (SD).

Dias	Grupos		
	G1	G2	G3
0	2 ^a	2 ^a	2 ^a
1	2 ^a	1 ^b	2 ^{ab}
5	2 ^a	1 ^{b**}	1 ^{b*}
10	2 ^a	1 ^b	1 ^b
15	2 ^a	1 ^b	2 ^a
20	2 ^a	2 ^a	2 ^a
25	2 ^a	2 ^a	2 ^a
30	2 ^a	2 ^a	2 ^a

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

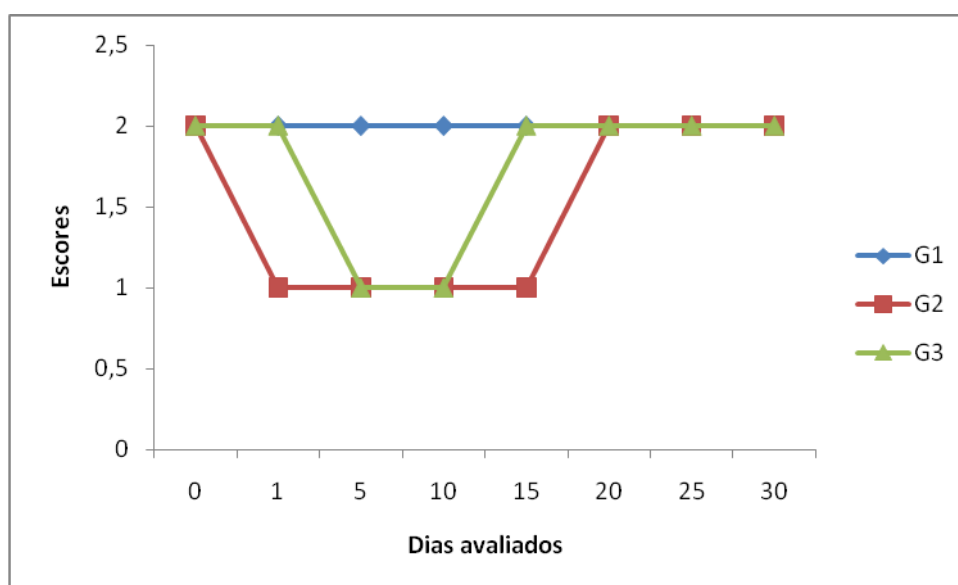


Figura 3 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de sensibilidade dolorosa SD.

A precocidade das recuperações motora e sensibilidade dolorosa observada no grupo G3 quando comparada ao G2, pode ser devida a maior integridade do tecido nervoso pela ação do dantroleno sódico fornecida nas primeiras horas, reduzindo a propagação dos eventos secundários relacionados ao trauma.

5.2.3 - Capacidade motora (CM)

Esse teste é mais simples e mais fácil de ser aplicado em relação ao BBB, mas pode sofrer influência do medo dos animais ao caminhar nas barras, apesar de terem sido treinados para reduzir essa interferência. Portanto, alguns animais demonstraram receio ao deambular sobre as barras, o que interferiu no tempo de realização do teste prolongando-o.

Na avaliação da capacidade motora no 1º dia após o trauma, não foi observada diferença entre os grupos G2 e G3 e, ambos apresentaram diferentes de G1, o que se esperava uma vez que foram comparados animais traumatizados e não-traumatizados. Porém, esta diferença permaneceu por todo o período de avaliação, corroborando com os achados do teste BBB (Tab. 8) (Fig. 4).

Tabela 8 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de capacidade motora (CM).

Dias	Grupos		
	G1	G2	G3
0	12 ^a	12 ^a	12 ^a
1	12 ^a	1,5 ^b	1 ^b
5	12 ^a	2 ^b	2 ^b
9	12 ^a	2,5 ^b	3 ^b
13	12 ^a	4,5 ^b	3 ^b
17	12 ^a	4,5 ^b	3 ^b
21	12 ^a	3,5 ^b	3 ^b
25	12 ^a	3,5 ^b	3 ^b
29	12 ^a	4 ^b	6 ^b
31	12 ^a	4,5 ^b	3 ^b

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p>0,05$).

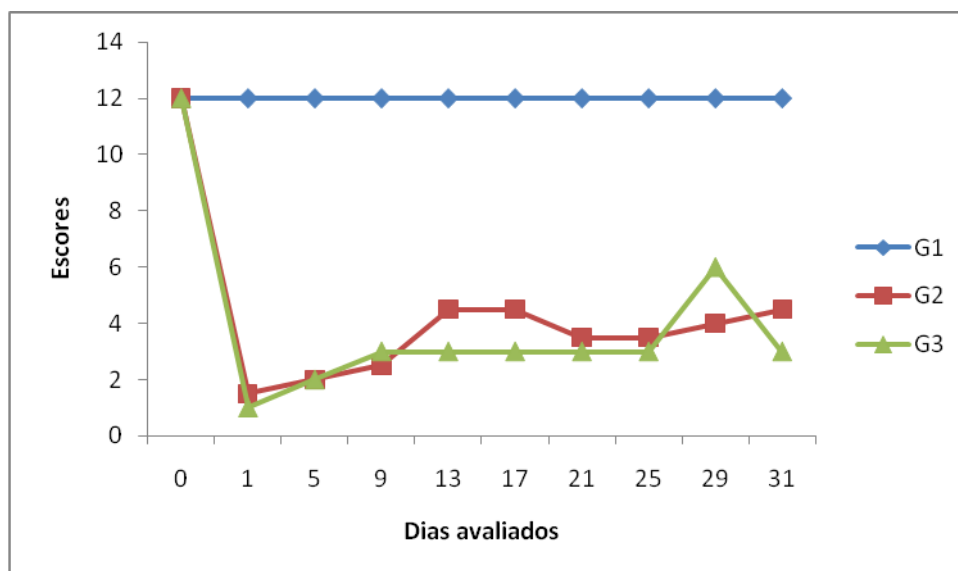


Figura 4 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de capacidade motora (CM).

Ao realizar as comparações entre dias no mesmo grupo, observou-se que os animais do grupo G3 tornaram-se semelhantes ao dia zero, no 9º dia, ao passo que os do grupo G2 demonstraram essa similaridade somente no 13º dia. Esses resultados demonstraram recuperação

mais tardia dos animais do grupo G2 (controle positivo) quando comparados com os do grupo G3 (dantroleno), os quais foram semelhantes aos dados encontrados no teste BBB (Tab. 9, 10).

Tabela 9 – Diferenças encontradas entre os dias do G2 (controle positivo) ao comparar os valores de p do teste capacidade motora (CM).

Grupo G2	
Dias	Escore
0 x 1	12 ^a e 1,5 ^b
0 x 5	12 ^a x 2 ^b
0 x 9	12 ^a x 2,5 ^b
0 x 13	12 ^a x 4,5 ^a

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p>0,05).

Tabela 10 – Diferenças encontradas entre os dias do G3 (dantroleno) ao comparar os valores de p do teste de capacidade motora (CM).

Grupo G3	
Dias	Escore
0 x 1	12 ^a x 1 ^b
0 x 5	12 ^a x 2 ^b
0 x 9	12 ^a x 3 ^a

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

O teste de deambulação em barras parece ser correspondente ao teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), pois os resultados da comparação entre dias foram semelhantes entre eles. Sendo, portanto, dois testes que poderão ser complementares para confirmação de resultados.

A melhora clínica mais precoce do G3 (dantroleno) foi demonstrada pelos exames BBB e CM resultado compatível com a recuperação da SD. Apesar de terem sido semelhantes estatisticamente, o teste BBB apresentou melhor execução clínica em relação a CM. Pois, este teste oferece maior detalhamento da deambulação, permitindo avaliação mais minuciosa e é mais fácil de ser realizado, porque não há o estresse da deambulação em barras. Portanto, deve-se adotar um teste com maior discriminação, mas que possa ser aplicado, pois testes mais simples algumas vezes podem não ser capazes de demonstrar diferenças clínicas discretas e experimentos iniciais podem denotar sutis resultados (Basso, 2004).

5.2.4 - Posicionamento proprioceptivo (PP)

O teste de posicionamento proprioceptivo foi simples e de fácil realização, porém há variação da resposta no mesmo indivíduo ao longo do dia, o que também ocorre no exame neurológico em cães com anormalidades proprioceptivas. Portanto, esse exame demonstrou que pode ser subjetivo, assim como relatado por Silva et al. (2008), e o que poderia melhorar sua qualidade seria fazê-lo várias vezes e obter uma média por dia.

Os grupos traumatizados foram semelhantes entre si, e diferentes do grupo G1 (controle negativo) durante todo o experimento (Tab. 11) (Fig. 5). Quando foi realizada a comparação entre dias não houve diferença em ambos os grupos traumatizados, mas apesar disso, o grupo G3 permaneceu com melhor probabilidade (Tab. 12, 13). Torres (2008) também não observou nenhuma diferença entre os grupos ao aplicar esse teste.

Tabela 11 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de posicionamento proprioceptivo (PP).

Dias	Grupos		
	G1	G2	G3
0	2 ^a	2 ^a	2 ^a
1	2 ^a	0 ^b	0 ^b
5	2 ^a	0 ^b	0 ^b
10	2 ^a	1 ^b	1 ^b
15	2 ^a	1 ^b	1 ^b
20	2 ^a	1 ^b	1 ^b
25	2 ^a	1 ^b	1 ^b
30	2 ^a	1 ^b	1 ^b

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

Tabela 12 – Diferenças encontradas entre os dias do G2 (controle positivo) ao comparar os valores de p do teste de posicionamento proprioceptivo (PP).

Grupo G2	
Dias	Escore
0 x 1	2 ^a e 0 ^{b*}
0 x 5	2 ^a x 0 ^{b*}

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$). * $p < 0,001$.

Tabela 13 – Diferenças encontradas entre os dias do G3 (dantroleno) ao comparar os valores de p do teste de posicionamento proprioceptivo (PP).

Grupo G3	
Dias	Escore
0 x 1	2 ^a e 0 ^{b*}
0 x 5	2 ^a x 0 ^{b**}

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$). * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

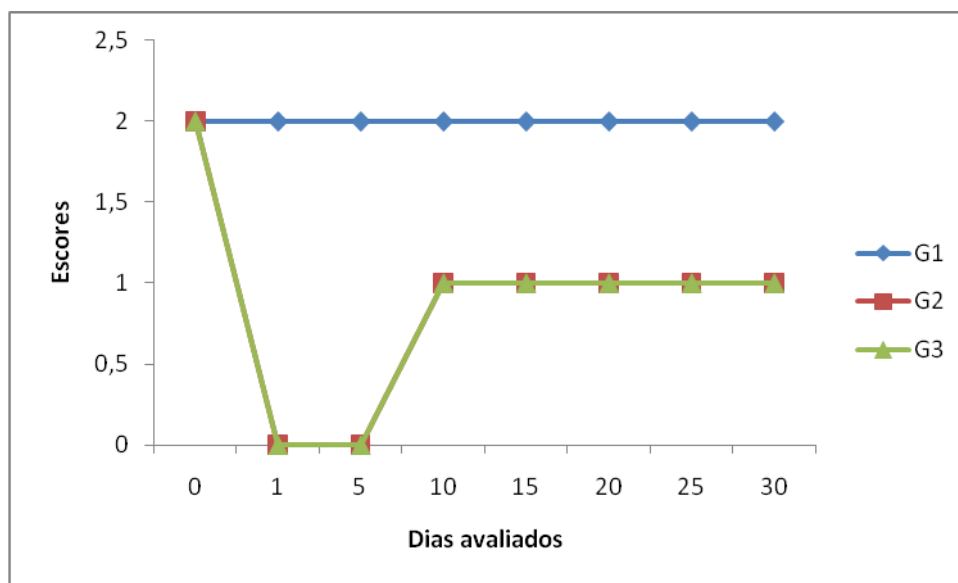


Figura 5 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de posicionamento proprioceptivo (PP).

Apesar da diferença entre os grupos traumatizados e o controle negativo, verificou-se que houve melhora da propriocepção nestes grupos no 10º dia e que essa permaneceu estável até o final do período de observação (Tab. 11) (Fig. 5).

Quando foi realizada comparação entre os dias nos grupos traumatizados (G2 e G3) não houve semelhança com o dia zero. Este resultado era esperado, pois apesar de verificar evolução da função motora e sensibilidade dolorosa, sabe-se que a propriocepção é o último parâmetro a retornar a normalidade. Isso é decorrente da distribuição das fibras pela periferia da substância branca e ao seu grande diâmetro denotando, portanto maior suscetibilidade dessas (Lorenz e Kornegay, 2006).

O teste de posicionamento proprioceptivo (PP) mensura principalmente a propriocepção consciente que é captada por fibras periféricas, penetram na raiz dorsal e não fazem sinapse com neurônios da medula. Essas fibras são enviadas para o bulbo e cérebro através dos fascículos grácil relacionados com os membros pélvicos, e cuneiforme associado com membros torácicos, ambos localizados no funículo dorsal da medula espinhal (Cosenza, 2005).

Já a propriocepção inconsciente é responsável pelo controle automático da motricidade, uma das funções do cerebelo. As fibras periféricas penetram pela raiz dorsal e fazem sinapse com neurônios da coluna dorsal. Esses neurônios enviam axônios para o funículo lateral e formam o trato espinocerebelar (dorsal e ventral), alcançando o cerebelo (Cosenza, 2005). Contudo, lesões medulares podem acarretar em alterações nessas estruturas responsáveis pela propriocepção e função motora, induzindo déficits visualizados pela redução ou ausência do reposicionamento do membro, após inferência de posição anômala (Lorenz e Kornegay, 2006).

5.2.5 – Posicionamento tátil (PT)

O teste de posicionamento tátil também avalia as capacidades proprioceptiva, motora e ainda a visual (Lorenz e Kornegay, 2006).

Ao realizar o exame de posicionamento tátil (PT) observou-se que os animais alternavam sua resposta devido à resistência ao método de contenção, onde eram suspensos através do tronco para induzir contato da face dorsal dos metatarsos com uma superfície. Fato concluído devido à variação da resposta encontrada nos animais do grupo G1 (controle negativo), pois hora o PT apresentava-se normal e ora ausente o que também foi observado por Metz et al. (2000).

Durante essa avaliação observou-se grande variação em cada grupo, provavelmente devido à existência de apenas dois escores, e conseqüentemente, não houve uma lógica na comparação entre os grupos e também em relação aos resultados dos demais testes.

Essa oscilação revela a possibilidade de se tratar de um teste subjetivo corroborando com Forsberg et al. (1974), que também obtiveram esse tipo de resposta inconstante no emprego deste teste. Quanto à comparação entre G2 e G3

e entre dias não houve diferença estatística, ou seja, o parâmetro não foi recuperado devido à ausência de normalização da propriocepção, também observada no teste de posicionamento proprioceptivo.

5.2.6 – Plano inclinado (PI)

O exame do plano inclinado foi de fácil realização, mas foi necessário o treinamento do animal para reduzir o estresse e para obtenção de resultados reais. Inicialmente devido ao medo os animais ficavam pouco tempo sobre a superfície e inclusive alguns pulavam do aparato, por isso foram treinados no período pré-operatório. Nesse período os animais foram capazes de se manter em 70° ou 80° de inclinação (escores 7 e 8, respectivamente) (Tab. 14), escore discretamente inferior em relação aos animais do experimento de Torres (2008) nesse mesmo período.

No 1° dia após o trauma os grupos G2 e G3 foram diferentes em relação ao grupo G1 e semelhantes entre si. Essa semelhança permaneceu por todo o período de avaliação. Porém, no 10° dia o grupo G3 tornou-se semelhante ao grupo G1, ao passo que, o grupo G2 alcançou essa semelhança somente no 15° dia (Tab. 14) (Fig. 6).

Tabela 14 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de plano inclinado (PI).

Dias	Grupos		
	G1	G2	G3
0	8 ^a	8 ^{ab}	7 ^b
1	9 ^a	5,5 ^b	6 ^b
5	9 ^a	6,5 ^b	7 ^b
10	8 ^a	7 ^b	7 ^{ab}
15	8 ^a	7 ^a	7 ^a
20	8 ^a	7,5 ^a	8 ^a
25	8 ^a	7 ^a	7 ^a
30	7 ^a	7,5 ^a	7 ^a

Medianas seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p>0,05$).

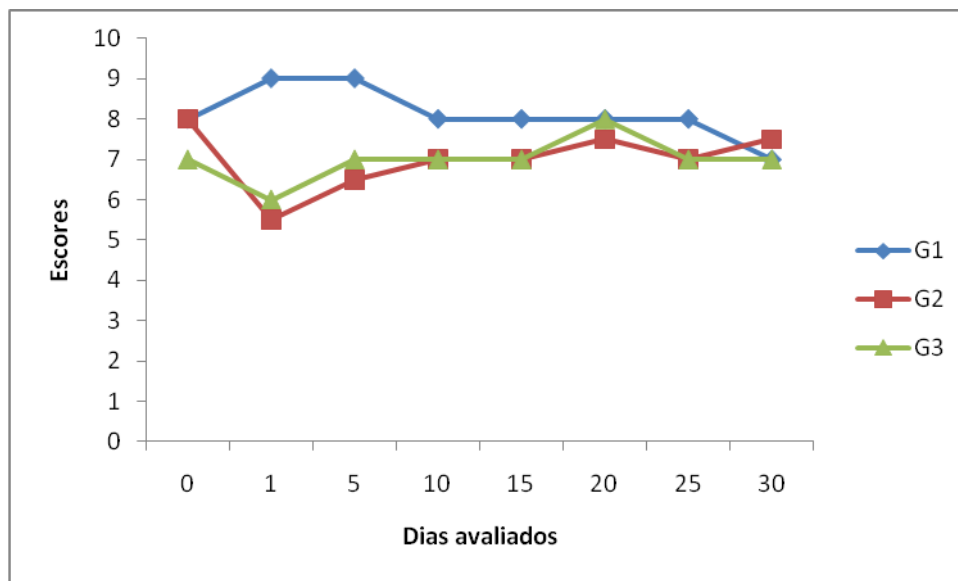


Figura 6 – Medianas obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) no teste de plano inclinado (PI).

Observa-se ainda que em alguns dias os animais do grupo controle negativo G1 permaneceram em ângulo superior em relação ao período pré-operatório. Este resultado pode ser uma resposta normal de animais hígdos em decorrência do condicionamento e como o grupo G3 se assemelhou ao G1 ao 10º dia, somando-se com a presença de escore superior ao do treinamento, ele se aproximou da normalidade (Tab. 14) (Fig. 6).

O teste PI é correlacionado com a integridade do trato rubroespinal e outros circuitos extrapiramidais. Esse feixe é responsável pela resposta descendente do mesencéfalo que controla o estímulo excitatório ou inibitório dos interneurônios, e esses por sua vez modulam os neurônios motores (Fehlings e Tator, 1995).

5.3 - Avaliação anatomoistopatológica da medula espinhal

Macroscopicamente, os animais do grupo G1 não apresentaram qualquer alteração na medula espinhal. Observou-se neste grupo, medula com coloração esbranquiçada, sem aderências das meninges no local da laminectomia. Nos grupos G2 (controle positivo) e G3 (dantroleno) foram observadas áreas focais de aderência entre dura-máter e vértebra, o que dificultou a dissecação, mas não havia congestão e hemorragia ao longo da medula, como descrito por Torres (2008) ao oitavo dia, provavelmente devido ao maior tempo decorrido do trauma e eutanásia, nesse experimento.

À avaliação microscópica das medulas espinhais, os animais do G1 (controle negativo) apresentaram estrutura morfológica compatível com a normalidade. Observou-se substância cinzenta em forma de “H”, constituída pelos cornos dorsais, ventrais e substância intermédia. Esse material estava circundado pela substância branca, apresentando aspecto circular, às vezes achatado nas regiões dorsais e ventrais. A substância branca se dividia morfológicamente em funículos dorsais, laterais e ventrais e apresentava axônios envoltos por mielina com poucas células da glia e da micróglia (Fig. 7D). Todo o tecido medular estava envolvido pela pia-máter (Summers et al., 1994).

Os neurônios desses animais apresentavam tamanhos e forma variáveis, sendo o corpo celular esférico, piriforme ou anguloso. Essas células possuíam grande núcleo com um nucléolo também evidente, principalmente nos cornos ventrais do órgão. O citoplasma neuronal possuía estruturas basofílicas dispersas ou corpúsculos de Nissl bem visíveis, em maior quantidade nos neurônios motores. Havia também células da glia e da micróglia dispersas por toda substância cinzenta e (Fig. 7A), no centro da medula se localizavam as células endimárias, delimitando o canal central ou endimário (Summers et al., 1994; Maxie e Youssef, 2007).

Já nos grupos traumatizados (G2 e G3) ambos apresentaram alterações morfológicas

confirmando que o modelo de trauma medular utilizado foi capaz de induzir graves alterações no epicentro. Elas eram representadas por áreas de cavitação (malácia) contendo células de Gitter ao redor, células da glia, e tecido medular danificado remanescente (Fig. 7F). Na região mais externa correspondente à substância branca também foi observada degeneração Walleriana grave, fatos que corroboram com resultados de Torres (2008) e Sparrey et al. (2009). Essa lesão levou a distorção do formato anatômico de “H” ou “borboleta” da substância cinzenta. Ressalta-se que as alterações morfológicas demonstradas nessa região, ou epicentro, foram basicamente as mesmas.

Devido à elevada intensidade de destruição tissular nesta região, optou-se por analisar os eventos nas secções craniais e caudais, uma vez que a lesão secundária ocorre ao longo da medula o que permitiu uma melhor caracterização das alterações. Essa forma de avaliação também foi relatada por Lee e et al. (2008), pois concluíram que, para verificar a eficácia dos medicamentos na lesão medular é necessária a manutenção das células e da estrutura da medula, sendo muitas vezes verificadas somente nas áreas adjacentes.

Nas regiões craniais e caudais ao epicentro, os grupos traumatizados (G2 e G3) apresentaram em geral, neurônios alterados com características morfológicas de degeneração com cromatólise central e marginalização nuclear, assim como de retração citoplasmática, condensação da cromatina, ausência de definição do nucléolo (Fig. 7C) e algumas vezes essas estruturas encontravam-se intensamente eosinofílicas o que sugeria a ocorrência de “neurônio vermelho”. As lesões neuronais aconteceram em vários focos da substância cinzenta e estavam sempre acompanhadas de gliose, com poucas figuras características de neuroniofagia.

Devido à semelhança morfológica da picnose nuclear e retração citoplasmática existente entre os mecanismos de morte celular por apoptose e necrose não foi possível afirmar presença ou ausência de ambos através de técnicas de coloração de rotina e pela observação com microscópio óptico (Huerta et al., 2007). Portanto, o termo “morte neuronal” utilizado na

análise anatomoistopatológica para definição desses eventos foi o mais adequado.

Na substância branca houve degeneração Walleriana, com perda de axônios, dilatação e fragmentação do tubo de mielina, cujo aspecto era semelhante à esponja. Havia também presença discreta a moderada de distrofia axonal ou balão axonal e câmaras de digestão acompanhadas por gliose, porém menos intensa em relação à da substância cinzenta (Fig. 7E). Essa lesão apresentou vários tipos de distribuição, desde focal a difusa. Não havia infiltração de leucócitos nos segmentos craniais e caudais ao epicentro, assim como não se observou congestão, pois essas alterações ocorrem nas primeiras semanas após a lesão primária, de acordo com Torres (2008) e Çolak et al. (2009).

As alterações histológicas evidenciadas nessa pesquisa puderam ser observadas após um longo período porque o desenvolvimento das lesões secundárias é lento e gradativo o que determina também uma estabilização tardia (Wrathall et al., 1994).

Ao analisar cada grupo individualmente, a região cranial ao epicentro do grupo G2 apresentou degeneração e morte neuronal (Fig. 7C) discretas a moderadas multifocais com gliose moderada difusa, associadas à degeneração Walleriana (Fig. 7E) focalmente extensa acentuada e gliose menos acentuada. Já no grupo G3 (dantroleno), a maioria dos animais (6/7) não apresentou lesões neuronais (Fig. 7A), porém havia gliose moderada difusa, mas a substância branca denotou lesão focalmente extensa acentuada acompanhada por gliose menos intensa.

Na região caudal ao epicentro no grupo G2 ocorreram os mesmos padrões de lesão de corpos neuronais em relação à região cranial. A

substância branca denotou degeneração Walleriana difusa moderada também associada à gliose difusa moderada. No grupo G3 (dantroleno) a maioria dos animais (4/7) também não apresentou alterações neuronais visíveis. Entretanto, todos apresentavam gliose, predominantemente moderada difusa. E na substância branca desse mesmo grupo G3 as alterações variaram de degeneração axonal difusa acentuada a discreta e, ausente de gliose.

Portanto, observou-se que os animais do G3 (dantroleno) apresentaram maior integridade neuronal, corroborando com os resultados histológicos e imunistoquímicos obtidos por Torres (2008), onde foi visualizada menor intensidade de apoptose e maior quantidade de corpos neuronais íntegros marcados com anticorpo monoclonal Anti-NeuN.

Essa maior integridade neuronal visualizada no grupo G3 (dantroleno) está associada aos resultados obtidos pelos testes de BBB, CM, SD, PI onde os animais deste grupo demonstraram recuperação mais rápida em relação ao grupo G2 (controle positivo).

A maior preservação da morfologia dos neurônios visualizados neste estudo pode estar relacionada à presença marcante dos astrócitos. A inibição dos astrócitos reativos após trauma aumenta a degeneração das substâncias branca e cinzenta, devido ao acúmulo de glutamato e conseqüente excitotoxicidade, levando ao déficit motor decorrente da grave desmielinização (Faulkner et al., 2004). Portanto, será que a presença marcante destas células nessa região podem ter impedido a exacerbação das lesões medulares, uma vez que, quando reativas estimulam a reparação tissular e, subseqüente recuperação funcional (Faulkner et al., 2004; Ito et al., 2009)?

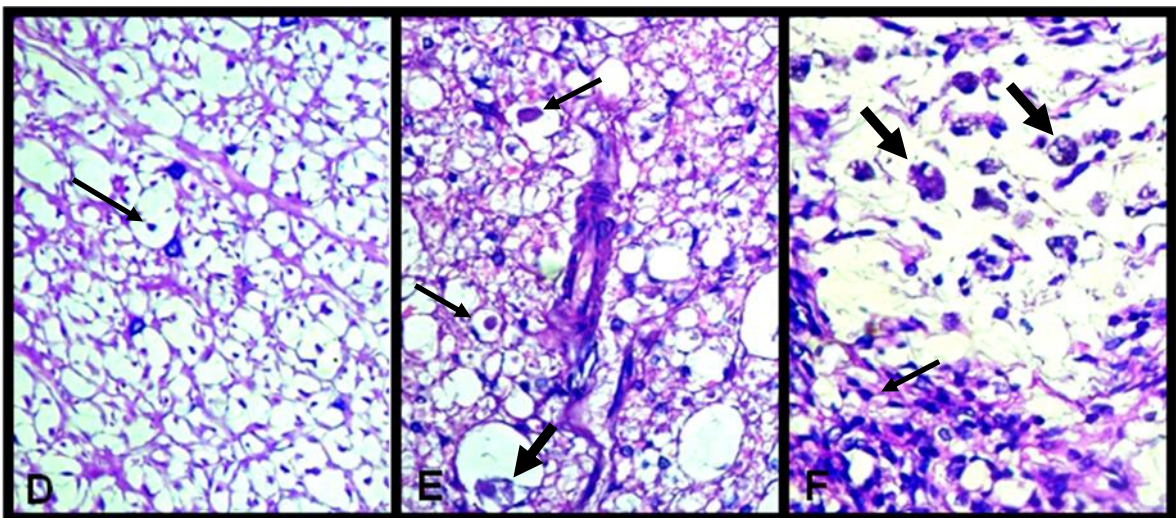
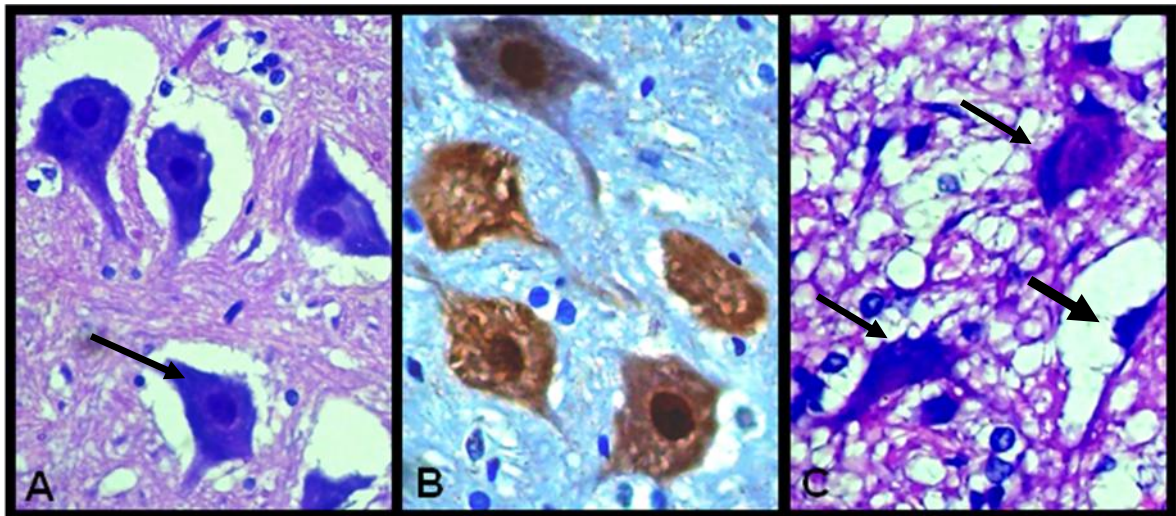


Figura 7 – Fotomicrografias de secções transversais histológicas e imunoistoquímicas da medula espinhal. (A), (B), (C) Substância cinzenta. (A) HE, 300X. Grupo dantroleno sódico (G3), neurônios íntegros, corpúsculos de Nissl (seta). (B) Anti-NeuN, 430X. Grupo dantroleno sódico (G3), neurônios íntegros. (C) HE, 500X. Grupo controle positivo (G2), degeneração neuronal (seta fina) e morte neuronal (seta grossa). (D), (E) Substância branca. (D) HE, 360X. Grupo controle negativo (G1), substância branca íntegra, axônio (seta). (E) HE, 220X. Grupo controle positivo (G2), degeneração Walleriana: tumefação axonal (seta fina) e câmara de digestão (seta grossa). (F) HE, 220X. Grupo controle positivo (G2), Epicentro, malácia, cicatriz glial (seta fina) e células de Gitter (seta grossa).

Além disso, um dos grandes problemas que influenciam negativamente o tratamento do trauma medular agudo é o tempo entre sua ocorrência e início da intervenção. Apesar de se ter melhores efeitos com administração em até 40 minutos após o trauma (Niebauer e Gruenthal, 1999), o dantroleno sódico acarretou bons resultados mesmo sendo administrado após uma hora. O medicamento conseguiu atingir o tecido nervoso danificado, provavelmente pela interrupção da integridade da barreira hemato-espinhal provocada pelo trauma e/ou se acumulou nas membranas por ser lipossolúvel.

5.4 – Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal

Ao realizar a técnica de imunoistoquímica para quantificação de neurônios íntegros com anticorpo Anti-NeuN observou-se que os animais do grupo G1 (controle negativo) apresentaram maior quantidade de neurônios marcados pelo DAB, demonstrando coloração marrom do citoplasma e núcleo dos neurônios. Esse resultado é compatível com a técnica cirúrgica na qual esses animais foram

submetidos, pois foi realizada somente a laminectomia dorsal minuciosa (Tab. 15).

Os animais do grupo G2 (controle positivo) apresentaram estatisticamente menor quantidade de neurônios marcados pelo DAB em relação ao G3 (dantroleno sódico) (Fig. 7B) (Tab. 15, 16), o que corrobora com resultados da histopatologia e avaliações comportamentais. E ainda, a média de corpos neuronais do grupo tratado G3 (dantroleno sódico) apresentou maior aproximação com quantidade de neurônios normais demonstrada pelo grupo G1 (controle negativo) (Tab. 15, 16). Portanto, a administração de dantroleno sódico reduziu a morte neuronal por apoptose e/ou necrose preservando o tecido medular, resultado encontrado também por Torres (2008). Mas com esse experimento pode-se afirmar que isto conseqüentemente acarretou na recuperação clínica mais precoce.

Tabela 15 – Médias obtidas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) na quantificação de neurônios com anticorpo Anti-NeuN.

Variável	G1	G2	G3
Número de neurônios íntegros	42,674 ^a	18,525 ^b	31,975 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si (p>0,05).

Tabela 16 – Valores de p em relação ao número de neurônios íntegros obtidos de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno).

Variável	G1xG2	G1xG3	G2xG3
Valores de p em relação ao número de neurônios íntegros	p<0,001	p<0,05	p<0,01

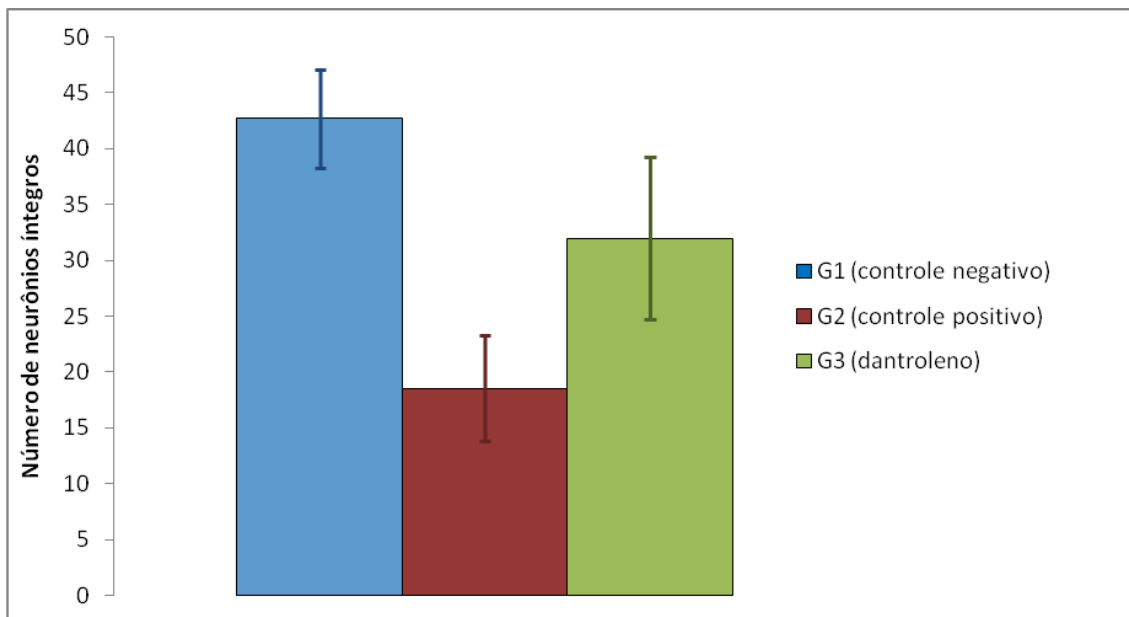


Figura 8 – Média de número de neurônios íntegros e reespectivos desvios padrões obtidos de ratos Wistar submetidos à laminectomia (G1 – controle negativo), ao trauma medular (G2 - controle positivo) e tratados com dantroleno sódico (G3 – dantroleno) na avaliação imunohistoquímica com anticorpo Anti-NeuN.

6 - CONCLUSÕES

O dantroleno sódico, em única administração pela via intraperitoneal, na dose de 10mg/kg, diminuiu a intensidade das lesões desencadeadas pelo trauma medular compressivo após 31 dias do mesmo. Fato também associado à recuperação clínica precoce determinada pelos testes BBB, CM, SD, e PI durante esse período. Resultados decorrentes do efeito do dantroleno sódico sobre os mecanismos fisiopatológicos do trauma medular agudo permitindo maior preservação da medula espinhal.

7 – PERSPECTIVAS

A fisiologia e fisiopatogenia do sistema nervoso revelam a existência de uma complexa relação entre os componentes do tecido nervoso (Takuma et al., 2004; Butt, 2006; Ito et al., 2009), o que o torna alvo para inúmeras pesquisas. Ao observar menor preservação da

substância branca em relação à cinzenta com o tratamento proposto, é interessante e necessário ressaltar a inter-relação oligodendrócito e axônio. Essa célula da glia é responsável pela síntese de mielina que envolve os axônios (Mitchell e Lee, 2008) e ainda o próprio axônio estimula a mielinização e a sobrevivência da mesma, portanto, há uma dependência entre essas estruturas (Butt, 2006). Mas, os oligodendrócitos são altamente vulneráveis aos distúrbios intracelulares de cálcio, particularmente pela excitotoxicidade provocada pelo glutamato (Popescu et al., 2002; Butt, 2006; Matute et al., 2005; Ibarretxe et al., 2006; Chen et al., 2008) através da estimulação dos receptores NMDA, AMPA e KA (Ibarretxe et al., 2006).

Portanto, o funcionamento inadequado de um dos componentes do tecido nervoso interfere no sistema como um todo, reduzindo a capacidade de recuperação. Sabendo-se da ação do dantroleno sódico na liberação de cálcio e glutamato e, conseqüentemente, sobre os mecanismos de apoptose (Wei et al., 2000) e necrose neuronal (Mautes et al., 2000; Kwon et al., 2004; Alatorre et al., 2007; Mattson, 2007 e Mitchell e Lee, 2008) e, de sua importância na perfusão tissular (Gwak et al., 2008;

Muehlschlegel et al., 2009; Salomone et al., 2009), pode-se também cogitar sua ação sobre as demais células da glia, o que, resultaria em uma ação indireta sobre os neurônios.

A associação de substâncias que atuam em diferentes células e estruturas do sistema nervoso também poderia proporcionar sinergismo, permitindo maior preservação ou até mesmo a regeneração do tecido nervoso. Düzenli e colaboradores (2005) verificaram ação neuroprotetora dose-dependente do dantroleno sódico em cultura de neurônios granulares do cerebelo expostas à estimulação pelo glutamato. Porém associado à nimodipina (bloqueador CCDV, canais para cálcio dependentes de voltagem) ou ao *ruthenium red* apresentou melhores resultados em relação ao seu uso isolado.

Outras pesquisas relatam ação benéfica da metilprednisolona sobre os oligodendrócitos no tratamento do trauma medular agudo. Isso ocorre porque os receptores específicos para essa substância nos oligodendrócitos ativam vias diferentes nas demais células do tecido nervoso, e quando incitadas aumentam a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-xL, reduzem a ativação da caspase-3 e conseqüentemente a inibem a fragmentação do DNA. Outra característica importante para o tratamento é considerar a suscetibilidade de cada célula após um distúrbio e essas foram as principais células a apresentar reação positiva para o anticorpo anti-caspase-3, sugerindo também maior sensibilidade ao trauma em relação às demais (Lee et al., 2008).

Portanto, será a associação do dantroleno sódico com outro medicamento como, a metilprednisolona que age sobre os oligodendrócitos mais eficaz que sua ação isolada?

Outra característica que deve ser considerada para o sucesso do tratamento do trauma medular é o processo fisiopatológico em cada célula do sistema nervoso. Exemplo disto são os oligodendrócitos que apresentam ondas apoptóticas tardias, cujo platô ocorre no sétimo dia, então como suprimir esses eventos? Administrando mais doses do dantroleno sódico? Além disso, será que administração de doses superiores poderia ser mais eficaz visto

que sua ação é dose-dependente? Portanto, a avaliação da dose ideal deverá ser investigada em experimentos futuros, podendo ser aumentada, pois de acordo com Chen et al (2008) a toxicidade ocorre quando atinge 25mg/kg.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATORRE, W. E. B.; MARTINEZ, D. G.; CORRAL, S. A. R. Critical ischemia time in a model of spinal cord section. A study performed on dogs. *European Spine Journal*, v.16, p.563-572, 2007.

ASLAN, A.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M. E.; Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. *European Spine Journal*, published online, 2009.

BAGLEY, R. S.; HARRINGTON, M. L. SILVER, G. M., et al. Exogenous spinal trauma: Clinical Assessment and initial Management. *Compendium*, v.21, p.11381143, 1999.

BALLOU, H.; STETTLER, O.; WEISS, S., et al. Upregulation in rat spinal cord microglia of the nonintegrin laminin receptor 37kDa-LRP following activation by a traumatic lesion or peripheral injury. *Journal of Neurotrauma*, v.26, p.195-207, 2009.

BAREYRE, F. M.; KERSCHENSTEINER, M.; RAINETEAU, O., et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rat. *Nature Neuroscience*, v.7, p.269-277, 2004.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma*, v.12, p.1-21, 1995.

BASSO, D. M.; Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities and controversies. *Journal of Neurotrauma*, v. 21, p.395-404, 2004.

- BATCHELOR, P. E.; TAN, S.; WILLIS, T. E., et al. Comparison of inflammation in the brain and spinal cord follow mechanical injury. *Journal of Neurotrauma*, v.25, p.1217-1225, 2008.
- BOROWICZ, K. K.; GASIOR, M.; KLEINROK, Z., et al. Influence of isradipine, nifedipine and dantrolene on the anticonvulsive action of conventional antiepileptics in mice. *European Journal of Pharmacology*, v.323, p. 45-51, 1997.
- BUDD, S. L.; LIPTON, S. A. Calcium tsunamis: do astrocytes transmit cell death messages via gap junctions during ischemia? *Nature Neuroscience*, v.1, p.431-432, 1998.
- BUTT, A. M.; Neurotransmitter-mediated calcium signaling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia*, v.54, p.666-675, 2006.
- CASELLA, G. T. B.; BUNGE, M. B.; WOOD, P. M. Improved immunocytochemical identification of neural, endothelial, and inflammatory cell types in paraffin-embedded injured adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience Methods*, v.139, p.1-11, 2004.
- CHAN, C. H. Dantrolene sodium and hepatic injury. *Neurology*, abstract, v.40, p.1427-1432, 1990.
- CHEN, X.; TANG, T.; TU, H., et al. Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *The journal of neuroscience*, v. 28, p.12713-12724, 2008.
- CHEN, B. K.; KNIGHT, A. M.; DE RUITER, G. C. W., et al. Axon regeneration through scaffold into distal spinal cord after transaction. *Journal of Neurotrauma*, v.26, p.1759-1771, 2009.
- COATES, J. R. Intervertebral disk disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.30, p.77-111, 2000.
- ÇOLAK, A.; KAYA, M.; KARAOĞLAN; A., et al. Calpain inhibitor AK 295 inhibits calpain-induced apoptoseis and improves neurologic function after traumatic spinal cord injury in rats. *Neurocirugía*, v.20, p.245-254, 2009.
- COLLOMBET, J-M.; MASQUELIEZ, C.; FOUR, E., et al. Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. *Neuroscience Letters*, v.398, p.337-342, 2006.
- COSENZA, R. M; *Fundamentos de neuroanatomia*, 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.123-139.
- DAS, G. D.; DAS. K. G.; BRASKO, J., et al. Spinal traumas: Some postoperative complications in experimental animals. *Brain Research Bulletin*, v.22, p.33-37, 1989.
- DE GROAT, W, C.; ARAKI, I.; VIZZARD, M. A., et al. Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway. *Behavioural Brain Research*, v.92, p.127-140, 1998.
- DÜZENLI, S.; BAKURIDZE, K.; GEPIREMEN, A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicology in vitro*, p.589-594, 2005.
- FAULKNER, J. R.; HERRMANN, J. E.; WOO, M. J.; Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, p.2143-2155, 2004.
- FAROOQUE, M.; Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta. Neuropathol.*, v.100, p.13-22, 2000.
- FEHLINGS, M. G.; TATOR, C. H.; 1995. The relationship among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Experimental Neurology*, v.132, 220-228, 1995.
- FLEWELLEN, E. H.; NELSON, T. E.; JONES, W. P., et al. Dantrolene dose response in awake man: implications for management of malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, v.59, p. 275-280, 1983.

- FORSSBERG, H.; GRILLNER, S.; SJOSTROM. Tactile placing reactions in chronic spinal kittens. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.92, p.114–120, 1974.
- FRUEN, B. R.; MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, 26965-26971, 1997.
- GALE, K., KERASIDIS, H., and WRATHALL, J.R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp. Neurol.* v.88, p.123–134, 1985.
- GARCÍA-ALÍAS, G.; BARKHUYSEN, S.; BUCKLE M., et al. Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nature neuroscience*, doi: 10.1038/nn.2377, p.1-8, 2009.
- GEMES, G.; RIGAUD, M.; WEYKER, P. D.; et al. Depletion of calcium stores in injured sensory neurons. *Anesthesiology*, v.111, p.393-405, 2009.
- GEPIREMEN, A.; HACIMÜFTÜOĞLU, A.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E, et al. Nitric oxide donor sodium nitroprusside induces neurotoxicity in cerebellar granular cell culture in rats by an independent mechanism from L-type or dantrolene-sensitive calcium channels. *Biol. Pharm. Bull*, v. 25(10) p.1295—1297, 2002.
- GIANNINI, G. C. A.; MAMMARELLA, S.; SCROBOGNA, M., et al. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *The Journal of Cell Biology*, v. 128, p.893-904, 1995.
- GILL, S. K.; ISHAK, M.; RYLETT, J. Exposure of nuclear antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded necropsy human spinal cord tissue: Detection of NeuN. *Journal of Neuroscience Methods*, v.148, p.26-35, 2005.
- GRUNER, J.A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma*, v.9, n.2, p.123-126, 1992.
- GWAK, M.; PARK, P.; KIM, K, et al. The effects of dantrolene on hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain. *Neurosurgical Anesthesiology*, v.106, p.227-233, 2008.
- HUERTA, S.; GOULET, E. J.; HERTAYEPEZ, S., et al. Research review, screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical Research*, v.139, p.143–156, 2007.
- HUANG, W.; WANG, H.; GALLIGAN, J. J., et al. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel mediated neuropeptide secretion and depressor effects: role of endoplasmic reticulum associated Ca²⁺ release receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Hypertension*, v.26, p.1966-1975, 2008.
- IBARRETXE, G.; SÁNCHEZ-GÓMES, M. V.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; et al. Differential Oxidative Stress in Oligodendrocytes a Neurons After Excitotoxic Insults and Protection by Natural Polyphenols. *GLIA*, v.53, p.201–211, 2006.
- ITO, M.; NATSUME, A.; TAKEUCHI, H., et al. Tipe I interferon inhibits astrocytic gliosis and promotes functional recovery after spinal cord injury by deactivation of the MEK/ERK pathway. *The Journal of Neurotrauma*, v. 26, p. 41-53, 2009.
- KIM, B. C.; KIM, H. T.; MAMURA, M., et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis in hepatoma cells by increasing Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum and suppressing Bcl-2 expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v.277, p.31381-31389, 2002.
- KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M. U.; FIEGE, M.; et al. Dantrolene – A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*, v.59, p.364-373, 2004.
- KUMAR, S. S.; BUCKMASTER, P. S. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. *Brain Research*, v. 1142, p.54-60, 2007.

- KUNKEL, B. E.; DAI, H. N.; BREGMAN, B. S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, v.119, 153–164, 1993.
- KWON, B. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The Spine Journal*, v.4, p.451-464, 2004.
- JONGEN-RÊLO, A. L.; FELDON, J. Specific neuronal protein: A new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions. *Physiology & Behavior*, v.76, p.449-456, 2002.
- LANE, I, F. Diagnosis and Management of urinary retention. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.30, p.25-57, 2000.
- LEE, J.; YAN, P.; XIAO, Q., et al. Methylprednisolone Protects Oligodendrocytes But Not Neurons after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, p. 3141-3149, 2008.
- LIETMAN, P. S.; HASLAM, R. H, WALCHER, J. R. Pharmacology of dantrolene sodium in children. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, v.55, p. 388-392, 1974.
- LIU, X. Z.; XU, X. M. HU, R.; et al. Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, v.17, p.5395-5406, 1997.
- LORENZ, M. D.; KORNEGAY, J. N. *Neurologia Veterinária*, 4ªed. São Paulo: Editora Manole, 2006, p.3-65.
- MADJO, G.; JORIS, I. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, v.146, p.3-15, 1995.
- MATTSON, M. P. Review, Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, v.6, p.337-350, 2007.
- MATUTE, C.; Interaction between glutamate signalling and immune attack in damaging oligodendrocytes. *Neuron Glia Biology*, v.3, p.281–285, 2007.
- MAUTES, A. E. M.; WEINZIERL, M. R.; DONOVAN, F., et al. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary patho Genesis. *Physical Therapy*, v.80, p.675-687, 2000.
- MAXIE, M. G. YOUSSEF, S. Pathology of domestic animals. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's, 5ed., Philadelphia: Saunders, 2007, p. 281-455.
- METZ, G. A. S.; MERKLER, D.; DIETZ, V., et al. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research* v.883, p.165–177, 2000.
- MEYER, F., et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, p.203-208, 2003.
- MITCHELL, C. S.; LEE, R. H. Pathology dynamics predict spinal cord injury therapeutic success. *Journal of Neurotrauma*, v.25, p.1483-1497, 2008.
- MOWBRAY, M.; SINCLAIR, S. A.; ALLAN S. J. *Clinical and Experimental Dermatology*, v.34, p.240-266, 2008.
- MUEHLSCHLEGEL, S.; RORDORF, G.; BODOCK, M; SIMS J. R. Dantrolene mediates vasorelaxation in cerebral vasoconstriction: a case series. *Neurocritical care*, v.10, p.116-121, 2009.
- MUEHLSCHLEGEL, S.; SIMS, J. R. Dantrolene: mechanisms of neuroprotection and possible clinical applications in the neurointensive care unit. *Neurocrit. care*, v.10, p.103-115, 2009.
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, v.116, p.201-211, 1992.
- NIEBAUER, M.; GRUENTHAL, M. Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental status epilepticus. *Neuropharmacology*, v. 38, p.1343-1348, 1999.

- NOBLE, L. J.; DONOVAN, F.; IGARASHI, T.; et al. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *The Journal of Neuroscience*, v.22, p.7526–7535, 2002.
- OGAWA, Y.; KUREBAYASHI, N.; MURAYAMA, T. Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR3). *TCM*, v.10, p.65-70, 2000.
- PEREIRA, F. E. L. *Bogliolo Patologia Geral*, 7ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006., p.21-64.
- POPESCU, B. O.; OPRICA, M.; SAJIN M., et al. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *J.Cell.Mol.Med.*, v.6, p.555-569, 2002.
- PORTIANSKY, E. L.; BARBEITO, C. G.; GIMENO, E. J., et al. Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging. *Experimental Neurology*, v.202, p.519-521, 2006.
- PROTASI, F. Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Frontiers in Bioscience*, v.7; p.650–658, 2002.
- RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J. Neurosurgery*, v.47, p. 577-581, 1977.
- ROY, S. S.; HAJNÓCZKY, G. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods*, doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.024, 2008.
- SALOMONE, S.; SOYDAN, G.; MOSKOWITZ, M. A., et al. Inhibition of cerebral vasoconstriction by dantrolene and nimodipine. *Neurocritical care*, v.10, p.93-102, 2009.
- ŠEDÝ, J.; URDŽÍKOVÁ, L.; JENDELOVÁ, P., et al. Review methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.32, p.550-580, 2008.
- ŞENTÜRK, M.; GÜLÇİN, I.; ÇİFTCI, M., et al. Dantrolene inhibits human erythrocyte glutathione reductase. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, p.2036-2039, 2008.
- SILVA, C. M. O; MELO, E. G.; ALMEIDA, A.E.R.F.; GOMES, M.G.; SILVA, et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.641-650, 2008.
- SILVERI, M.; SALSANO, L.; PIERRO, M. M., et al. Pediatric spinal cord injury: Approach for urological rehabilitation and treatment. *Journal of Pediatric Urology*, v.2, p.10-15, 2006.
- SIMON, C. M.; SHARIF, S.; TAN, R. P., et al. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *Journal of Neurotrauma*, v.26, p.563-574, 2009.
- SPARREY, C. J. MANLEY, G. T.; KEAVENY, T. M. Effects os white, grey, and pia mater properties on tissue level stresses and strains in the compressed spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, v.26, p. 585-595, 2009.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS J. F.; LAHUNTA, A. de. *Veterinary Neuropathology: Principles of Neuropathology*. St. Louis, Missouri: Mosby-year Book, 1994, chap. 1, chap.4, p.1-54, p.202-204.
- SUN, H-S, FRENCHB, R. J.; FENG, Z-P. A method for identifying viable and damaged neurons in adult mouse brain slices. *Acta histochemica*, v.111, p.531—537, 2009.
- SUTKO, J. L.; AIREY, J. A. Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiological Reviews* v.76, p.1027-1071, 1996.
- TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, v.72, p.111-127, 2004.
- THORELL, W. E.; LEIBROCK, L. G.; AGRAWAL, S. K. Role of RyRs and IP3 Receptors after Traumatic Injury to Spinal Cord White Matter. *Journal of Neurotrauma*, v.19, p.335-342, 2002.

TORRES, B.B.J. *Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular agudo experimental*: 2008. 84p. Mestrado em Ciência Animal Dissertação de conclusão de curso de da Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

TORRES, B.B.J.; SILVA, C.M.O.; ALMEIDA, A.E.R.F., et al. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.6, 2010.

VON EULER, V. M.; AKESSON E.; SAMUELSSON E., et al. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, v.137, p.242-254, 1996.

WEI, H.; LEEDS, P.; CHEN, R.; et al. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *The journal of Neurochemistry*, v.75, p.81-90, 2000.

WRATHALL, J. R.; CHOINIERE, D.; TENG, Y. D. Dose-dependent reduction of tissue loss and functional impairment after spinal cord trauma with the AMPA/Kainate antagonist NBQX. *The Journal of Neuroscience*, p.6598-6607, 1994.

WUERMSER, L.; HO, C. H.; CHIODO, A. E., et al. Spinal Cord Injury Medicine. 2.Acute Care Mangement of Traumatid and Nontraumatic Injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v.88, p.S55-S61, 2007.

YAMAGISHI, F.; KOMODA, T.; OHNISHI, K.; et al. Protective effect of dantrolene sodium on carbon tetrachloride induced liver injury in the rat. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, v.82, p.237-240, 1993.

ZHAO, F.; LI, P.; CHEN S. R., et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.13810-13816, 2001.

9 – ANEXO