

Carla Maria Osório Silva

**EFEITO DA PREDNISONA EM LESÃO MEDULAR AGUDA
EXPERIMENTAL EM RATOS (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Medicina Veterinária.
Área: Medicina e Cirurgia
Orientadora: Prof^a Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2006

S586e Silva, Carla Maria Osório, 1977-
Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos (*Rattus norvegicus*)/
Carla Maria Osório Silva. – 2006.
46 p. : il.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Cirurgia veterinária – Técnica – Teses.
3. Medicamentos – Administração – Teses. 4. Medula espinhal – Teses. I. Melo, Eliane
Gonçalves de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD - 636.089 7

Dissertação defendida e aprovada em 10 de março de 2006, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof.^a Dra Eliane Gonçalves de Melo
Presidente

Prof. Dr. Renato Cesar Sacchetto Tôres

Prof. Dr. Vitor Márcio Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha família por tudo!

À professora Eliane Gonçalves de Melo pelos valiosos ensinamentos curriculares e extracurriculares, pela amizade, apoio, atenção e paciência.

Ao professor Álvaro Enéas Falcão pelas idéias criativas e pelo desenvolvimento de vários aparatos essenciais para a realização desse trabalho.

Ao professor da Universidade Federal de Viçosa Carlos Henrique Osório Silva pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Mel pela amizade, disponibilidade e colaboração fundamentais.

À Juliana, Sílvia, Nayche, Guilherme, Durval, Paulo, Marina, Michelle, Thalita e Marilene pela grandiosa ajuda.

À Profª Milene Alvarenga Rachid pela orientação na histopatologia e participação na banca de defesa.

Aos professores Renato César Sacchetto Torres e Vitor Márcio Ribeiro, que compuseram a banca de defesa contribuindo para finalização desse trabalho.

À Professora Rogéria Serakides por disponibilizar o biotério e pela colaboração.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário especialmente ao Carlos e ao Messias.

Às secretárias Nilda, Lourdes e Rosângela.

Ao pessoal da limpeza, particularmente à Valdirene por manter o biotério sempre agradável.

Aos porteiros do DCCV, sobretudo aos noturnos pela cooperação.

Aos meus amigos de república e/ou do coração Otto, Sílvia, Lê, Róger, Theo, Patrícia, Flor, Líllian, Mari, Paula, Jú e Lili pela amizade e apoio emocional.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

Aos meus pais José Carlos e Sônia Dalva

SUMÁRIO

	RESUMO	11
	ABSTRACT	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.	Patogênese do trauma medular agudo	14
2.2.	Principais eventos e mediadores do trauma medular agudo	16
2.2.1.	Efeitos da isquemia	16
2.2.2.	O papel do cálcio e do glutamato	17
2.2.3.	Os radicais livres e a peroxidação de lipídios	19
2.2.4	A apoptose	20
2.3.	Alterações clínicas e perspectivas em relação às lesões medulares agudas	20
2.4.	Os corticóides e as lesões medulares	22
2.5.	Estudo experimental das lesões medulares	24
3.	ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL	24
3.1.	Material e método	24
3.2	Resultados e discussão	27
3.3	Conclusão	28
4.	ETAPA 2 - ESTUDO DO EFEITO DA PREDNISONA EM DOSE ALTA, ADMINISTRADA EM DIFERENTES TEMPOS, APÓS O TRAUMA MEDULAR AGUDO	28
4.1.	Material e método	28
4.1.1.	Análise estatística	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÕES	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo dos resultados do teste de K-W aplicado em cada dia de avaliação, com os p-valores máximos e mínimos para cada uma das variáveis, e indicação do dia da observação entre parêntese.....	34
Tabela 2 -	Modelos de regressão ajustados para capacidade motora (CM), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 91,93\%$, p-valor $< 0,0001$ para o teste F do modelo completo com 9 e 50 graus de liberdade, $F = 63,31$	35
Tabela 3 -	Modelos de regressão ajustados para posicionamento proprioceptivo (PP), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 93,55\%$, p-valor $< 0,0001$ para o teste F do modelo completo com 14 e 45 graus de liberdade, $F = 46,66$	36
Tabela 4 -	Modelos de regressão ajustados para reflexo de localização (LC), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 85,09\%$, p-valor $< 0,0001$ para o teste F do modelo completo com 9 e 50 graus de liberdade, $F = 31,70$	37
Tabela 5 -	Modelos de regressão ajustados para plano inclinado (PI), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 70,19\%$, p-valor $< 0,0001$ para o teste F do modelo completo com 9 e 50 graus de liberdade, $F = 13,08$	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A) Fotografia do aparelho estereotáxico com haste compressiva (seta) e mesa de apoio do animal (asterisco). Fotografias B, C, D e E demonstram animal em procedimento cirúrgico de trauma medular experimental. B) Foco cirúrgico com identificação dos processos espinhosos; C) Visualização da medula espinhal com aspecto normal; D) Procedimento de lesão da medula com peso de 50g; E) Visualização da medula com hemorragia após o trauma.....	25
Figura 2 -	A, B, C, D e E fotografias de animais sendo submetidos à avaliação neurológica A) Sensibilidade dolorosa; B) Caminhar na barra de madeira para determinação da capacidade motora, observe que o animal não está utilizando o membro posterior esquerdo; C) Avaliação do posicionamento proprioceptivo em animal com déficit; D) Reflexo de localização; E) Teste do plano inclinado.....	31
Figura 3 -	Se for adotado 10% como nível de significância, o grupo E teria uma resposta aproximada significativamente diferente do controle. Note que no gráfico os grupos A, B, C e D estão fundidos em uma mesma linha enquanto o grupo E se destaca dos demais, nesse grupo os escores iniciais são inferiores e os finais superiores.....	36
Figura 4 -	Pelo gráfico observa-se que os grupos A, C e E apresentaram modelos ajustados idênticos e estão representados por uma única linha. O modelo ajustado para o grupo B apresentou somente uma constante diferente do controle, já o grupo D apresentou uma resposta estatisticamente diferente do controle.....	37
Figura 5 -	Pelo gráfico verifica-se que os grupos B e D apresentaram uma resposta média igual ao controle (A), sendo os três representados pela mesma linha. A resposta do grupo E diferiu apenas por uma constante, porém com igual incremento linear (retas paralelas), já o grupo C apresentou uma resposta estatisticamente diferente. Observe que o grupo C no início tem os menores escores e termina com os escores superiores.....	38

Figura 6 -	Visualiza-se pelo gráfico que o grupo B diferiu dos demais grupos, representados por uma única linha, apenas por uma constante, ele iniciou e terminou com escores mais altos, mas com incremento linear igual ao dos outros grupos (retas paralelas).....	39
Figura 7 -	Fotomicrografias de raízes nervosas ventrais em cortes transversais corados por H-E, 100x. Degenerações axonais A)Discreta a B)acentuada. C, D e E - Fotomicrografias de medulas espinhais em cortes longitudinais (C e E) e transversal (D) corados por H-E, 100x. C) Células de Gitter em foco necrótico. D) Microgliócitos reativos, células inflamatórias mononucleares e vasos sanguíneos neoformados em cavitação. E) Degeneração intensa do neurópilo.....	41

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Protocolo de avaliação neurológica com os respectivos escores para: sensibilidade dolorosa, capacidade motora, posicionamento proprioceptivo, reflexo de localização e plano inclinado. Quanto maior o escore atingido mais próximo da normalidade o animal se encontra.....	29
------------	--	----

RESUMO

Objetivou-se desenvolver um modelo de trauma medular agudo e moderado, para avaliar o efeito da prednisona em diferentes tempos após esse trauma. Primeiramente foram utilizados 10 *Rattus norvegicus* submetidos à compressão medular empregando-se um aparelho estereotáxico com diferentes pesos e tempos e padronizou-se a utilização de 50,5g por cinco minutos. Posteriormente, utilizou-se 25 ratos submetidos ao trauma proposto e divididos em cinco grupos de cinco. O grupo A recebeu placebo oito horas após o trauma; os grupos B, C, D e E receberam prednisona oito, 24, 48 e 120 horas após o trauma, respectivamente. A prednisona foi administrada na dose de 2mg/Kg, durante cinco dias com diminuição progressiva até o 26º dia. Os animais foram avaliados conforme a capacidade motora; posicionamento proprioceptivo; reflexo de localização; plano inclinado e sensibilidade dolorosa. Após 33 dias da cirurgia os animais foram sacrificados e, realizou-se a histopatologia das medulas espinhais onde constatou-se degeneração das raízes nervosas, necrose medular e reação glial, sem diferenças entre os grupos. Verificou-se falta de correlação entre os testes indicando que não houve um grupo superior. A utilização da prednisona na lesão medular não teve efeito diferenciado com o tempo e a administração tardia não foi prejudicial à recuperação neurológica.

Palavras-chave: prednisona, modelo experimental, lesão medular, ratos

ABSTRACT

We develop a model to evaluate the effects of prednisone when applied at different time intervals after moderate and acute spinal cord injury. A pilot study using 10 *Rattus norvegicus* allowed us to define a spinal cord injury protocol as 50.5g applied during five minutes with estereotoxic equipment. Later 25 rats were submitted to this protocol and randomly divided into five treatment groups: one group received placebo 8 hours after injury and the remaining four groups received prednisone eight, 24, 48 and 120 hours after injury. Prednisone was applied at 2 mg/Kg dosage during five days and progressively reduced until the 26th day. Animals were evaluated by motor capacity, proprioceptive positioning, searching ness reflex, inclined plan and sensibility to pain. Each rat was sacrificed 33 days after surgery for histopathology of the spinal cords that revealed degeneration of the rootlets, spinal cord necrosis and reactive gliosis, with no significant differences among treatment groups. Results for the various tests did not seem to be consistent and hence we could not conclude which treatment group was the best. Late administration of high dosages of prednisone to animals with acute spinal cord injury had no deleterious effects on neurological recovery.

Key Words: Prednisone; experimental models, spinal cord injury, rats.

1. INTRODUÇÃO

A lesão à medula espinhal geralmente tem resultados devastadores com déficits neurológicos graves e de longa duração (Tator e Fehlings, 1991; Delamarter et al., 1995; Araújo, 2005). Além de ser um dos problemas neurológicos mais comuns na prática veterinária, também é muito instigante (Braund et al., 1990b). Uma terapia efetiva para tratar a medula espinhal lesada é uma das maiores indagações que desafiam médicos veterinários e humanos (Hoerlein et al., 1983).

Os danos à medula espinhal variam consideravelmente dependendo da gravidade, velocidade e duração da injúria. Um trauma agudo resulta em déficits neurológicos causados pela interrupção direta das vias neuronais, e por alterações subseqüentes que ocorrem por um período de horas até dias após a lesão primária. Esses traumas geralmente causam hemorragia, edema e isquemia, afetando principalmente a substância cinzenta. Na maioria das vezes, a agressão primária não é suficiente para causar dano permanente, mas desencadeia uma série de eventos secundários progressivos que agravam essas primeiras lesões. Mecanismos vasculares, bioquímicos e eletrolíticos são responsáveis por esses eventos pós-traumáticos, e coletivamente resultam em redução do fluxo sanguíneo espinhal, isquemia e eventual necrose (Rivlin e Tator, 1979; Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990b; Shores, 1992; Summers et al., 1995; Kraus, 1996; Li et al., 1996; Tator e Koyanagi, 1997; Taoka e Okajima, 1998; Bagley et al., 1999; Jeffery e Blakemore, 1999b; Bagley, 2000; Bergman et al., 2000a; Lu et al., 2000; Mallei et al., 2005).

Embora não se tenha o controle sobre o trauma inicial à medula espinhal, o tratamento clínico e/ou cirúrgico pode influenciar a sobrevivência neuronal pela interrupção dos eventos subseqüentes ao trauma. O tempo para se iniciar o tratamento é fundamental na determinação do prognóstico (Rucker et al., 1981; Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a; Coughlan, 1993; Kraus, 1996; Meintjes et al., 1996; Bagley et al., 1999; Bagley, 2000; Bergman et al., 2000b; Carlson et al., 2000). Exames patofisiológicos do trauma agudo da medula espinhal mostram que a progressão dos danos teciduais já se encontra quase concluída em 24

horas, então se preconiza que o tratamento para ser efetivo deve ser instituído dentro desse prazo (Janssens, 1991).

Devido à natureza debilitante das lesões de medula e à falta de tratamento efetivo, inúmeras pesquisas têm sido feitas para investigar o mecanismo patofisiológico e uma possível interrupção das suas seqüelas (Brown e Hall, 1992). O trauma medular experimental é estudado com o propósito de se entender melhor a patologia buscando alternativas terapêuticas mais eficientes para tratá-la (Janssens, 1991).

Apesar do grande avanço nas pesquisas neurocientíficas espinhais, poucos instrumentos estão disponíveis e acessíveis para a simulação experimental da lesão medular. Essa pouca disponibilidade de equipamentos e metodologias se deve principalmente a altos custos, incapacidade dos instrumentos de se adaptar aos vários tamanhos de animais e aos diferentes segmentos medulares, falhas no ajuste do alinhamento espinhal para manipulações cirúrgicas, e complicado manuseio pré-cirúrgico (Cunningham et al., 2005). Obter um modelo animal reprodutível é crítico e fundamental para o desenvolvimento de terapias experimentais em pesquisas laboratoriais (Dohrmann, 1972; Roussos et al., 2005).

Os corticóides são as principais drogas utilizadas por veterinários para tratar o trauma medular, apesar de sua eficácia ser bastante questionada (Bracken et al., 1984; Von Euler et al., 1996). Evidências sugerem que seu efeito se deve principalmente a capacidade de inibir a peroxidação de lipídios pelos radicais livres, quando empregados logo após a injúria em altas dosagens (Tator e Fehlings, 1991; Brown e Hall, 1992; Meintjes et al., 1996; Von Euler et al., 1996; Gerndt et al., 1997), e de aumentar o fluxo sanguíneo espinhal e a perfusão dos microvasos melhorando clinicamente a recuperação neurológica (Young e Flamm, 1982; Tator e Fehlings, 1991).

A prednisona é um corticóide comumente utilizado no tratamento de cães com lesão de medula espinhal no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. E, contradizendo muitos estudos publicados que desencorajam o uso de

corticóides tardiamente ao trauma de medula espinhal, este medicamento tem demonstrado bons resultados clínicos mesmo quando instituído muitas horas após a injúria.

O objetivo desse estudo foi desenvolver um modelo experimental de trauma medular compressivo agudo; simples, econômico, eficaz, reproduzível e capaz de provocar lesões de várias intensidades. Objetivou também avaliar o efeito do tratamento com a prednisona administrada em dosagem alta em diferentes tempos após o trauma de medula espinhal produzido experimentalmente em ratos, através de estudos clínico e histopatológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O trauma espinhal é uma afecção neurológica freqüentemente encontradas na prática veterinária de pequenos animais (Faden et al., 1984; Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990b; Tator e Fehlings, 1991; Meintjes et al., 1996; Bergman et al., 2000a). O dano neurológico que causa pode comprometer permanentemente a qualidade de vida do animal, e muitas vezes determina sua morte ou sacrifício (Colter e Rucker, 1988).

As lesões ao sistema nervoso central podem ser causadas por fatores extrínsecos e/ou intrínsecos. O trauma à coluna espinhal é uma causa comum de disfunção da medula e, quando extrínseco comumente causa fratura ou luxação vertebral (Bagley et al., 1999; Bagley, 2000; Bagley et al., 2000). Os fatores extrínsecos incluem atropelamentos, quedas, chutes e pisoteios, mordidas e armas de fogo. As causas intrínsecas compreendem protrusão do disco intervertebral, malformação vertebral, fraturas patológicas devido a osteopenia, osteomielite, e massas compressivas extramedulares como abscessos e neoplasias (Hoerlein, 1971; Colter e Rucker, 1988; Shores et al. 1990; Summers et al., 1995). Um animal pode indiretamente ferir sua medula espinhal correndo, pulando ou fazendo algum outro movimento que produza hiperextensão, hiperflexão ou torção anormal da coluna. O trauma pode resultar em lesão apenas na medula espinhal, na coluna ou em ambas (Hoerlein, 1971; Shores et al. 1990; Shores, 1992).

A compressão medular pode ocorrer facilmente em cães, porque nessa espécie o canal vertebral é relativamente pequeno comparado com o diâmetro da medula (Bergman et al., 2000a), especialmente na região toracolombar (Hoerlein, 1971). Os traumas torácicos tendem a causar lesões medulares mais graves do que os cervicais (Bergman et al., 2000a), porque na porção cervical o canal medular é um pouco maior em relação à medula, o que determina uma maior tolerância à compressão (Braund et al., 1990a). A parte torácica é a região mais estável da coluna vertebral de um cão, sendo a junção toracolombar a região de maior ocorrência de fraturas e luxações (Braund et al., 1990b; Summers et al., 1995).

As afecções agudas e crônicas da medula espinhal são síndromes clinicopatológicas distintas (Kraus, 1996; Kornegay, 1998). Existe uma grande diferença nos sintomas, grau de lesão e tempo de recuperação entre as injúrias agudas e aquelas causadas por compressão lenta, por isso o tipo de trauma é um fator importante na avaliação do dano (Scharamm et al, 1979, Carlson et al., 2000). Uma compressão gradual lenta tende a ter um prognóstico melhor do que uma compressão aguda (Braund et al., 1990a; Summers et al., 1995; Araújo, 2005).

Nas compressões crônicas, devido à rigidez das vértebras, a medula tende a distribuir o aumento da pressão por toda a sua extensão e não apenas nos segmentos adjacentes. Esse aumento da pressão pode determinar uma disfunção e, geralmente, o fluxo sanguíneo e o nível de oxigênio se mantêm (Kraus, 1996). Esse tipo de trauma comumente não produz hemorragia aguda e nem necrose, e preserva mais a função da medula. Clinicamente é caracterizado por déficit neurológico lentamente progressivo, diminuição da propriocepção e parestesia espástica, algumas vezes intercalados por períodos de normalidade. A substância branca é a principal estrutura afetada com desmielinização e perda dos axônios (Summers et al., 1995; Kraus, 1996).

A recuperação neurológica após uma compressão crônica é proporcional à sua duração. A descompressão breve propicia melhores chances de recuperação, enquanto que sua realização após seis horas diminui essa possibilidade. Ocorre uma associação entre o

tempo de compressão e a extensão dos danos (Delamarter et al., 1995; Carlson et al., 2000). Dependendo do grau e duração da compressão, a lesão pode se tornar permanente (Summers et al., 1995; Kraus, 1996).

O trauma compressivo está associado com morte de neurônios, células da glia e células dos microvasos. A compressão induz uma mudança retardada, indicando apoptose de células da glia, principalmente oligodendrócitos. A morte de neurônios e oligodendrócitos após o trauma interfere com a condutibilidade e induz degeneração da mielina. Essa perda tardia dos oligodendrócitos irá reduzir a possibilidade de remielinização após uma lesão axonal e promover a degeneração da mielina após a compressão. Existe a hipótese axonal que após a lesão da medula os axônios lesados falhariam em produzir estímulo para sobrevivência dos oligodendrócitos, ou seja, os oligodendrócitos dependeriam dos axônios intactos (Li et al., 1996).

No trauma medular agudo a lesão direta ou primária ocorre no momento da injúria por ação mecânica de compressão, distração, concussão e/ou laceração no tecido nervoso e vascular. Esse dano inicial desencadeia uma série de acontecimentos, os eventos secundários, causados por interrupção na perfusão vascular normal, mudanças eletrolíticas, e por uma cascata de mediadores da degeneração tecidual: produtos dos leucócitos, prostaglandinas, leucotrienos, radicais livres e excitotoxinas (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a; Tator e Fehlings, 1991; Shores, 1992; Coughlan, 1993; Summers et al., 1995; Kornegay, 1998; Bagley, 2000; Lu et al., 2000; Araújo, 2005; Lee et al., 2005). Essas mudanças patofisiológicas progressivas resultam em lesão de mais tecido neuronal e de suporte, muitas vezes tornando o dano à medula irreversível (Panjabi e Wrathall, 1988). Essas alterações geralmente não ocorrem nas compressões lentas (Braund et al., 1990a).

As lesões agudas são freqüentemente acompanhadas por hemorragia, reação inflamatória e edema, que começam na substância cinzenta, e em algumas horas se expandem envolvendo a substância branca e os segmentos medulares adjacentes (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a). A

substância cinzenta, a qual contém os corpos neuronais, é mais sensível ao trauma agudo e à isquemia do que a branca (Summers et al., 1995).

Apesar de intensamente estudado, o completo mecanismo que sucede a lesão primária no trauma medular agudo ainda não foi totalmente elucidado (Faden et al., 1984; Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990b; Tator e Fehlings, 1991; Meintjes et al., 1996; Bergman et al., 2000a).

2.1. Patogênese do trauma medular agudo

A gravidade da lesão e a intensidade das alterações histológicas variam diretamente com a força do impacto, portanto, a patogênese do trauma medular agudo depende da força da injúria inicial (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a; Shores, 1992; Coughlan, 1993; Kornegay, 1998; Bergman et al., 2000b).

Em impactos moderados ocorrem lacerações microvasculares com hemorragia e edema na substância cinzenta após cerca de 15 minutos; seguida de degeneração neuronal, edema e tumefação axonal focal na branca. Em impactos fortes as lesões são mais graves e mais amplamente distribuídas, geralmente após cinco ou seis dias do impacto resulta na formação de uma cavidade central na medula em que apenas a borda periférica da substância branca é preservada (Tator e Fehlings, 1991; Kornegay, 1998). Dependendo da gravidade da lesão, a necrose pode se estender cranial e caudalmente, tipicamente na base do funículo dorsal. A cromatólise dos neurônios do corno ventral ocorre em resposta às injúrias no segmento proximal de seus axônios, é a chamada reação axonal. Enquanto nos traumas moderados a medula apresenta cavitações císticas centrais, em alguns casos mais graves toda a medula se torna necrótica, sofre liquefação e se torna pastosa, sendo mantida no lugar apenas pelas meninges (Summers et al., 1995).

Parece haver três mecanismos principais de lesão ao tecido nervoso. O primeiro é a compressão não isquêmica ao tecido neural. Dependendo do trauma inicial este tipo de compressão pode causar uma resposta axonal aguda ou crônica com bloqueio da

condutibilidade do axônio e interrupção ao fluxo normal de nutrientes, causando quebra dos elementos nucleares e desorganização da mielina. A resposta aguda é mais difícil de ser revertida pela descompressão. Já a resposta axonal crônica pode ser parcialmente revertida se a descompressão ocorrer antes do desenvolvimento de mudanças graves no tecido neuronal (Delamarter et al., 1995). Alguns axônios se tornam necróticos e ocorre fragmentação axonal devido à injúria (Janssens, 1991).

O segundo mecanismo de lesão é a isquemia, particularmente após contusão com danos aos vasos sanguíneos (Delamarter et al., 1995). Ocorre um aumento nas catecolaminas, provavelmente devido à deposição vascular no local da hemorragia. A concentração intracelular de cálcio aumenta, e depósitos de cálcio no axoplasma formam cristais de hidroxiapatita. A medula espinhal perde a autorregulação do fluxo sanguíneo. Os principais aspectos observados são necrose hemorrágica na substância cinzenta e degeneração axonal na branca. O edema na medula se estende dos segmentos lesados aos adjacentes. Ocorre infiltração de albumina nos neurônios a ponto de romper a membrana neuronal e desfazer a barreira hemato-encefálica. A pressão de oxigênio diminui juntamente com um grande aumento na concentração de lactato (Janssens, 1991).

O terceiro mecanismo é a resposta imune. Infiltrado inflamatório constituído por polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos produzem uma reação auto-imune no local da lesão que inibe a regeneração axonal (Delamarter et al., 1995). Astrócitos reativos podem conter imunoglobulinas, aparentemente seqüestradas após a interrupção da barreira hemato-encefálica. Ocorre quimiotaxia de leucócitos, principalmente neutrófilos, em três a seis horas após a lesão. Em três dias, os macrófagos derivados dos monócitos sanguíneos são evidentes, e diminuem por volta do quinto dia (Summers et al., 1995). A fagocitose que se inicia poucos dias após a lesão resulta na formação de cavitações (Janssens, 1991).

Um dos principais eventos patofisiológicos que ocorrem no trauma medular agudo é a ruptura

das membranas celulares e dos microvasos. A ruptura dos microvasos leva a formação de radicais livres, agregação trombocítica e obstrução de vasos. A oxigenação celular fica comprometida e eventualmente ocorre morte celular, especialmente na substância cinzenta. A ruptura da membrana celular é guiada pelo influxo de cálcio, liberação de glutamato e ativação da cascata de ácido aracdônico. Essa cascata resulta na produção de tromboxanos, prostaglandinas e prostaciclina, que atuam na agregação trombocítica, liberação de serotonina, vasoconstrição e edema levando a anóxia e morte celular (Colter e Rucker, 1988; Janssens, 1991).

Os eventos patológicos desencadeados pelo trauma inicial culminam com necrose hemorrágica da substância cinzenta e intensa degeneração axonal na substância branca após 24 horas (Braund et al., 1990b), quando então começa o processo regenerativo (Colter e Rucker, 1988; Janssens, 1991). A morte celular pode ser evidenciada na medula cinzenta em quatro horas e a área de necrose vai se expandindo progressivamente por 48 horas (Jeffery e Blackmore, 1999a) ou alguns dias (Summers et al., 1995).

A lesão resultante de diferentes tipos de trauma medular agudo é freqüentemente similar, com cavitação da substância cinzenta e acometimento variável do tecido periférico. A extensão em que ocorre morte celular de neurônios ou células da glia durante os eventos secundários é responsável pela formação das cavitações. Essas células morrem por dois processos distintos: necrose e apoptose (Lu et al., 2000). Os eventos secundários levam a expansão da lesão primária, inicialmente por necrose das células adjacentes que é quase imediato, e depois por um processo de morte mais tardio, que é caracterizado por apoptose neuronal, e ainda mais tarde por ativação microglial e apoptose de oligodendrócitos (Beattie, 2004).

Uma semana após o trauma quase todas as células na área necrótica contêm lisossomos e desenvolvem vacúolos ficando com aspecto espumoso (células de Gitter). A remielinização se inicia após uma semana e se conclui em quatro. O edema persiste por cerca de quatro semanas (Janssens, 1991).

2.2. Principais eventos e mediadores do trauma medular agudo

Três processos inter-relacionados são fundamentais nos eventos secundários: a isquemia, o aumento de cálcio intraneuronal e a peroxidação de lipídios induzida por radicais livres (Coughlan, 1993). A apoptose também é um componente essencial dos eventos secundários. Ela ocorre em neurônios e oligodendrócitos poucas horas após o trauma inicial podendo persistir por vários meses, sendo responsável por perda celular tardia (Mallei et al., 2005).

2.2.1. Efeitos da isquemia

A isquemia progressiva pós-traumática desempenha importante papel na patogênese do trauma medular agudo (Hedeman e Sil, 1974; Kornegay, 1998). Sua intensidade está diretamente relacionada com a gravidade e a progressão das injúrias (Hoerlein et al., 1985; Braund et al., 1990b; Tator e Fehlings, 1991; Jeffery e Blackmore, 1999a; Carlson et al., 2000).

Os traumas agudos na medula espinhal causam alterações locais e sistêmicas na vascularização, como lesões diretas aos pequenos vasos e perda da auto-regulação, e também mudanças circulatórias sistêmicas como hipotensão, diminuição do débito cardíaco (Tator e Fehlings, 1991; Summers et al., 1995; Taoka e Okajima, 1998) e diminuição da perfusão tecidual (Hoerlein et al., 1983). As lesões vasculares têm um papel crucial nos danos primários e secundários (Tator e Koyanagi, 1997). Além disso, a diminuição do fluxo sanguíneo medular facilita a liberação de ferro e contribui para formação de radicais livres e peroxidação de lipídios que agravam ainda mais a lesão (Carlson et al., 2000).

Dois mecanismos principais foram propostos para explicar a redução do fluxo sanguíneo na medula espinhal após a lesão aguda: vascular e neurovascular. A teoria vascular atribui a isquemia aos efeitos diretos do traumatismo na parede dos vasos, causando vasoespasmos, lacerações vasculares, tumefação das células endoteliais e trombos. Entretanto, alguns pesquisadores acreditam que o fator mais

importante responsável pela isquemia é o vasoespasmo causado por agentes vasoativos, como a norepinefrina e seu precursor a dopamina, a serotonina derivada das plaquetas, as endorfinas, as prostaglandinas, os radicais de oxigênio e o cálcio. Além disso, tem-se estudado o papel relativo da acidose láctica, radicais de oxigênio e neurotransmissores excitatórios na isquemia cerebral e medula (Kornegay, 1998).

Em seguida à injúria ocorre uma perda de autorregulação no segmento lesado e a perfusão na medula espinhal relaciona-se diretamente com a pressão arterial central. Ocorre também um período de hipotensão sistêmica que pode persistir por várias horas. A combinação desses fatores contribui para uma queda no fluxo sanguíneo espinhal (Tator e Fehlings, 1991; Coughlan, 1993). O fluxo sanguíneo diminuído desencadeia uma cascata de eventos que determinam a morte neuronal e perda das funções sensorial e motora (Meintjes et al., 1996).

As alterações patológicas que caracterizam essa cascata são: hemorragias, extravasamento de plasma, edema intracelular, necrose com formação de cavitações, gliose e perda da arquitetura histológica (Hedeman e Sil, 1974; Hoerlein et al., 1983). Essas mudanças têm sido atribuídas à liberação de serotonina, prostaglandinas, tromboxanos e histamina, que contribuem para o agravamento da isquemia e causam trombose pela agregação plaquetária ou de fibrina, obstrução e ruptura de pequenos vasos devido à proliferação endotelial e vasoespasmos (Hoerlein et al., 1983; Janssens, 1991; Coughlan, 1993). Opióides endógenos também atuam na microcirculação diminuindo o fluxo sanguíneo à medula (Hoerlein et al., 1983; Braund et al., 1990b; Shores, 1992).

Ocorre um aumento dessas substâncias vasoconstritivas no segmento medular lesado e no fluido cérebro-espinhal circundante (Coughlan, 1993). Dependendo da gravidade do trauma, neurônios são danificados e se tornam necróticos, as sinapses são desfeitas e atrofiadas e o transporte axoplasmático fica diminuído ou ausente na maioria dos axônios (Janssens, 1991).

Um possível mecanismo envolvido na progressão da destruição celular envolve edema vasogênico com conseqüente diminuição do fluxo sanguíneo espinhal (Meintjes et al., 1996). O edema vasogênico é componente importante do processo de necrose hemorrágica central. A exsudação de líquidos ocorre primeiramente devido às lacerações vasculares decorrentes do traumatismo, e continua devido à perda da continuidade vascular subseqüente aos efeitos necrosantes da isquemia. Esse líquido se concentra primeiro na substância cinzenta, mas gradualmente vai envolvendo a substância branca. O edema aumenta a pressão intraluminal causando compressão de estruturas vasculares e nervosas (Kornegay, 1998).

O fluxo sanguíneo da medula espinhal fica reduzido por até 24 horas após uma lesão aguda. Essa redução do fluxo é maior na região central da medula, substância cinzenta, correlacionando com a seqüência de alterações histopatológicas observadas após isquemia e lesão experimental (Kornegay, 1998). Dessa forma, a principal mudança que ocorre no segmento medular lesado está centrada na substância cinzenta com envolvimento progressivo da branca (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990b; Tator e Fehlings, 1991; Shores, 1992; Coughlan, 1993; Summers et al., 1995; Kornegay, 1998). Uma das primeiras alterações microscópicas é a formação de pequenos focos hemorrágicos na substância cinzenta que mais tarde evoluem para necrose hemorrágica (Tator e Koyanagi, 1997). Ocorre dano perceptível da substância branca apenas depois de isquemia prolongada ou impacto extremo (Kornegay, 1998), e seu fluxo sanguíneo pode se manter inalterado ou até mesmo aumentar em traumas de pouca gravidade (Coughlan, 1993). As mudanças desta substância começam com o alargamento do espaço entre os axônios, seguida de desmielinização (Braund et al., 1990b).

A predominância de hemorragias na substância cinzenta pode ser explicada pela sua rica rede de capilares altamente susceptível ao trauma mecânico devido à textura frouxa, o que também facilita a entrada de fluidos e sangue causando separação dos neurofilamentos. As meninges são inelásticas, fazendo com que o aumento de pressão causado por hemorragia e edema concentra-se na região central (Braund et al., 1990b; Tator e Koyanagi, 1997; Kornegay,

1998). A grande demanda metabólica desta substância também determina maior susceptibilidade ao trauma, pois pode ser que sua necessidade energética seja maior do que o suprimento sanguíneo disponibiliza (Braund et al., 1990b; Kornegay, 1998).

A perfusão tecidual deficiente resulta em hipóxia celular, com diminuição do oxigênio e da glicose e conversão para o metabolismo anaeróbico. Vias anaeróbicas produzem quantidades deficientes de adenosina trifosfato (ATP) e ainda formam substâncias potencialmente lesivas como lactato, prostaglandinas e radicais livres de oxigênio (Janssens, 1991; Ambrósio et al., 2000). O acúmulo de metabólitos do ácido láctico determina acidose e morte celular com liberação do conteúdo lisossomal composto de enzimas hidrolíticas que agravam o dano tecidual (Colter e Rucker, 1988).

A depleção de ATP leva à falência bombas da membrana que mantém a concentração iônica, levando ao acúmulo de sódio e cálcio dentro das células. O excesso de sódio resulta em edema celular e o cálcio ativa enzimas lesivas a proteínas e lipídios intracelulares. A lipólise leva ao acúmulo de ácidos graxos livres gerando substrato para formação de leucotrienos e prostaglandinas. A proteólise determina a formação de radicais livres. A quantidade de radicais formados é dependente da gravidade e duração da isquemia (Ambrósio et al., 2000).

Porém, a ruptura das mitocôndrias não está relacionada com a isquemia, mas com a reoxigenação. Considerando que a liberação de radicais livres de oxigênio é derivada da entrada de oxigênio no tecido isquêmico, o fenômeno de anóxia-oxigenação repete a chamada síndrome de reperfusão (Araújo, 2005).

2.2.2. O papel do cálcio e do glutamato

Em circunstâncias fisiológicas normais, o cálcio está envolvido em vários mecanismos de sinalização intraneuronais. A concentração de cálcio no citosol neuronal é mantida dentro de um limite estreito por eficiente mecanismo de armazenamento e liberação, pois uma quantidade elevada é citotóxica. O acionamento de muitos sistemas enzimáticos é baseado na

citotoxicidade mediada pelo cálcio (Coughlan, 1993).

Imediatamente após a lesão há uma interrupção na condução nervosa mediada por mudanças na concentração de vários íons dentro e fora de neurônios e axônios. Ocorre um aumento de sódio e uma diminuição do potássio intracelular e aumento do potássio extracelular. Esse excesso de potássio fora das células leva à perda do potencial de membrana e bloqueio da sua condução (Janssens, 1991; Jeffery e Blackmore, 1999a). A elevação do sódio dentro da célula leva a edema citotóxico podendo causar o rompimento mecânico da mesma. Ocorre um grande influxo de cálcio para o meio intracelular, correlacionado com a gravidade do trauma inicial, seu acúmulo é frequentemente a via comum de lesão e morte celular após uma lesão de medula (Jeffery e Blackmore, 1999a).

O acúmulo de cálcio intracelular provoca contrações musculares e venoespasmos; prejudica o funcionamento mitocondrial e aumenta a produção de prostaglandinas vasoativas e leucotrienos. Além disso, media a degradação de neurofilamentos e a progressiva degradação axonal causando dano e morte de neurônios, axônios, bainha de mielina e gliócitos (Braund et al., 1990b). Esse cálcio desempenha um papel importante na destruição celular porque ativa fosfolipases, proteases e outras enzimas intracelulares (Janssens, 1991; Jeffery e Blackmore, 1999a).

Proteases ativadas danificam o citoesqueleto neuronal e as endonucleases atacam e desnaturam o ácido nucléico (Coughlan, 1993). A ativação da fosfolipase A₂ pelo cálcio quebra o ácido araquidônico da membrana fosfolipídica iniciando uma resposta inflamatória. Esse ácido é metabolizado através da via das cicloxigenases para formar prostaglandinas e pela via das lipoxigenases para originar os leucotrienos (Janssens, 1991; Coughlan, 1993). Esses agentes causam aumento da permeabilidade vascular resultando em extravasamento de plasma, edema tecidual e hemoconcentração. A partir do ácido araquidônico também é formado tromboxano que causa vasoestase e potencializa a agregação plaquetária (Ambrósio et al., 2000). O acúmulo de cálcio em estruturas como o complexo de Golgi e as mitocôndrias prejudica seu

funcionamento causando mais distúrbios na célula. O cálcio também exacerba a peroxidação de lipídios induzida pelos radicais livres (Coughlan, 1993).

Assim que o cálcio entra nas células ele é sequestrado por várias estruturas, como mitocôndrias, fosfolipídios, enzimas e pelo fosfato inorgânico (Braund et al., 1990b). O fosfato inorgânico liga o cálcio à hidroxiapatita, esgotando rapidamente o fosfato disponível. Essa falta de fosfato leva a carência de adenosina trifosfato, adenosina difosfato e adenosina monofosfato, ou seja, perda do suprimento energético da célula. Nessas circunstâncias a mitocôndria libera o cálcio sequestrado, e já não pode funcionar normalmente, perdendo sua habilidade para fosforilação oxidativa (Janssens, 1991).

A entrada de cálcio nas células ocorre via canais de cálcio ou através de falhas na continuidade da membrana celular. Os canais da membrana são sensíveis à voltagem e se abrem quando ocorre um potencial de membrana específico, ou funcionam através de agonistas (Coughlan, 1993). O influxo de íons cálcio parece ser facilitado pela ativação dos receptores de glutamato (Shores, 1992).

O glutamato é um aminoácido amplamente distribuído no sistema nervoso central (Braund et al., 1990b), sendo conhecido atualmente como principal neurotransmissor excitatório (Coughlan, 1993; Leonard e Kirby, 2002; Engelhardt, 2003). O sistema glutamatérgico é fundamental em diversas funções, sendo responsável por mediar neurotransmissão rápida em complexas redes de conexões neuronais. Além disso, é fortemente relacionado à plasticidade neuronal, à utilização da glicose e ao controle vasomotor (Leonard e Kirby, 2002; Engelhardt, 2003).

Em circunstâncias normais o glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica por eficientes mecanismos existentes nos neurônios pré-sinápticos e nos astrócitos vizinhos, que interrompem sua ação. Entretanto, quando ocorre uma lesão medular aguda, a concentração extracelular de glutamato se torna elevada e ele é responsabilizado por desencadear neurodegeneração (Shores, 1992; Beattie, 2004), sendo por isso conhecido como

“excitotoxina” (Braund et al., 1990b; Leonard e Kirby, 2002). Nessas concentrações determina uma superestimulação de receptores pós-sinápticos excitatórios e toxicidade neuronal, resulta em concentrações elevadas de cálcio e sódio e conseqüente dano neuronal (Leonard e Kirby, 2002). Essa lesão neuronal leva o glutamato para o espaço extracelular o que, em altas concentrações inicia uma cascata excitotóxica com aumento de cálcio neuronal e glial levando à necrose (Beattie, 2004).

A associação do glutamato com os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) mantém abertos os canais iônicos permitindo uma entrada contínua de cálcio (Coughlan, 1993; Leonard e Kirby, 2002). A superestimulação desses receptores pelo excesso de glutamato inicia uma cascata de eventos envolvendo uma entrada excessiva de cálcio nas células, perda da função mitocondrial e da produção de energia seguidas de edema e ruptura celular e nuclear, ou seja, necrose. Entretanto, um estímulo menos intenso com menor entrada de cálcio nas células pode não alterar a função mitocondrial, mas causar apoptose mais tardiamente (Lu et al., 2000). O excesso de glutamato, por si só também pode induzir a apoptose (Mallei et al., 2005), assim como as enzimas dependentes do cálcio e os radicais livres (Araújo, 2005).

2.2.3. Os radicais livres e a peroxidação de lipídios

Não há dúvidas de que os radicais livres, neurotoxinas metabólicas como os opióides endógenos, e aminoácidos excitatórios estão profundamente implicados no trauma medular agudo (Araújo, 2005).

Os radicais derivados do oxigênio são importantes mediadores de formas graves de destruição celular. Apesar do oxigênio molecular ser essencial para sobrevivência celular, seus catabólitos intermediários podem ser deletérios para estrutura e função celular, e são denominados coletivamente como radicais livres derivados do oxigênio (Brown e Hall, 1992). Eles são produtos do metabolismo celular normal e sua concentração é controlada por antioxidantes e sistemas enzimáticos de varredura. O desequilíbrio ocorre no metabolismo celular devido a um trauma ou

isquemia que leva ao aumento de sua produção, ultrapassando as defesas naturais. Os radicais livres são extremamente instáveis e reativos devido à presença de um elétron livre em sua órbita mais externa. Eles atacam todos os componentes celulares, mas reagem principalmente com os ácidos graxos insaturados da membrana fosfolipídica (Braund et al., 1990b; Coughlan, 1993; Araújo, 2005).

A peroxidação dessa camada causa desalinhamento dos lipídios, alterando a integridade da membrana, a fluidez e a manutenção dos gradientes iônicos. Este é o efeito mais grave dos radicais livres, pois leva a destruição rápida e muitas vezes irreversível de tecidos após lesão ou isquemia (Brown e Hall, 1992). E tem sido implicado como a maior causa de degeneração do sistema nervoso central após o trauma com início muito cedo (Brown e Hall, 1992; Kraus, 1996; Gerndt et al., 1997). Essa peroxidação é acelerada por alguns componentes sanguíneos como cobre e ferro, e por produtos da degradação de hemácias, substâncias essas que estão aumentadas na lesão medular (Braund et al., 1990b).

Os radicais livres também podem causar lesões diretas ao tecido neuronal e contribuir para as lesões isquêmicas através de danos à microvascularização. A quebra da membrana celular pelos radicais livres é uma fonte potencial de ácido aracônico para ser metabolizado pelas vias da lipoxigenase e ciclooxigenase. Através da ciclooxigenase há formação de variantes da prostaglandina, tromboxanos e prostaciclina. As prostaglandinas induzem a vasodilatação e a agregação plaquetária e estimula a degranulação de mastócitos, com liberação de histamina. Nessas condições ocorre hiperemia, aumento da permeabilidade vascular e formação de edema. Ao passo que o tromboxano é um potente vasoconstritor. Através das lipoxigenases são produzidos os leucotrienos, liderando a quimiotaxia para polimorfonucleares (Janssens, 1991).

A presença de leucócitos polimorfunucleares fagocíticos nas adjacências das paredes dos vasos sanguíneos e as áreas de hemorragias são indicativos de reação inflamatória aguda na medula traumatizada. Essa reação determina a ativação de lipases induzida pelo trauma que

também podem hidrolisar os fosfolipídios da membrana e liberar o ácido aracdônico potencializando a inflamação (Braund et al., 1990b).

Portanto, em decorrência da destruição celular ocorre liberação de radicais livres que reagem com diversos componentes celulares causando peroxidação dos lipídios (Janssens, 1991). Essa peroxidação acontece também como resultado final da interação da cascata de ácido aracdônico com as cicloxigenases e lipoxigenases resultando em produtos como o potente vasoconstritor tromboxano e radicais livres de oxigênio que se acumulam e destroem componentes da membrana celular (Janssens, 1991; Shores, 1992). Não existe uma doença causada especificamente pelos radicais livres, mas eles podem agravar vários distúrbios como um trauma da medula espinhal (Araújo, 2005).

2.2.4. A apoptose

A apoptose parece ter um papel crucial no desenvolvimento dos danos secundários. E assim como a necrose, ela pode ser desencadeada por vários mecanismos, incluindo excitotoxicidade glutamérgica, cálcio, radicais livres, citocinas e lesões inflamatórias (Li et al., 1996; Lu et al., 2000). As células em apoptose vão ser fagocitadas e digeridas por proteases sem produzir inflamação (Li et al., 1996).

A expansão da lesão primária ocorre primeiro por necrose das células adjacentes que é quase imediato, e depois por um processo de morte mais tardio, que é caracterizado por apoptose neuronal, e ainda mais tarde por ativação microglial e apoptose de oligodendrócitos (Beattie, 2004). Existem evidências da ocorrência tardia de apoptose induzida pela lesão compressiva em quatro tipos de células da medula espinhal de ratos: neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglíocitos. Após quatro horas da lesão as células neuronais e gliais apoptóticas são detectadas nesta área através de imunohistoquímica, com pico em oito e 24 horas respectivamente (Lu et al., 2000).

A morte neuronal e de oligodendrócitos após o trauma interfere com a conectibilidade e induz degeneração da mielina. Nos próximos sete dias ocorre um aumento progressivo da área de

lesão, e as cavitações aumentam com mais morte neuronal e glial. Uma segunda onda de apoptose, dessa vez de oligodendrócitos, é detectada no sétimo dia e está associada com a degeneração axonal. Os oligodendrócitos tardiamente mortos reduzirão a possibilidade de remielinização após lesão axonal. Existe a hipótese axonal que após a lesão medular, os axônios alterados não produziram sinal crucial para sobrevivência dos oligodendrócitos, ou seja estes dependeriam dos axônios intactos (Li et al., 1996). Essa distribuição da apoptose em neurônios e células da glia pode ser responsável pela contínua expansão da lesão e pela prolongada desmielinização de axônios em regiões distantes do epicentro da lesão (Lu et al., 2000).

Portanto, a apoptose ocorre em neurônios e oligodendrócitos poucas horas após o trauma inicial, é responsável por perda celular tardia, podendo persistir por vários meses. É um componente essencial dos eventos secundários (Mallei et al., 2005).

2.3. Alterações clínicas e perspectivas em relação às lesões medulares agudas

A manifestação clínica do trauma medular é dependente da sua localização na medula (Moore, 1992). A disfunção reflete várias intensidades de lesão à substância branca ou cinzenta. O prognóstico sempre tende a ser reservado, mas é influenciado por fatores como o grau e a localização do dano medular (Braund et al., 1990a).

Em cães, se o trauma agudo ocorrer em uma área de substância cinzenta essencial para locomoção como a intumescência cervical (C6-T2) ou lombossacral (L4-S3), o prognóstico tende a ser desfavorável, pois essa substância é mais sensível a esse tipo de trauma (Bergman et al., 2000a). Como essas regiões enervam respectivamente os membros torácicos e pélvicos, uma injúria envolvendo a substância cinzenta de uma delas resultará em sinais de neurônio motor inferior para o membro correspondente (Moore, 1992; Kraus, 1996; Jeffery e Blackmore, 1999a). Uma lesão grave na substância cinzenta no segmento cervical caudal além de afetar os membros torácicos pode danificar os neurônios que originam o nervo frênico, resultando em falência

respiratória e até mesmo a morte do animal. E uma lesão na intumescência lombossacral pode afetar a inervação da bexiga (Braund et al., 1990a).

Entretanto, se a injúria for em uma área de substância cinzenta não essencial para os membros, como o segmento de T3 a L3, a lesão não vai ter tanto impacto na locomoção (Moore, 1992; Kraus, 1996; Jeffery e Blackmore, 1999a), e terá pouco significado clínico, pois nenhum grupo muscular grande ou órgão vital será denervado (Braund et al., 1990a).

Nas lesões cervicais craniais e toracolombares, os sinais clínicos refletem primariamente danos aos tratos ascendentes e descendentes da substância branca. Essas fibras mais intensamente mielinizadas refletem as primeiras disfunções (Braund et al., 1990a). Lesão à substância branca em qualquer local pode afetar a coordenação dos membros produzindo paresia e ataxia por interferir com a condução do impulso a partir e através de estruturas supraespinhais. A lesão da substância branca cranial a um membro produz sinais de neurônio motor superior para aquele membro (Moore, 1992; Jeffery e Blackmore, 1999a).

Os sinais de uma injúria que afeta os neurônios motores inferiores são: fraqueza, diminuição ou ausência dos reflexos espinhais, diminuição do tônus muscular, paralisia flácida e atrofia muscular grave e precoce. A lesão ao neurônio motor superior causa tônus muscular normal ou aumentado (espasticidade), paresia ou paralisia tônica e reflexos espinhais exacerbados (Thomas, 2000).

Dependendo do tipo de injúria, a medula espinhal pode ser afetada principalmente em sua região dorsal ou ventral, influenciando os sintomas, uma vez que a porção ventral possui principalmente função motora, enquanto a porção dorsal é principalmente sensorial (Hoerlein et al., 1983).

Além disso, as fibras possuem diâmetro variável e diferente sensibilidade à lesão conforme a sua localização na medula. Sendo assim, as fibras de maior diâmetro, as da propriocepção, são as mais sensíveis às injúrias (Summers et al., 1995; Kraus, 1996). Portanto, os sinais de lesão neurológica associados ao trauma agudo em

ordem de progressão são: perda ou diminuição da propriocepção, seguida de disfunção motora voluntária e distúrbios sensoriais com diminuição ou perda da sensação dolorosa superficial e por último da profunda (Braund et al., 1990a ; Moore, 1992; Summers et al., 1995; Kraus, 1996; Fossum, 2002). A recuperação neurológica ocorre na ordem inversa, entretanto, a perda de propriocepção pode ser permanente (Braund et al., 1990a).

As vias medulares responsáveis pela dor profunda são fibras delgadas, localizadas profundamente na medula, são multisinápticas e bilaterais. Como as fibras finas são mais resistentes aos danos, é necessário um trauma grave na medula espinhal para interromper a sensação de dor profunda (Moore, 1992; Bergman et al., 2000a). Desse modo, a percepção de dor profunda constitui o teste prognóstico mais importante do exame neurológico e é um indicador confiável da integridade fisiológica do cordão espinhal (Bagley et al., 1999; Thomas, 2000; Fossum, 2002). Animais com ausência de dor profunda geralmente têm prognóstico desfavorável (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a; Sharp e Thomas, 1996; Bagley et al., 1999; Bagley, 2000; Lanz et al., 2000; Thomas, 2000; Fossum, 2002). Entretanto, a perda da dor profunda não implica necessariamente em transecção anatômica da medula (Jeffery e Blakemore, 1999b).

A capacidade do sistema nervoso de se reorganizar após uma lesão pode permitir recuperação funcional mesmo em presença de destruição tecidual substancial. Boas taxas de recuperação podem ser esperadas em animais com lesões discretas a moderadas, mas pouca coisa pode ser feita para melhorar a recuperação em caso de lesões graves (Jeffery e Blakemore, 1999b). O prognóstico para pessoas com lesão medular é sempre desfavorável, o que aumenta o ímpeto para investigações experimentais acerca do mecanismo e da reparação da lesão medular. Na perspectiva veterinária, o prognóstico para cães e gatos pode ser um pouco melhor devido ao fato deles serem quadrúpedes, o que permite que eles andem satisfatoriamente apesar de pouca coordenação (Jeffery e Blackmore, 1999a).

A lesão tecidual adicional, o reduzido fluxo sanguíneo e a perpetuação de produtos bioquímicos tóxicos levam à morte celular e ao dano permanente à medula espinhal. A reversão desse mecanismo secundário é a meta principal no manejo da lesão espinhal aguda (Shores, 1992). O papel da maioria dos medicamentos é inibir esses eventos secundários progressivos e evitar que o dano à medula espinhal se torne irreversível (Rucker et al., 1981; Colter e Rucker, 1988; Meintjes et al., 1996; Jeffery e Blakemore, 1999b). Qualquer droga ou cirurgia que tenha como objetivo aliviar os danos causados pelos eventos secundários deve ser instituída nas primeiras quatro a seis horas após o trauma para ter um efeito terapêutico máximo (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a e b; Brown e Hall, 1992; Summers et al., 1995; Kraus, 1996; Jeffery e Blakemore, 1999b; Beattie, 2004).

É comumente observado em clínicas que animais com lesões espinhais graves podem recuperar satisfatoriamente a função, algumas vezes sem nenhum tipo de tratamento. Em parte essa recuperação pode ser atribuída à reversão de lesões como a restauração normal das concentrações intra e extracelulares de íons ou da remoção da compressão, permitindo que a condução normal da substância branca seja restabelecida. A habilidade do sistema nervoso de se reorganizar pode ser observada mesmo na presença de destruição tecidual substancial, onde algumas áreas passam a ter uma função maior assumindo o encargo da área comprometida (Jeffery e Blackmore, 1999a).

O ritmo no qual a função melhora após a lesão varia com o estágio de recuperação, possivelmente como resultado de diferentes mecanismos subjacentes a diferentes estágios de recuperação. A função pode recuperar espontaneamente como resultado da resolução de lesões reversíveis, ou através da reorganização de circuitos sobreviventes, um processo denominado “plasticidade”. Esses dois processos tendem a ocorrer em tempos diferentes após a lesão, a reversão da disfunção geralmente ocorre rapidamente após a lesão, em cerca de 14 dias, enquanto a plasticidade pode continuar ocorrendo por um período de semanas ou meses (Jeffery e Blackmore, 1999a).

Melhoras breves na função podem ser atribuídas à reversão de alguns distúrbios na homeostase que causam a perda de função inicial, como os níveis alterados de sódio e potássio. Em alguns neurônios e axônios o mecanismo secundário que leva ao desequilíbrio iônico leva a célula à morte, enquanto em outros o equilíbrio é restabelecido pelo transporte de íons no sangue, fluido cérebro-espinhal e pela difusão nos tecidos subjacentes. A remielinização espontânea pode ocorrer e geralmente é visível do sétimo ao 21º dia após a lesão. Apesar da remielinização ser frequentemente observada em animais experimentais, algumas vezes ela é incompleta (Jeffery e Blackmore, 1999a).

2.4. Os corticóides e as lesões medulares

Os corticóides são ampla e rotineiramente utilizados no tratamento de lesões da medula espinhal (Young e Flamm, 1982; Bracken et al., 1984; Faden et al., 1984; Brown e Hall, 1992; Bergman et al., 2000b; Andrade, 2002; Lee et al., 2005). Mas não existe um protocolo definido em relação a seu uso; a dose, o intervalo, o tempo de tratamento ideal e o mecanismo de ação permanecem indeterminados (Meintjes et al., 1996; McDonald e Langston, 1997; Bondy e Cohn, 2002a).

A literatura que abrange o uso dessas drogas no trauma medular é controversa, enquanto muitos pesquisadores demonstram efeito benéfico, outros atestam que eles não têm qualquer ação em potencializar a recuperação neurológica (Means et al., 1981; Bracken et al., 1984; Faden et al., 1984; Lee et al., 2005). Além disso, torna-se difícil realizar comparações entre os estudos, pois diferentes tipos de lesões medulares, espécies animais, métodos de avaliação clínica e protocolos são utilizados (Means et al., 1981).

Apesar do mecanismo de ação dos corticóides não ser totalmente conhecido, algumas características farmacológicas estão bem estabelecidas, particularmente a ação de reverter o desequilíbrio iônico e de água com supressão do edema. Muitos estudos experimentais têm demonstrado que os corticóides podem amenizar os danos histopatológicos causados por lesões no cérebro e na medula espinhal. Vários efeitos hipotéticos têm sido propostos para explicar a sua ação benéfica nos tecidos

nervosos lesados, tais como, estabilização das membranas, inibição de substâncias vasoconstritoras, aumento do fluxo sanguíneo espinhal, inibição da resposta inflamatória e depleção dos radicais livres (Means et al., 1981; Young e Flamm, 1982; Meintjes et al., 1996). Além disso, a apoptose presente na lesão medular também pode ser reduzida por drogas antiinflamatórias como os corticóides (Mallei et al., 2005).

Os corticóides inibem ambas as vias da inflamação, a da cicloxigenase e da lipoxigenase (McDonald e Langston, 1997; Andrade, 2002). A supressão da inflamação acontece através da inibição dos leucócitos, incluindo quimiotaxia, fagocitose, síntese de mediadores inflamatórios e liberação de enzimas lisossomais. Eles inibem a fosfolipase A2 impedindo a liberação do ácido aracídico da membrana fosfolipídica e conseqüente formação de eicosanóides e radicais livres (Taoka e Okajima, 1998).

Tem sido proposto um efeito antioxidante de altas doses de corticóides. Parece que eles têm importante papel na estabilização de membranas através da inibição dos radicais livres. Altas doses reduzem a peroxidação de lipídios e protegem enzimas como a ATPase e neurofilamentos, reverterem o acúmulo de ácido láctico e recuperam o cálcio extracelular. Mas a ação mais expressiva parece ser a prevenção da quebra da membrana através da inibição da peroxidação e hidrólise de lipídios. Outro efeito da inibição da peroxidação de lipídios é a redução de produtos vasoativos provenientes do metabolismo do ácido aracídico e conseqüente aumento do fluxo sanguíneo na medula (Faden et al., 1984; Taoka e Okajima, 1998). Talvez uma das descobertas mais significativas sobre os corticóides é que eles têm efeito neuroprotetor quando administrados em altas doses (Braund et al., 1990a).

Apesar da dexametazona ser bastante utilizada no tratamento do trauma de medula espinhal, seu uso é questionado e não tem demonstrado contribuição efetiva na recuperação neurológica (Rucker et al., 1981; Brown e Hall, 1992; Sharp e Thomas, 1996; Bagley et al., 1999; Bergman et al., 2000b; Yang et al., 2003). A metilprednisolona é relatada como mais eficaz do que a dexametazona. Ela atravessa

imediatamente as membranas celulares, possui maior disponibilidade celular e atividade antioxidante. Além disso, quando utilizada em altas dosagens, a metilprednisolona inibe a peroxidação de lipídios, sustenta o metabolismo energético, reverte o acúmulo de cálcio intracelular, previne a isquemia progressiva, e aumenta a resposta eletrofisiológica na medula após o trauma (Bracken et al., 1984; Meintjes et al., 1996; Bondy e Cohn, 2002a). Essa droga parece ter efeito neuroprotetor devido também a sua capacidade de seqüestrar radicais livres de oxigênio que são gerados no tecido isquêmico e prevenir isquemia e degradação de neurofilamentos (Taoka e Okajima, 1998; Jeffery e Blakemore, 1999b; Bergman et al., 2000b). Essas vantagens são suficientes para preconizar o uso das prednisolonas nos traumas agudos da medula espinhal (Bracken et al., 1984; Hoerlein et al., 1985; Shores et al. 1990).

O succinato sódico de metilprednisolona é a droga de escolha para o tratamento das lesões agudas da medula espinhal e tem demonstrado efeito benéfico na recuperação neurológica dos pacientes quando administrada nas primeiras horas após o trauma (Braund et al., 1990a; Shores, 1992; Meintjes et al., 1996; Jeffery e Blakemore, 1999b; Taoka e Okajima, 1998; Bergman et al., 2000b; Lu et al., 2000; Yang et al., 2003).

A sua administração em altas doses o mais precocemente possível em pacientes humanos têm aumentado significativamente as taxas de recuperação nos casos de trauma medular (Braund et al., 1990a). É uma terapia padrão em casos de lesão medular aguda com até oito horas (Kraus, 1996; Gerndt et al., 1997; Bagley et al., 1999; Bagley, 2000; Bergman et al., 2000b; Bondy e Cohn, 2002a, Lee et al., 2005), devendo ser continuada por até 24 horas (Taoka e Okajima, 1998) ou 48 horas para se ter maior efeito da droga (Jeffery e Blakemore, 1999b). Mas, estudos em animais têm demonstrado que esse período no qual a metilprednisolona teria efeito benéfico é menor, possivelmente menos de uma hora (Bagley et al., 1999; Bagley, 2000) e a sua administração deve ser instituída antes que a necrose hemorrágica e o edema se tornem significativos (Means et al., 1981). Após oito horas a recuperação neurológica pode ser pior do que o placebo em alguns pacientes (Kraus, 1996; Lu et al., 2000).

Outras drogas também empregadas no tratamento do trauma medular são prednisona ou prednisolona oral (Bondy e Cohn, 2002a). A prednisona é um corticóide sintético que precisa de conversão hepática para se transformar no composto ativo, a prednisolona. Entretanto as duas drogas podem ser utilizadas de maneira similar em aplicações sistêmicas, pois a conversão é rápida e completa (Bondy e Cohn, 2002b).

Portanto, a eficácia dos corticóides no trauma medular, bem como o tempo entre a lesão e a sua administração ainda são motivos de muitos estudos (Hoerlein et al., 1985). Normalmente altas doses são necessárias para se obter efeito benéfico e o tratamento é de curta duração com diminuição gradativa da dosagem (McDonald e Langston, 1997; Andrade, 2002). A sua administração frequentemente aumenta o risco de imunossupressão, hemorragias, úlceras e perfurações gastrointestinais e pancreatite (Ducker e Hamit; 1969; Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a; Bagley et al., 1999; Bagley et al., 2000), além de causar poliúria, polidipsia e polifagia (Bondy e Cohn, 2002a) e retardo na cicatrização (Gerndt et al., 1997).

2.5. Estudo experimental das lesões medulares

Existem muitas controvérsias a respeito do tratamento e do tempo apropriado para se tratar as lesões medulares. Para reproduzir os vários tipos de lesões medulares e, então, elucidar esses problemas têm sido desenvolvidos diversos protocolos experimentais com animais de laboratório (Tarlov et al., 1953).

O desenvolvimento de um modelo experimental reproduzível de lesão medular tem sido objeto de muitas investigações (Dohrmann, 1972; Scharamm et al, 1979; Ford, 1983; Panjabi e Wrathall, 1988; Taoka e Okajima, 1998; Meyer et al., 2003). Tem se estudado o trauma medular agudo experimental principalmente em ratos, gatos, cachorros e macacos. São empregadas técnicas de queda de peso sobre a coluna, balão compressivo, cliques ou ligaduras constritivas na medula e lesões por calor através de radiofrequência (Dohrmann, 1972; Delamarter et al., 1995; Taoka e Okajima, 1998; Lee et al., 2005). Porém, as observações patofisiológicas

nem sempre são comparáveis, o que pode ser explicado pelo uso de diferentes espécies de animais experimentais, tipos diferentes de trauma e de métodos de avaliação (Janssens, 1991). Um modelo animal padronizado e reproduzível é necessário para o desenvolvimento de um protocolo apropriado para tratar a lesão medular (Taoka e Okajima, 1998; Ma et al., 2001).

Ratos e camundongos são excelentes modelos para se estudar a medula espinhal (Cunningham et al., 2005). O rato é o animal mais frequentemente utilizado como modelo de lesão medular devido ao baixo custo, tamanho, acessibilidade (Roussos et al., 2005) e capacidade de tolerar o rigor da experimentação (Taoka e Okajima, 1998).

A cirurgia experimental em ratos e camundongos permite estudar a fisiologia da medula espinhal, o trauma medular agudo e vários tipos de patologias medulares. Além disso, possibilita investigações sobre potenciais tratamentos para o devastador problema da lesão medular (Cunningham et al., 2005).

3. ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

Esse estudo foi precedido de um experimento piloto que objetivou determinar um modelo viável de trauma medular capaz de produzir lesões neurológicas clínicas, moderadas e reversíveis em ratos.

3.1. Material e método

Foram empregados 10 *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, sendo três machos e sete fêmeas, adultos com idade aproximada de seis meses e pesando em média 380g.

Os animais foram submetidos à cirurgia de laminectomia (técnica descrita no item 4.1) para indução do trauma medular na região toracolombar, variando de T9 a L3. A lesão foi induzida utilizando um aparelho estereotáxico confeccionado na Escola de Veterinária da UFMG, baseado no modelo apresentado por Farooque (2000), com dimensões apropriadas para a espécie (Fig.1).

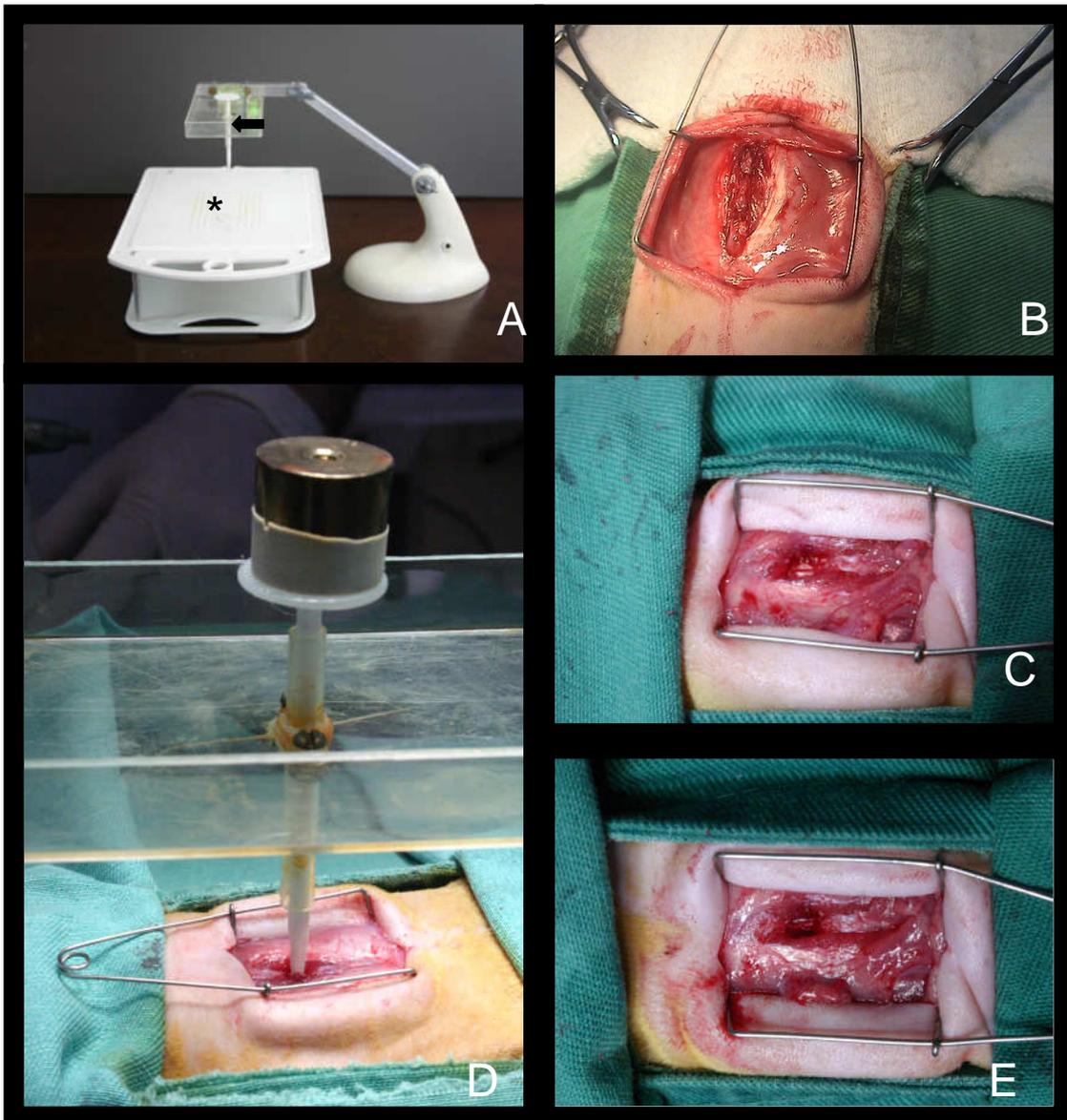


Figura 1 - A) Fotografia do aparelho estereotáxico com haste compressiva (seta) e mesa de apoio do animal (asterisco). Fotografias B, C, D e E demonstram animal em procedimento cirúrgico de trauma medular experimental. B) Foco cirúrgico com identificação dos processos espinhosos; C) Visualização da medula espinhal com aspecto normal; D) Procedimento de lesão da medula com peso de 50g; E) Visualização da medula com hemorragia após o trauma.

Cada animal foi submetido a um determinado protocolo no qual variavam-se o peso e o tempo de aplicação direta na medula, de acordo com a seguinte divisão, animais:

- 1, 2 e 3 - fêmeas - Peso de 2,5g por 30 segundos
- 4 - fêmea - 7,5g por um minuto
- 5 - fêmea - 7,5g por três minutos
- 6 - macho - 35,5g por três minutos
- 7 - macho - 35,5g por cinco minutos
- 8 - macho e 9 - fêmea - 50,5g por três minutos
- 10 - fêmea - 50,5g por cinco minutos

Os animais foram avaliados diariamente através da observação da atividade motora espontânea em campo aberto e do teste da propriocepção. Após 15 a 30 dias da cirurgia eles foram sacrificados com sobredose de tiopental sódico¹, via intraperitoneal, e procedeu-se a necropsia com coleta das medulas espinhais. As medulas foram fixadas em formol tamponado a 10%, processadas por técnicas rotineiras para coloração em hematoxilina-eosina e avaliadas em microscopia óptica.

3.2. Resultados e discussão

Esse modelo de lesão medular experimental compressiva aguda é de fácil execução e reprodução e possui baixo custo. Condizente com Taoka e Okajima (1998) que relataram que a técnica de lesão medular através da compressão por peso é simples, requer pouca retirada de osso e tecido mole e pode ser realizada rapidamente utilizando aparato não muito caro. E acrescentaram que esse método produz paralisia caudal parcialmente reversível de uma maneira reproduzível, e que geralmente a função motora melhora gradualmente, mas não completamente.

A utilização de 35,5g causou paresia discreta em um animal e nenhuma alteração clínica em outro, e o emprego de 50,5g por três ou cinco minutos causou paresia moderada. Li et al. (1996) realizaram lesões compressivas em ratos utilizando pesos de 9, 35 e 50g por cinco minutos e produziram respectivamente nenhum: déficit neurológico, paraparesia transitória e paraplegia. Taoka e Okajima (1998) utilizaram

peso de 20g por 20 minutos para causar paraplegia em animais da mesma espécie.

Os ratos como animais experimentais demonstraram ser satisfatórios para o estudo de lesão medular, pois eles toleraram bem o rigor da experimentação, e apresentaram a vantagem de serem baratos e disponíveis. Estes achados também foram observados por Taoka e Okajima (1998). Foi constatado que o sucesso do modelo em ratos também depende do procedimento cirúrgico e de intensivos cuidados pós-operatórios, esses fatores contribuem para uma alta taxa de sobrevivência mesmo em lesões graves (Ma et al., 2001).

Os animais 1 e 2 vieram a óbito imediatamente após a cirurgia, provavelmente devido à hipotermia. Esse problema foi contornado com a utilização de uma bolsa de água quente e então não houve mais nenhum óbito.

No pós-operatório imediato, os ratos 3, 4 e 5 apresentaram déficit proprioceptivo discreto, sendo que o 4 e o 5 também apresentaram alteração muito discreta na deambulação. No segundo dia após a cirurgia eles já não apresentavam nenhum déficit neurológico. Ao exame histopatológico, não foi observada qualquer alteração nas medulas espinhais. Essas alterações clínicas provavelmente ocorreram devido a mudanças reversíveis na medula, como por exemplo, um desequilíbrio iônico, e logo que foi restabelecido o equilíbrio a função voltou ao normal (Jeffery e Blackmore, 1999a).

O animal 6 apresentou déficit proprioceptivo e motor moderados no pós-operatório imediato, mas dois dias após a cirurgia já estava com esses parâmetros normais. Na avaliação histopatológica foi encontrada degeneração axonal moderada em uma das raízes nervosas ventrais e vários microgliócitos reativos.

Apesar do animal 7 não ter apresentado nenhuma alteração clínica após a cirurgia, observou-se na histologia área extensa de necrose caracterizada por formação de cavidade repleta por células de Gitter atingindo principalmente a substâncias cinzenta, mas também a branca. Próximo à região da necrose observou-se foco discreto de hemorragia e uma das raízes nervosas encontrava-se com degeneração axonal moderada. A ausência de

¹ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda

sinais clínicos provavelmente ocorreu devido ao fato da lesão ter acometido especialmente a substância cinzenta e ter sido na região toracolombar, onde essa substância não é essencial para locomoção.

A função motora e a propriocepção estavam ausentes no pós-operatório imediato dos ratos 8, 9 e 10, mas a sensação dolorosa não estava alterada. O primeiro animal começou a movimentar os membros posteriores após cinco dias e com 17 dias apresentava propriocepção e deambulação normais. Os animais 9 e 10 tiveram recuperação semelhante com início da movimentação dos membros três dias após a cirurgia e não apresentavam mais déficit com 10 dias. As alterações microscópicas foram semelhantes nos três animais. A porção dorsolateral da medula continha extensa área de necrose (microcavitações) contendo várias células de Gitter. Observou-se ainda nessa região infiltrado inflamatório moderado de células mononucleares e reação glial inicial. Na área adjacente à necrose visualizou-se degeneração moderada a intensa do neurópilo (Fig.7E). Nos animais 8 e 10 notou-se além disso degeneração axonal moderada das raízes nervosas.

Observou-se que as alterações clínicas e histopatológicas foram intensificadas à medida que o peso utilizado para provocar a lesão aumentava. Entretanto não se verificou diferença entre a utilização do peso de 50,5g por três ou cinco minutos, ambos foram capazes de causar uma lesão moderada com sinais clínicos parcialmente reversíveis. Optou-se pela utilização do tempo de cinco minutos como uma tentativa de se conseguir resultados mais eficazes e homogêneos. Esperava-se que este protocolo determinasse um déficit mais acentuado com o emprego de animais mais leves.

3.3. Conclusão

O uso do modelo estereotáxico com peso de 50,5g por cinco minutos é viável para produzir lesão da medula espinhal em ratos com produção de paresia moderada e reversível.

4. ETAPA 2 - ESTUDO DO EFEITO DA PREDNISONA EM DOSE ALTA, ADMINISTRADA EM DIFERENTES TEMPOS, APÓS O TRAUMA MEDULAR AGUDO

4.1. Material e método

Foram utilizados 25 machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, com três meses de idade, pesando entre 272 e 377g. Eles foram desverminados com tiabendazol², 50mg por animal, via oral; e divididos através de sorteio, em cinco grupos de cinco animais. Os ratos foram colocados em caixas plásticas com cinco animais cada, sendo um de cada grupo. Os animais receberam ração comercial para roedores e água *ad libitum* e foram submetidos a ciclos de 12 horas com luz e 12 horas sem luz.

Todos os animais foram submetidos à avaliação neurológica conforme os testes propostos para esse experimento (Quadro1) sendo que nenhum deles apresentou déficit. Os ratos foram mantidos no biotério por 14 dias para aclimatação.

Ao final desse período, os animais foram preparados para cirurgia asséptica. Imediatamente antes da cirurgia realizou-se antibioticoterapia com cefalotina³, 30mg/Kg, via endovenosa; e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol⁴, 2mg/Kg, via oral. A indução e a manutenção anestésica foram realizadas com isoflurano⁵ fornecido através de máscara empregando sistema semi-aberto. Os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre uma mesa confeccionada por duas chapas de polietileno (Fig.1) englobando uma bolsa térmica contendo água com temperatura aproximada de 80°C. A chapa em contato com o animal foi perfurada para permitir maior troca de calor. Após antisepsia da região dorsal do tronco, foi realizada a incisão de pele e tecido

² Thiaben® - Uci-farma

³ Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda

⁴ Solução oral - Manipulado pela Farmácia Artesanal em Belo Horizonte-MG

⁵ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda

Quadro 1 - Protocolo de avaliação neurológica com os respectivos escores para: sensibilidade dolorosa, capacidade motora, posicionamento proprioceptivo, reflexo de localização e plano inclinado. Quanto maior o escore atingido mais próximo da normalidade o animal se encontra.

ESCORE		AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA	
<i>SENSIBILIDADE DOLOROSA (SD)</i>			
0	Ausente		
1	Diminuída		
2	Normal		
<i>CAPACIDADE MOTORA (CM)</i>			
0	Nenhum movimento nos posteriores, sem apoio de peso		
1	Movimento sutil, desconexo dos posteriores, sem apoio de peso		
2	Movimento bem visível nos posteriores, sem apoio de peso		
3	Apoio de peso nos posteriores, anda com um déficit acentuado		
4	Anda com déficit moderado		
5	Anda com déficit discreto e não consegue andar na barra, de 7,7cm		
6	Anda normal ou com déficit discreto e consegue andar na barra de 7,7 cm		
7	Consegue andar na barra de 6,7 cm		
8	Consegue andar na barra de 5,7 cm		
9	Consegue andar na barra de 4,7 cm		
10	Consegue andar na barra de 3,7 cm		
11	Consegue andar na barra de 2,7 cm		
12	Consegue andar na barra de 1,7 cm		
<i>POSICIONAMENTO PROPRIOCEPTIVO (PP)</i>			
0	Ausente		
1	Diminuída		
2	Normal		
<i>REFLEXO DE LOCALIZAÇÃO (LC)</i>			
0	Ausente		
1	Diminuído		
2	Normal		
<i>PLANO INCLINADO (PI)</i>			
1	Consegue ficar em um ângulo 30° menor do que ficava antes da cirurgia		
2	Consegue ficar em um ângulo 20° menor do que ficava antes da cirurgia		
3	Consegue ficar em um ângulo 10° menor do que ficava antes da cirurgia		
4	Consegue ficar no mesmo ângulo que ficava antes da cirurgia		

subcutâneo na linha média dorsal estendendo de T6 a L1. As inserções dos músculos epiaxiais foram incisadas, e eles afastados lateralmente. Com o auxílio de uma pinça goiva realizou-se osteotomia do processo espinhal de T12 ou T13 e em seguida, a retirada da lâmina dorsal da vértebra empregando-se drill pneumático neurológico. As brocas do drill foram constantemente irrigadas com solução fisiológica⁶ para evitar o aquecimento do tecido. Após a visualização da medula espinhal, foi provocado trauma mecânico sobre a duramáter com emprego do aparelho estereotáxico (Fig.1). O trauma foi realizado através da colocação de um peso de 50,5g exercendo pressão em uma superfície de 1mm² sobre a região de T12 ou

T13 durante cinco minutos. Após a retirada da compressão, o local foi irrigado com solução fisiológica. Os músculos foram aproximados empregando-se sutura padrão Reverdin com fio de polipropileno 6-0⁷. Em seguida realizou-se a redução do espaço morto com sutura simples contínua com o mesmo fio. A pele foi suturada com pontos simples separados com fio de nylon 6-0⁸.

Após a cirurgia os animais foram mantidos em caixa aquecida até completa recuperação anestésica. Eles receberam cloridrato de tramadol, 2mg/Kg, via oral a cada 8 horas por três dias, e a seguir a cada 12 horas por mais

⁶ Cloreto de sódio a 0,9% - Solução eletrolítica injetável - Laboratório Sanobiol Ltda

⁷ Prolene® - Polypropylene suture - Ethicon Incorporations

⁸ Fio absorvível sintético Johnson & Johnson

dois dias. Os pontos de pele foram removidos nove dias após o procedimento cirúrgico.

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de tratamento, mas com início em diferentes tempos após a cirurgia. A medicação foi administrada por via oral em forma de xarope⁹ em volume e intervalos semelhantes, sendo que o grupo controle (A) recebeu o xarope sem nenhuma droga e os demais grupos (B, C, D e E) tomaram o xarope com prednisona¹⁰. No início do tratamento, a prednisona foi administrada na dose de 2mg/Kg, sendo considerada uma dose alta, indicada quando se deseja imunossupressão. O protocolo consistiu de 2mg/Kg de prednisona, ou volume equivalente de placebo, a cada 12 horas durante cinco dias, seguido de 1mg/Kg a cada 12 horas por cinco dias, e 0,5mg/Kg a cada 12 horas durante cinco dias, passando para 0,5 mg/Kg a cada 24 horas por mais cinco dias, e mais três administrações de 0,5mg/Kg a cada 48 horas. O início do protocolo após a cirurgia foi de acordo com o grupo:

A - Controle - Início do protocolo com o placebo oito horas após a cirurgia.

B - Início do protocolo com prednisona oito horas após a cirurgia.

C - Início do protocolo com prednisona 24 horas após a cirurgia.

D - Início do protocolo com prednisona 48 horas após a cirurgia.

E - Início do protocolo com prednisona 120 horas após a cirurgia.

Os animais foram submetidos à avaliação neurológica 24 horas após a intervenção cirúrgica e a cada três dias até o 33º dia, num total de 12 avaliações por animal. O exame neurológico consistiu na realização de cinco testes: sensibilidade dolorosa, capacidade motora, posicionamento proprioceptivo, reflexo de localização e plano inclinado (Fig.2). Adotou-se o método de escala numérica descritiva, e os animais foram testados pela

mesma pessoa durante todo o período experimental.

A sensibilidade dolorosa (SD) foi testada pela pressão de uma pinça hemostática mosquito de Halsted fechada até a primeira cremalheira na prega interdigital (Fig.2A). A resposta foi avaliada pelo comportamento do animal como tentativa de morder, vocalização, e também pela força e velocidade com que o membro foi retirado.

A capacidade motora (CM) foi baseada na observação da atividade espontânea do animal, primeiro em um campo aberto sem obstáculo, e quando apresentava apenas déficit discreto na deambulação era colocado para caminhar em barras de madeira cada vez mais estreitas de acordo com a capacidade neurológica do animal (Fig.2B). As barras, apoiadas em cavaletes de 60cm de altura, tinham um metro de extensão e a largura variava de 7,7 a 1,7cm, com diferença de 1cm entre elas, num total de sete barras. Quando o animal conseguia caminhar na barra mais larga, de 7,7cm, com os quatro membros apoiados na superfície superior, ele era colocado em uma barra 1cm mais estreita, até a barra de 1,7cm. Foi considerada para registro de escore a menor barra em que o animal conseguia caminhar utilizando os quatro membros.

O posicionamento proprioceptivo (PP) foi realizado flexionando-se a pata do animal de maneira que sua superfície dorsal ficasse em contato com o chão (Fig.2C). Foram avaliadas a rapidez e a precisão com que o animal retornava a pata para posição normal.

O reflexo de localização (LC) foi verificado carregando o animal e deixando o membro a ser testado livre, no caso os posteriores. A superfície plantar de cada membro era colocada em contato com a borda lateral de uma mesa (Fig.2D). Foram avaliadas com que precisão e rapidez o animal colocava o membro na superfície da mesa.

O teste do plano inclinado (PI) consistiu em colocar o animal em uma tábua coberta por emborrachado cuja superfície podia ser ajustada para permanecer em vários ângulos (Fig.2E). Dessa forma foi possível estabelecer o maior ângulo no qual o animal conseguia manter sua

⁹ Xarope base + glicerina 10% - Manipulado pela Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

¹⁰ Xarope base + glicerina 10% + prednisona 0,0125mg/gota - Manipulado pela Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

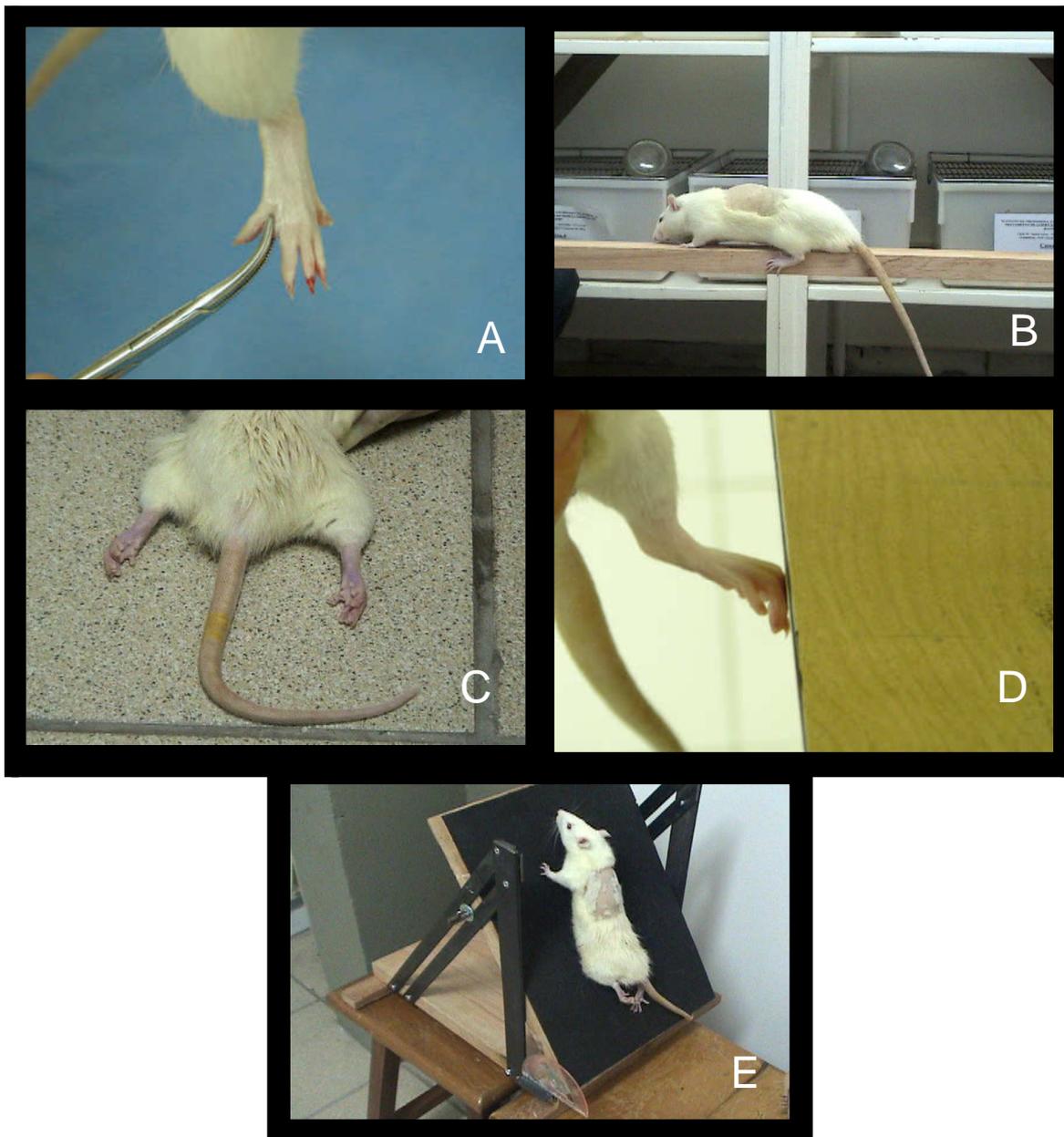


Figura 2 - A, B, C, D e E - Fotografias de animais sendo submetidos à avaliação neurológica A) Sensibilidade dolorosa; B) Caminhar na barra de madeira para determinação da capacidade motora, observe que o animal não está utilizando o membro posterior esquerdo; C) Avaliação do posicionamento proprioceptivo em animal com déficit; D) Reflexo de localização; E) Teste do plano inclinado.

posição por cinco segundos. Os ângulos foram testados com intervalos de 10 graus, começando de 10° até 90°.

Nos testes de sensibilidade dolorosa, posicionamento proprioceptivo e reflexo de localização os dois membros posteriores dos animais foram testados separadamente, e foi considerado apenas os escores do membro que teve o pior desempenho na primeira avaliação. A avaliação neurológica com os escores dos testes estão apresentadas no quadro 1. Quanto maior o escore atingido nos testes, mais próximo da normalidade o animal se encontra.

No 33° dia os animais foram submetidos à última avaliação neurológica e logo após foram sacrificados com sobredose de tiopental sódico, via intraperitoneal. A medula espinhal foi retirada junto com a coluna e imersa imediatamente em paraformaldeído a 4% e em seguida o animal foi necropsiado. As medulas permaneceram 30 dias no paraformaldeído para fixação. Após esse período os segmentos de coluna foram dissecados para obtenção das medulas espinhais que foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela hematoxilina-eosina para avaliação histológica pela microscopia óptica.

Esse experimento foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com protocolo número: 092/05.

4.1.1. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System, version 8, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, 2006. Adotou-se 5% como nível de significância nas análises.

Os efeitos dos tratamentos foram inicialmente estudados em cada um dos 12 dias de avaliação. Aplicou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) com o intuito de testar a hipótese de igualdade entre os efeitos dos tratamentos (medianas iguais). Apesar do número de ratos utilizados por tratamento ter sido igual a cinco, não ideal para se utilizar a aproximação assintótica pela distribuição de qui-quadrado do teste K-W, o teste é uma melhor opção do que a

ANOVA usual. Se o teste K-W indicasse existir diferença significativa entre os grupos, eles seriam comparados dois a dois, portanto 10 comparações, pelo teste não paramétrico Wilcoxon rank sum, adotar-se-ia p-valor multiplicado por 10, corrigido por Bonferroni em cada comparação.

Adicionalmente, foram calculados os valores médios dos testes (variáveis) dos cinco ratos de cada grupo por dia de avaliação (Y), para se proceder a análises de regressão $Y=f(X)$, sendo X os 12 dias de avaliação. O objetivo das análises de regressão foi comparar as respostas aproximadas de cada um dos grupos tratados com prednisona com o grupo controle. Adotou-se ajustar os modelos lineares simples de primeiro grau, $Y = \alpha + \beta_1.X + \varepsilon$, e também o de segundo grau, $Y = \alpha + \beta_1.X + \beta_2.X^2 + \varepsilon$. Os modelos foram ajustados e comparados quanto à igualdade dos parâmetros α , β_1 e β_2 .

As alterações histopatológicas foram analisadas pelo método qualitativo descritivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum animal apresentou infecção da ferida cirúrgica, e nem alteração de comportamento, apetite, defecação e micção. Três animais apresentaram aumento de volume na região ferida, mas sem sinal de deiscência dos pontos na ferida cirúrgica. Na realização da necropsia constatou-se que era uma cavidade delimitada repleta de conteúdo serosangüinolento localizada apenas no tecido subcutâneo. Esse seroma pode ter sido provocado devido a grande frouxidão da pele desses animais e pelo intenso manuseio pós-cirúrgico. Não foi observada qualquer alteração na ferida que sugerisse reação ao fio empregado.

Todos os animais apresentaram déficit neurológico de moderado a acentuado na primeira avaliação neurológica, 24 horas após o procedimento cirúrgico, sendo que alguns animais foram mais acometidos do que outros. Panjabi e Wrathall (1988) também encontraram variações em lesões medulares causadas por um mesmo peso, possivelmente causadas por movimentação da coluna no momento do trauma devido à respiração, ou por variações anatômica dos animais como dimensão da

medula, firmeza da coluna e massa corporal. Ma et al. (2001) sugerem que a dificuldade na padronização dos parâmetros pode ser comum após lesões discretas ou moderadas em ratos, sugerindo que esses animais usam um amplo padrão de locomoção nos membros.

Na primeira avaliação verificou-se também que a maioria dos animais teve lesão assimétrica. Apenas um animal teve os membros posteriores direito e esquerdo igualmente afetados, os outros 24 ratos tinham acometimento lateralizado, sendo que em todos eles o membro esquerdo foi mais intensamente afetado do que o direito. Esse problema também foi constatado por Ford (1983) que descreveu que a lateralização da lesão na medula era uma possível dificuldade em seu modelo experimental através da queda de peso. O autor sugeriu para um jeito de minimizar esse problema a utilização de um suporte curvo para apoiar a coluna de modo que a parte onde se deseja lesionar corresponda também ao centro gravitacional.

A avaliação neurológica foi realizada através da utilização de vários testes comportamentais, conforme Von Euler et al. (1996) e Farooque (2000) que constataram que esse tipo de teste fornece informações úteis e importantes para se avaliar uma lesão medular experimental, incluindo a melhora espontânea através do tempo e o efeito de diferentes tratamentos. Os testes utilizados também foram condizentes com esses autores que propuseram que eles devem ser fáceis de aplicar pelo pesquisador, requerer um mínimo pré-treino para o animal, não ser estressante, não utilizar equipamentos elaborados e fornecer uma avaliação realista de diferentes graus de lesão medular. A utilização de vários testes é apoiada pelos mesmos, que afirmaram ser difícil encontrar um único teste que satisfaça todos esses requisitos, especialmente quando se trata de animais de laboratório como os ratos. Esse tipo de avaliação neurológica também é recomendada por Ma et al. (2001) que reforçam que para avaliar a função medular residual e a recuperação funcional após a lesão medular em modelos roedores são recomendados vários testes comportamentais e não apenas um.

O intervalo de três dias entre as avaliações neurológicas foi baseado em Von Euler et al.

(1996) que afirmaram que os resultados de testes neurológicos durante três dias consecutivos em um mesmo rato mostrou uma diferença de escore muito pequena, não justificando intervalos menores do que esse entre as avaliações.

Na avaliação dos exames neurológicos não ocorreram indícios de efeitos diferenciados de nenhum dos grupos, em nenhum dos dias de avaliação pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, aplicado em cada um dos 12 dias. O p-valor = 0,05 (5%) ou menor é um indicativo de que a hipótese de igualdade dos tratamentos deve ser rejeitada. A hipótese H0 testada é a de que os tratamentos têm todos o mesmo padrão de resposta. Observe na tabela 1 que todos os p-valores são grandes e, portanto não há indícios de efeito diferenciado. Essa tabela mostra um resumo dos resultados do teste e são apresentados os p-valores máximos e mínimos para cada uma das variáveis, com a indicação do dia da observação.

Tabela 1 - Resumo dos resultados do teste de K-W aplicado em cada dia de avaliação, com os p-valores máximos e mínimos para cada uma das variáveis, e indicação do dia da observação entre parêntese.

Variáveis	p-valor ^{a/} (dia)	
	Mínimo	Máximo
CM	0,56 (1)	0,99 (30)
PP	0,29 (12)	0,41 (^{b/})
LC	0,18 (27)	1,00 (1)
PI	0,36 (15)	0,70 (21)

^{a/} Com 4 graus de liberdade, Prob ($\chi^2 >$ valor calculado K-W)

^{b/} p-valores iguais para os dias 1, 6, 9, 18, 21, 24, 27, 30 e 33

CM=capacidade motora; PP=posição proprioceptiva, LC=reflexo de localização; PI=plano inclinado

Na análise de regressão ajustou-se modelos de regressão completos, isto é, com parâmetros para todos os grupos, inicialmente o de primeiro grau e depois o de segundo. Para as variáveis LC e PI o modelo linear de primeiro grau apresentou melhor ajuste aos dados. Para a variável PP o modelo de segundo grau foi o mais adequado, enquanto que para CM ambos os modelos se ajustaram bem e optou-se pelo de primeiro grau por simplicidade.

Todos os testes apresentaram uma resposta significativa de escores médios com o tempo pela análise de regressão com p-valores menores do que 0,05 para todos os testes t dos

coeficientes da regressão e também para os teste F dos modelos de regressão. Ou seja, um mesmo teste apresentou escores significativamente diferentes entre os dias de avaliação neurológica. Os resultados resumidos das análises de regressão estão apresentados nas próximas tabelas. São indicados os modelos ajustados e os resultados dos testes de identidade de modelos, com a indicação dos grupos que apresentaram respostas iguais ao controle nos 12 dias de avaliação.

A capacidade motora foi baseado na observação da deambulação espontânea do animal e do caminhar na barra, testes similares foram utilizados por Von Euler et al. (1996); Farooque (2000) e Thomas (2000). O caminhar na barra foi incluído na determinação da capacidade motora porque muitas vezes a visualização do caminhar em campo aberto deixava dúvidas sobre a existência de pequenas alterações na deambulação. Moore (1992) ressaltou que apesar da observação cuidadosa da ambulação fornecer informações importantes sobre a existência de alterações neurológicas, algumas vezes as anormalidades visualizadas podem ser bem sutis e subjetivas, e que a aplicação de outros testes neurológicos podem ajudar a percebê-las.

Foi verificado que o teste utilizando a barra possibilita detectar déficits mínimos que não são visualizados no andar em campo aberto, condizente com as observações de Farooque (2000). O caminhar na barra foi eficiente para avaliar a melhora funcional do animal. Von Euler et al. (1996) e Farooque (2000) afirmaram também que esse teste permite avaliar a eficiência de diferentes estratégias de tratamento e tem grande correlação com as alterações neurológicas microscópicas. O teste

da barra é muito sensível, mesmo para pequenas lesões tromboembólicas que acometem apenas a região dorsal da medula e possui a vantagem de ter uma escala gradual objetiva (Von Euler et al., 1996).

Para a variável capacidade motora todos os grupos apresentaram respostas médias iguais ao grupo controle nos 12 dias de avaliação. Vale ressaltar que o grupo E, que iniciou tardiamente o protocolo com prednisona, teve o melhor desempenho se for considerado 10% como nível de significância (Tab.2). Pela figura 3 pode-se observar que no início das avaliações os animais do grupo E tinham escores menores do que os outros grupos, mas ao final da avaliação esses escores se tornaram superiores. Esse resultado sugere um possível efeito benéfico da prednisona utilizada 120 horas após lesões medulares agudas, entrando em contradição com autores que relatam que a utilização de corticóides após oito horas (Meintjes et al., 1996; Bergman et al., 2000b) ou 24 horas (Yang et al., 2003) teria efeito deletério na recuperação neurológica.

Tabela 2 – Modelos de regressão ajustados para capacidade motora (CM), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 91,93\%$, p-valor $< 0,0001$ para o teste F do modelo completo com 9 e 50 graus de liberdade, $F = 63,31$.

Grupos	CM = $\alpha + \beta_1 \cdot \text{dia}$	
	α	β_1
A	2,050	0,194
B	=	=
C	=	=
D	=	=
E	1,003 ^{7,2%}	0,251 ^{5,6%}

O símbolo de igualdade (=) na célula da tabela indica que o teste t não rejeitou (p-valor $> 0,05$) a hipótese de igualdade entre os parâmetros do modelo com o do grupo controle (A). Estimativas foram apresentadas somente quando o teste indicou diferença significativa.

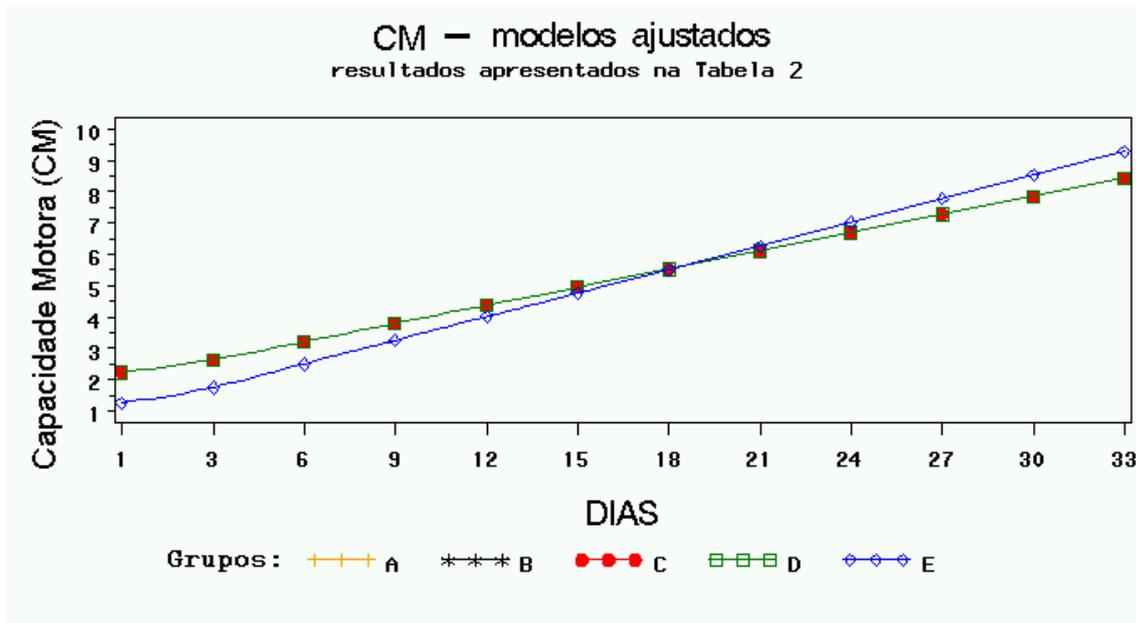


Figura 3 - Se for adotado 10% como nível de significância, o grupo E teria uma resposta aproximada significativamente diferente do controle. Note que no gráfico os grupos A, B, C e D estão fundidos em uma mesma linha enquanto o grupo E se destaca dos demais, nesse grupo os escores iniciais são inferiores e os finais superiores.

Após a lesão medular experimental todos os animais apresentaram déficit proprioceptivo, e nenhum recuperou totalmente essa função. Mesmo os quatro animais que atingiram escore máximo nos testes do CM e PI, ainda apresentavam déficit proprioceptivo e de localização ao final do experimento, condizente com Moore, 1992; Thomas, 2000 e Fossum, 2002 que afirmaram que a propriocepção é afetada logo no início das doenças neurológicas e que na recuperação ela é o último parâmetro a recuperar a normalidade.

Na avaliação do posicionamento proprioceptivo os grupos A, C e E apresentaram modelos ajustados idênticos (Tab.3), o que permite concluir que as respostas médias aproximadas foram iguais nos 12 dias avaliados. Quanto às respostas aproximadas, o modelo ajustado para o tratamento B apresentou somente uma constante de regressão (α) diferente do controle. Já o tratamento D apresentou uma resposta estatisticamente diferente do controle.

Nesse mesmo teste, o grupo D teve recuperação melhor do que os demais grupos (Fig.4), apontando uma possível ação benéfica da prednisona quando utilizada 48 horas após a injúria. Assim como no teste da capacidade

motora, não era previsto que um grupo com início tardio do tratamento tivesse uma recuperação neurológica melhor do que os grupos que iniciaram o tratamento mais cedo. Esse resultado não era esperado, pois segundo Kraus (1996), Bagley et al. (1999), Bagley (2000), Bergman et al. (2000b), Lu et al. (2000), Bondy e Cohn (2002a) e Lee et al. (2005) os corticóides só teriam efeito benéfico na reabilitação quando utilizados até oito horas após o trauma. Essa ocorrência talvez possa ser atribuída à diferença individual entre os animais e ao pequeno número de animais em cada grupo.

Tabela 3 – Modelos de regressão ajustados para posicionamento proprioceptivo (PP), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 93,55\%$, p-valor < 0,0001 para o teste F do modelo completo com 14 e 45 graus de liberdade, $F = 46,66$.

Grupos	$PP = \alpha + \beta_1 \cdot dia + \beta_2 \cdot dia^2$		
	α	β_1	β_2
A	-0,158	0,085	-0,002
B	=	=	=
C	=	=	=
D	0,206	0,051	0,001
E	=	=	=

O símbolo de igualdade (=) na célula da tabela indica que o teste t não rejeitou (p-valor > 0,05) a hipótese de igualdade entre os parâmetros do modelo com o do grupo controle (A). Estimativas foram apresentadas somente quando o teste indicou diferença significativa.

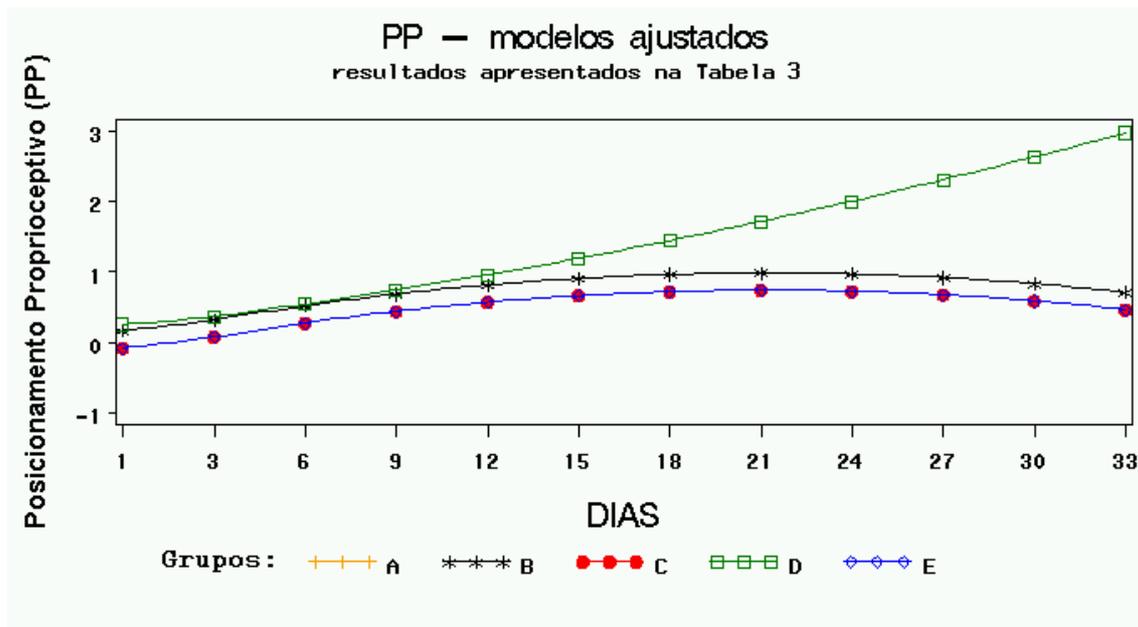


Figura 4 - Pelo gráfico observa-se que os grupos A, C e E apresentaram modelos ajustados idênticos e estão representados por uma única linha. O modelo ajustado para o grupo B apresentou somente uma constante diferente do controle, já o grupo D apresentou uma resposta estatisticamente diferente do controle.

Pelos resultados do reflexo de localização apresentados na Tabela 4 verificou-se que os grupos B e D apresentaram uma resposta média igual ao controle, a resposta do grupo E diferiu apenas por uma constante, enquanto o grupo C apresentou uma resposta estatisticamente diferente. Pela figura 5 pode-se observar a resposta do grupo E com incremento linear igual aos grupos A, B e D (retas paralelas), enquanto o grupo C, que tem os menores escores no início das observações, termina com escores superiores aos demais grupos.

Os ratos do grupo C tiveram o melhor desempenho neste teste sugerindo um potencial efeito benéfico da prednisona iniciada 24 horas após a lesão. Contradizendo os autores consultados (Means, 1981; Young e Flamm, 1982; Hoerlein et al., 1985; Braund et al., 1990a; Shores, 1992; Meintjes et al., 1996; Von Euler et al., 1996; Bagley et al., 1999; Jeffery e Blakemore, 1999b; Bagley, 2000; Lu et al., 2000; Yang et al., 2003) que indicam que deve-se utilizar os corticóides o mais rápido possível

após a injúria para se obter um maior efeito benéfico.

De acordo com Von Euler et al. (1996) o reflexo de localização é altamente correlacionado com as alterações morfológicas microscópicas encontradas após lesão medular experimental fotoquimicamente induzida. Esse reflexo testa o posicionamento tátil, e uma resposta diminuída ou ausente sugere lesão no trajeto sensorial (Fossum, 2002) ou no neurônio motor inferior (Moore, 1992).

Tabela 4 – Modelos de regressão ajustados para reflexo de localização (LC), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 85,09\%$, p-valor < 0,0001 para o teste F do modelo completo com 9 e 50 graus de liberdade, $F = 31,70$.

Tratamentos	LC = $\alpha + \beta_1 \cdot \text{dia}$	
	α	β_1
A	0,006	0,033
B	=	=
C	-0,363	0,051
D	=	=
E	-0,300	=

O símbolo de igualdade (=) na célula da tabela indica que o teste t não rejeitou (p-valor > 0,05) a hipótese de igualdade entre os parâmetros do modelo com o do grupo controle (A).

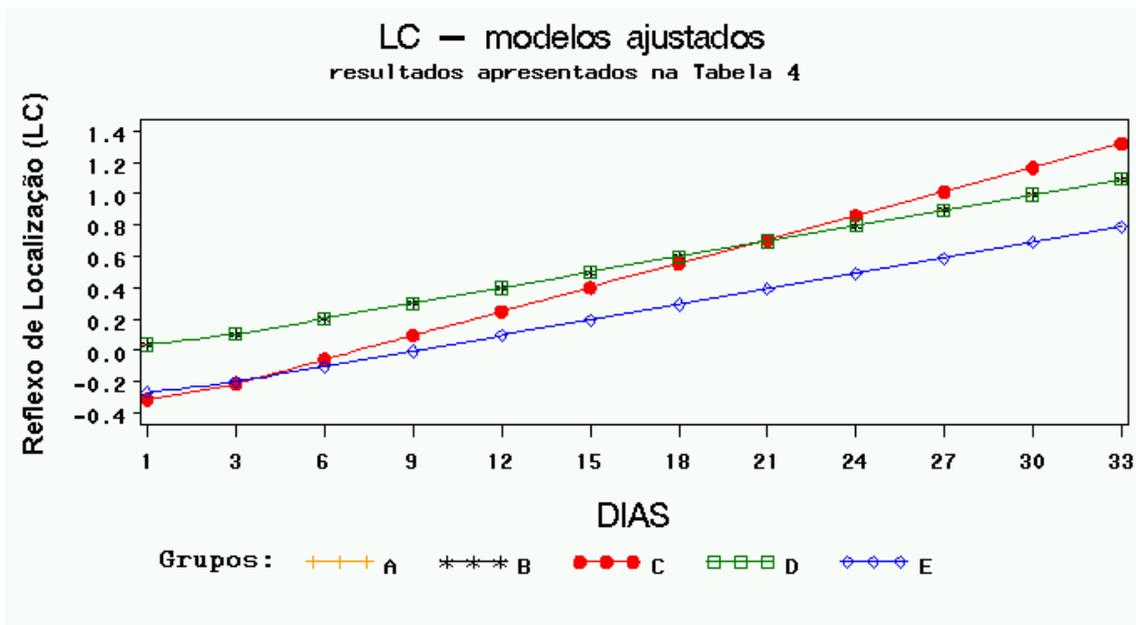


Figura 5 - Pelo gráfico verifica-se que os grupos B e D apresentaram uma resposta média igual ao controle (A), sendo os três representados pela mesma linha. A resposta do grupo E diferiu apenas por uma constante, porém com igual incremento linear (retas paralelas), já o grupo C apresentou uma resposta estatisticamente diferente. Observe que o grupo C no início tem os menores escores e termina com os escores superiores.

O teste do plano inclinado, desenvolvido por Rivlin e Tator (1977), é amplamente utilizado para avaliação do trauma medular (Von Euler et al., 1996). Nesse teste os tratamentos evoluíram de modo semelhante ao longo do tempo, somente a resposta média do tratamento B se diferiu do A por um termo constante, mas sem diferença na evolução (Tab.5). Pela figura 6 pode-se perceber que apesar dos animais do grupo B terem escores maiores desde o início do teste, a recuperação foi semelhante.

Segundo Rivlin e Tator (1977), esse teste ajuda a detectar pequenas alterações que não podem ser visualizadas facilmente no caminhar, que muitas vezes parece normal em animais inferiores com lesões medulares de pouca intensidade. Contudo, foi observado que a maioria dos animais conseguiu permanecer no mesmo ângulo de antes da cirurgia sem deambular normalmente, apenas cinco animais andavam normal antes de atingirem o escore máximo nesse teste. Talvez esse achado possa

ser explicado pelo fato de ter se utilizado uma variação de 10 graus entre os ângulos, enquanto Rivlin e Tator fizeram avaliações a cada cinco graus. Mas Von Euler et al. (1996) consideraram que a diferença de ângulo entre os ratos normais e os com lesões intensas é muito pequena, apenas cerca de 25°, o que dificulta as correlações.

Tabela 5 – Modelos de regressão ajustados para plano inclinado (PI), com respectivos testes de igualdade dos parâmetros, para os grupos B, C, D e E comparados com A. $R^2 = 70,19\%$, $p\text{-valor} < 0,0001$ para o teste F do modelo completo com 9 e 50 graus de liberdade, $F = 13,08$.

Grupos	PI = $\alpha + \beta_1 \cdot \text{dia}$	
	α	β_1
A	3,134	0,030
B	3,548	=
C	=	=
D	=	=
E	=	=

O símbolo de igualdade (=) na célula da tabela indica que o teste t não rejeitou ($p\text{-valor} > 0,05$) a hipótese de igualdade entre os parâmetros do modelo com o do grupo controle (A). Estimativas foram apresentadas somente quando o teste indicou diferença significativa.

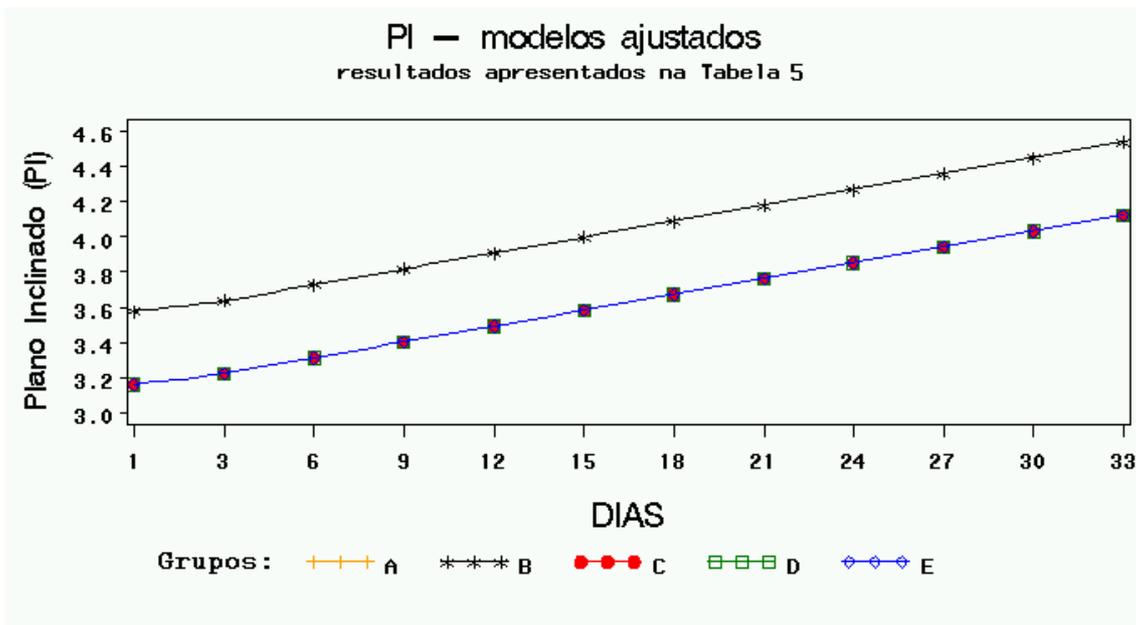


Figura 6 - Visualiza-se pelo gráfico que o grupo B diferiu dos demais grupos, representados por uma única linha, apenas por uma constante, ele iniciou e terminou com escores mais altos, mas com incremento linear igual ao dos outros grupos (retas paralelas).

A sensibilidade dolorosa se manteve inalterada durante todo o experimento em todos os animais e por esse motivo não foi necessário submetê-la à análise estatística. Esse fato era esperado e desejado, pois objetivou-se provocar uma lesão medular moderada e reversível. Segundo Thomas (2000) e Fossum (2002) a percepção dolorosa profunda constitui o teste prognóstico mais importante do exame neurológico e constitui um indicador confiável da integridade da medula. Moore (1992) e Bergman et al. (2000a) concordam que é necessário um trauma bem grave na medula espinhal para interromper a sensação de dor profunda e que quando isso ocorre o prognóstico é desfavorável. Esses dados estão condizentes com os resultados encontrados, pois nenhum animal teve perda da dor profunda, e todos eles tiveram alguma recuperação neurológica.

Os corticóides devem ser utilizados o mais rápido possível após o trauma. É motivo de controvérsia que seu uso após oito horas da lesão teria efeito deletério na recuperação neurológica (Kraus, 1996; Meintjes et al., 1996; Von Euler et al., 1996; Bergman et al., 2000b). Era esperado que o grupo B, que iniciou o tratamento mais rapidamente após o trauma, tivesse o melhor desempenho, entretanto isso não ocorreu, todos os grupos tiveram evolução igual ao longo do tempo. Não foi verificada

correlação entre os testes, pois em cada teste um grupo teve a melhor resposta. Mas apesar disso, cada um dos grupos que iniciou tardiamente o tratamento, após 24, 48 ou 120 horas teve a melhor performance em um teste, respectivamente localização, propriocepção e plano inclinado; enquanto o grupo controle e o grupo B, que iniciou o protocolo com oito horas, não se destacaram em nenhum teste. Esses resultados corroboram os indícios de que a prednisona administrada após 24, 48 ou 120 horas da lesão não prejudica a recuperação neurológica.

Os resultados encontrados na avaliação neurológica e a falta de correlação entre os diferentes testes indicam que não houve um grupo que se sobressaiu dos demais. Essa recuperação semelhante em todos os animais fornece indícios de que o tratamento não interferiu com o restabelecimento. De acordo com Jeffery e Blackmore (1999a) quando a lesão medular não é grave o suficiente para causar alterações permanentes, pode ocorrer recuperação espontânea, e que isso pode ser observado também no tratamento placebo ou conservativo após uma lesão experimental aguda. Nesse caso os animais recuperariam suas funções com ou sem tratamento, ficando sujeito apenas às alterações individuais.

Em todos os animais foram encontradas alterações microscópicas semelhantes com intensidades diferentes sem, contudo, notar uma predominância de lesões mais ou menos intensas em determinado grupo. O método de fixação da medula com paraformoldeído a 4% por 30 dias não foi eficiente, determinando dissolução do material, dificultando o seu processamento, e algumas vezes causando artefatos que alteraram a morfologia histológica do corte.

Observou-se em todas as lâminas degeneração axonal discreta a intensa em uma ou mais raízes nervosas (Fig.7A e B). Na maioria dos animais, independente do grupo, a medula espinhal apresentava cavitação contendo células de Gitter, gliócitos reativos, células inflamatórias mononucleares e vasos sanguíneos neoformados (Fig.7C e D). A extensão da área de necrose variou desde um pequeno foco até a ocupação de cerca de um terço da medula, sendo que muitas vezes o acometimento foi mais intenso de um dos lados. Sempre houve o envolvimento das duas substâncias, sendo que a cinzenta foi a principal afetada em extensão e intensidade, o que já foi citado por Rivlin e Tator (1979); Shores (1992); Summers et al. (1995); Kraus (1996); Li et al. (1996); Tator e Koyanagi (1997); Taoka e Okajima (1998); Bagley et al. (1999); Jeffery e Blakemore (1999b); Bagley (2000); Bergman et al. (2000a) e Mallei et al. (2005) quando relatam que essa substância é mais sensível ao trauma agudo, sendo a principal afetada nesse tipo de injúria.

Apesar da substância cinzenta ter sido a principal afetada nesse trauma (Rivlin e Tator, 1979; Summers et al., 1995; Li et al., 1996; Bagley et al., 1999; Bagley, 2000; Bergman et al., 2000a e Mallei et al., 2005), a recuperação da locomoção provavelmente se deveu ao fato da lesão ter ocorrido em T12 ou T13, uma área onde essa substância não é essencial para a inervação dos membros (Moore, 1992; Kraus, 1996; Jeffery e Blackmore, 1999a). Nessa região, o acometimento da substância branca é mais prejudicial à função motora por interferir com a condução do impulso a partir de estruturas supraespinhais (Moore, 1992; Jeffery e Blackmore, 1999b).

Não foi encontrada necrose em um animal do grupo A, um animal do grupo D, dois animais

dos grupos B, dois do grupo C e dois do grupo E. Entretanto, essas lâminas continham pouco material devido ao problema da fixação prejudicando suas interpretações.

Os resultados encontrados na histologia estão de acordo com Janssens (1991) que relata que a fagocitose que começa poucos dias após a lesão resulta na formação de cavidades, e que uma semana após o trauma todas as células da área necrótica contêm citoplasmas com aspecto espumoso. Os achados histológicos também condizem com Lu et al. (2000) que afirmaram que a lesão resultante de diferentes tipos de trauma medular agudo é freqüentemente similar, com cavitações da substância cinzenta e acometimento variável do tecido periférico. E que a extensão em que ocorre morte celular de neurônios e da glia durante os eventos secundários é responsável pela formação de cavitações.

Portanto, não foram observadas diferenças histológicas entre os grupos, o que inviabilizou determinar se a administração de altas doses de prednisona, em diferentes tempos, promoveu alterações morfológicas distintas na medula espinhal após o trauma. Esta impossibilidade pode ter sido decorrente da falha na fixação do material.

6. CONCLUSÕES

O modelo de lesão medular experimental compressiva aguda apresentado nesse estudo é eficaz para produzir dano à medula espinhal, com paraplegia moderada e reversível.

A intensidade da lesão medular produzida com o aparelho estereotáxico apresentado pode variar de acordo com o tempo e/ou peso utilizados.

A utilização de altas doses de prednisona em lesão medular aguda experimental não teve efeito diferenciado com o tempo em que foi administrada, sendo que a administração tardia não teve efeito prejudicial na recuperação neurológica.

A ocorrência de recuperação espontânea em ratos com lesões medulares moderadas dificulta a avaliação do efeito do tratamento.

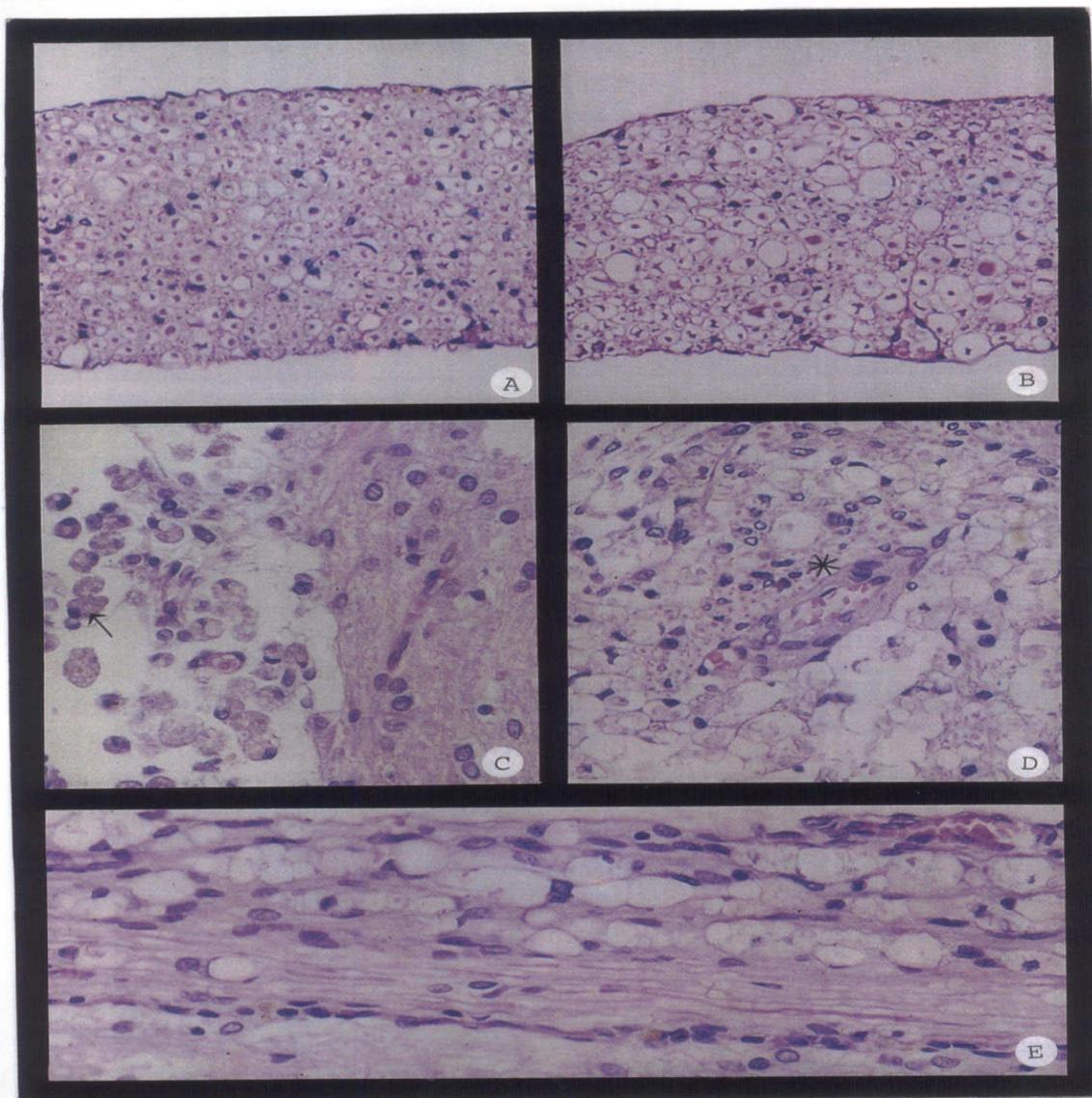


Figura 7 - A e B - Fotomicrografias de raízes nervosas ventrais em cortes transversais corados por H-E, 100x. Degenerações axonais A)Discreta a B)acentuada. C, D e E - Fotomicrografias de medulas espinhais em cortes longitudinais (C e E) e transversal (D) corados por H-E, 100x. C) Células de Gitter (seta) em foco necrótico. D) Microgliócitos reativos, células inflamatórias mononucleares e vasos sangüíneos neoformados em cavitação (asterisco). E) Degeneração intensa do neurópilo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBRÓSIO, A.M.; FANTONI, D.T.; MIGLIAT, E.R. Síndrome da isquemia e reperfusão em cães: revisão de literatura. *Clínica Veterinária*, n.24, p.34-38, 2000.

ANDRADE, M.M.J. Antiinflamatórios esteróides. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNADI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.22, p.224-239.

ARAÚJO, I.S. Presence of free radicals in spinal cord injury. Experimental evidence in rats. *Revista Brasileira de Neurologia*, v.41, n.1, p.23-29, 2005.

BAGLEY, R.S.; HARRINGTON, M.L.; SILVER, G.M. et al. Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. *Compendium: Small Animal/Exotics*, v.21, n.12, p.1138-1144, 1999.

BAGLEY, R.S. Spinal fracture or luxation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.30, n.1, p.133-153, 2000.

BAGLEY, R.S.; SILVER, G.M.; CONNORS, R.L. et al. Exogenous spinal trauma: surgical therapy and aftercare. *Compendium: Small Animal/Exotics*, v.22, n.3, p.218-229, 2000.

BEATTIE, M.S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *TRENDS in Molecular Medicine*, v.10, n.12, p.580-583, 2004.

BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. *Veterinary Medicine*, v.95, n.11, p.846-849, 2000a.

BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. *Veterinary Medicine*, v.95, n.11, p.855-866, 2000b.

BONDY, P.J.; COHN, L.A. Choosing an appropriate glucocorticoid treatment plan. *Veterinary Medicine*, v.97, n.11, p.841-849, 2002a.

BONDY, P.J.; COHN, L.A. Physiological effects and pharmacologic considerations of glucocorticoids. *Veterinary Medicine*, v.97, n.11, p.836-839, 2002b.

BRACKEN, M.B.; COLLINS, W.F.; FREEMAN, D.F. et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *The Journal of the American Medical Association*, v.251, p.45-52, 1984.

BRAUND, K.G.; SHORES, A.; BRAWNER, W.R. Recovering from spinal cord trauma: the rehabilitative steps, complications, and prognosis. *Veterinary Medicine*, v.85, p.740-743, 1990a.

BRAUND, K.G.; SHORES, A.; BRAWNER, W.R. The etiology, pathology, and pathophysiology of acute spinal cord trauma. *Veterinary Medicine*, v.85, p.684-691, 1990b.

BROWN, S.A.; HALL, E.D. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *The Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.200, n. 12, p.1849-1858, 1992.

CARLSON, G.D.; GORDEN, C.D.; NAKAZOWA, S. et al. Perfusion-limited recovery of evoked potential function after spinal cord injury. *Spine*, v.25, n.10, p.1218-1226, 2000.

COLTER, S.; RUCKER, N. C. Acute injury to the central nervous system. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.18, n.3, p.545-563, 1988.

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

CUNNINGHAM, M.G.; DONALDS, R.A.; SCOUTEN, C.W. et al. A versatile, low-cost adaptor for stereotaxic and electrophysiologic spinal preparations in juvenile and adult rodents. *Brain Research Bulletin*, v.68, p.157-162, 2005.

DELAMARTER, R. B.; SHERMAN, J.; CARR, J. B. Pathophysiology of spinal cord

- injury. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.77, n.7, p.1042-1049, 1995.
- DOHRMANN, G.J. Experimental spinal cord trauma. *Archives of Neurology*, v.27, p.468-473, 1972.
- DUCKER, T.B.; HAMIT, H.F. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, v.30, p.693-697, 1969.
- ENGELHARDT, E. O sistema glutamatérgico e desordens neuropsiquiátricas: aspectos básicos. *Revista Brasileira de Neurologia*, v.39, n.2, p.5-19, 2003.
- FADEN, A.I.; JACOBS, T.P.; PATRICK, D.H. et al. Megadose corticosteroid therapy following experimental traumatic spinal injury. *Journal of Neurosurgery*, v.60, p.712-716, 1984.
- FAROOQUE, M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta of Neuropathology*, v.100, p.13-22, 2000.
- FORD, R.W.J. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *Journal of Neurosurgery*, v.59, p.268-275, 1983.
- FOSSUM, T.W. Fundamentos de neurocirurgia. In: ___. *Cirurgia de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Roca, 2002. cap.33, p.1139-1158.
- GERNDT, S.J.; RODRIGUEZ, J.L.; PAWLIK, J.W. et al. Consequences of high-dose steroid therapy for acute spinal cord injury. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, v. 42, n.2, p.279-284, 1997.
- HEDEMAN, L.S.; SIL, R. Studies in experimental spinal cord trauma. Part 2: comparison of treatment with steroids, low molecular weight dextran, and catecholamine blockade. *Journal of Neurosurgery*, v.40, p.44-51, 1974.
- HOERLEIN, B. F. General spinal disorders. In: ___. *Canine Neurology: Diagnosis and Treatment*. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders company, 1971, cap.10, p.233-302.
- HOERLEIN, B.F.; REDDING, R.W.; HOFF, E.J. et al. Evaluation of dexamethasone, DMSO, mannitol and solcoseryl in acute spinal cord trauma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.19, p.216-226, 1983.
- HOERLEIN, B.F.; REDDING, R.W.; HOFF, E.J. et al. Evaluation of naloxone, crocetin, thyrotropin releasing hormone, methylprednisolone, partial myelotomy, and hemilaminectomy in the treatment of acute spinal cord trauma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.21, p.67-77, 1985.
- JANSSENS, L.A.A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. *Journal of Small Animal Practices*, v.32, p.572-578, 1991.
- JEFFERY, N.D.; BLAKEMORE, W.F. Spinal cord injury in small animals 1. Mechanisms of spontaneous recovery. *Veterinary Record*, v.144, p.407-413, 1999a.
- JEFFERY, N.D.; BLAKEMORE, W.F. Spinal cord injury in small animals 2. Current and future options for therapy. *Veterinary Record*, v.145, p.183-190, 1999b.
- KORNEGAY, J. N. Patogênese das afecções do sistema nervosa central. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 2.ed. São Paulo: Manole, 1998. v.1, cap.71, p.1231-1249.
- KRAUS, K.H. The pathophysiology of spinal cord injury and its clinical implications. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, v.11, n.4, p.201-207, 1996.
- LANZ, O.; BERGMAN, R.; SHELL, L. Initial assessment of patients with spinal cord trauma. *Veterinary Medicine*, v.95, n.11, p.851-853, 2000.
- LEE, B.H.; LEE, K.H.; YOON, D.H. et al. Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord rats. *The Journal of Korean Medical Science*, n.20, p.132-138, 2005.
- LEONARD, E.; KIRBY, R. The role of glutamate, calcium and magnesium in secondary brain injury. *Journal of Veterinary*

Emergency and Critical Care, v.12, n.1, p.17-32, 2002.

LI, G.L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M. et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v.55, p.280-289, 1996.

LU, J.; ASHWELL, K.W.S.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine*, v.25, n.14, p.1859-1866, 2000.

MA, M.; BASSO, D.M.; WALTERS, P. et al. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57Bl/6 mouse. *Experimental Neurology*, v.169, p.239-254, 2001.

MALLEI, A.; ADEN, S.A.; BACHIS, A. et al. The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. *Brain Research*, v.1062, p.16-25, 2005.

MCDONALD, R.K.; LANGSTON, V.C. Uso de corticóides e medicamentos antiinflamatórios não esteróides. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997, v.1, p.406-418.

MEANS, E.D.; ANDERSON, D.K.; WATERS, T.R. et al. Effect of methylprednisone in compression trauma to the feline spinal cord. *Journal of Neurosurgery*, v.55, p.200-208, 1981.

MEINTJES, E.; HOSGOOD, G.; DANILOFF, J. Pharmaceutic treatment of acute spinal cord trauma. *Compendium of Continued Education in Practical Veterinary*, v.18, n.6, p.625-635, 1996.

MEYER, F.; VIALLE, L.R.; VIALLE, E.N. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, n.3, p.203-208, 2003.

MOORE, M.P. Approach to the patient with spinal disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.22, n.4, p.751-781, 1992.

PANJABI, M.M.; WRATHALL, J.R. Biomechanical analysis of experimental spinal cord injury and functional loss. *Spine*, v.13, n.12, p.1365-1370, 1988.

RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery*, v.47, p.577-581, 1977.

RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Effect of vasodilators and myelotomy on recovery after acute spinal cord injury in rats. *Journal of Neurosurgery*, v.50, p.349-352, 1979.

ROUSSOS, I.; RODRÍGUEZ, M.; VILLÁN, D. et al. Development of a rat model of spinal cord injury and cellular transplantation. *Transplantation Proceedings*, v.37, p.4127-4130, 2005.

RUCKER, N. C.; LUMB, W. V.; SCOTT, R. J. Combined pharmacologic and surgical treatments for acute spinal cord trauma. *American Journal of Veterinary Research*, v.42, n.7, p.1138-1142, 1981.

SCHRAMM, J.; HASHIZUME, K.; FUKUSHIMA, T. et al. Experimental spinal cord injury produced by slow, graded compression. *Journal of Neurosurgery*, v.50, p.48-57, 1979.

SHARP, N.J.H.; THOMAS, W.B. How do I treat? Spinal fracture due to external trauma. *Progress in Veterinary Neurology*, v.7, n.1, p.29-32, 1996.

SHORES, A.; BRAUND, K.G.; BRAUNER, W.R. Management of acute spinal cord trauma. *Veterinary Medicine*, v.85, p.724-739, 1990.

SHORES, A. Spinal trauma: pathophysiology and management of traumatic spinal injuries. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.22, n.4, p.859-887, 1992.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DeLAHUNTA, A. Injuries to the central nervous system. In: ____. *Veterinary Neuropathology*. St. Louis: Ed. Mosby, 1995. cap.4, p.189-207.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiology*, v.56, p.341-358, 1998.

TARLOV, M.; KLINGER, H.; VITALE, S. Spinal cord compression studies: 1. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *Archives of Neurology and Psychiatry*. v.70, p.813-819, 1953.

TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*, v.75, p.15-26, 1991.

TATOR, C.H.; KOYANAGI, I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, v.86, p.483-492, 1997.

THOMAS, W.B. Initial assessment of patients with neurologic dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.30, n.1, p.1-23, 2000.

VON EULER, M.; AKESSON, E.; SAMUELSSON, E. B. 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.

YANG, J.W.; JEONG, S.M.; SEO, K.M. et al. Effects of corticosteroid and electroacupuncture on experimental spinal cord injury in dogs. *Journal of Veterinary Science*, v.4, n.1, p.97-101, 2003.

YOUNG, W.; FLAMM, E.S. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *Journal of Neurosurgery*, v.57, p.667-673, 1982.