

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**EFEITOS DO DANTROLENE SÓDICO**  
**EM RATOS ADULTOS COM**  
**TRAUMA MEDULAR AGUDO EXPERIMENTAL**

**BRUNO BENETTI JUNTA TORRES**

**Belo Horizonte**  
**2008**

BRUNO BENETTI JUNTA TORRES

**EFEITOS DO DANTROLENE SÓDICO  
EM RATOS ADULTOS COM  
TRAUMA MEDULAR AGUDO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.  
Área de concentração: Ciência Animal.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2008

T693e Torres, Bruno Benetti Junta, 1981-  
Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular  
agudo experimental / Bruno Benetti Junta Torres. – 2008.  
84p. : 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. Traumatismos da  
medula espinhal – Teses. 3. Neurologia – Teses. 4. Medicamentos –  
Administração – Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 616.8

Dissertação defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

---

Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo  
Presidente

---

Profa. Dra. Cleuza Maria de Faria Rezende

---

Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho

---

Profa. Dra. Rogéria Serakides

---

Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid

À minha família, à minha amada e doce Karen  
e à todos aqueles que participaram, de alguma forma,  
de mais essa etapa em minha vida...

...dedico.

*Conhecimento não divulgado  
É como palco com cortina fechada;  
Como rádio sem som;  
Como um quadro num quarto escuro;  
Como céu sem estrelas.*

(Livis Dzelve)

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo à força maior que rege o equilíbrio de nossas vidas neste mundo.

Aos meus pais, sequer existiriam palavras para descrever minha eterna gratidão pelo apoio, paciência e persistência em estimular e acreditar, juntos comigo, que posso ir sempre adiante, até onde meus pés permitirem e meus sonhos alcançarem. José Luís, Rita e Denise: eu amo vocês!

À professora Eliane Gonçalves de Melo, pela orientação, competência, paciência, pelos ensinamentos, amizade e confiança em mim depositados. À você meu muito obrigado!

Minha querida Karen, companheira, sempre compreensiva e paciente, meu braço direito (e esquerdo também!). Obrigado por suportar e dividir comigo toda angústia dos momentos de preocupação no transcorrer desse trabalho. Obrigado por fazer meu dia mais feliz! Sem seu apoio moral, emocional, sem seu amor incondicional, eu não teria conseguido... Eu te amo!

Aos meus amigos Iuri, Renato, Diego, Mauro, aos amigos de Lavras e Santo André e, principalmente, ao Endrigo, incentivador e confidente de bons e nem tão bons momentos. Além dos conselhos, sem as ocasiões de alívio de tensão e curtição nas raras horas vagas, não teria chegado até aqui com tamanha disposição. À vocês minha admiração.

À República Zona Rural (Lavras) sempre acolhedora, meus companheiros, aos antigos e novos integrantes, em especial ao Gambazão pela diversão e simplicidade de encarar a vida e Zé Walter pela “truculência pacífica” de sempre. Carminha, Januzia, Dada e Gi vocês fazem parte dessa conquista.

Aos novos amigos conquistados nessa etapa, principalmente à Fátima, Mel e Fabíola, importantes em todos os momentos, sempre dispostas a ajudar e superar os percalços. Aos colegas da ANCLIVEPA-MG, que estiveram presentes nesses dois anos de trabalho. Também ao amigo e incentivador Sandro Alex Stefanos.

Ao professor Falcão pela engenhosidade e genialidade de transformar “sucata” em aparatos tecnicamente aproveitáveis para o desenvolvimento da ciência. Um exemplo a ser seguido.

À Sofia, Fátima e Karen pela ajuda nos cuidados aos ratinhos do experimento, certamente seu carinho e dedicação tornaram os dias deles menos fatigantes.

À Mel e à Marilene pelo auxílio no processamento do material histopatológico. À professora Rogéria Serakides pelo auxílio na leitura histopatológica das bexigas, à Aline Viott e professora Milene Alvarenga Rachid pela leitura histopatológica das medulas, e aos professores Anilton e Luciana do ICB e Gustavo Bregunci pelo apoio nas imunoistoquímicas. Obrigado pela disposição e prestatividade, seus aconselhamentos foram mais que oportunos.

Gostaria de expressar minha sincera e especial gratidão à Mel por suas assistências técnicas, científicas e esforços muito além de suas obrigações, mas acima de tudo isso, por sua nobreza, por sua amizade, pelos momentos que quisemos chorar e ela nos fez sorrir.

Ao brilhante estatístico e amigo Renato de Abreu Faria, pelos conhecimentos compartilhados e análises estatísticas.

Agradeço aos demais professores, colegas veterinários, residentes, pós-graduandos e funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, sem seu apoio esse trabalho não teria sido possível.

Aos professores Cleuza Maria de Faria Rezende, João Guilherme Padilha Filho, Rogéria Serakides e Milene Alvarenga Rachid, que compõem a banca de defesa, pela contribuição inestimável para conclusão e aprimoramento desse trabalho.

Considerando que ciência não se difunde sozinha, gostaria de demonstrar minha eterna gratidão aos mestres e incentivadores, de ontem de hoje e de sempre, professores Mauro dos Santos de Carvalho, Leonardo Augusto Lopes Muzzi, Rodrigo Bernardes Nogueira, João Guilherme Padilha Filho, Antônio Navarro Alberola (Murcia), Eliane Gonçalves de Melo, Cleuza Maria de Faria Rezende, Geraldo Eleno da Silveira Alves, Rogéria Serakides. Minha admiração e idolatria pelos profissionais e pessoas que são.

À todos os animais, em especial ao Arthus, à Dolly e aos ratinhos do experimento. Assim como eles, não tenho palavras para expressar minha profunda gratidão. Pudera eu com apenas um olhar, como o de um cão para seu dono, demonstrar minha eterna admiração e paixão pelo bem que os animais exercem sobre minha vida. Arthus, dentre todos os melhores cães do mundo, você é o melhor cão que eu poderia querer! Que isso fique aqui registrado, meu eterno e incomparável companheiro.

Agradeço a parceria da Empresa Cristália Ltda. que acreditou em nossa equipe de pesquisa, em nosso projeto e gentilmente nos concedeu o fármaco Dantrolene, objeto de toda nossa investigação.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPEMIG pelo investimento em nosso projeto de pesquisa.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b> .....	17
	<b>ABSTRACT</b> .....	18
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1	FISIOPATOGENIA DO TRAUMA MEDULAR AGUDO.....	21
2.1.1	Eventos Primários.....	21
2.1.2	Eventos Secundários.....	23
2.1.3	Resposta ao Trauma.....	25
2.2	ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES MEDULARES...	26
2.3	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TRAUMA MEDULAR AGUDO.....	28
2.4	ESTUDO EXPERIMENTAL DAS LESÕES MEDULARES.....	33
2.5	TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA EM RATOS.....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	ANIMAIS.....	36
3.2	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	36
3.3	TRATAMENTO.....	37
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	40
3.5	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	42
3.6	AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA SISTÊMICA.....	43
3.7	AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL.....	43
3.8	TUNEL.....	43
3.9	IMUNOISTOQUÍMICA.....	44
<b>4</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	44

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	45
5.2	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	52
5.3	AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA SISTÊMICA.....	55
5.4	AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL.....	63
5.5	TUNEL.....	65
5.6	IMUNOISTOQUÍMICA.....	70
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	74

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b> – Sinais clínicos das síndromes espinhais.....	26
<b>Tabela 2</b> – Grupos experimentais de acordo com protocolo de tratamento instituído e tempo de observação após procedimento cirúrgico.....	40
<b>Tabela 3</b> – Protocolo para avaliação dos testes comportamentais com os respectivos escores para: sensibilidade dolorosa (SD), capacidade motora (CM), posicionamento proprioceptivo (PP), posicionamento tátil (PT) e plano inclinado (PI), conforme Silva et al. (2008).....	42
<b>Tabela 4</b> – P-valores da comparação de resultados entre os grupos para os testes comportamentais de sensibilidade dolorosa (SD), capacidade motora (CM), posicionamentos proprioceptivo (PP) e tátil (PT) e plano inclinado (PI). (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Com 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ), os p-valores marcados em vermelho apresentam diferença significativa.....	46

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1** – Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. A) Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa adaptada para a realização da técnica cirúrgica. Anestesia por meio de máscara em sistema semi-aberto; B) Aparelho estereotáxico: bandeja com bolha de nível (seta preta), haste compressiva (seta branca) e mesa cirúrgica (asterisco); C) Campo cirúrgico com identificação dos processos espinhosos (seta); D) Visibilização da medula espinhal com aspecto normal após laminectomia dorsal (ponta da pinça). E) Procedimento de compressão da medula espinhal com peso de 70,5g..... 39
- Figura 2** – Fotografias da avaliação neurológica por meio dos testes comportamentais (A, B, C, D e E) e sinais clínicos (F, G e H) após trauma medular agudo em ratos Wistar. A) Beliscamento da prega interdigital para avaliação da sensibilidade dolorosa; B) Caminhada na barra de madeira para determinação da capacidade motora; C) Avaliação do posicionamento proprioceptivo em animal com déficit; D) Avaliação do posicionamento tátil em animal com déficit; E) Teste do plano inclinado; F) Paraplegia de membros pélvicos; G) Urina liberada (seta) após realização de massagem abdominal para auxiliar o esvaziamento da bexiga; H) Hematúria intensa (seta) decorrente de cistite hemorrágica..... 49
- Figura 3** – Gráfico do teste de Sensibilidade Dolorosa mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = ausente; 1 = diminuída; 2 = normal)..... 50
- Figura 4** – Gráfico do teste de Capacidade Motora mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = nenhum movimento nos membros pélvicos, sem apoio de peso; 1 = movimento sutil, desconexo dos membros pélvicos, sem apoio de peso; 2 = movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso; 3 = apoio de peso nos membros pélvicos, anda com 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 7,7cm; 7 = consegue andar na barra de 6,7cm; 8 = consegue andar na barra de 5,7cm; 9 = consegue andar na barra de 4,7cm; 10 = consegue andar na barra de 3,7cm; 11 = consegue andar na barra de 2,7cm; 12 = consegue andar na barra de 1,7cm)..... 50
- Figura 5** – Gráfico do teste de Posicionamento Proprioceptivo mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = ausente; 1 = diminuída; 2 = normal)..... 51

- Figura 6** – Gráfico do teste de Posicionamento Tátil mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = ausente; 1 = diminuída; 2 = normal)..... 51
- Figura 7** – Gráfico do teste de Plano Inclinado mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 1 = permanece em um ângulo 30° menor do que antes da cirurgia; 2 = permanece em um ângulo 20° menor do que antes da cirurgia; 3 = permanece em um ângulo 10° menor do que antes da cirurgia; 4 = permanece no mesmo ângulo que antes da cirurgia)..... 52
- Figura 8** – Gráficos das médias e desvios padrão dos valores séricos de albumina, bilirrubina total, CK, creatinina, proteínas totais, AST, ALT e uréia de ratos Wistar (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias) ( $p \leq 0,05$ )..... 54
- Figura 9** – Fotografias de bexigas de ratos Wistar à necropsia: aspecto normal (A), 32 horas após o trauma (B e C) e oito dias após o trauma (D, E, F e G). A) Bexiga com aspecto normal (seta) em animal submetido a laminectomia sem trauma medular; B) Intensa distensão vesical, serosa congesta e conteúdo líquido avermelhado em animal do GI (controle positivo - 32 horas); C) Mucosa com áreas multifocais de hemorragia e coágulos (seta) em animal do GIII (dantrolene - 32 horas); D) Distensão vesical com líquido avermelhado e congestão de serosa em animal do GIV (controle positivo - oito dias); E) Nota-se espessamento de parede, mucosa hiperêmica com áreas multifocais de hemorragia, conteúdo turvo e vermelho escuro em animal do GIV; F) Animal do GVI (dantrolene - oito dias) com alterações semelhantes ao GIV, porém menos intensas; G) Grande quantidade de conteúdo líquido vermelho escuro (hematúria) sendo puncionado em animal do GIV..... 57
- Figura 10** – Fotomicroscopias de secções de bexiga de ratos Wistar coradas em H.E. A) Bexiga normal: epitélio de transição (EP), lâmina própria (LP) e túnica muscular (TM). Animal do GII (controle negativo - 32 horas) – 115,3x; B) Bexiga normal de animal do GV (controle negativo - oito dias) – 58,5x; C) Áreas multifocais de hemorragia (h) e infiltrado inflamatório (asterisco) em animal do GI (controle positivo - 32 horas) – 116,6x; D) Áreas multifocais de hemorragia (h) e infiltrado inflamatório (asterisco) em animal do GIII (dantrolene - 32 horas) – 115,6x; E) Infiltrado inflamatório (asterisco) e hemorragia (h) intensos em animal do GIV (controle positivo - oito dias) – 119,5x; F) Bexiga normal em animal do GVI (dantrolene - oito dias) – 59,2x..... 61

- Figura 11** – Gráfico das médias e desvios padrão da porcentagem de hemorragia por campo, em bexiga de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )..... 62
- Figura 12** – Gráfico das médias e desvios padrão da porcentagem de infiltrado inflamatório por campo, em bexiga de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )..... 62
- Figura 13** – Fotomicroscopia de secções transversais da medula espinhal de ratos Wistar coradas em H.E. A) Medula espinhal morfologicamente normal, circundada pelas meninges, dividida em substâncias branca (SB) e cinzenta (SC). A seta indica o canal epidurário. Animal do GII (controle negativo - 32 horas) - 25,7x; B) Medula espinhal normal de animal do GV (controle negativo - oito dias) - 25,4x; C) Epicentro da lesão mostrando áreas multifocais acentuadas de hemorragia (h) e malacia na substância branca e perda da substância cinzenta (asterisco) de animal do GIII (dantrolene - 32 horas) - 24,7x; D) Epicentro da lesão com vários focos de malacia extensa e grave tanto da substância branca como da cinzenta de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 22,1x; E) Degeneração axonal em segmento adjacente ao epicentro de animal do GI (controle positivo - 32 horas) - 23,6x; F) Degeneração axonal em segmento adjacente ao epicentro de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 25,3x..... 67
- Figura 14** – Fotomicroscopias de secções da medula espinhal de ratos Wistar coradas em H.E. (A a F) ou TUNEL (G) mostrando detalhes das lesões medulares. A) Degeneração Walleriana observada em corte longitudinal de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 441,7x; B) Células Gitter (setas) em área de malacia de animal do GVI (dantrolene – oito dias) - 559,4x; C) Degeneração de raiz nervosa dorsal em corte transversal de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 326,8x; D) Gliose e câmara de digestão (asterisco) em área de malacia de animal do GVI (dantrolene – oito dias) - 327,1x; E) Corte transversal de segmento adjacente ao epicentro contendo neurônios com características de apoptose (setas finas) e neurônios íntegros (seta cheia) de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 435,7x; F) Área de malacia em corte transversal apresentando neurônios com características de apoptose (seta fina) e neuroniofagia (seta cheia) de animal do GIV (controle positivo - oito dias)- 285,5x; G) Núcleos de corpos neuronais (setas) com características apoptóticas marcados com TUNEL em corte transversal de segmento adjacente ao epicentro da lesão. Animal do GIV (controle positivo - oito dias)- 368x..... 69
- Figura 15** – Gráfico das médias e desvios padrão do número de corpos neuronais TUNEL-positivos por campo, em medula espinhal de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença

significativa ( $p \leq 0,05$ )..... 70

**Figura 16** – Fotomicroscopias de secções transversais de medula espinhal adjacentes ao epicentro da lesão em ratos Wistar. Imunoistoquímica com anti-NeuN. A) Marcação de núcleos de corpos neuronais íntegros (NeuN-positivos) da substância cinzenta em animal do GII (controle negativo - 32 horas) - 23,5x; B) Marcação de neurônios NeuN-positivos em animal do GV (controle negativo - oito dias) - 26x; C) Marcação discreta de neurônios NeuN-positivos em animal do GI (controle positivo - 32 horas) - 24x; D) Marcação moderada de neurônios NeuN-positivos em animal do GIII (dantrolene - 32 horas) - 21,8x; E) Marcação discreta de neurônios NeuN-positivos em animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 23,9x; F) Marcação de neurônios NeuN-positivos semelhante aos grupos sem lesão. Animal do GVI (dantrolene - oito dias) - 23,3x; G) Detalhe de neurônios NeuN-positivos (setas) com núcleo marcado pelo anticorpo monoclonal anti-NeuN - 374,6x..... 73

**Figura 17** – Gráfico das médias e desvios padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em medula espinhal de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )..... 74

---

## LISTA DE ANEXOS

---

<b>Anexo I</b>	Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).....	85
----------------	---	----

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da administração de dantrolene sódico em ratos com trauma medular agudo experimental. Foram utilizados 46 ratos Wistar, machos com três meses de idade, divididos em seis grupos: GI (controle positivo - 32 horas); GII (controle negativo - 32 horas); GIII (dantrolene - 32 horas); GIV (controle positivo - oito dias); GV (controle negativo - oito dias); GVI (dantrolene - oito dias). Realizou-se laminectomia de T13 em todos os animais, sendo que aqueles dos grupos GI, GIII, GIV e GVI foram também submetidos a trauma medular compressivo, por meio de aparelho estereotáxico, com peso de 70,5g, durante cinco minutos. Uma hora depois, os grupos GIII e GVI receberam 10mg/kg de dantrolene em dose única, por via intraperitoneal, e os grupos GI e GIV, volume equivalente de seu diluente. Foram avaliados sensibilidade dolorosa, capacidade motora, posicionamentos proprioceptivo e tátil, capacidade de se manter em plano inclinado e perfil bioquímico sérico. Após eutanásia, foram coletadas amostras de pele, musculatura esquelética, diafragma, coração, pulmão, fígado, baço, rim e bexiga, e medula espinhal para avaliação histológica. Para avaliar a integridade da medula espinhal foram realizados TUNEL e imunohistoquímica (anti-NeuN). Os animais traumatizados apresentaram paraplegia grave e retenção urinária com cistite hemorrágica. Não foi observada diferença estatística nas avaliações comportamentais nem bioquímicas entre os grupos, porém, aqueles tratados com dantrolene apresentaram menor lesão vesical aos oito dias ( $p \leq 0,05$ ). Em todos os animais submetidos ao trauma medular observou-se malacia nas substâncias branca e cinzenta do epicentro da lesão. Nos segmentos mais íntegros foram observados balões axonais e células Gitter, caracterizando câmaras de digestão. Os animais tratados com dantrolene apresentaram menor quantidade de neurônios TUNEL-positivos, ressaltando seu efeito antiapoptótico, e maior quantidade de NeuN-positivos, 32 horas e oito dias após o trauma ( $p \leq 0,05$ ). Portanto, conclui-se que o dantrolene apresenta efeito protetor na bexiga e na medula espinhal de ratos submetidos a trauma medular agudo.

Palavras-chave: Neurologia, trauma medular agudo, dantrolene, NeuN, TUNEL, rato.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of dantrolene sodium on experimental acute spinal cord injured rats. Were used forty-six male Wistar rats, three months old, randomized in six groups: GI (positive sham - 32 hours); GII (negative sham - 32 hours); GIII (dantrolene - 32 hours); GIV (positive sham - eight days); GV (negative sham - eight days); GVI (dantrolene - eight days). Was performed laminectomy at T13 in all rats, and those of groups GI, GIII, GIV and GVI were also submitted to compressive spinal cord injury, by a stereotaxic equipment, with a weight of 70,5g, during five minutes. One hour later, the groups GIII and GVI received 10mg/kg of dantrolene in a single intraperitoneal injection, and the groups GI and GIV, its diluent equivalent volume. Were evaluated painful sensibility, locomotor capacity, proprioceptive and tactil placing, capacity of keep on inclined plan and seric biochemical profile. After euthanasia, samples of skin, esqueletic muscle, diaphragm, heart, lung, liver, spleen, kidney, bladder, and spinal cord were collected for histological evaluation. To evaluate the spinal cord integrity were performed TUNEL and immunochemistry (anti-NeuN). The traumatized animals showed severe paraplegia and urinary retention with hemorrhagic cystitis. No statistic difference was observed in the behavioral tests or biochemical evaluation among the groups, however, those treated with dantrolene showed the least bladder injury at eight days ( $p \leq 0,05$ ). In all rats submitted to spinal cord injury was observed malacia in white and grey matter of injury epicenter. In the adjacent segments were observed swollen axons and Gitter cells, characterizing digestion chambers. The animals treated with dantrolene showed smaller amount of TUNEL-positive neurons, emphasizing its antiapoptotic effect, and bigger amount of NeuN-positive neurons, at 32 hours and eight days after trauma ( $p \leq 0,05$ ). Therefore, its conclude that dantrolene presents protective effect on bladder and spinal cord of rats submitted to acute spinal cord trauma.

Keywords: Neurology, acute spinal cord injury, dantrolene, NeuN, TUNEL, rat.

## 1 - INTRODUÇÃO

A ocorrência do trauma medular gera perda de vidas, sofrimento humano e repercussões econômicas (Yeziarski, 2005; Fernandez et al., 2006). Na medicina veterinária, as espécies domésticas também estão susceptíveis às lesões medulares, sendo que muitas dessas situações evoluem para a morte ou eutanásia do paciente acometido (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005).

Quando um paciente apresenta-se com trauma agudo da medula espinhal, o tempo é seu maior inimigo. A abordagem terapêutica imediata é primordial para restauração da melhor função neurológica possível, visto que a progressão dos danos teciduais encontra-se quase concluída em 24 horas após a injúria inicial. Portanto, para que um tratamento seja efetivo, ele deve ser instituído neste período (Janssens, 1991).

As consequências do trauma medular são graves e, além da incapacidade locomotora, manifestam-se na perda de controle sensorial, urológico, fecal e sexual (Harkey III et al., 2003; Rosenzweig e McDonald, 2004; Wheeler e Sharp, 2005; Yeziarski, 2005; Ayas et al., 2006; El Masri, 2006; Siddall e Middleton, 2006). O decúbito prolongado e a falta de movimentação desencadeiam anormalidades dos sistemas respiratório, cardiovascular, digestório, imune, tegumentar e musculoesquelético. Essas complicações requerem a devida atenção para que seja possível prolongar e proporcionar uma melhor qualidade de vida ao paciente (Kwon et al., 2005; Yeziarski, 2005; Wuermsler et al., 2007).

O restabelecimento da função neurológica, o controle da dor e o curto período de hospitalização, evitando assim complicações em longo prazo, constituem objetivos a serem alcançados no tratamento da lesão medular. Para tanto, busca-se o incremento do potencial regenerativo dos neurônios

lesados, pela limitação das consequências do dano celular secundário ao trauma inicial, e promoção da plasticidade dos circuitos sobreviventes por meio de procedimentos de reabilitação (Bareyre et al., 2004; Fernandez et al., 2006; Siddall e Middleton, 2006).

Atualmente, os estudos envolvendo a fisiopatologia das injúrias medulares têm se tornado cada vez mais frequentes. Existe um expressivo interesse em reconhecer e entender os mecanismos de degeneração e reparo neuronais, o que pode aumentar as chances de sucesso na recuperação dos pacientes (Dumont et al., 2002).

Diferentes modelos *in vivo* são utilizados para reproduzir lesão medular experimentalmente (Krassioukov et al., 2002). Dentre eles, um dos mais utilizados tem sido a produção de trauma medular compressivo por peso em ratos (Basso et al., 1996; Carlson et al., 1998; Farooque, 2000; Gaviria et al., 2000; Ma et al., 2001; Silva et al., 2008). Além de um modelo adequado, a avaliação precisa da função neurológica, por meio de testes comportamentais motores e sensoriais, é imprescindível para determinar a eficácia do tratamento após a injúria (Basso et al., 1996; Metz et al., 2000; Roussos et al., 2005; Schmitt et al., 2006).

Diante desta afecção que acarreta em prejuízos consideráveis aos pacientes, a descoberta de um medicamento capaz de reverter o quadro patológico da lesão na medula espinhal permanece como um objetivo a ser alcançado, e que possa ser empregado nas medicinas humana e veterinária.

A administração de altas doses de succinato sódico de metilprednisolona ainda é o protocolo terapêutico de escolha para pacientes com lesão aguda na medula espinhal. Este fármaco atua, principalmente, na redução do edema e inibição da peroxidação lipídica, desde que

administrado nas primeiras oito horas após o trauma (Jeffery e Blakemore, 1999). Porém, existem controvérsias sobre seus efeitos deletérios serem maiores que os benéficos. Os corticóides podem inibir a remielinização, suprir o sistema imunológico e induzir ulceração gastrintestinal (Matsumoto et al., 2001; Short, 2001; Olby e Jeffery, 2003; Hall e Springer, 2004; Tsutsumi et al., 2006). Diversos outros fármacos já foram testados *in vitro* e utilizados sem resultados satisfatórios quando aplicados em modelos animais (Bergman et al., 2000a; Dumont et al., 2001; Kwon et al., 2004).

O dantrolene sódico, um derivado da hidantoína, bloqueia a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e, por isso, acredita-se que proteja as células neuronais de lesões secundárias que são desencadeadas pelo acúmulo de cálcio intracitoplasmático (Krause et al., 2004).

Já foram comprovadas propriedades antioxidantes do dantrolene como prevenção da peroxidação lipídica, proteção das células de lesões oxidativas e de efeitos tóxicos dos radicais livres de oxigênio (Büyükkuroglu et al., 2001; Büyükkuroglu et al., 2002; Ucuncu et al., 2005). Além disso, diversos estudos demonstram os efeitos neuroprotetores do dantrolene em modelos de morte neuronal induzida por isquemia cerebral (Zhang et al., 1993; Wei e Perry, 1996; Yano et al., 2001; Nakayama et al., 2002; Li et al., 2005), de excitotoxicidade (Gepdiremen et al., 2001; Makarewicz et al., 2003; Düzenli et al., 2005), e de epilepsia (Niebauer e Gruenthal, 1999; Popescu et al., 2002; Ballough e Filbert, 2003; Yoshida e Sakai, 2006).

Neste contexto, o dantrolene surge como uma opção promissora a ser testada na injúria medular aguda, pois ainda não foi avaliado em tais situações. Espera-se que esse fármaco apresente efeito neuroprotetor sobre as medulas lesadas, pela diminuição

da progressão dos mecanismos da lesão secundária, em ratos submetidos a trauma medular agudo. Também espera-se que atue no auxílio do controle miccional, relaxando o esfíncter uretral externo, propriedade essa já conhecida desse fármaco (Hackler et al., 1980; Wheeler e Sharp, 2005).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do dantrolene sódico, administrado precocemente em dose única em ratos adultos com trauma medular agudo experimental, por meio de testes comportamentais e avaliações bioquímicas séricas, anatomopatológica e imunoistoquímica.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

As espécies domésticas são frequentemente acometidas por afecções neurológicas, dentre as quais o trauma da medula espinhal é uma das mais comuns. Muitas dessas situações quando não comprometem a qualidade de vida, acabam evoluindo para a morte ou eutanásia do paciente acometido (Bergman et al., 2000a; Chacón e Nieto-Sampedro, 2005).

O trauma da coluna espinhal é causado por fatores extrínsecos e/ou intrínsecos e pode resultar em lesão na coluna vertebral, na medula espinhal ou em ambas. Os fatores extrínsecos incluem atropelamentos, quedas, chutes e pisoteios, mordidas e armas de fogo e, comumente, acarretam em fratura ou luxação vertebral (Bagley et al., 1999; Bagley, 2000). As causas intrínsecas compreendem protrusão e extrusão do disco intervertebral, malformação vertebral, fraturas patológicas devido à osteopenia, osteomielite e massas compressivas extramedulares como abscessos e neoplasias (Colter e Rucker, 1988; Shores et al., 1990; Summers et al., 1995).

Em cães, o canal vertebral é relativamente estreito comparado com o diâmetro da

medula, especialmente na região toracolombar, justificando assim a maior frequência de compressões nesse local (Bergman et al., 2000a). Os traumas toracolombares tendem a causar lesões mais graves que os cervicais, pois na região cervical o canal vertebral é proporcionalmente maior em relação à medula, o que determina maior tolerância à compressão. A região torácica é a mais estável da coluna vertebral do cão, sendo a junção toracolombar a de maior ocorrência de fraturas e luxações (Braund et al., 1990a; Braund et al., 1990b; Summers et al., 1995; Bergman et al., 2000a).

As afecções agudas e crônicas da medula espinhal são síndromes clínico-patológicas distintas, com diferentes sinais clínicos, graus de lesão e tempo de recuperação (Kraus, 1996; Olby e Jeffery, 2003). Por isso, o tipo de trauma é um fator importante na avaliação da lesão (Schramm et al, 1979, Carlson et al., 2000). Uma compressão gradual lenta tem um prognóstico mais favorável que uma compressão aguda, pois possibilita a acomodação da medula espinhal e, assim, a disfunção neurológica inicial é menor. Nesse caso, geralmente, não há hemorragia aguda e necrose, e a função da medula permanece preservada (Braund et al., 1990a; Summers et al., 1995; Araújo, 2005). Clinicamente, o trauma crônico é caracterizado por déficit neurológico lentamente progressivo, diminuição da propriocepção e paresia, algumas vezes intercalados por períodos de normalidade. A substância branca é a principal estrutura acometida com desmielinização e perda dos axônios (Summers et al., 1995; Kraus, 1996).

A recuperação neurológica após uma compressão crônica é proporcional ao tempo de duração e, portanto, a descompressão precoce propicia melhores chances de reparação. Ocorre uma associação entre o tempo de compressão e a extensão dos danos e, dependendo do grau e duração da

compressão, a lesão pode se tornar permanente (Delamanter et al., 1995; Summers et al., 1995; Kraus, 1996; Carlson et al., 2000).

As lesões agudas são acompanhadas por hemorragia, reação inflamatória e edema, que começam na substância cinzenta e, em poucas horas, se estendem até substância branca e segmentos medulares adjacentes (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990a). A substância cinzenta é mais sensível ao trauma agudo e à isquemia que a substância 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. Acredita-se que o conhecimento profundo de tais mecanismos possa proporcionar uma base para o desenvolvimento e implementação de uma terapia racional (Faden et al., 1984; Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990b; Tator e Fehlings, 1991; Meintjes et al., 1996; Bergman et al., 2000b).

## 2.1 - FISIOPATOGENIA DO TRAUMA MEDULAR AGUDO

### 2.1.1 - Eventos Primários

A transferência de um impacto mecânico para a medula espinhal que resulta em ruptura de vasos sanguíneos, corpos neuronais, axônios e lesão de demais células nervosas é considerada a causa da lesão primária na medula espinhal. A gravidade das alterações histológicas varia proporcionalmente com a magnitude do trauma inicial (Delamanter et al., 1995; Kraus, 1996; Hulsebosch, 2002).

A lesão primária não pode ser evitada e, em seu estágio agudo, ocorre destruição da barreira hematoencefálica e dos vasos sanguíneos locais. A injúria vascular gera hemorragia, edema e isquemia locais e, na presença de hipóxia e hipoglicemia, o

metabolismo torna-se anaeróbico, instaurando-se acidose láctica. O conjunto desses eventos resulta em necrose hemorrágica central da substância cinzenta que se inicia dentro de aproximadamente quinze minutos após o trauma. A degeneração neuronal é observada por volta de uma a quatro horas, e edema e tumefação axonal focal ocorrem na substância branca após cerca de quatro a oito horas (Jeffery e Blackmore, 1999; Bergman et al., 2000a; Olby e Jeffery, 2003; Yeziarski, 2005). Dependendo da gravidade da lesão, a necrose pode se estender cranial e/ou caudalmente. Enquanto nos traumas moderados a medula apresenta cavitações císticas centrais, em alguns casos mais graves toda a medula se torna necrótica e sofre liquefação, sendo mantida no lugar apenas pelas meninges (Summers et al., 1995).

As razões para o envolvimento preferencial da substância cinzenta não foram ainda totalmente esclarecidas. Contudo, a disposição e compactação das substâncias branca e cinzenta provavelmente são fatos contributivos. Em contraste com as fibras intimamente compactadas da substância branca, os neurônios e seus processos estão frouxamente dispostos e, portanto, são mais facilmente separados pela hemorragia e pelo edema. Além disso, a predominância de hemorragias na substância cinzenta pode ser explicada pela presença de grande rede capilar altamente susceptível ao trauma mecânico. O aumento na pressão intramedular espinhal pós-traumática também está mais concentrado centralmente, predispondo esta área a lesões mais intensas. A maior demanda metabólica da substância cinzenta em comparação à substância branca, é fator adicional para sua maior susceptibilidade ao trauma, particularmente durante os períodos de isquemia (Olby e Jeffery, 2003).

As alterações vasculares produzem diminuição do aporte de adenosina-trifosfato

(ATP) gerando disfunção de processos dependentes de energia, como a bomba de sódio e potássio, responsável pela preservação da homeostase celular. Concomitantemente, o edema que comprime os tecidos produz variação anormal nas concentrações de eletrólitos (cálcio, sódio e potássio) no líquido intersticial. Tais alterações podem interferir na excitabilidade e transmissão sináptica, o que justifica a possível interrupção da condução do estímulo nervoso imediatamente após o trauma (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005; Corona e Tapia, 2005).

Seguindo-se à lesão vascular, instauram-se processos inflamatório e imunológico que inibem a reparação axonal (Delamanter et al., 1995). As respostas imunomediadas envolvem componentes celulares (neutrófilos, macrófagos e células T) e componentes não celulares (moléculas, citocinas e prostaglandinas). Aproximadamente três a seis horas após o trauma, o local é invadido por neutrófilos, que secretam enzimas líticas e citocinas, as quais podem, futuramente, danificar o tecido e recrutar outras células inflamatórias. Monócitos e macrófagos são recrutados e a micróglia residente no local é ativada. Essas células contêm lisossomos e vacúolos apresentando aspecto espumoso (células Gitter) que iniciam o processo de fagocitose do tecido lesado e subsequente formação de cavitações. Essas e outras células reativas produzem citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas e interferóns que além de mediadores da resposta inflamatória também podem contribuir para futuros danos teciduais (Lu et al., 2000; Hulsebosch, 2002; Beattie, 2004; Kwon et al., 2004; Qiao et al., 2006).

A redução do fluxo sanguíneo para o segmento lesado pode ainda ser ocasionada por alteração anatômica do canal vertebral, hemorragia, edema, e redução da pressão sistêmica, que acarretam uma lesão medular adicional, denominada lesão secundária.

Dessa forma, a produção e o acúmulo de metabólitos resultantes de necrose tecidual (devido ao impacto primário) e o desequilíbrio de eletrólitos intra e extracelulares, ocasionados pela redução do fluxo sanguíneo local, podem provocar a morte de células nervosas e de axônios que não foram inicialmente lesados, inclusive em áreas distantes do ponto de impacto mecânico inicial (Beattie et al., 1998; Hulsebosch, 2002; Goldberg, 2003; Kwon et al., 2004).

### 2.1.2 - Eventos Secundários

A fisiopatologia da lesão secundária é complexa e ainda não está completamente esclarecida. Entretanto, sabe-se que ocorre uma cascata de mecanismos bioquímicos, moleculares, intra e extracelulares desencadeada pela necrose inicial, que sinaliza as células adjacentes para uma morte programada, conhecida como apoptose celular. A morte celular por apoptose pode ser detectada horas, dias e até semanas após a injúria medular inicial, e ocorre em diversos tipos celulares, incluindo neurônios, células da glia e células inflamatórias, dentre elas neutrófilos, micróglia e macrófagos (Kerr et al., 1972; Lu et al., 2000; Mattson, 2000; Kwon et al., 2004; Genovese et al., 2006; Qiao et al., 2006).

A transmissão sináptica é dependente de íons cálcio, os quais apresentam papel primordial na regulação da permeabilidade dos íons sódio e potássio durante a excitação neuronal, atuando ainda no controle das atividades de enzimas e, no armazenamento e liberação dos neurotransmissores em suas respectivas vesículas sinápticas (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005; Corona e Tapia, 2005).

Imediatamente após o trauma, ocorre uma despolarização induzida mecanicamente acompanhada pela abertura dos canais iônicos dependentes de voltagem. Isso

permite uma massiva liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, mais importante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (Olby e Jeffery, 2003; Hall e Springer, 2004; Platt, 2007).

O glutamato atua por meio da ligação às proteínas receptoras específicas, denominadas receptores glutamatérgicos, os quais são divididos em dois grandes grupos de acordo com suas estruturas e mecanismos de ação. Os receptores ionotrópicos estão associados a canais iônicos e, quando ativados, permitem a entrada de cátions (cálcio e sódio) na célula, causando uma despolarização de membrana neuronal. Já os receptores metabotrópicos estão associados a proteínas G, agindo por meio de sinalização intracelular por mensageiros (Hall e Springer, 2004; Platt, 2007).

Os receptores ionotrópicos são subdivididos em receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico (AMPA) e kainato (Hall e Springer, 2004; Waxman e Lynch, 2005; Platt, 2007). Embora a ativação dos receptores AMPA e kainato resulte em influxo de sódio do meio extracelular, alguns subtipos podem ainda ser permeáveis ao cálcio. Em contraste, os receptores NMDA são responsáveis principalmente pela entrada de cálcio na célula (Mody e MacDonald, 1995; Waxman e Lynch, 2005; Platt, 2007).

Em circunstâncias normais o glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica por 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, causando super-estimulação de receptores excitatórios e elevação das concentrações de cálcio e sódio intracelular, predispondo a toxicidade e morte neuronal (Leonard e Kirby, 2002; Beattie, 2004). Essa

lesão neuronal permite a liberação e manutenção de mais glutamato no espaço extracelular perpetuando a cascata degenerativa (Beattie, 2004). O conjunto dos efeitos deletérios das células em consequência da estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos é conhecido como excitotoxicidade (Lu et al., 2000; Kwon et al., 2004; Waxman e Lynch, 2005; Platt, 2007).

O desequilíbrio do sódio também está implicado na fisiopatologia da lesão medular, em particular nas lesões de axônio e de componentes da glia. O aumento do sódio intracelular ocorre por meio do influxo realizado pelos canais dependentes de voltagem, daqueles associados aos receptores de glutamato, além da troca cálcio-sódio, na qual o cálcio é transportado para fora da célula em troca de sódio. O seu acúmulo e, conseqüentemente, o de água no interior dos axônios os levam a morte (Beattie et al., 1998; Goldberg, 2003; Kwon et al., 2004).

Como visto anteriormente, o acúmulo do cálcio intracelular ocorre por meio do influxo realizado pelos canais dependentes de voltagem e pelos canais associados aos receptores NMDA. Além disso, o incremento intracelular deste íon pode ocorrer principalmente pela ativação dos receptores metabotrópicos, que leva ao metabolismo de fosfolípidios de inositol. Esses, por sua vez, são responsáveis pela mobilização de reservas intracelulares de cálcio ao estimularem os receptores rianodina (RyR) nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Por outro lado, os receptores metabotrópicos inativam os transportadores de cálcio dependentes de energia, cuja função é bombear o cálcio citoplasmático através da membrana celular, ou sequestrar o mesmo para dentro de compartimentos, como mitocôndria e retículo endoplasmático, mantendo assim esse íon em altas concentrações citoplasmáticas. A ativação dos receptores

NMDA também resulta na mobilização das reservas intracelulares de cálcio (Mody e MacDonald, 1995).

O aumento de cálcio intra-axonal inicia-se cerca de 30 minutos após a lesão e, aproximadamente oito horas depois, atinge seu valor máximo, podendo permanecer em elevadas concentrações por uma semana (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005). Tal acúmulo permite desencadear uma amplitude de processos cálcio-dependentes, os quais alteram letalmente o metabolismo celular dos neurônios remanescentes. Esses processos incluem: 1) disfunção da fosforilação oxidativa mitocondrial, levando a falência do metabolismo aeróbico e acúmulo de ácido láctico; 2) ativação de óxido nítrico sintetase (NOS) mitocondrial e citoplasmático, e produção de óxido nítrico; 3) ativação de fosfolipases C e A2 que alteram as membranas celulares liberando ácidos graxos poliinsaturados e produzindo ácido araquidônico, o qual será convertido pelas enzimas cicloxigenases (COX 1 e 2) e lipoxigenases (LOX). As COX convertem o ácido araquidônico em prostanóides deletérios, como as potentes prostaglandinas vasoconstritoras (PGF<sub>2α</sub>) e os tromboxanos (TXA<sub>2</sub>), que são vasoconstritores e promotores de agregação plaquetária. As LOX convertem o ácido araquidônico em leucotrienos (LT<sub>s</sub>), quimiotáticos para leucócitos polimorfonucleares e macrófagos; 4) ativação das calpaínas e caspases, que são proteases de cisteína dependentes de cálcio que modulam diversos substratos, incluindo proteínas citoesqueléticas e contribuem para a transdução do sinal apoptótico (Hayashi et al., 1998; Lu et al., 2000; Matsushita et al., 2000; Mattson, 2000; Hall e Springer, 2004; Kwon et al., 2004).

Uma das principais consequências da disfunção mitocondrial, da atividade das COX e LOX, e da ativação de NOS, é a formação de radicais livres de oxigênio (RLO), os quais promovem alterações estruturais em proteínas, carboidratos,

ácidos nucléicos e lipídeos, permitindo a formação de lipoperóxidos que destroem as membranas celulares (Bergman et al., 2000a; Hall e Springer, 2004; Chacón e Nieto-Sampedro, 2005; Genovese et al., 2006).

O trauma induz ainda, a liberação de opióides endógenos que exacerba o processo da lesão secundária, pela estimulação de receptores NMDA e pela ativação de receptores opiáceos, que contribuem para disfunção vascular, e distúrbios iônicos e metabólicos (Hall e Springer, 2004).

A morte de neurônios e oligodendrócitos interfere com a condução sináptica e induz degeneração da mielina. O processo de degeneração do axônio e seu estrato mielínico distalmente ao ponto de separação do corpo celular neuronal é denominado degeneração Walleriana. A degeneração dessas estruturas resulta numa série de segmentos ovóides conhecidos como elipsóides que são gradualmente removidos por macrófagos, deixando vacúolos residuais por toda a substância branca. A distribuição anatômica dessas alterações na medula espinhal reflete a organização das vias aferentes (sensitiva - corpos celulares situados caudalmente a lesão) e eferentes (motoras - corpos celulares situados cranialmente a lesão) da medula espinhal. Os vacúolos e axônios em processo de degeneração são mais evidentes nas colunas dorsolaterais (principalmente aferentes), cranialmente à lesão, e nas colunas ventrolaterais (principalmente eferentes), caudalmente à lesão. Nas proximidades do local traumatizado, as terminações axonais ainda aderidas ao corpo celular tornam-se distendidas com o axoplasma formando balões axonais (Olby e Jeffery, 2003).

A partir de quatro horas depois do trauma, as células neuronais e gliais apoptóticas são detectadas pela imunistoquímica, com picos em oito e 24 horas respectivamente (Lu et al., 2000). Dentro de sete dias ocorre

um aumento progressivo da área lesada e as cavitações aumentam com mais morte neuronal e glial. Um terceiro pico de apoptose, dessa vez de oligodendrócitos, é detectado no sétimo dia e está associado com agravamento da degeneração axonal. Os oligodendrócitos tardiamente mortos reduzem a possibilidade de remielinização após lesão axonal. Existem indícios de que os axônios quando alterados não produzem estímulo para sobrevivência dos oligodendrócitos, ou seja, estes dependeriam dos axônios intactos para sobreviver (Li et al., 1996).

No período de uma a quatro semanas já estão presentes áreas bem demarcadas de cavitações dentro das substâncias branca ou cinzenta, degeneração Walleriana extensa, e tecido cicatricial preenchido por astrócitos, outras células da glia, e até por fibroblastos, representando os estágios finais da evolução histopatológica da lesão medular (Beattie et al., 1998; Radojicic et al., 2005).

### 2.1.3 - Resposta ao Trauma

Uma vez que os neurônios e os axônios do sistema nervoso central são destruídos eles não podem ser substituídos, embora possam ser formados novos padrões de circuito que carregam informação nervosa. Tanto os oligodendrócitos quanto os astrócitos podem ser regenerados no SNC. A regeneração dos oligodendrócitos possibilita a reposição da bainha de mielina nos axônios acometidos, levando assim a restauração de uma condução segura. Esse processo, entretanto, nem sempre ocorre de forma espontânea, por motivos ainda não esclarecidos, talvez devido a alterações de fluxo sanguíneo na região acometida ou à depleção da reserva dos progenitores de oligodendrócitos. Após degeneração axonal há proliferação e hipertrofia astrocítica, denominada astrocitose ou gliose reativa, que costuma evoluir, produzindo uma cicatriz, que pode ser prejudicial devido à formação de uma

barreira ao crescimento axonal (Olby e Jeffery, 2003).

Pode haver restabelecimento da função perdida após considerável injúria tecidual, mesmo não havendo reversão da lesão, devido à capacidade do SNC em sofrer plasticidade em seus circuitos. Além disso, sinapses inativas podem ser convertidas em funcionais formando novos padrões de circuitos alternativos (Olby e Jeffery, 2003).

## 2.2 - ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES MEDULARES

A manifestação clínica do trauma medular depende de sua localização (Tabela 1), sendo que a disfunção vai refletir a

intensidade da lesão na substância branca ou cinzenta. O prognóstico é influenciado por fatores como grau, cronicidade e local da injúria medular (Braund et al., 1990a; Moore, 1992).

As consequências do trauma da medula espinhal variam desde compressão mínima em herniações discais até ruptura completa da medula espinhal, em fraturas vertebrais com deslocamento e, por isso, os níveis de deficiências neurológicas variam de discreta ataxia, perda de propriocepção consciente e paresia até paraplegia, que pode ser acompanhada por diminuição ou ausência da sensação de dor profunda (Braund e Sharp, 2003; Wheeler e Sharp, 2005).

**Tabela 1** - Sinais clínicos das síndromes espinhais

<b>ALTERAÇÕES REFLEXAS</b>				
<b>Localização na medula espinhal*</b>	<b>Paresia/ Paralisia</b>	<b>Membros torácicos</b>	<b>Membros pélvicos</b>	<b>Outros sinais</b>
Cervical (C1-C5)	Hemiparesia ipsilateral até tetraplegia	Normal a aumentado	Normal a aumentado	Dor e rigidez cervical
Cervicotorácia (C6-T2)	Hemiparesia ipsilateral até tetraplegia	Diminuído a ausente	Normal a aumentado	± Síndrome de Horner (T1-T2), perda ipsilateral do reflexo do músculo cutâneo do tronco (C8/T1)
Toracolombar (T3-L3)	Paraparesia espástica até paraplegia	Normal	Normal a aumentado	Retenção urinária e fecal; ± postura de Schiff-Sherrington
Lombossacra (L4-S3)	Paraparesia até paraplegia flácida (L4-S1); normal (apenas S2-S3)	Normal	Diminuído a ausente	Incontinência urinária e fecal; cauda flácida

\* Segmentos da medula espinhal

± Pode ou não estar presente.

**Adaptado de Wheeler e Sharp, 2005.**

Os resultados encontrados nos testes comportamentais, após trauma medular experimental, são altamente correlacionados com as alterações histológicas. A gravidade dos déficits sensorial e motor está diretamente relacionada à intensidade da injúria e à área de tecido nervoso danificado.

Portanto, o conhecimento da função e localização das vias sensitivas e motoras da medula espinhal auxilia na determinação da intensidade da lesão medular (Basso et al., 1996; Gruner et al., 1996; Von Euler et al., 1996; Von Euler et al., 1997; Fouad et al.,

2000; Soblosky et al., 2001; Cao et al., 2005).

Quando o trauma agudo ocorre em uma área de substância cinzenta essencial para locomoção, como nas intumescências cervical (C6- T2) e lombossacra (L4-S3), o prognóstico tende a ser desfavorável, pois essa substância é mais sensível a esse tipo de injúria (Bergman et al., 2000b). Como essas regiões inervam respectivamente os membros torácicos e pélvicos, uma lesão envolvendo a substância cinzenta de uma delas resultará em sinais de neurônio motor inferior para os membros correspondentes (Moore, 1992; Kraus, 1996; Jeffery e Blackmore, 1999). 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. Já uma lesão na intumescência lombossacra pode afetar a inervação da bexiga determinando incontinência urinária (Braund et al., 1990a).

Entretanto, se existe acometimento da área de substância cinzenta não essencial para os membros, como o segmento de T3 a L3, a lesão não vai acarretar em déficit relevante sobre a locomoção (Moore, 1992; Kraus, 1996; Jeffery e Blackmore, 1999), e terá pouco significado clínico, pois nenhum grupo muscular grande ou órgão vital será denervado (Braund et al., 1990a).

Nos traumatismos cervicais craniais e toracolombares, os sinais clínicos refletem, primariamente, danos aos tratos ascendentes e descendentes da substância branca (Braund et al., 1990a). Uma lesão na 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 injúria da substância branca cranial a um membro produz sinais de neurônio motor superior

para aquele membro (Moore, 1992; Jeffery e Blackmore, 1999).

Os sinais de uma lesão 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 injúria do neurônio motor superior causa tônus muscular normal ou aumentado (espasticidade), paresia ou paralisia tônica e reflexos espinhais exacerbados (Thomas, 2000).

Os tratos de substância branca da medula espinhal são compostos por fibras nervosas de diferentes diâmetros, a maioria das quais tem estrato mielínico. Fibras de diâmetro maior são mais susceptíveis a lesões por compressão do que as mais delgadas. É necessário um trauma grave na medula espinhal para interromper a sensação de dor profunda, carregada por fibras delgadas e amielínicas (Moore, 1992; Bergman et al., 2000b). Desse modo, a percepção de dor profunda constitui o teste prognóstico mais importante do exame neurológico e é um indicador confiável da integridade fisiológica da medula espinhal (Bagley et al., 1999; Thomas, 2000; Wheeler e Sharp, 2005). Portanto, a propriocepção consciente se perde em primeiro lugar, seguindo-se a atividade motora voluntária, sensação da dor superficial e sensação da dor profunda. A recuperação neurológica ocorre na ordem inversa, entretanto, a perda de propriocepção pode ser permanente (Braund et al., 1990a).

Lesões compressivas, de intensidade discreta a moderada, realizadas por abordagem dorsal à medula, destroem além da substância cinzenta, principalmente os funículos dorsais e dorsolaterais, mantendo áreas significantes dos funículos ventrais intactas. O controle da locomoção é regulado principalmente pelos tratos contidos nos funículos ventrais e ventrolaterais, isto é, tratos reticuloespinhal, vestibuloespinhal, e projeções do

proprioespinal. Lesões nos tratos dos funículos dorsais (corticoespinal e rubroespinal) danificam gravemente a precisão dos movimentos, mas permitem boa recuperação funcional locomotora, incluindo sustentação do peso. Entretanto, o controle refinado e o equilíbrio durante a locomoção permanecem deficientes, como refletem os testes de caminhar em barras estreitas (Fouad et al., 2000; Soblosky et al., 2001; Loy et al., 2002).

Em um estudo realizado por Fouad et al. (2000), a preservação dos funículos ventrais e ventrolaterais permitiu ao rato retorno da utilização funcional de seus membros por volta de sete dias após o trauma e, da movimentação satisfatória com apoio do peso sobre os mesmos, dentro de três a quatro semanas. No trauma grave há perda total dos funículos dorsais, laterais e parcial ou total dos ventrais. O acometimento dos funículos ventrais leva à ruptura do trato corticoespinal dessa região, gerando disfunções sensoriais e motoras acentuadas. Esses animais não mostram indícios de recuperação, provavelmente porque todos seus tratos espinhais necessários para realização da locomoção estão gravemente afetados a ponto de que não seja possível a reparação das fibras axonais (Basso, 2000; Soblosky et al., 2001; Loy et al., 2002).

A função pode recuperar espontaneamente como resultado da resolução de lesões reversíveis, ou por meio da reorganização dos 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, 1999).

## 2.3 - TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TRAUMA MEDULAR AGUDO

Como o trauma primário não pode ser evitado e tampouco amenizado com tratamento farmacológico, os mecanismos secundários têm sido alvos de tais terapias. Cada agente terapêutico atua sobre um ou mais mecanismos da lesão secundária, objetivando conferir neuroproteção e/ou restauração do tecido lesado (Hulsebosch, 2002; Fehlings e Baptiste, 2005). Já foi demonstrada capacidade de controle voluntário da movimentação em animais com apenas 5% a 10% de axônios íntegros no foco da lesão, o que justifica os esforços para preservação ou restauração do tecido neuronal lesado (Eidelberg et al., 1977; Fehlings e Tator, 1995).

### *Corticoideterapia*

Os glicocorticóides têm sido exaustivamente pesquisados em trauma medular por suas diversas ações moduladoras sobre os mecanismos secundários da lesão. Embora seus efeitos protetores sejam, na prática, alvos de controvérsia, esses fármacos são amplamente utilizados. Dentre seus efeitos benéficos têm-se a supressão do edema vasogênico, restauração da barreira hematoencefálica, aumento do fluxo sanguíneo medular, estabilização das membranas lisossomais, inibição da liberação de endorfinas hipofisárias, alteração da concentração eletrolítica em tecidos lesados e atenuação da resposta inflamatória. Todos esses efeitos são creditados à capacidade antioxidante desses agentes, que fazem a varredura de radicais livres de oxigênio, evitando assim a destruição tecidual induzida pela peroxidação lipídica (Amar e Levy, 1999; Bergman et al., 2000a; Dumont et al., 2001; Hall e Springer, 2004).

O succinato sódico de metilprednisolona apresenta propriedades antioxidantes superiores à dexametasona e hidrocortisona

por atravessar a membrana celular mais rapidamente, e resultar em menor indução de neutropenia. Embora existam controvérsias sobre o uso de corticoideterapia no tratamento do trauma medular, a utilização da metilprednisolona em altas dosagens continua sendo o protocolo de eleição para pacientes que tenham sofrido trauma em menos de oito horas. Após esse período sua utilização parece ser ineficaz, pois sua capacidade de distribuição dentro da medula diminui rapidamente pós-injúria e a peroxidação lipídica instaurada poucas horas depois da lesão se torna irreversível. Alguns estudos afirmam que após oito horas esse fármaco pode, inclusive, ser prejudicial, agravando o resultado final das lesões. Inibição da remielinização, supressão do sistema imunológico e indução de ulceração gastrointestinal estão entre os principais efeitos deletérios relatados (Matsumoto et al., 2001; Short, 2001; Olby e Jeffery, 2003; Hall e Springer, 2004; Tsutsumi et al., 2006).

#### *Lazaróides*

Também conhecidos como 21-aminosteróides, possuem propriedades antioxidantes e aumentam a estabilidade de membranas. Atuam sobre receptores não esteroidais, por isso são denominados de agentes antioxidantes não-glicocorticóides. O mezilato de tirilazade é um potente agente que, em modelos animais, mostrou ser 100 vezes mais potente que a metilprednisolona na inibição da peroxidação lipídica, sendo também capaz de aumentar o fluxo sanguíneo medular e reverter a isquemia. Sua ação está relacionada a três principais mecanismos. O primeiro consiste na varredura dos radicais livres de oxigênio e bloqueio das reações em cadeia dos lipoperóxidos de uma maneira similar à vitamina E. Como competem pela mesma reação, a vitamina E endógena é poupada, o que retarda sua degradação e aumenta seu tempo de ação, sendo esse o segundo mecanismo de atuação deste agente. O

terceiro mecanismo condiz com a estabilização de membrana por meio do rearranjo lipídico da bicamada das membranas fosfolipídicas, diminuindo a fluidez das membranas e também, conseqüentemente, a liberação de ácido araquidônico das membranas celulares lesadas (Hall, 1993; Bergman et al., 2000a; Dumont et al., 2001; Hall e Springer, 2004).

#### *Antagonistas de receptores opióides*

A liberação de opióides endógenos após o trauma medular aumenta os níveis de endorfinas, o que resulta em hipotensão e diminuição do fluxo sanguíneo medular, agravando a isquemia instaurada. A naloxona, um antagonista não específico de receptores opióides, tem sido amplamente estudado para reverter esses mecanismos. Estudos demonstram sua capacidade em aumentar o fluxo sanguíneo medular, reduzir o influxo de cálcio celular, aumentar a concentração de magnésio livre e a taxa bioenergética celular, além de modular a liberação de aminoácidos excitatórios. Seus efeitos benéficos foram constatados quando utilizada dentro de oito horas após o trauma medular (Dumont et al., 2001; Kwon et al., 2004).

#### *Gangliosídeos*

São ácidos glicolipídicos complexos presentes em altas concentrações dentro das células do sistema nervoso central (SNC) que estão localizados principalmente na camada externa da membrana celular. O monosialotetrahexosilgangliosídeo (GM-1) é encontrado principalmente nos axônios neuronais, bainha de mielina e células da glia dentro da substância branca. Evidências experimentais sugerem que sua administração pode acelerar o crescimento da placa neurítica e estimular a regeneração do axônio. Pode também atenuar a excitotoxicidade e prevenir a progressão apoptótica, além de regular a proteína quinase C, responsável pela velocidade da

condução nervosa, aumentando assim a plasticidade da função neurológica do paciente (Ferrari et al., 1993; Geisler et al., 1993; Mattson, 2000; Goldberg, 2003; Mocchetti, 2005).

#### *Hormônio liberador de tirotropina (TRH) e Análogos do TRH*

São tripeptídeos que estão sendo pesquisados no tratamento do trauma medular devido a seus efeitos em prevenir e amenizar tais lesões. Os mecanismos propostos para seus efeitos neuroprotetores incluem propriedades antiinflamatória, antioxidante e estabilizadora de membranas celulares. Demonstram ainda capacidade em antagonizar os efeitos auto-destrutivos dos opióides endógenos, do fator ativador de plaquetas, dos leucotrienos, e dos aminoácidos excitatórios. Podem aumentar o fluxo sanguíneo medular, restaurar o equilíbrio iônico e o estado bioenergético celular (Dumont et al., 2001; Fehlings e Baptiste, 2005).

#### *Antioxidantes e varredores de radicais livres*

A peroxidação lipídica, resultante do trauma medular, pode ser atenuada pelos antioxidantes endógenos. Entretanto, foi demonstrado que níveis de antioxidantes endógenos, como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido retinóico (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), selênio e certas ubiquinonas como a coenzima Q, estão diminuídas após o trauma. Por isso, a reposição de tais antioxidantes pode ser eficaz em prevenir lesões causadas pela peroxidação lipídica. Outros compostos também mostram benefícios ao atuarem como varredores de radicais livres de oxigênio, dentre eles, superóxido desmutase, alopurinol, desferroxamina, e o polietileno-glicol (Hall, 1993; Dumont et al., 2001; Genovese et al., 2006).

#### *Sulfato de Magnésio*

Estudos comprovam sua ação neuroprotetora contra convulsões induzidas por receptores gabaérgicos e contra neurodegeneração hipocampal em ratos. Seu efeito benéfico em lesões isquêmicas induzidas no cérebro e medula espinhal também foi demonstrado. Além de prevenir a excitotoxicidade por sua ação antagonista de receptores NMDA em estruturas neurais, o magnésio parece inibir a ativação da caspase-3 exercendo um efeito antiapoptótico após lesões isquêmicas. Além disso, a suplementação do magnésio está associada à diminuição da peroxidação lipídica, aumento significativo de taxas bioenergéticas celulares e, conseqüentemente, melhora da função neurológica (Hayashi et al., 1998; Kaptanoglu, et al., 2003; Solaroglu et al., 2005).

#### *Bloqueadores de canais de sódio*

Agentes anestésicos locais, antiarrítmicos e certos anticonvulsivantes estão sendo avaliados por suas capacidades de bloquear canais de sódio, sugerindo um possível efeito neuroprotetor. Estudos avaliaram a tetrodotoxina, um potente bloqueador de canais de sódio, em trauma medular de ratos e, após sua administração local, foi possível observar uma preservação tecidual em longo prazo e diminuição nos déficits neurológicos. Outros estudos mostraram que a utilização do riluzole, outro agente dessa classe, em trauma medular promoveu um efeito neuroprotetor significativo, preservando tanto a substância branca quanto a cinzenta, melhorando a função neurológica (Lang-Lazdunskia et al., 2000a; Lang-Lazdunskia et al., 2000b; Dumont et al., 2001; Kwon et al., 2004).

#### *Antagonistas de receptores glutamatérgicos*

O reconhecimento de que a ativação dos receptores NMDA ou não-NMDA (AMPA ou kainato) tem um papel importante na

lesão por excitotoxicidade após o trauma medular estimulou o desenvolvimento de intervenções farmacológicas que inibam esse mecanismo. Assim, antagonistas de receptores NMDA, como o MK801 e gaciclidina (GK11) estão sendo investigados experimentalmente, e têm apresentado efeitos neuroprotetores e aumento na função locomotora, possivelmente pela redução da perda de células gliais na substância branca. Tais agentes podem apresentar certa toxicidade, uma vez que sua administração sistêmica pode interferir com a transmissão sináptica em vias glutamatérgicas essenciais. Portanto, pesquisas são necessárias já que continuam sendo uma estratégia terapêutica promissora (Hulsebosch, 2002; Kwon et al., 2004; Waxman e Lynch, 2005; Platt, 2007).

#### *Modulação do metabolismo do ácido araquidônico*

Os metabólitos resultantes da conversão do ácido araquidônico possuem um papel fundamental no mecanismo secundário das lesões medulares. Nesta etapa, a terapia farmacológica visa inibir as enzimas responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em tais metabólitos, sejam elas as COX (cicloxigenases) ou as LOX (lipoxigenases). Assim, diversos fármacos, dentre eles os antiinflamatórios não-esteroidais, que apresentam ações inibitórias contra essas enzimas, têm sido testados. Principalmente os compostos inibidores específicos e seletivos de COX-2, demonstram efeitos neuroprotetores por aumentar o fluxo sanguíneo medular, diminuir a formação de radicais livres, impedir a agregação plaquetária e modular a resposta inflamatória (Dumont et al., 2001; Hulsebosch, 2002; Kwon et al., 2004).

#### *Progesterona*

A progesterona pode apresentar efeitos neuroprotetores por prevenir a morte celular induzida pela excitotoxicidade presente nos traumas medulares. Sua função é modular o

ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e os receptores NMDA, além de diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica e apresentar propriedades antioxidantes, inibindo assim a peroxidação lipídica. Todavia, contrariando pesquisas prévias, alguns estudos não foram capazes de associar tais propriedades a efeitos neuroprotetores concretos (Thomas et al., 1999; Deniselle et al., 2003; Fee et al., 2007).

#### *Dimetilsulfóxido (DMSO)*

Esse agente possui um potencial benéfico no trauma medular, devido a sua ação antiedematosa, vasodilatadora, antiinflamatória, varredora de radicais livres, inibidora de agregação plaquetária, bloqueadora de canais de cálcio, e facilitadora de regeneração da fibra nervosa. Sua infusão sistêmica foi proposta como um meio de aumentar o fluxo sanguíneo medular (Amar e Levy, 1999).

#### *Bloqueadores de canais de cálcio*

O agente mais estudado dessa classe é a nimodipina, por ter seus efeitos preferencialmente sobre a função circulatória do SNC. Ela age sobre a microvasculatura, atenuando o vasoespasmó induzido pela lesão, o que aumenta o fluxo sanguíneo medular e reverte a isquemia pós-traumática em modelos experimentais. Age também, sobre o processo de excitotoxicidade, impedindo sua progressão, embora alguns estudos mostrem que, quando administrada após o trauma, a nimodipina não parece ter efeito benéfico significativo, e sim quando a terapia é iniciada antes do trauma. O influxo do cálcio celular e suas consequências podem manifestar-se imediatamente após o trauma, limitando assim as oportunidades para uma possível intervenção (Dumont et al., 2001; Kwon et al., 2004).

### *Dantrolene Sódico*

Os fármacos relacionados anteriormente apresentaram alguma resposta neuroprotetora quando estudados em ensaios *in vitro*, porém, existe uma grande dificuldade na aplicação de tais resultados em estudos clínicos (Bergman et al., 2000a; Dumont et al., 2001; Kwon et al., 2004). Por isso, o dantrolene é uma opção promissora, testado pela primeira vez em ensaio clínico de trauma medular agudo.

O dantrolene sódico foi originalmente sintetizado por Snyder e seus colaboradores em 1967 (Snyder et al., 1967). Esse fármaco é um derivado da hidantoína que bloqueia a liberação de cálcio do retículo endoplasmático impedindo a excitação-contracção do músculo esquelético. Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição dos receptores rianodina (RYR) presentes no retículo endoplasmático, responsáveis pelo controle do efluxo de cálcio para o citoplasma. Esses receptores estão presentes em diversos tecidos sob três isoformas distintas, sejam elas RYR1 presentes nos músculos esqueléticos, RYR2 presentes no músculo cardíaco, e RYR3 presentes no tecido nervoso (Krause et al., 2004; Paul-Pletzer et al., 2005).

Devido a suas propriedades miorrelaxantes é o medicamento de eleição na profilaxia e tratamento do hipermetabolismo grave do músculo esquelético, característico da hipertermia maligna (HM). Também se utiliza em outros estados hipercatabólicos como na síndrome neuroléptica maligna, e em espasticidade muscular de diferentes origens, sejam elas esclerose múltipla, paralisia cerebral ou lesão medular (Krause et al., 2004).

Após sua administração, o dantrolene liga-se de forma rápida e reversível às proteínas plasmáticas, principalmente albumina, e mantém-se em concentrações plasmáticas estáveis durante aproximadamente cinco

horas. Posteriormente, é metabolizado pelo fígado principalmente em 5-hidroxdantrolene, com metade da potência do fármaco original e em metabólitos menores e inativos. Sua eliminação é feita pelos rins e pela bile. O tempo de meia vida do dantrolene foi estimado em 12 horas e de seu metabólito maior, em torno de 15 horas. A LD50 após a injeção intraperitoneal de dantrolene foi de 780mg/kg em ratos (Ellis e Carpenter, 1974; Fournier, 1982; Krause et al., 2004).

O dantrolene apresenta-se como um fármaco seguro e com mínimos efeitos colaterais quando utilizado em doses terapêuticas em humanos (Krause et al., 2004), gatos (Bowman et al., 1979), aves (Silverman e Hikida, 1977), suínos (Harrison, 1998), equinos (Edward et al., 2003), cães, coelhos, ratos, camundongos e hamsters (Fournier, 1982). Os efeitos indesejáveis podem ocorrer com a administração de dose única excessiva ou crônica por uso prolongado. Ao iniciar o tratamento em humanos foram ocasionalmente relatados sintomas de euforia, tonturas, sonolência e fadiga, ainda que de forma transitória. Hepatotoxicidade, debilidade muscular, flebite, e falha respiratória foram os achados mais consistentes com tratamentos crônicos e/ou doses elevadas (Pastó Cardona et al., 1995; Brandon e Larach, 2002; Krause et al., 2004).

Hotchkiss et al. (1995) demonstraram em um modelo de endotoxina utilizando camundongos que o dantrolene pode ser eficaz em tratar desordens inflamatórias mediadas por citocinas. Büyükkuroglu (2002), em estudos com ratos e camundongos, afirmou que o dantrolene apresenta propriedades antiinflamatórias e anti-nociceptivas, sendo capaz de diminuir consideravelmente a formação de edema e inibir a síntese de metabólitos do ácido araquidônico. Além disso, Gülçin et al. (2004) demonstraram que o dantrolene, após uma hora do momento da aplicação, é capaz

de diminuir a atividade da enzima anidrase carbônica (CA) de forma sistêmica, atuando na correção de alcalose metabólica, na redução de edemas e de glaucoma e no controle da epilepsia, além de apresentar propriedades antiulcerogênicas já relatadas também por Büyükokuroglu et al. (2002).

Também foram comprovadas suas propriedades antioxidantes por prevenir a peroxidação lipídica e proteger as células contra os efeitos tóxicos dos radicais livres de oxigênio (Büyükokuroglu et al., 2001; Büyükokuroglu et al., 2002; Ucuncu et al., 2005).

O dantrolene apresenta efeito benéfico sobre o esvaziamento vesical em pacientes com retenção urinária subsequente a lesão medular cranial a região sacral. Esse fármaco atua no relaxamento da musculatura estriada esquelética do esfíncter uretral externo diminuindo assim, a resistência ao esvaziamento vesical, auxiliando no controle miccional (Khalaf et al., 1979; Hackler et al., 1980; Wheeler e Sharp, 2005).

Diversos estudos demonstram os efeitos neuroprotetores do dantrolene em modelos de morte neuronal. Após lesão hipocampal induzida por isquemia transitória, foi capaz de prevenir a liberação excessiva das reservas de cálcio intracelular em ratos (Yano et al., 2001) e em gerbils (Zhang et al., 1993; Wei e Perry, 1996), reduzir as concentrações de glutamato extracelular em ratos (Nakayama et al., 2002) e diminuir o número de células apoptóticas também nessa espécie (Li et al., 2005). Em modelos de lesão produzida por excitotoxicidade em culturas de neurônios granulares de cerebelo de ratos, o dantrolene não permitiu a liberação do cálcio induzida pela estimulação dos receptores NMDA (Gepdiremen et al., 2001; Makarewicz et al., 2003; Düzenli et al., 2005).

Foi sugerido também, efeito anticonvulsivante do dantrolene em modelos

de lesão cerebral em ratos, induzida por *status epilepticus* eletrogênico (Niebauer e Gruenthal, 1999) e químico (Ballough e Filbert, 2003). Yoshida e Sakai (2006) afirmam que a inibição das convulsões ocorre devido ao impedimento da liberação do cálcio das reservas intracelulares, provocado pelo dantrolene. Popescu et al. (2002) estudaram a morte celular apoptótica induzida pela ação epilética do ácido kaínico em culturas de células granulares cerebelares (*in vitro*) e em neurônios cerebrais (*in vivo*) de ratos e relataram que o dantrolene foi capaz de diminuir significativamente a apoptose neuronal.

#### 2.4 - ESTUDO EXPERIMENTAL DAS LESÕES MEDULARES

Estudos experimentais continuam buscando um melhor entendimento das interações entre os mecanismos fisiopatológicos imediatamente após o trauma medular, com objetivo de intervir com novas estratégias terapêuticas que minimizem a lesão neurológica (Waxman e Kocsis, 1997; Dumont et al., 2002; Hulsebosch, 2002; Chuckowree et al., 2004; Kwon et al., 2005; Thuret et al., 2006).

Pesquisas que envolvem trauma da medula espinhal empregam diversos modelos animais para mimetizar os mecanismos patológicos secundários a esse tipo de acometimento. O rato é a espécie mais comumente utilizada nesses estudos, pois além de ser tolerante à intensidade do trauma experimental, apresenta como vantagens sua fácil aquisição, baixo custo e simplicidade de manipulação. A viabilidade da sobrevivência desses animais está relacionada ao protocolo anestésico, ao procedimento cirúrgico e aos cuidados intensivos pós-operatórios, fatores esses que contribuem para uma alta taxa de sobrevivência mesmo em lesões graves (Taoka e Okajima, 1998; Ma et al., 2001).

Acredita-se que os modelos de trauma realizados por compressão induzam um tipo de lesão semelhante a que acomete a espécie humana e os animais de companhia com maior frequência (Brechtel et al., 2006). O modelo de contusão por peso compressivo, utilizado para reproduzir o trauma medular agudo, foi proposto originalmente em cães por Allen em 1911 (Taoka e Okajima, 1998). Esse modelo mimetiza de maneira representativa o que ocorre na maioria das lesões espinhais em humanos e vem sendo modificado e aprimorado ao longo do tempo, para adequar-se às necessidades de cada grupo de pesquisadores em obter determinado padrão de lesão medular (Kwon et al., 2004). O impactador *New York University* (NYU) desenvolvido pelo Laboratório de Neurocirurgia da Universidade de Nova Iorque e descrito por Gruner (1992), é o mais utilizado para proporcionar esse tipo de contusão medular em ratos. Esse aparelho estereotático é conectado a um computador com *software* específico que registra a velocidade de queda da haste que suporta o peso sobre a medula, o momento do impacto e o grau de compressão sofrida pela medula espinhal, diminuindo, portanto, a variabilidade do trauma entre os animais (Gruner, 1992; Basso et al., 1996).

Devido à inacessibilidade a tal equipamento por parte de alguns centros de pesquisa, por ser acima de tudo oneroso e à necessidade de reproduzir-se um trauma medular padronizado, semelhante aquele proporcionado pelo impactador NYU, com baixo custo e fácil execução, buscam-se mecanismos impactadores alternativos, como o proposto por Silva et al. (2008). Nesse estudo, Silva et al. (2008) utilizando um aparelho estereotático simples e eficiente, demonstraram que um peso compressivo de 50,5g em T13 durante cinco minutos era capaz de reproduzir um trauma medular de grau moderado em ratos.

## 2.5 - TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA EM RATOS

Uma variedade de testes motores e sensoriais tem sido desenvolvida por diversos pesquisadores para avaliar a integridade dos tratos espinhais remanescentes (Basso et al., 1996; Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000; Metz et al., 2000; Ma et al., 2001; Giglio et al., 2006; Silva et al., 2008). Os comportamentos funcionais responsáveis pela locomoção envolvem integração das capacidades sensorial e motora, portanto, a perda de uma dessas, ou de ambas, resulta em déficits mensuráveis por vários testes comportamentais. Para uma avaliação completa, devem-se incluir testes de avaliação funcional motora e/ou sensitiva (Muir e Webb, 2000).

Um teste comportamental adequado deve ser de fácil aplicabilidade, objetivo, dispensar treinamento prévio dos animais, ou seja, testes que mimetizem atividades cotidianas desses animais, não ser estressante para os mesmos, utilizar equipamentos simples que forneçam uma avaliação realista de diferentes graus de lesão medular, e oferecer alta confiabilidade entre diferentes avaliadores (Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000; Muir e Webb, 2000; Ma et al., 2001). Contudo, é difícil encontrar um único teste que satisfaça todos esses requisitos, especialmente quando se tratam de animais de laboratório como os ratos. Assim, a utilização de múltiplos testes faz-se necessário para atender as necessidades de uma avaliação completa e meticulosa (Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000).

O teste de capacidade motora (CM) é baseado na observação da deambulação espontânea em campo aberto e do caminhar em barras estreitas, suspensas do solo (Von Euler et al., 1996; Von Euler et al., 1997; Farooque, 2000; Silva et al., 2008). Este teste avalia a integridade das vias

descendentes motoras contidas na substância branca dos funículos laterais, como é o caso dos tratos rubroespinal e corticoespinal, responsáveis pelos movimentos voluntários ou atividade muscular flexora e dos funículos ventrais, como é o caso dos tratos reticuloespinal e vestibuloespinal, responsáveis pelo movimento involuntário (tratos de postura ou extensores). Presumivelmente, quando os tratos rubroespinal, corticoespinal, vestibuloespinal e reticuloespinal estão envolvidos no trauma, os membros são paralisados e incapazes de produzir movimentos voluntários ou suportar o peso (Chrisman, 1991; Basso, 2000; Greenstein e Greenstein, 2000).

Ma et al. (2001) ressaltaram que apesar da observação cuidadosa da locomoção em campo aberto fornecer informações importantes sobre a existência de alterações, algumas vezes as anormalidades visibilizadas podem ser sutis e subjetivas e a aplicação de outros testes neurológicos ajudam a percebê-las. Verificou-se então que, o teste de locomoção quando realizado sobre barras estreitas, suspensas do solo, possibilitava a detecção de déficits mínimos que poderiam passar despercebidos no andar em campo aberto (Farooque, 2000; Metz et al., 2000). Neste teste o comprometimento dos tratos sensitivos dos funículos dorsais, que geram informações para movimentos refinados dos membros e dígitos, pode ser detectado com maior sensibilidade. É possível, portanto, avaliar a eficácia de diferentes estratégias terapêuticas sobre as alterações proporcionadas pelo trauma, pois além de sua alta sensibilidade, mesmo para pequenas lesões, e por ter uma escala gradual objetiva, apresentam resultados altamente correlacionados com as alterações histológicas (Von Euler et al., 1996; Von Euler et al., 1997; Farooque, 2000; Metz et al., 2000).

Os testes de posicionamentos proprioceptivo (PP) e tátil (PT) avaliam o sistema sensorial,

que determina a capacidade do animal na identificação do posicionamento do membro quando flexionado, estendido, ou anormalmente posicionado e o sistema motor, ou seja, a resposta de retorno do membro à posição normal (Fouad et al., 2000; Greenstein e Greenstein, 2000; Loy et al., 2002; Lorenz e Kornegay, 2004). Uma resposta diminuída ou ausente sugere lesão no trajeto sensorial ou motor. O fascículo grácil, que está localizado nos funículos dorsais, carrega propriocepção consciente ou censo de posição dos membros pélvicos para o córtex cerebral e capacita o animal a corrigir os membros quando posicionados de forma anormal em relação ao corpo. Já os tratos corticoespinais são os responsáveis pela resposta motora de reposicionamento do membro (Chrisman, 1991; Greenstein e Greenstein, 2000; Wheeler e Sharp, 2005).

Os tratos espinocerebelares dorsal e ventral transmitem informações proprioceptivas inconscientes dos membros pélvicos para o cerebelo, a fim de fornecer impulsos aferentes necessários para coordenar o movimento muscular, e estão localizados na região mais superficial dos funículos laterais da medula espinal. Esses tratos são afetados precocemente em compressões superficiais da medula espinal e produzem ataxia ou andar descoordenado (Chrisman, 1991). Por isso, a propriocepção é afetada logo no início das doenças neurológicas e é a última a recuperar a normalidade (Gruner et al, 1996).

O teste do plano inclinado (PI) desenvolvido por Rivlin e Tator (1977), é amplamente utilizado para avaliação do trauma medular em ratos. Esse teste permite detectar discretas alterações que não podem ser visibilizadas facilmente no caminhar, que muitas vezes parece normal em animais com lesões medulares de pouca intensidade.

A avaliação da sensibilidade dolorosa (SD) é o teste prognóstico mais importante do exame neurológico e constitui um indicador

confiável da integridade da medula. A dor é transmitida por vários tratos espinhais, entre eles o espinotalâmico, espinocervical e espinoreticular. Os tratos espinotalâmicos carregam estímulos de dor profunda e temperatura captados pelos membros (Lorenz e Kornegay, 2004). Para que a modalidade de dor profunda seja destruída deve haver um acometimento grave e bilateral da medula espinhal e, por isso, nesses casos o prognóstico torna-se desfavorável (Chrisman, 1991; Farooque, 2000).

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com protocolo número: 059/03 (Anexo I). Os animais foram mantidos durante todo o experimento nas instalações do Laboratório de Experimentação Animal, do Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da UFMG.

#### 3.1 - ANIMAIS

Foram utilizados 46 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, com três meses de idade, pesando em média 354g. Eles foram desverminados com tiabendazol<sup>1</sup>, na dose de 100mg/kg, por via oral, divididos aleatoriamente em seis grupos e colocados em caixas plásticas forradas com maravalha (quatro animais por caixa). Foram submetidos a 14 dias de aclimatação, com ciclos de 12 horas com luz e 12 horas sem luz, e receberam água e ração comercial para roedores *ad libitum*.

Após esse período, os animais foram preparados para cirurgia asséptica e receberam antibioticoterapia profilática com

---

<sup>1</sup> Thiaben® - Uci-Farma. São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

cefalotina sódica<sup>2</sup>, na dose de 30mg/kg, por via intravenosa, 30 minutos antes do início do procedimento. Realizou-se então, medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol<sup>3</sup>, na dose de 2mg/kg, por via oral e indução e manutenção anestésica com isoflurano<sup>4</sup> administrado por meio de máscara em sistema semi-aberto (Figura 1-A).

#### 3.2 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O animal foi depilado na região dorsal entre a segunda vértebra torácica e a terceira lombar (T2 a L3) e fixado com auxílio de fita adesiva em decúbito esternal na mesa cirúrgica. A mesa cirúrgica para realização dos procedimentos de laminectomia dos ratos foi confeccionada com duas chapas de polietileno, paralelas entre si, e separadas por quatro hastes de alumínio. Foi introduzida uma bolsa térmica com água à temperatura aproximada de 80°C no espaço entre as duas chapas. Perfurações na superfície da chapa em contato com o rato permitiram a passagem do calor da bolsa térmica e aquecimento do animal (Figura 1-A e B).

Foi realizada anti-sepsia com iodopovidona degermante<sup>5</sup> e solução de álcool iodado na região previamente depilada. Pele e tecido subcutâneo foram incisados na linha média dorsal estendendo-se desde a sexta vértebra torácica até a primeira lombar (T6 a L1). As inserções dos músculos epaxiais foram incisadas, e estes afastados lateralmente. Com o auxílio de uma goiva realizou-se osteotomia do processo espinhal da décima-terceira vértebra torácica (T13). Em seguida,

---

<sup>2</sup> Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Solução oral - Manipulado pela Farmácia Artesanal. Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Biotrat® - LMFarma. São José dos Campos, SP, Brasil.

retirou-se a lâmina dorsal da vértebra (laminectomia), empregando-se *drill* pneumático<sup>6</sup> neurológico, com irrigação constante das brocas com solução fisiológica<sup>7</sup> (Figura 1-C e D).

Após a visibilização da medula espinhal recoberta pela dura-máter intacta, realizou-se trauma mecânico com emprego de aparelho estereotáxico (Figura 1-B) conforme descrito por Silva et al. (2008). O trauma foi realizado por meio da colocação de um peso de 70,5g (0,5g correspondente ao peso da haste que suporta o peso de 70g) exercendo pressão em uma superfície de 1mm<sup>2</sup> sobre a região de T13, durante cinco minutos (Figura 1-E). Após a retirada da compressão, o local foi irrigado com solução fisiológica e, em seguida, os músculos, que haviam sido previamente afastados, foram aproximados e o espaço morto foi reduzido empregando-se sutura padrão simples contínua com fio poliglecaprone<sup>8</sup> 4-0. A sutura de pele foi realizada com pontos simples separados utilizando-se fio mononylon<sup>9</sup> 4-0.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixa aquecida a 37°C, durante aproximadamente cinco minutos, tempo médio da recuperação anestésica e, a seguir, devolvidos a suas caixas originais. Eles receberam cloridrato de tramadol na dose de 2mg/kg, por via oral, a cada oito horas por três dias consecutivos. Também foi realizada massagem abdominal, três vezes ao dia, para auxiliar a micção e defecação, até que cada animal recuperasse sua função voluntária.

### 3.3 - TRATAMENTO

O protocolo terapêutico consistiu de 10mg/kg de dantrolene sódico<sup>10</sup> ou o volume equivalente de seu diluente que constituiu o placebo administrado em dose única, por via intraperitoneal uma hora após o procedimento cirúrgico e/ou compressivo da medula espinhal. Este tempo foi escolhido baseado em Chacón e Nieto-Sampedro (2005) que afirmaram que o aumento de cálcio intra-axonal inicia-se cerca de 30 minutos após a lesão.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais de acordo com o protocolo de tratamento instituído e o tempo de observação após o procedimento cirúrgico, conforme demonstrado na tabela 2.

---

<sup>6</sup> With ECCOS® Aesculap - Laboratórios B. Braun S.A. São Gonçalo, RJ, Brasil.

<sup>7</sup> Cloreto de sódio a 0,9% - Solução eletrolítica injetável - Laboratório Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG, Brasil.

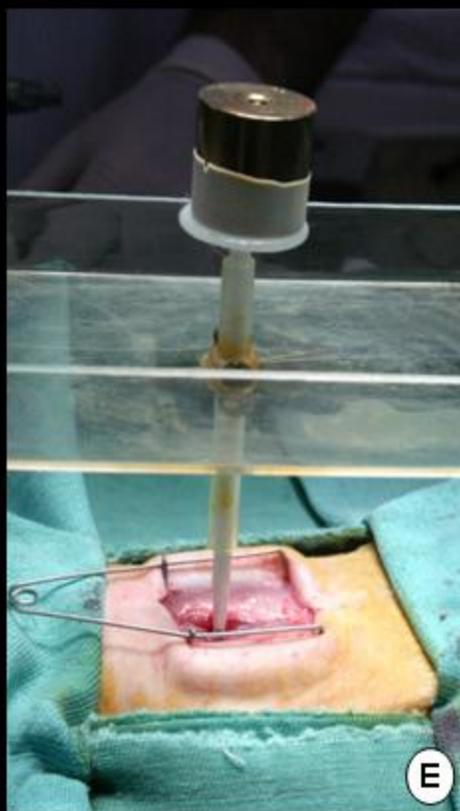
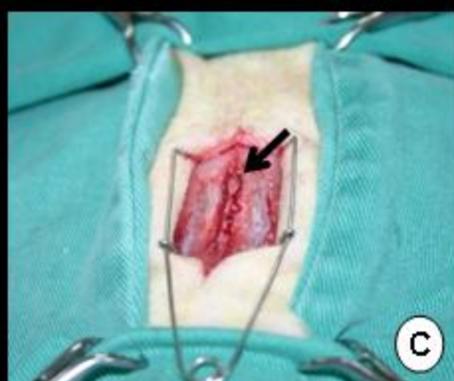
<sup>8</sup> Carprofyl - fio absorvível sintético - Johnson & Johnson. São José dos Campos, SP, Brasil.

<sup>9</sup> Fio inabsorvível - Ethicon - Johnson & Johnson. São José dos Campos, SP, Brasil.

---

<sup>10</sup> Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

**Figura 1** – Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. A) Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa adaptada para a realização da técnica cirúrgica. Anestesia por meio de máscara em sistema semi-aberto; B) Aparelho estereotáxico: bandeja com bolha de nível (seta preta), haste compressiva (seta branca) e mesa cirúrgica (asterisco); C) Campo cirúrgico com identificação dos processos espinhosos (seta); D) Visibilização da medula espinhal com aspecto normal após laminectomia dorsal (ponta da pinça). E) Procedimento de compressão da medula espinhal com peso de 70,5g.



**Tabela 2** – Grupos experimentais de acordo com protocolo de tratamento instituído e tempo de observação após procedimento cirúrgico

<b>Grupo</b>	<b>Denominação</b>	<b>Número de Animais</b>	<b>Descrição</b>
<b>GI</b>	Controle positivo - 32 horas	sete	Os animais foram submetidos a laminectomia seguida de trauma medular compressivo, receberam placebo e foram eutanasiados 32 horas após o procedimento cirúrgico.
<b>GII</b>	Controle negativo – 32 horas	sete	Os animais foram submetidos a laminectomia, receberam dantrolene e foram eutanasiados 32 horas após o procedimento cirúrgico.
<b>GIII</b>	Dantrolene - 32 horas	oito	Os animais foram submetidos a laminectomia seguida de trauma medular compressivo, receberam dantrolene e foram eutanasiados 32 horas após o procedimento cirúrgico.
<b>GIV</b>	Controle positivo – oito dias	oito	Os animais foram submetidos a laminectomia seguida de trauma medular compressivo, receberam placebo e foram eutanasiados oito dias após o procedimento cirúrgico.
<b>GV</b>	Controle negativo – oito dias	oito	Os animais foram submetidos a laminectomia, receberam dantrolene e foram eutanasiados oito dias após o procedimento cirúrgico.
<b>GVI</b>	Dantrolene – oito dias	oito	Os animais foram submetidos a laminectomia seguida de trauma medular compressivo, receberam dantrolene e foram eutanasiados oito dias após o procedimento cirúrgico.

Ressalta-se que a escolha dos tempos de eutanásia foi baseada no critério dos picos de morte celular secundária ao trauma inicial, ou seja, às 32 horas pretende-se observar os picos de oito e 24 horas e, aos oito dias o pico de sete dias.

Todos os resultados foram avaliados como estudo cego e por um único observador.

### 3.4 - TESTES COMPORTAMENTAIS

A função neurológica dos animais foi avaliada 24 horas antes da intervenção cirúrgica e, diariamente após a laminectomia, adotando-se o método de escala numérica descritiva.

O exame neurológico consistiu na realização de cinco testes comportamentais, seguindo o mesmo protocolo utilizado por Silva et al. (2008): sensibilidade dolorosa (SD),

capacidade motora (CM), posicionamento proprioceptivo (PP), posicionamento tátil (PT) e plano inclinado (PI) (Figura 2).

A SD foi testada pela pressão de uma pinça hemostática de *Halsted* fechada até a primeira cremalheira na prega interdigital dos membros pélvicos (Figura 2–A). 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 CM foi baseada na observação da atividade espontânea do animal, primeiro em campo aberto (1,0m<sup>2</sup>) sem obstáculo durante no máximo quatro minutos e quando apresentou apenas déficit discreto ou ausente na deambulação foi colocado para caminhar em barras de madeira com largura variando de forma decrescente de acordo com a capacidade neurológica do animal, seguindo

descrição de Von Euler et al. (1996) (Figura 2–B). As barras, apoiadas em cavaletes de 60cm de altura, tinham um metro de extensão e a largura variou de 7,7 a 1,7cm, com diferença de 1cm entre elas, em um total de sete barras. Quando o animal conseguiu caminhar na barra mais larga de 7,7cm, com os quatro membros apoiados na superfície superior, ele foi 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 conseguiu caminhar utilizando os quatro membros.

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

O PT foi verificado sustentando o animal e deixando o membro pélvico a ser testado livre. A superfície dorsal de cada membro

foi colocado em contato com a borda lateral de uma mesa (Figura 2–D). Foram avaliadas com que precisão e rapidez o animal colocou o membro na superfície da mesa.

O teste do PI, conforme descrito por Rivli e Tator (1977), consistiu em colocar o animal em uma tábua revestida por emborrachado cuja superfície podia ser ajustada para permanecer em vários ângulos (Figura 2–E) e foi estabelecido o maior ângulo no qual o animal conseguiu manter sua posição por cinco segundos. A capacidade dos animais manterem-se sobre a tábua em diferentes ângulos foi testada com intervalos angulares de 10 graus, começando desde 10° até 90°.

Os escores dos testes comportamentais estão apresentados na tabela 3. Nos testes de SD, PP e PT os dois membros pélvicos dos animais foram testados separadamente e considerou-se apenas o escore do membro com pior desempenho na primeira avaliação.

**Tabela 3** - Protocolo para avaliação dos testes comportamentais com os respectivos escores para: sensibilidade dolorosa (SD), capacidade motora (CM), posicionamento proprioceptivo (PP), posicionamento tátil (PT) e plano inclinado (PI), conforme Silva et al. (2008)

ESCORE	TESTES COMPORTAMENTAIS
	<b>SENSIBILIDADE DOLOROSA (SD)</b>
0	Ausente
1	Diminuída
2	Normal
	<b>CAPACIDADE MOTORA (CM)</b>
0	Nenhum movimento nos membros pélvicos, sem apoio de peso.
1	Movimento sutil, desconexo dos membros pélvicos, sem apoio de peso.
2	Movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso.
3	Apoio de peso nos membros pélvicos, anda com 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 7,7cm
7	Consegue andar na barra de 6,7cm
8	Consegue andar na barra de 5,7cm
9	Consegue andar na barra de 4,7cm
10	Consegue andar na barra de 3,7cm
11	Consegue andar na barra de 2,7cm
12	Consegue andar na barra de 1,7cm
	<b>POSICIONAMENTO PROPRIOCEPTIVO (PP)</b>
0	Ausente
1	Diminuído
2	Normal
	<b>POSICIONAMENTO TÁTIL (PT)</b>
0	Ausente
1	Diminuído
2	Normal
	<b>PLANO INCLINADO (PI)</b>
1	Permanece em um ângulo 30° menor do que antes da cirurgia
2	Permanece em um ângulo 20° menor do que antes da cirurgia
3	Permanece em um ângulo 10° menor do que antes da cirurgia
4	Permanece no mesmo ângulo que antes da cirurgia

### 3.5 - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico<sup>11</sup> (50mg/kg) por via intraperitoneal, para cardiopunção. Foram colhidas amostras de sangue para avaliação das funções hepática e renal, por meio da

dosagem sérica de bilirrubina, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e uréia e creatinina, respectivamente, além de creatina quinase (CK) para avaliação de lesões musculares. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Escola de Veterinária,

<sup>11</sup> Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

utilizando-se aparelho analisador bioquímico<sup>12</sup>, seguindo protocolo dos kits comerciais de diagnósticos<sup>13</sup>.

### 3.6 - AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA SISTÊMICA

Os ratos foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico por via intraperitoneal e necropsiados para avaliação da integridade dos órgãos. Amostras de pele na região da incisão cirúrgica, do músculo longíssimo lombar, diafragma, coração, pulmão, fígado, baço, rim e bexiga, foram colhidas, fixadas em formol a 10%, em tampão fosfato (pH 7,4), durante 24 horas e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções de 4 µm foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina<sup>14</sup> (H.E.) para avaliação morfológica em microscópio óptico (Luna, 1968).

Além da avaliação morfológica, realizou-se a morfometria da bexiga para quantificar o processo inflamatório. Foi determinada a porcentagem das áreas de inflamação e hemorragia, com auxílio de uma ocular micrométrica contendo uma graticula com 121 pontos, em oito campos representativos, observados à objetiva de 40x.

### 3.7 - AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL

O segmento entre C5 e L5 da coluna vertebral com medula espinhal foi colhido e fixado em formol a 10%, em tampão fosfato (pH 7,4), durante sete dias e, a seguir, dissecado. Foram realizados cortes transversais, com auxílio de lâmina de bisturi, nas regiões do epicentro (local mais acometido da medula espinhal - T13) e cranial e caudal adjacentes a este e cortes longitudinais nos seguimentos cranial e

caudal restantes. Os fragmentos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções de 4µm foram coradas pela técnica de H.E. para avaliação morfológica e classificação de características apoptóticas das células nervosas de acordo com a intensidade (discreta, moderada ou acentuada) em microscópio óptico (Luna, 1968). Outras secções foram coradas pela técnica de imunistoquímica para avaliação de núcleos neuronais, utilizando-se anticorpos monoclonais (anti-NeuN)<sup>15</sup>.

### 3.8 – TUNEL

A fragmentação do DNA de neurônios da medula espinhal foi avaliada utilizando o método TUNEL (*TdT mediated dUTP nick endlabelling*). As lâminas contendo cortes transversais de medula espinhal foram desparafinadas e processadas para técnica de TUNEL, utilizando o kit comercial<sup>16</sup> de acordo com as instruções preconizadas pelos produtores, seguindo as etapas: (1) permeabilização da amostra com 0,5% de triton X-100 em 0,1% de citrato de sódio; (2) bloqueio da peroxidase endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol); (3) reação para equilíbrio e inserção de nucleotídeos; (4) pernoite a 37°C; (5) finalização da reação de inserção de nucleotídeos; (6) detecção (tampão bloqueio e conjugado) e incubação por 1 hora em temperatura ambiente; (7) 3-3' diaminobenzidina/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB) e contra-coloração com hematoxilina. Foram utilizados controle positivo (secções de baço, linfonodos e medula espinhal normal de rato) e negativo (secções de medula espinhal normal de rato, sem nucleotídeos) em todas as reações.

Nas secções de medula espinhal marcadas com TUNEL foi determinado o número de corpos neuronais TUNEL-positivos por

<sup>12</sup> Cobas Mira® - Roche. Jacarepaguá, RJ, Brasil.

<sup>13</sup> Biosystems S.A. Barcelona, CT, Espanha.

<sup>14</sup> H&E (Sigma-Aldrich, MO, USA). Saint Louis, MO, USA.

<sup>15</sup> Anti-NeuN – Chemicon. Temecula, CA, USA.

<sup>16</sup> ApopTag Plus – Oncor. Gaithersburg, MD, USA.

campo. Utilizaram-se para quantificação dez campos (número mínimo comum para todos os animais) da região de substância cinzenta na secção adjacente ao epicentro que apresentou maior integridade tissular. Os resultados foram expressos como número médio de corpos neuronais TUNEL-positivos por campo em cada grupo. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão.

### 3.9 - IMUNOISTOQUÍMICA

As lâminas contendo cortes transversais de medula espinhal foram desparafinadas e processadas para imunoistoquímica<sup>17</sup>, utilizando os anticorpos primários anti-NeuN (1:1600) - catálogo número MAB377 - , seguindo as etapas: (1) recuperação antigênica por meio de aquecimento em solução retrieve; (2) bloqueio da peroxidase endógena em PBS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (3) incubação em soro normal; (4) pernoite em anticorpo primário em refrigerador; (5) anticorpo secundário específico; (6) complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase; (7) 3-3' diaminobenzidina/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB) e contra-coloração com hematoxilina. Foram utilizados controle positivo (secções de medula espinhal normal de rato) e negativo (secções de medula espinhal normal de rato, sem anticorpo primário) em todas as reações. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão.

Nas secções de medula espinhal tratadas com anticorpo anti-NeuN foi determinado o número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo. Utilizaram-se para quantificação, dez campos (número mínimo comum para todos os animais) da região de substância cinzenta na secção adjacente ao epicentro que apresentou maior integridade tissular. Os resultados foram expressos como número médio de corpos neuronais NeuN-positivos por campo em cada grupo.

---

<sup>17</sup> Novocastra Labs. Benton Lane, Newcastle-UK.

## 4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento foi inteiramente casualizado. Os escores das variáveis dos testes neurológicos entre os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e entre os dias pelo teste de Friedman. Os dados das variáveis das dosagens bioquímicas, quantidade de lesão vesical e número de corpos neuronais NeuN-positivos e TUNEL-positivos foram comparados pelo teste de ANOVA e a significância entre as médias estabelecida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico *GraphPad Prism 5 for Windows*. Adotou-se 95% como nível de confiança das análises (p-valor  $\leq 0,05$  indica diferença significativa).

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo de trauma compressivo por peso possibilitou a avaliação do tratamento proposto e acompanhamento da evolução do processo clínico-patológico instaurado. A utilização do aparelho estereotáxico desenvolvido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, com pequenas modificações da metodologia proposta por Silva et al. (2008), permitiu produzir trauma medular em ratos de maneira padronizada e satisfatória.

Os animais apresentaram tolerância satisfatória à intensidade dos procedimentos, constituindo, portanto, modelo experimental viável e adequado para o estudo dos efeitos do dantrolene no tratamento da lesão medular aguda. Taoka e Okajima (1998) e Ma et al. (2001) relataram alta taxa de sobrevivência, consequentes do emprego de protocolo anestésico seguro, procedimento cirúrgico padronizado e cuidados pós-operatórios intensivos, apesar da gravidade das lesões instauradas. A viabilidade deste modelo também foi observada por Silva et al. (2008).

A utilização de um peso compressivo de 70,5g, com uma superfície de contato de 1mm<sup>2</sup>, diretamente sobre a dura-máter em T13, durante cinco minutos, resultou em paraplegia grave dos membros pélvicos, retenção urinária com hematúria e constipação concomitantes (Figura 2 – F, G e H). Essas alterações não foram observadas por Silva et al. (2008) no emprego de peso compressivo de 50,5g, quando objetivaram um trauma medular moderado. Ausência de déficit neurológico, paraparesia transitória ou ainda paraplegia têm sido relatados após a indução de trauma compressivo e são proporcionais ao peso empregado (Li et al., 1996; Taoka e Okajima, 1998; Silva et al., 2008).

Distúrbios comportamentais, como alteração de apetite e infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica não foram observados. À necropsia, seis animais (13%), distribuídos aleatoriamente, apresentaram estrutura cavitária repleta de conteúdo serosanguinolento no tecido subcutâneo subjacente à ferida cirúrgica, sugestivo de seroma. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2008) que atribuíram tal reação a grande frouxidão da pele desses animais e intenso manuseio pós-cirúrgico. Não foi observada qualquer alteração na ferida que sugerisse reação ao fio cirúrgico empregado.

### 5.1 - TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais empregados (Figura 2) demonstraram fácil aplicabilidade, objetividade e não resultaram em estresse para os animais. Além disso, não exigiram treinamento prévio e foram realizados com equipamentos simples e de baixo custo. A utilização de múltiplos testes fez-se necessária para atender às necessidades de uma avaliação completa e meticulosa dos déficits sensoriais e motores (Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000; Muir e Webb, 2000; Ma et al., 2001).

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade. Foram capazes de caminhar em campo aberto e na barra de 1,7cm e, no PI mantiveram-se em ângulo aproximado de 90 graus por no mínimo cinco minutos.

Os animais do GII (controle negativo – 32 horas) e do GV (controle negativo – oito dias) foram capazes de caminhar sobre a barra de 1,7cm e não apresentaram nenhum déficit neurológico nos demais testes. Esses resultados estão de acordo com os de Kaptanoglu et al. (2003) que também não observaram qualquer déficit nos ratos submetidos ao mesmo procedimento. Porém, estudos de Farooque (2000) e Giglio et al. (2006) contrariam tais resultados, já que observaram discreto déficit neurológico em roedores submetidos apenas a laminectomia. Esse déficit pode ser atribuído a alguma injúria na medula durante a cirurgia por se tratar de um procedimento delicado e de difícil execução devido ao tamanho do animal em estudo.

Todos os animais dos grupos GI (controle positivo - 32 horas), GIII (dantrolene - 32 horas), GIV (controle positivo - oito dias) e GVI (dantrolene - oito dias) apresentaram déficit neurológico grave na primeira avaliação que ocorreu 24 horas após o procedimento cirúrgico. No teste de CM observou-se paraplegia dos membros pélvicos e, portanto, incapacidade de apoio do peso sobre os mesmos. Ausência de resposta nos testes de SD, PP e PT também foram observados e, os animais não foram capazes de se manter em angulação superior a 60 graus no PI.

Déficit bilateral e simétrico, caracterizado por paraplegia dos membros pélvicos foi observado nos ratos traumatizados, enquanto Ford (1983) e Silva et al. (2008) verificaram assimetria. Lateralização da lesão tem sido relatada como dificuldade de padronização

desse modelo experimental (Ford, 1983; Silva et al., 2008), uma vez que a haste pode ser lateralizada no momento do posicionamento do peso compressivo.

Esses resultados confirmam a padronização do trauma, já que não houve diferença no grau de acometimento entre os animais. Silva et al. (2008) utilizando metodologia semelhante observaram variação no acometimento entre os animais, após lesão medular moderada. Movimentação da coluna no momento do trauma devido à respiração, variações anatômicas individuais tais como, dimensão e consistência da

medula e massa corporal são fatores que interferem com a quantidade de tecido danificado e também justificam a dificuldade de padronização das lesões (Panjabi e Wrathall, 1988; Gruner et al., 1996; Ma et al., 2001).

De acordo com a avaliação comportamental não houve diferença entre os diversos grupos cujos animais foram submetidos ao trauma medular (GI, GIII, GIV e GVI) (Tabela 4), nem entre dias de avaliação quanto à recuperação das funções sensorial e motora (Figuras 3 a 7).

**Tabela 4** - P-valores da comparação de resultados entre os grupos para os testes comportamentais de sensibilidade dolorosa (SD), capacidade motora (CM), posicionamentos proprioceptivo (PP) e tátil (PT) e plano inclinado (PI). (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Com 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ), os p-valores marcados em vermelho apresentam diferença significativa.

Grupos	SD	CM	PP	PT	PI
GI x GII	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
GI x GIII	0,705	1,000	1,000	1,000	1,000
GII x GIII	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
GIV x GV	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
GIV x GVI	0,268	0,959	0,882	0,882	0,807
GV x GVI	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nenhum dos animais apresentou recuperação total das funções aos testes de PP e PT após oito dias de avaliação. Quanto ao PI, a maioria dos animais permaneceu em ângulo idêntico ao anterior a cirurgia, ou seja, próximo a 90 graus, embora apresentassem ataxia. Resultado semelhante foi relatado por Von Euler et al. (1996) e Silva et al. (2008) e, possivelmente, a variação de 10 graus entre os ângulos foi grande para detectar qualquer diferença. Rivlin e Tator (1977) fizeram avaliações a cada cinco graus e relataram maior sensibilidade na detecção de déficits mínimos.

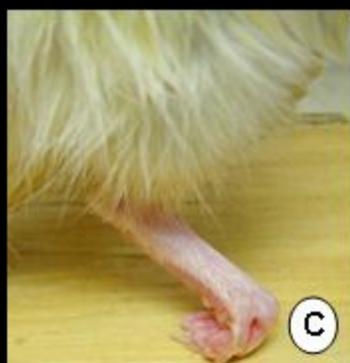
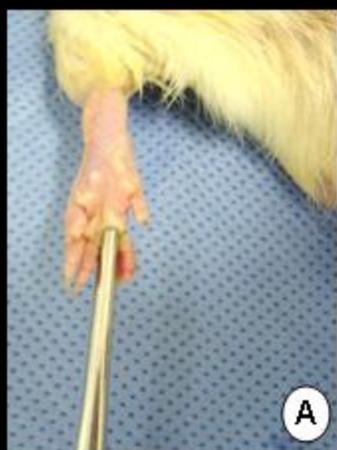
Embora em nenhum dos testes comportamentais tenha sido observada diferença entre os grupos com trauma medular (GI, GIII, GIV e GVI), possivelmente em consequência do trauma grave ou do curto período de observação, nota-se discreta tendência de recuperação em oito dias, especialmente no teste de SD, principalmente nos animais tratados com dantrolene (Figura 3). Conforme citado por Wheeler e Sharp (2005), este parâmetro seria o primeiro a retornar a normalidade.

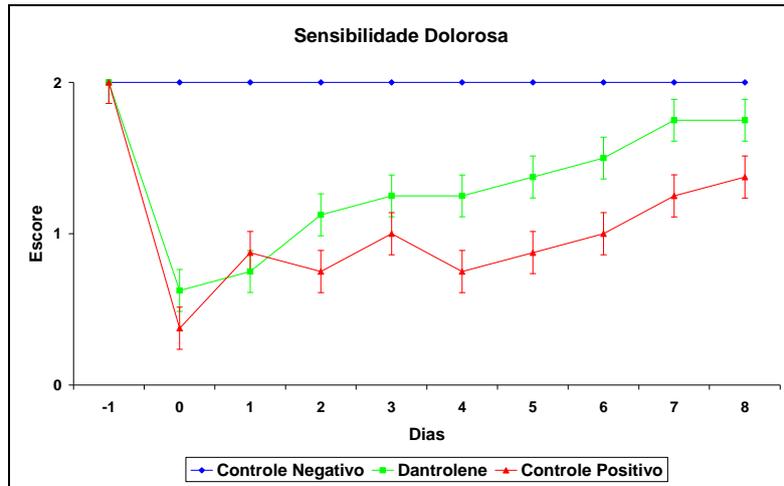
Recuperação espontânea e precoce após trauma medular discreto a moderado tem sido relatada e pode dificultar a avaliação do tratamento proposto (Jeffery e Blakemore, 1999; Silva et al., 2008). Este evento é consequência da adaptação ou do retorno funcional dos axônios temporariamente afuncionais que se mantiveram intactos em meio ao tecido danificado. Além disso, em longo prazo, o estabelecimento de vias alternativas que contornem os locais afetados (neuroplasticidade) e, possivelmente, a regeneração de axônios lesados, podem aumentar as chances de retorno funcional (Soblosky et al., 2001; Brechtel et al., 2006).

Portanto, os resultados sugerem que os animais submetidos a lesão compressiva

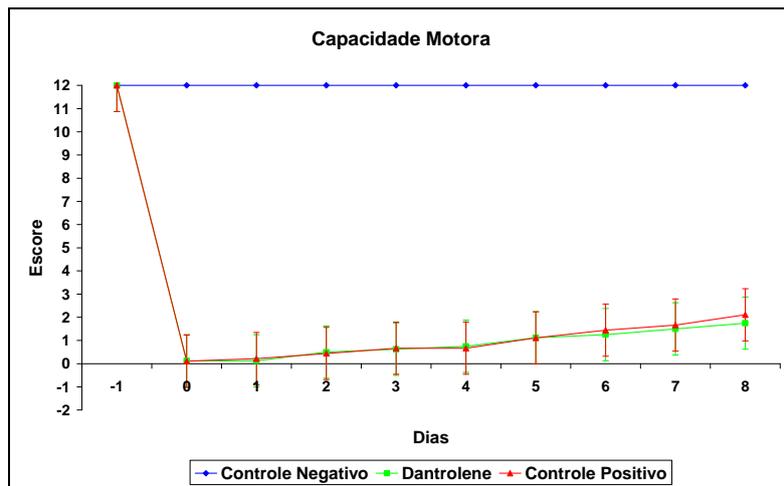
com 70,5g durante cinco minutos, em T13, apresentaram comprometimento dos tratos sensitivos e motores responsáveis pela inervação dos membros pélvicos, uma vez que resultou em incapacidade funcional extensa e grave dos mesmos. Os tempos de observação de 32 horas e oito dias não foram eficazes para demonstrar um possível efeito clínico (por meio dos testes comportamentais) do dantrolene no tratamento de trauma medular agudo em ratos. Porém, já que houve tendência de recuperação mais evidente entre os animais tratados com este fármaco, sugere-se que a avaliação neurológica possa demandar maior tempo de observação em traumas medulares graves.

**Figura 2** - Fotografias da avaliação neurológica por meio dos testes comportamentais (A, B, C, D e E) e sinais clínicos (F, G e H) após trauma medular agudo em ratos Wistar. A) Beliscamento da prega interdigital para avaliação da sensibilidade dolorosa; B) Caminhada na barra de madeira para determinação da capacidade motora; C) Avaliação do posicionamento proprioceptivo em animal com déficit; D) Avaliação do posicionamento tátil em animal com déficit; E) Teste do plano inclinado; F) Paraplegia de membros pélvicos; G) Urina liberada (seta) após realização de massagem abdominal para auxiliar o esvaziamento da bexiga; H) Hematúria intensa (seta) decorrente de cistite hemorrágica.

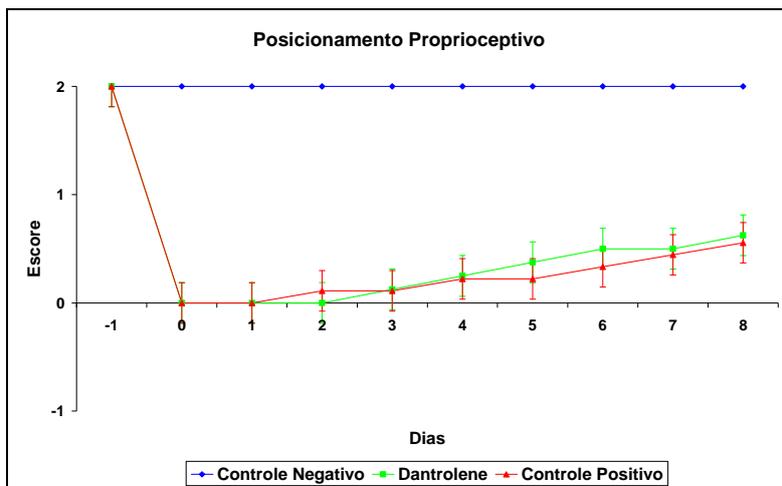




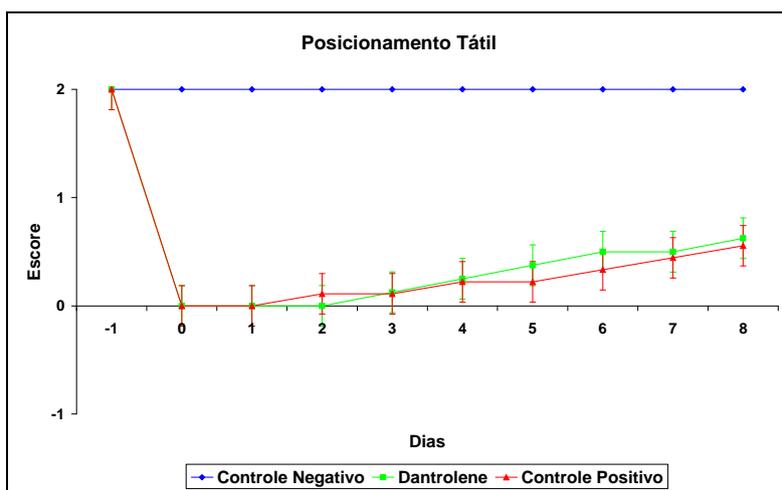
**Figura 3** - Gráfico do teste de Sensibilidade Dolorosa mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = ausente; 1 = diminuída; 2 = normal).



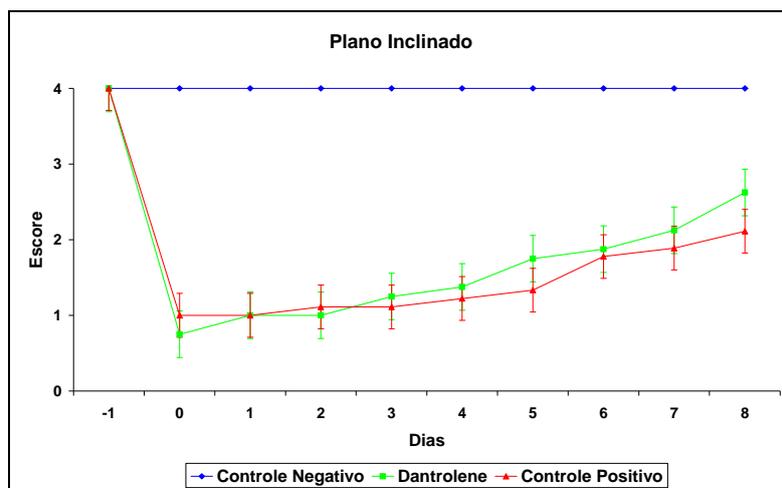
**Figura 4** - Gráfico do teste de Capacidade Motora mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = nenhum movimento nos membros pélvicos, sem apoio de peso; 1 = movimento sutil, desconexo dos membros pélvicos, sem apoio de peso; 2 = movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso; 3 = apoio de peso nos membros pélvicos, anda com 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 7,7cm; 7 = consegue andar na barra de 6,7cm; 8 = consegue andar na barra de 5,7cm; 9 = consegue andar na barra de 4,7cm; 10 = consegue andar na barra de 3,7cm; 11 = consegue andar na barra de 2,7cm; 12 = consegue andar na barra de 1,7cm).



**Figura 5** - Gráfico do teste de Posicionamento Proprioceptivo mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = ausente; 1 = diminuída; 2 = normal).



**Figura 6** - Gráfico do teste de Posicionamento Tátil mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 0 = ausente; 1 = diminuída; 2 = normal).



**Figura 7** - Gráfico do teste de Plano Inclinado mostrando os escores (média e erro padrão) do acompanhamento diário de ratos Wistar, submetidos a laminectomia (controle negativo) e ao trauma medular agudo, tratados (dantrolene) ou não (controle positivo), durante oito dias de observação. (Dia -1 = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; Dia 0 = dia do procedimento cirúrgico. Escores: 1 = permanece em um ângulo 30° menor do que antes da cirurgia; 2 = permanece em um ângulo 20° menor do que antes da cirurgia; 3 = permanece em um ângulo 10° menor do que antes da cirurgia; 4 = permanece no mesmo ângulo que antes da cirurgia).

## 5.2 - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Os valores séricos das provas hepáticas (albumina, bilirrubina, proteínas totais, AST, ALT), renais (uréia, creatinina) e de CK não apresentaram diferença em relação aos parâmetros fisiológicos para a espécie (Thrall, 2004; Hooper et al., 2007) e nem entre os diversos grupos (Figura 8). Isso sugere que não houve alterações destas funções nos animais submetidos ao trauma medular agudo, independente do tratamento e do tempo de avaliação.

O dantrolene quando utilizado em altas doses e/ou por longo período pode resultar em lesões hepáticas. Os riscos variam desde elevações assintomáticas de enzimas hepáticas séricas, até hepatite fatal (Ward et al., 1986). Chan (1990), em um estudo retrospectivo, relatou hepatotoxicidade em humanos adultos com hipertermia maligna submetidos ao tratamento com dantrolene, por pelo menos dois meses, em doses que variaram de 200-1600mg/dia. Foram encontradas desde elevações assintomáticas

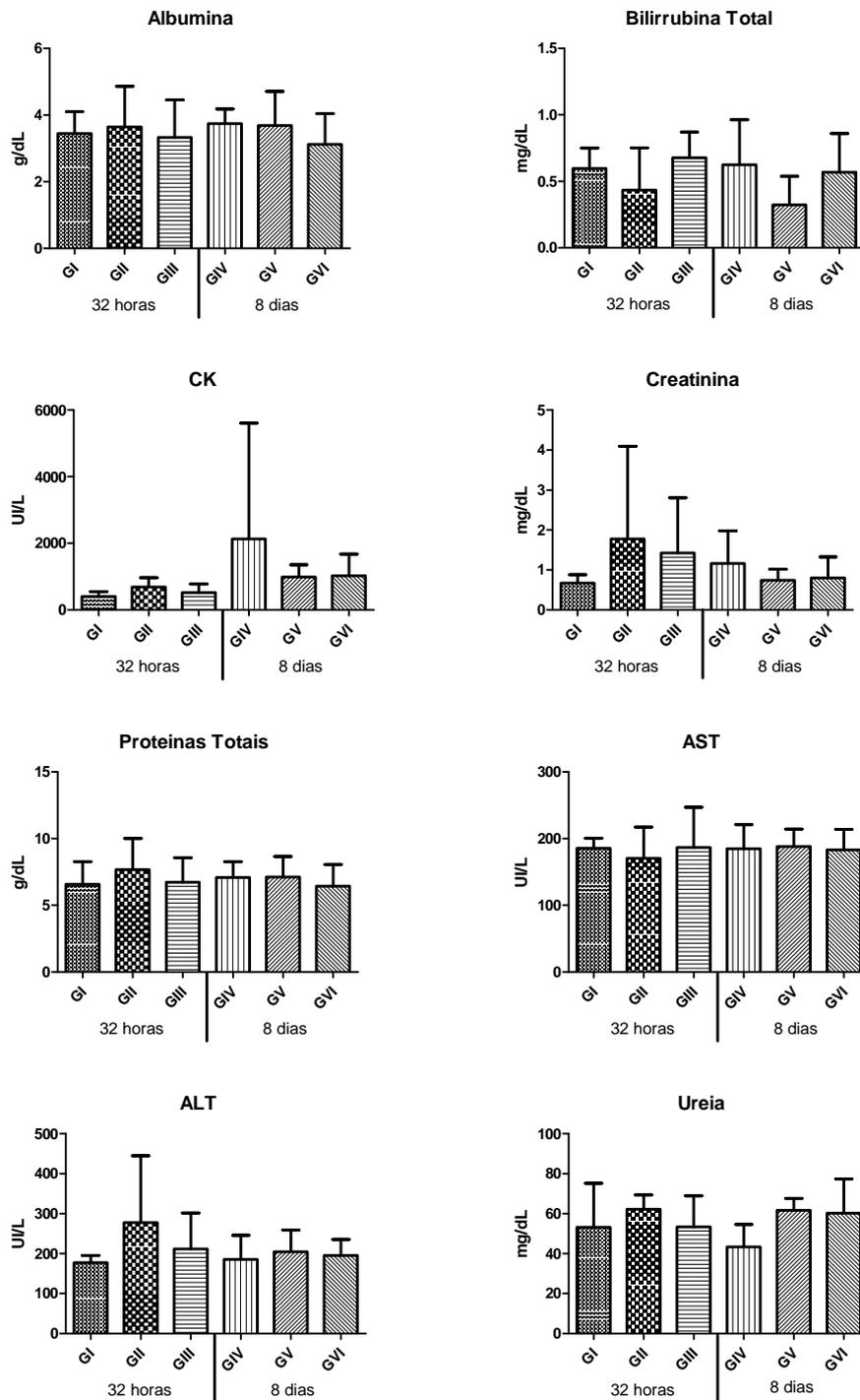
das transaminases, até hiperbilirrubinemia, icterícia e óbito. Nos testes de biópsia os achados eram condizentes com hepatite crônica ativa, lesões pré-cirróticas e cirróticas.

A realização da massagem abdominal permitiu efetivo esvaziamento da bexiga, o que provavelmente preveniu o desenvolvimento de um quadro urêmico e de infecções do trato urinário. A incapacidade de esvaziamento vesical originado pelo trauma medular agudo pode predispor a um quadro de uremia pós-renal, com aumento de compostos nitrogenados reabsorvidos da urina para a circulação sanguínea (Cowgill e Elliott, 2000). Nesses casos, a massagem abdominal previne o acúmulo urinário por períodos prolongados dentro da bexiga, evitando o desenvolvimento da uremia (Ayas et al., 2006).

O aumento na concentração sérica de CK geralmente indica afecção muscular e pode ocorrer em pacientes após traumatismos com consequente atrofia muscular ou decúbito

prolongado (Wheeler e Sharp, 2005). Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, Edwards et al. (2003) e McKenzie et al. (2004) demonstraram a eficácia do dantrolene em diminuir a CK sérica após atividade física, em equinos portadores de rabdomiólise recorrente induzida por exercício. Pagala et al. (1997) também observaram tais propriedades desse fármaco, após induzirem estimulação química e elétrica em músculos isolados de ratos.

Ausência de alteração em parâmetros bioquímicos corrobora os dados da literatura que afirmam que o dantrolene é um fármaco seguro e com poucos efeitos colaterais quando utilizado em dose terapêutica, reforçando a segurança da utilização da dosagem única de 10mg/kg do fármaco para tratamento de afecções neurodegenerativas (Silverman e Hikida, 1977; Bowman, et al., 1979; Fournier, 1982; Wei e Perry, 1996; Harrison, 1998; Edwards et al., 2003; Gülçin et al., 2004; Krause et al., 2004).



**Figura 8** – Gráficos das médias e desvios padrão dos valores séricos de albumina, bilirrubina total, CK, creatinina, proteínas totais, AST, ALT e uréia de ratos Wistar (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias) ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.3 - AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA SISTÊMICA

Não foram observadas alterações macro e microscópicas dignas de nota nos órgãos avaliados, com exceção da medula espinhal, musculo longissimo lombar e bexiga. Portanto, a avaliação anatomopatológica corroborou os resultados obtidos na análise de bioquímica sérica, uma vez que também nesta não foram evidenciadas alterações importantes ou diferença entre os grupos estudados.

Observou-se à microscopia óptica, degeneração dos feixes fibrosos do músculo longissimo lombar em todos os animais submetidos a trauma medular, consistente com hipotrofia muscular. Este fato possivelmente decorreu-se da interrupção dos impulsos axonais que inervam essa musculatura, além do desuso da mesma, já que os animais com paraplegia de membros pélvicos apresentaram diminuição da carga sobre esse grupo muscular (Wheeler e Sharp, 2005).

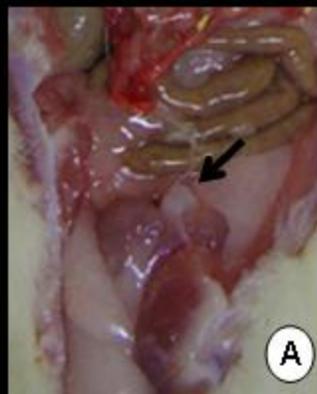
À necropsia, foram observadas alterações de bexiga na maioria dos animais que sofreu trauma medular, independente do tratamento, sendo que 50,0% (oito animais) dos tratados com dantrolene e 60,0% (nove

animais) dos que receberam placebo foram acometidos.

Os animais submetidos apenas a laminectomia (GII: controle negativo - 32 horas; e GV: controle negativo - oito dias) não apresentaram alterações na bexiga (Figura 9-A), enquanto aqueles submetidos ao trauma medular apresentaram cistite hemorrágica de intensidade variável nos diferentes grupos (Figura 9-B a G). No GI (controle positivo - 32 horas) e GIII (dantrolene - 32 horas) observaram-se intensa distensão vesical, serosa congesta e mucosa com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia, coágulos e conteúdo líquido translúcido e avermelhado (Figura 9-B e C).

Já os animais do GIV (controle positivo - oito dias) apresentaram distensão moderada a intensa da bexiga, congestão de serosa e espessamento de parede, mucosa hiperêmica e com áreas multifocais de hemorragia e conteúdo variando de translúcido a turvo e vermelho escuro (Figura 9-D e E). As alterações foram menos intensas no GVI (dantrolene - oito dias), no qual apenas três animais apresentaram espessamento moderado de parede, áreas multifocais e discretas de hemorragia na mucosa e conteúdo discretamente avermelhado (Figura 9-F).

**Figura 9** - Fotografias de bexigas de ratos Wistar à necropsia: aspecto normal (A), 32 horas após o trauma (B e C) e oito dias após o trauma (D, E, F e G). A) Bexiga com aspecto normal (seta) em animal submetido a laminectomia sem trauma medular; B) Intensa distensão vesical, serosa congesta e conteúdo líquido avermelhado em animal do GI (controle positivo - 32 horas); C) Mucosa com áreas multifocais de hemorragia e coágulos (seta) em animal do GIII (dantrolene - 32 horas); D) Distensão vesical com líquido avermelhado e congestão de serosa em animal do GIV (controle positivo - oito dias); E) Nota-se espessamento de parede, mucosa hiperêmica com áreas multifocais de hemorragia, conteúdo turvo e vermelho escuro em animal do GIV; F) Animal do GVI (dantrolene - oito dias) com alterações semelhantes ao GIV, porém menos intensas; G) Grande quantidade de conteúdo líquido vermelho escuro (hematúria) sendo puncionado em animal do GIV.



À avaliação histológica, as bexigas dos animais do GII (controle negativo – 32 horas) e do GV (controle negativo – oito dias) não apresentaram alterações (Figura 10-A e B). A bexiga urinária normal é constituída por uma camada de epitélio de transição (mucosa), lâmina própria, composta por tecido conjuntivo frouxo, túnica muscular que pode ser formada por três subcamadas de músculo liso arranjado em feixes e por revestimento externo constituído por túnica serosa (peritônio). A mucosa pode estar pregueada e, nesse momento o epitélio fica espesso. Com a distensão da bexiga, a espessura do epitélio de transição se reduz e as pregas da mucosa se desfazem (Banks, 1993; Junqueira e Carneiro, 2003).

No GI (controle positivo – 32 horas), observaram-se áreas multifocais de hemorragia discreta nas camadas musculares e lâmina própria, e infiltrado inflamatório misto, discreto a moderado, constituído por macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Figura 10-C). No GIII (dantrolene - 32 horas) características semelhantes às do GI foram identificadas (Figura 10-D).

Aos oito dias após o trauma medular, as bexigas do GIV (controle positivo – oito dias) apresentaram maior intensidade das lesões, com infiltrado inflamatório e hemorragia variando de moderados a intensos em todas as camadas (Figura 10-E). Já no GVI (dantrolene – oito dias), havia discreto infiltrado inflamatório, predominantemente de macrófagos na lâmina própria e as características morfológicas das bexigas assemelhavam-se com as dos animais não traumatizados (GII e GV) (Figura 10-F).

A quantificação das lesões de bexiga por campo confirmou a descrição dos achados morfológicos, e nota-se que aos oito dias de observação, os animais que receberam placebo (GIV) apresentaram hemorragia e infiltrado inflamatório significativamente

maiores quando comparados aos animais dos grupos sem trauma (GV) ou tratados com dantrolene (GVI). Fica claro que, aos oito dias de observação, os animais com trauma medular tratados com dantrolene (GVI) não apresentam lesões significativas na bexiga, assemelhando-se aos animais dos grupos GII e GV que não sofreram trauma medular (Figuras 11 e 12).

Os animais com trauma medular apresentaram além de retenção urinária e hematúria ao exame clínico, alterações macro e microscópicas, as quais confirmam o quadro de cistite. Os achados histológicos das bexigas após trauma medular compressivo em região torácica (T13) foram semelhantes àqueles identificados por Meyer et al. (2003).

A retenção urinária é uma das principais sequelas do trauma medular, que prejudica e causa incômodo aos seres humanos e, algumas vezes, determina a eutanásia do paciente na medicina veterinária. Esta afecção é frequente em pacientes que sofreram trauma medular na região de T3 a L3, pois ocorre desenvolvimento de incapacidade de esvaziamento vesical. Em casos mais graves podem-se desenvolver infecção ascendente do trato urinário, hidronefrose e insuficiência renal aguda (Meyer et al., 2003; Wheeler e Sharp, 2005; Leung et al., 2007).

A variação de intensidade da cistite observada entre os grupos submetidos ao trauma possivelmente foi efeito do tratamento. O emprego da massagem abdominal e/ou do dantrolene podem ter melhorado a condição clínica dos animais, auxiliando no esvaziamento da bexiga, impedindo o aparecimento de alterações bioquímicas, como azotemia pós-renal, e evitando conseqüências mais graves da retenção urinária (Ayas et al., 2006).

Considerando-se que o esvaziamento vesical seja um dos mecanismos de proteção do

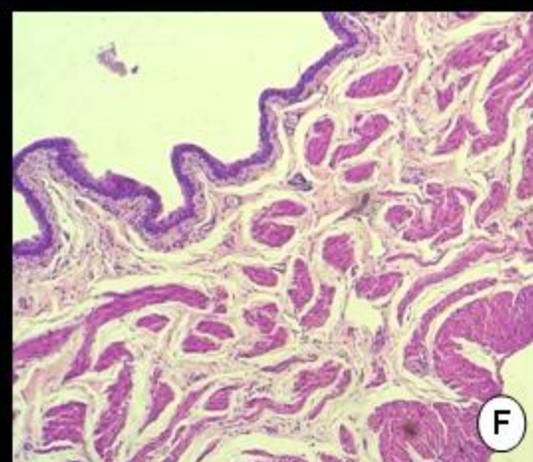
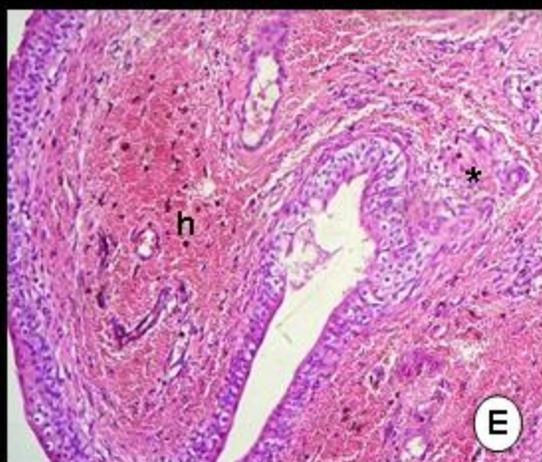
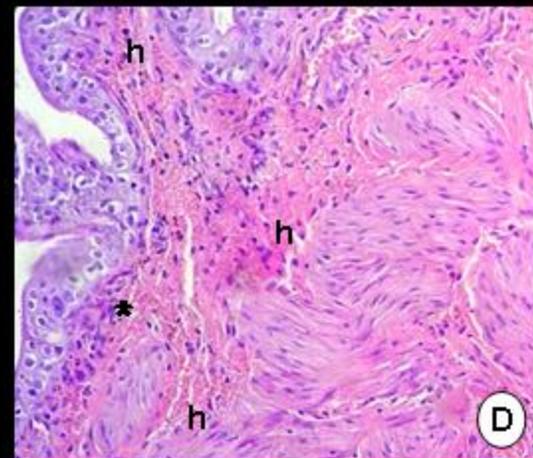
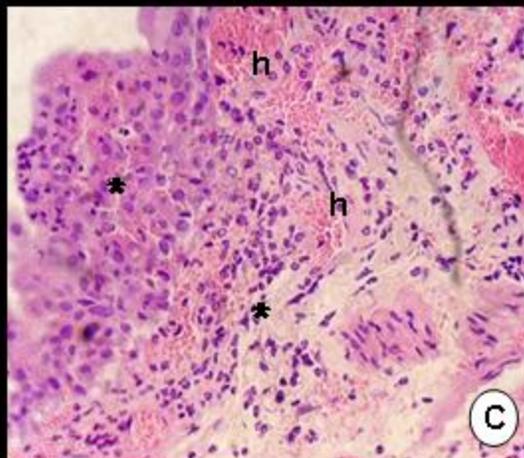
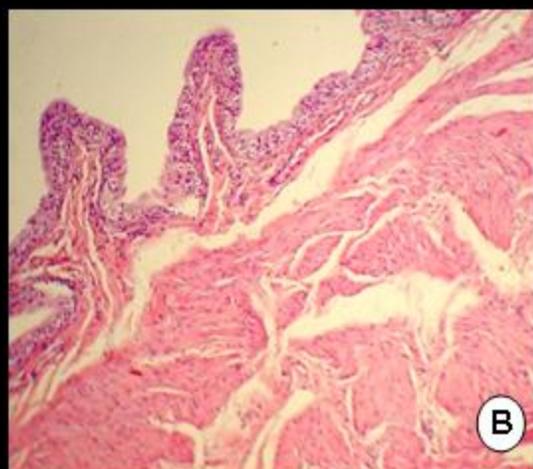
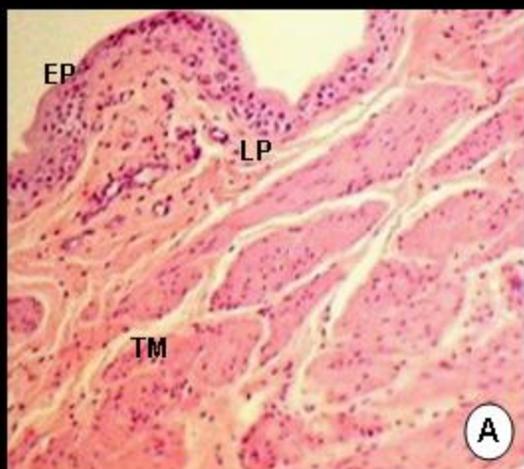
sistema urinário, é possível que a ação do dantrolene sobre o esfíncter tenha participação importante nesse processo (Pedersen et al., 1978; Khalaf et al., 1979; Hackler et al., 1980; Wheeler e Sharp, 2005). Outra possibilidade é a ação indireta do medicamento nas lesões de neurônios envolvidos nas conduções sensitiva e motora responsáveis pela função urinária (Braund e Sharp, 2003; Wheeler e Sharp, 2005). Além disso, pode-se sugerir a associação destas possibilidades.

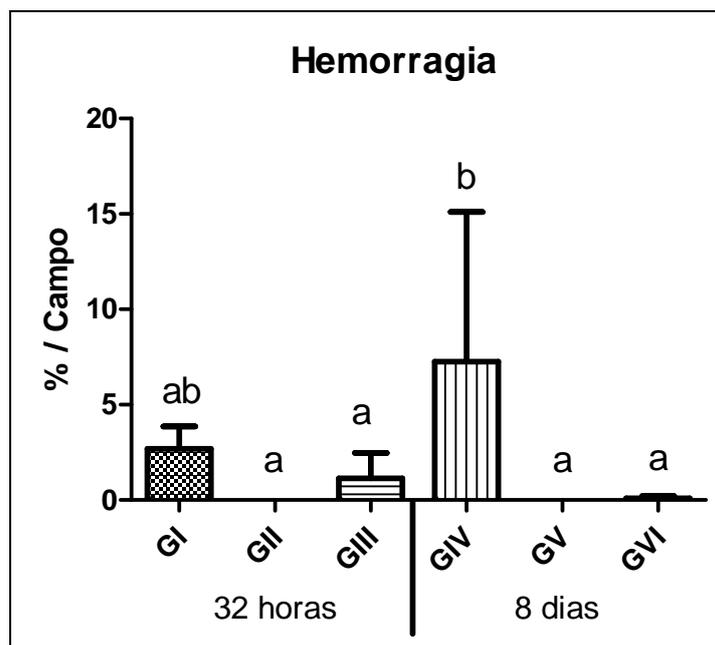
Já foram demonstradas a eficácia do dantrolene em tratar desordens inflamatórias mediadas por citocinas (Hotchkiss et al., 1995) e suas propriedades antiinflamatórias e anti-nociceptivas, sendo capaz de diminuir consideravelmente a formação de edema e inibir a síntese de metabólitos do ácido

araquidônico (Büyükkuroglu, 2002; Gülçin et al., 2004). Também foram comprovadas suas propriedades antioxidantes por prevenir a peroxidação lipídica e proteger as células contra os efeitos tóxicos dos radicais livres de oxigênio (Büyükkuroglu et al., 2001; Büyükkuroglu et al., 2002; Ucuncu et al., 2005).

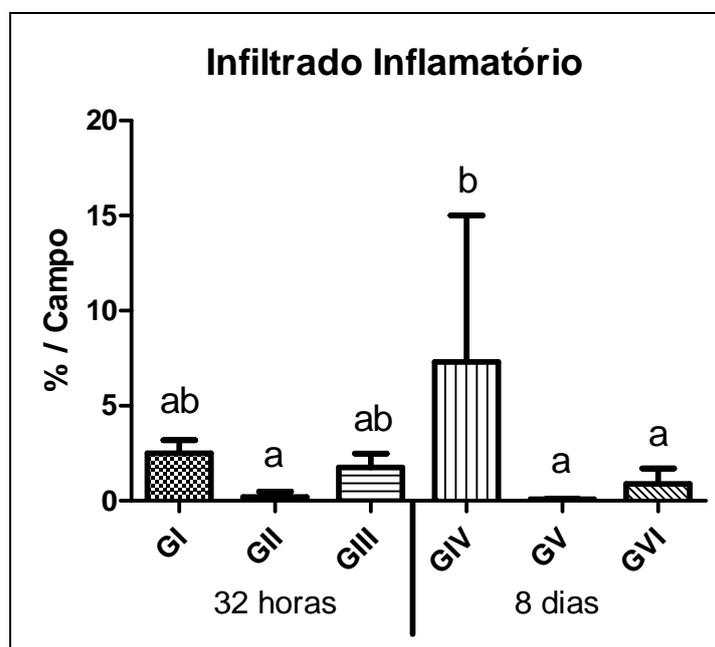
Não foram observados na literatura relatos do efeito do dantrolene sobre a histologia da bexiga, entretanto, os resultados sugerem que o dantrolene foi capaz de evitar os processos hemorrágico e inflamatório, resultando em bexigas com menor intensidade das lesões e, portanto, apontam para uma possível ação protetora do fármaco neste órgão.

**Figura 10** - Fotomicroscopias de secções de bexiga de ratos Wistar coradas em H.E. A) Bexiga normal: epitélio de transição (EP), lâmina própria (LP) e túnica muscular (TM). Animal do GII (controle negativo - 32 horas) – 115,3x; B) Bexiga normal de animal do GV (controle negativo - oito dias) – 58,5x; C) Áreas multifocais de hemorragia (h) e infiltrado inflamatório (asterisco) em animal do GI (controle positivo - 32 horas) – 116,6x; D) Áreas multifocais de hemorragia (h) e infiltrado inflamatório (asterisco) em animal do GIII (dantrolene - 32 horas) – 115,6x; E) Infiltrado inflamatório (asterisco) e hemorragia (h) intensos em animal do GIV (controle positivo - oito dias) – 119,5x; F) Bexiga normal em animal do GVI (dantrolene - oito dias) – 59,2x.





**Figura 11** - Gráfico das médias e desvios padrão da porcentagem de hemorragia por campo, em bexiga de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 12** - Gráfico das médias e desvios padrão da porcentagem de infiltrado inflamatório por campo, em bexiga de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.4 - AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL

Macroscopicamente, nos animais dos grupos GI (controle positivo - 32 horas), GIII (dantrolene - 32 horas), GIV (controle positivo - oito dias) e GVI (dantrolene - oito dias) observaram-se congestão e aderência mais intensas de dura-máter e leptomeninges em T13, congestão e hemorragia moderadas a intensas na região dorsal da medula, estendendo-se da região torácica cranial até a lombar caudal. Os animais do GII (controle negativo - 32 horas) e do GV (controle negativo - oito dias) não apresentaram alterações macroscópicas na medula espinhal.

À avaliação histológica da medula espinhal dos animais submetidos apenas a laminectomia (GII: controle negativo - 32 horas; e GV: controle negativo - oito dias) não foram constatadas alterações, assemelhando-se a uma medula normal (Figura 13–A e B). Observou-se medula espinhal arredondada ou oval, circundada pela paquimeninge (dura-máter) e leptomeninges (pia-máter e aracnóide), dividida em substâncias branca e cinzenta. Substância cinzenta disposta num arranjo descrito como “H” ou borboleta e constituída de corpos neuronais, fibras axonais, astrócitos, oligodendrócitos, microgliócitos e alguns vasos sanguíneos com delgadas fibras perivasculares de tecido conjuntivo. Canal espinhal contido no interior da comissura cinzenta e substância branca composta por fibras axonais, elementos dispersos da neuróglia e vasos sanguíneos. Um funículo dorsal ocupando a região entre as colunas dorsais, um funículo lateral situado entre as colunas dorsal e ventral e um funículo ventral entre as colunas ventrais (Banks, 1993, Junqueira e Carneiro, 2003).

Resultados semelhantes foram observados por Kaptanoglu et al. (2003) que avaliaram ratos oito horas após laminectomia sem

trauma medular e descreveram ausência de alterações histológicas nas mesmas.

Os animais dos GI (controle positivo - 32 horas) e GIII (dantrolene - 32 horas) apresentaram padrões de lesão com características semelhantes no epicentro (local mais acometido da medula espinhal) (Figura 13–C). Nas meninges do segmento dorsal da medula observaram-se vários focos de hemorragia e infiltrado inflamatório de intensidade moderada, predominante de polimorfonucleares (PMN). Devido a essas alterações a meninge apresentou-se espessada nesses segmentos. As raízes nervosas adjacentes a essa área apresentaram degeneração e necrose multifocal discreta, tumefação de alguns processos axonais e infiltrado inflamatório composto por PMN. Observaram-se na substância branca microvascularização difusa e áreas multifocais acentuadas de hemorragia com degeneração Walleriana e necrose. Nos segmentos mais íntegros foi observada grande quantidade de balões axonais e algumas células Gitter, caracterizando câmaras de digestão. Houve perda total da substância cinzenta e, nesse segmento foram observados vários focos de hemorragia e grande quantidade de debris celulares, restos de neurônios necróticos e infiltrado multifocal discreto de células Gitter. Tanto na substância branca quanto na cinzenta notou-se infiltrado difuso discreto de neutrófilos.

Os animais dos GIV (controle positivo - oito dias) e GVI (dantrolene - oito dias) também apresentaram no epicentro padrões de lesão com características semelhantes entre si. Na região dorsal da medula as meninges apresentaram fibrose focal e extensa, vários focos de neovascularização discreta e focos extensos de infiltrado inflamatório intenso constituído de PMN (Figura 13–D). Nas raízes nervosas observou-se discreta degeneração com infiltrado de PMN (Figura 14–C). Havia vários focos de malacia extensa e grave tanto na substância branca

(degeneração Walleriana) (Figura 14-A) como cinzenta, afetando metade do diâmetro medular (Figura 13-D). Nessas áreas foi observado infiltrado acentuado de células Gitter (Figura 14-B). Nos segmentos mais íntegros da substância branca notou-se moderada quantidade de balões axonais e presença discreta de câmaras de digestão (Figura 14-D). Estes resultados sugerem um estágio avançado de degeneração da medula.

A formação de balões axonais, câmaras de digestão e malacia são características comumente descritas durante a evolução das lesões em modelos de trauma medular agudo (Li et al., 1996; Quencer e Bunge, 1996; Beattie et al., 1998; Olby e Jeffery, 2003; Radojicic et al., 2005). Dentro de uma semana, a maioria dos balões axonais tendem a desaparecer (Von Euler et al., 1997) e, no período de quatro semanas áreas bem demarcadas de cavitações podem surgir nas substâncias branca e/ou cinzenta. Degeneração Walleriana extensa e tecido cicatricial preenchido por astrócitos e outras células da glia e fibroblastos podem estar presentes. Estas alterações representam os estágios finais da evolução histopatológica da lesão medular (Quencer e Bunge, 1996; Beattie et al., 1998; Radojicic et al., 2005).

Cao et al. (2005) estudaram a relação entre a gravidade do trauma compressivo e a quantidade de tecido preservado em ratos. A substância cinzenta apresentou-se mais susceptível que a branca, independente da gravidade do trauma. Em geral, a quantidade de substância branca preservada diminuiu proporcionalmente com o aumento da gravidade do trauma. O estudo demonstrou que uma medula discretamente contundida sofre desmielinização da substância branca evidente principalmente no funículo dorsal, enquanto nos funículos ventral e lateral essa alteração foi discreta. No entanto, com o aumento da gravidade do trauma, produziu-se maior desmielinização da substância branca, especialmente nos funículos ventral e lateral.

Corroborando as observações de Cao et al. (2005), o trauma grave causado pela compressão com peso de 70,5g durante cinco minutos resultou na combinação de injúria aos funículos ventrolateral e dorsolateral, o que proporcionou déficits sensorial e motor graves. Estes resultados estão de acordo com as avaliações comportamentais descritas anteriormente, nas quais foi verificada paraplegia dos membros pélvicos dos ratos sem reverção significativa do quadro. Estes resultados também sugerem que a gravidade da compressão e/ou o período de oito dias de observação não possibilitaram recuperação significativa das alterações morfológicas da medula e, conseqüentemente, do quadro clínico do animal.

Nas áreas adjacentes ao epicentro da lesão, foram observadas degeneração axonal na substância branca (Figura 13-E e F), aumento difuso e acentuado da celularidade na substância cinzenta, neuroniofagia, necrose neuronal multifocal discreta e satelitose (Figuras 14-D e F). Além disso, as alterações histológicas observadas nas regiões adjacentes ao epicentro incluem características morfológicas de apoptose, as quais foram mais frequentes no GIV (controle positivo - oito dias) (Figura 14-E e F). Foram visibilizados neurônios e células da glia com crescente condensação citoplasmática e da cromatina e formação de corpos apoptóticos, dentre outras.

Dependendo da gravidade da lesão, a necrose pode se estender cranial e caudalmente e enquanto nos traumas moderados a medula apresenta cavitações císticas centrais, em alguns casos mais graves toda a medula se torna necrótica e sofre liquefação, sendo mantida no lugar apenas pelas meninges (Summers et al., 1995).

Altas concentrações de cálcio intracitoplasmático desencadeiam processos

cálcio-dependentes, os quais alteram letalmente o metabolismo celular dos neurônios remanescentes. Assim, a produção dos metabólitos do ácido araquidônico, a falência mitocondrial com produção de óxido nítrico e ativação das calpaínas e caspases contribuem para a transdução do sinal apoptótico (Dowd, 1995; Wei e Perry, 1996; Nicotera e Orrenius, 1998; Abe et al., 2006). O dantrolene impede que o acúmulo do cálcio intracelular ative ou dê origem a esses processos e seus metabólitos que sinalizam o neurônio para morte celular programada (Zhang et al., 1993; Yano et al., 2001; Nakayama et al., 2002).

#### 5.5 – TUNEL

O TUNEL determinou a marcação da fragmentação do DNA de neurônios e células da glia. Neurônios não marcados apresentaram características morfológicas preservadas, enquanto aqueles marcados apresentaram características patológicas de necrose ou apoptose.

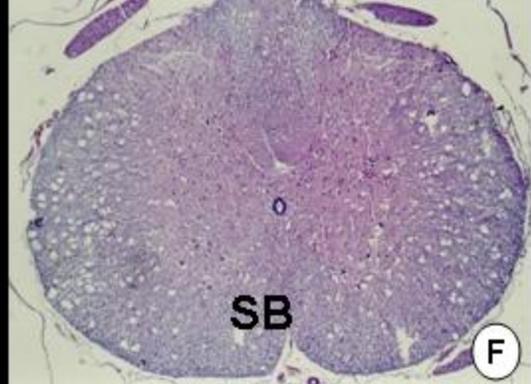
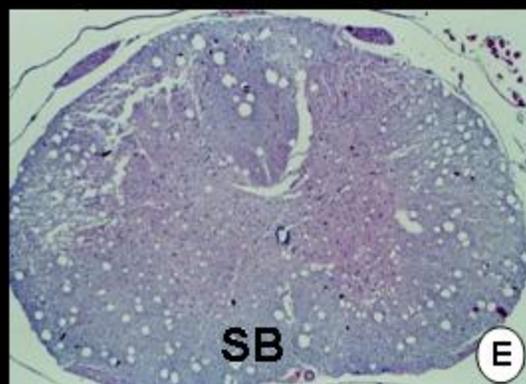
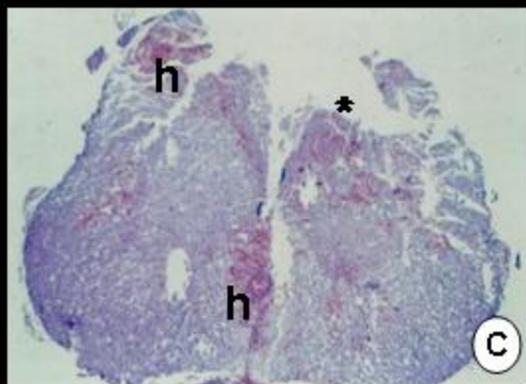
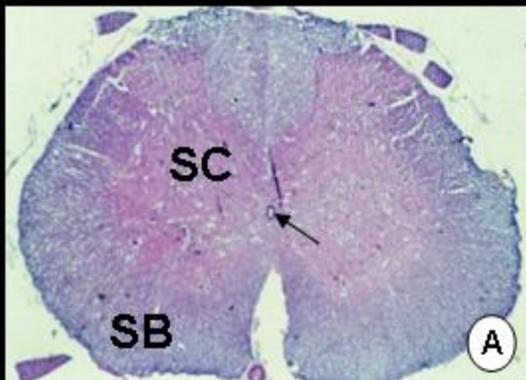
O número de neurônios com marcação TUNEL-positiva foi significativamente menor nos animais do GIII (dantrolene - 32 horas) e do GVI (dantrolene - oito dias) do que naqueles dos GI (controle positivo - 32 horas) e GIV (controle positivo - oito dias), respectivamente. Embora o número de neurônios TUNEL-positivos tenha sido maior no grupo GIII (dantrolene - 32 horas) em comparação com o GII (controle negativo - 32 horas), aos oito dias observou-se quantidade semelhante entre os animais tratados com dantrolene (GVI) e os que não receberam trauma medular (GV) (Figuras 14-G; e 15). Estes resultados sugerem que após tratamento com dantrolene houve

menor morte neuronal, ou seja, maior preservação do tecido nervoso, independente do tempo de observação.

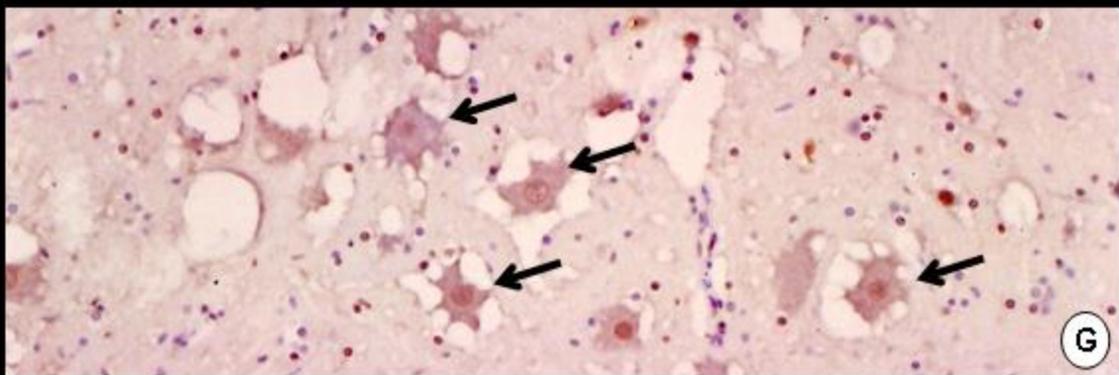
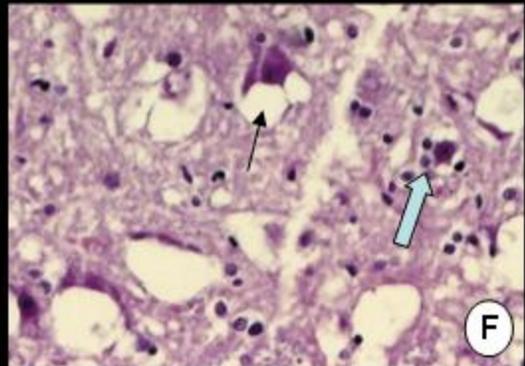
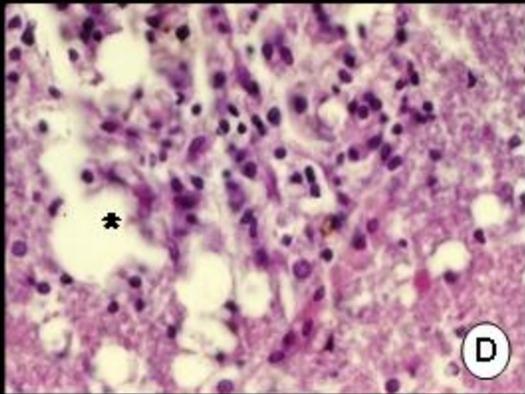
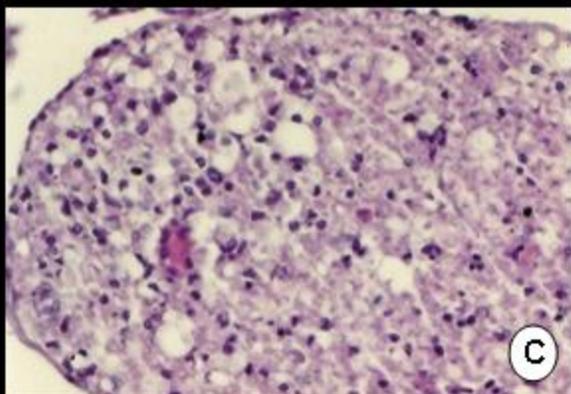
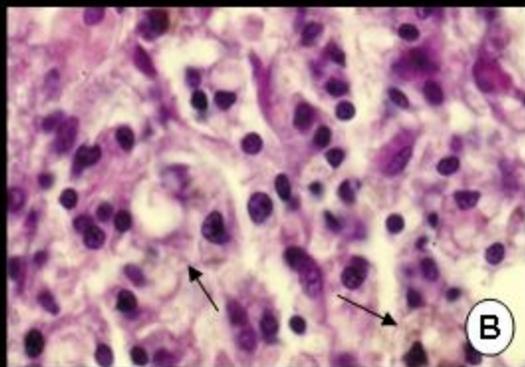
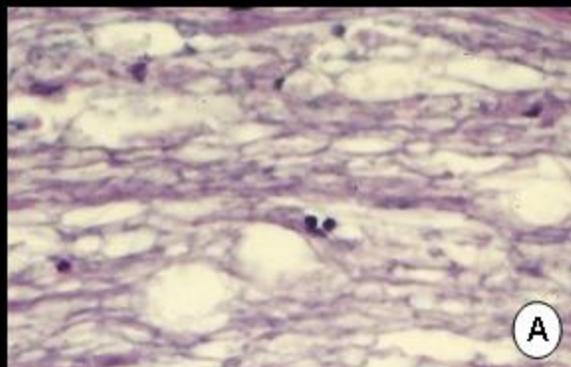
As evidências da ação antiapoptótica do dantrolene no presente estudo corroboram vários autores que relatam tais propriedades após indução de morte neuronal seguida de tratamento com dantrolene. Wei e Perry (1996) demonstraram que a liberação anormal de cálcio das reservas intracelulares pode causar morte neuronal por apoptose e comprovaram o efeito antiapoptótico do dantrolene em estudo *in vitro* de culturas de neurônios hipotalâmicos. Wei et al. (2000) relataram que o dantrolene possivelmente previne o colapso do potencial de membrana mitocondrial e bloqueia o estímulo mitocondrial para ativação de caspases, inibindo assim a morte neuronal por apoptose. Em outro estudo, Popescu et al. (2002) estudaram a morte celular apoptótica induzida pelo ácido kaínico em culturas de células granulares cerebelares (*in vitro*) e em neurônios cerebrais (*in vivo*) em ratos Wistar, e relataram que o dantrolene foi capaz de diminuir significativamente a apoptose neuronal. Li et al. (2005) relataram o efeito neuroprotetor desse fármaco, pela diminuição do número de células apoptóticas em ratos, após isquemia cerebral focal transiente.

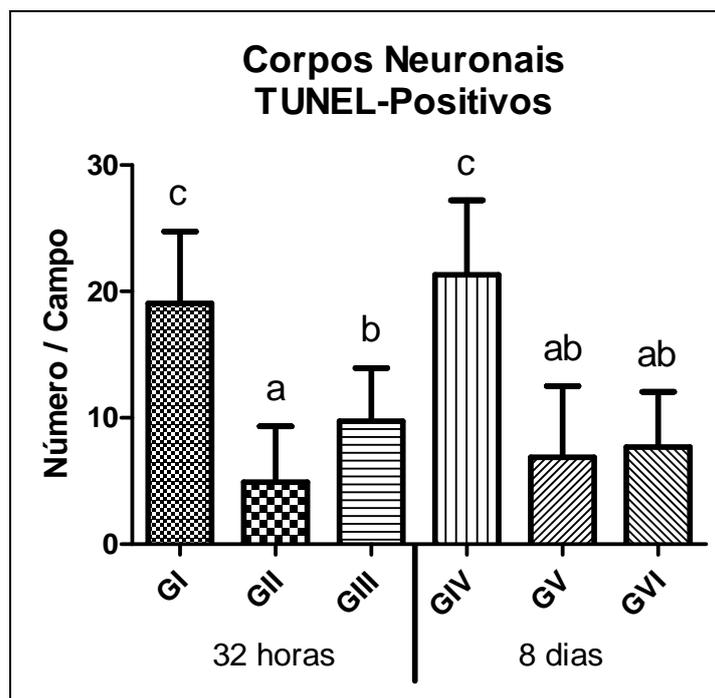
O mecanismo de ação do dantrolene ocorre via ativação de receptores rianodina, com consequente inibição do efluxo de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol (Zhao et al., 2001; Ayar e Kelestimur, 2002; Kobayashi et al., 2005; Mori et al., 2005), justificando, portanto, o efeito neuroprotetor do fármaco.

**Figura 13** - Fotomicroscopia de secções transversais da medula espinhal de ratos Wistar coradas em H.E. A) Medula espinhal morfológicamente normal, circundada pelas meninges, dividida em substâncias branca (SB) e cinzenta (SC). A seta indica o canal ependimário. Animal do GII (controle negativo - 32 horas) - 25,7x; B) Medula espinhal normal de animal do GV (controle negativo - oito dias) - 25,4x; C) Epicentro da lesão mostrando áreas multifocais acentuadas de hemorragia (h) e malacia na substância branca e perda da substância cinzenta (asterisco) de animal do GIII (dantrolene - 32 horas) - 24,7x; D) Epicentro da lesão com vários focos de malacia extensa e grave tanto da substância branca como da cinzenta de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 22,1x; E) Degeneração axonal em segmento adjacente ao epicentro de animal do GI (controle positivo - 32 horas) - 23,6x; F) Degeneração axonal em segmento adjacente ao epicentro de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 25,3x.



**Figura 14** - Fotomicroscopias de seções da medula espinhal de ratos Wistar coradas em H.E. (A a F) ou TUNEL (G) mostrando detalhes das lesões medulares. A) Degeneração Walleriana observada em corte longitudinal de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 441,7x; B) Células Gitter (setas) em área de malacia de animal do GVI (dantrolene – oito dias) - 559,4x; C) Degeneração de raiz nervosa dorsal em corte transversal de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 326,8x; D) Gliose e câmara de digestão (asterisco) em área de malacia de animal do GVI (dantrolene – oito dias) - 327,1x; E) Corte transversal de segmento adjacente ao epicentro contendo neurônios com características de apoptose (setas finas) e neurônios íntegros (seta cheia) de animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 435,7x; F) Área de malacia em corte transversal apresentando neurônios com características de apoptose (seta fina) e neuroniofagia (seta cheia) de animal do GIV (controle positivo - oito dias)- 285,5x; G) Núcleos de corpos neuronais (setas) com características apoptóticas marcados com TUNEL em corte transversal de segmento adjacente ao epicentro da lesão. Animal do GIV (controle positivo - oito dias)- 368x.





**Figura 15** - Gráfico das médias e desvios padrão do número de corpos neuronais TUNEL-positivos por campo, em medula espinhal de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5.6 - IMUNOISTOQUÍMICA

O anticorpo monoclonal anti-NeuN determinou a marcação específica de neurônios permitindo avaliar a integridade da medula espinhal nos diferentes grupos (Figura 16). Não foi observada marcação de células gliais e, os neurônios marcados apresentaram invariavelmente características morfológicas preservadas, enquanto neurônios com características patológicas (necrose ou apoptose) não apresentaram imunorreatividade ao anti-NeuN. Alguns neurônios apresentaram características morfológicas aparentemente íntegras, embora não estivessem reativos ao anti-NeuN, o que sugere que o processo patológico resultante do trauma interferiu com a expressão da proteína NeuN.

O número de neurônios com marcação positiva para o anticorpo monoclonal anti-

NeuN foi maior nos animais do GIII (dantrolene - 32 horas) e do GVI (dantrolene - oito dias) do que naqueles dos GI (controle positivo - 32 horas) e GIV (controle positivo - oito dias), respectivamente. Embora o número de neurônios NeuN-positivos tenha sido menor no grupo GIII (dantrolene - 32 horas) em comparação com o GII (controle negativo - 32 horas), aos oito dias observou-se quantidade semelhante entre os animais tratados com dantrolene (GVI) e os que não receberam trauma medular (GV) (Figuras 16-A a F; e 17). Estes resultados reafirmam os do TUNEL, que após tratamento com dantrolene houve maior preservação neuronal, ou seja, menor extensão da lesão, independente do tempo de observação.

A proteína *Neuronal Nuclei* (NeuN) é um constituinte específico de neurônios e está presente no núcleo e, em menor quantidade, no corpo celular, sendo precocemente

expresso em neurônios a partir da fase inicial de diferenciação celular e molecular. O NeuN não é expresso em células da glia, ou seja, oligodendrócitos, astrócitos ou células da micróglia não expressam essa proteína. Mullen et al. (1992) desenvolveram o anticorpo monoclonal A60, ou anti-NeuN, para identificar a proteína NeuN. Este anticorpo é amplamente utilizado como marcador neuronal em culturas celulares ou diagnósticos histopatológicos (Ünal-Çevik et al., 2004).

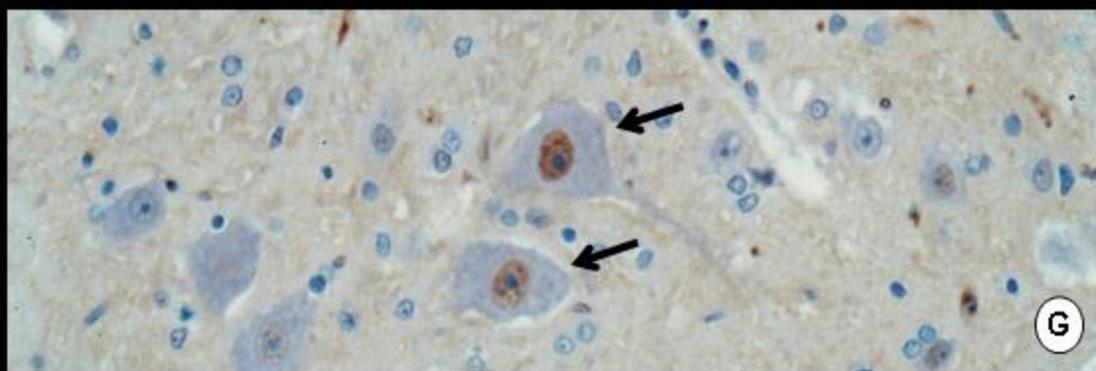
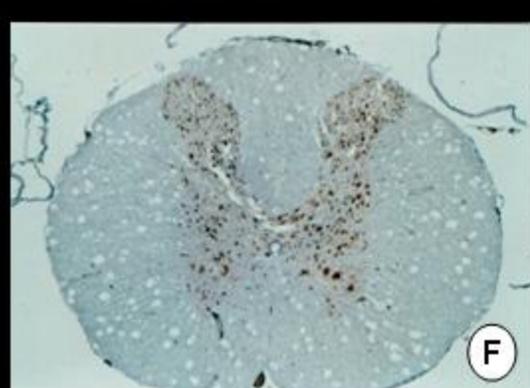
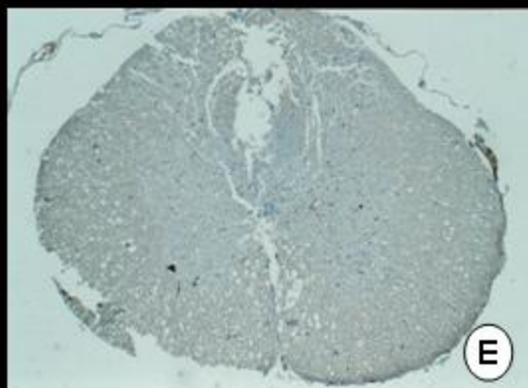
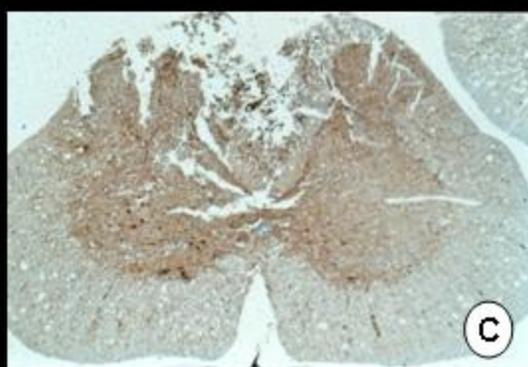
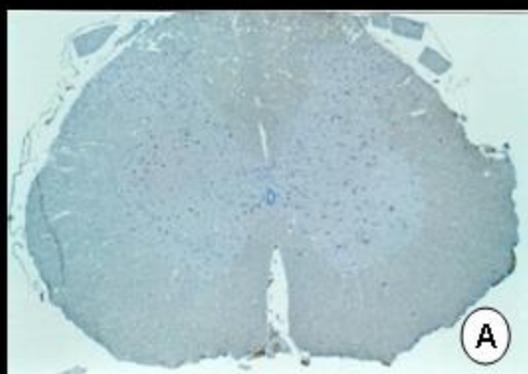
Segundo Mullen et al. (1992) e Casella et al. (2004) a expressão de altas concentrações do NeuN pode corresponder ao estado de diferenciação ou atividade neuronal, ou seja, a imunorreatividade ao anti-NeuN diminui sob condições patológicas diversas que afetam a viabilidade neuronal, como

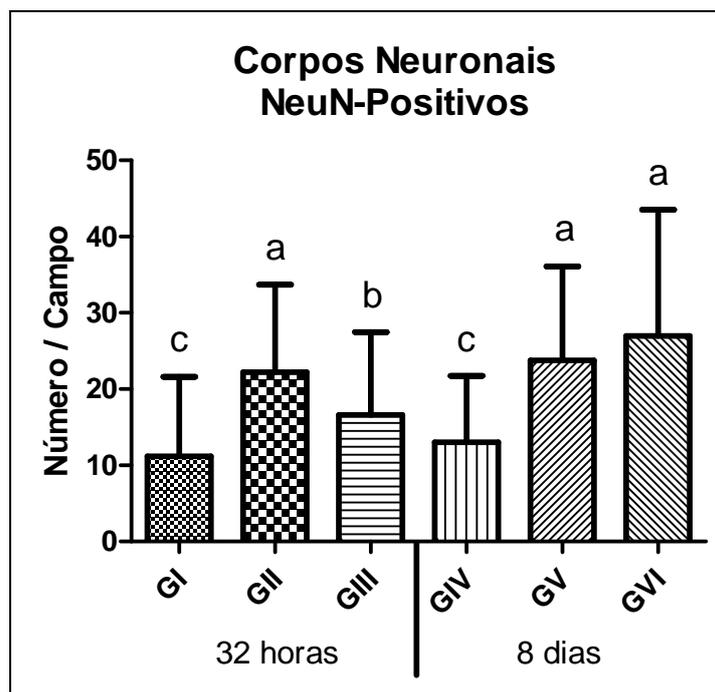
isquemia, hipóxia e trauma (Xu et al., 2002; Ünal-Çevik et al., 2004).

Uma vez que houve maior expressão protéica de NeuN e menor marcação de TUNEL relacionadas a preservação neuronal nos animais tratados com dantrolene, estes resultados confirmam o efeito neuroprotetor deste fármaco no tratamento de trauma medular agudo experimental em ratos.

Assim, sugere-se, pela primeira vez em trauma medular, que o dantrolene sódico apresenta efeito neuroprotetor por atuar na inibição apoptótica. Este fármaco surge, portanto, como um promissor adjuvante no tratamento de desordens neurodegenerativas, como é o caso das lesões na medula espinhal.

**Figura 16** - Fotomicroscopias de secções transversais de medula espinhal adjacentes ao epicentro da lesão em ratos Wistar. Imunoistoquímica com anti-NeuN. A) Marcação de núcleos de corpos neuronais íntegros (NeuN-positivos) da substância cinzenta em animal do GII (controle negativo - 32 horas) - 23,5x; B) Marcação de neurônios NeuN-positivos em animal do GV (controle negativo - oito dias) - 26x; C) Marcação discreta de neurônios NeuN-positivos em animal do GI (controle positivo - 32 horas) - 24x; D) Marcação moderada de neurônios NeuN-positivos em animal do GIII (dantrolene - 32 horas) - 21,8x; E) Marcação discreta de neurônios NeuN-positivos em animal do GIV (controle positivo - oito dias) - 23,9x; F) Marcação de neurônios NeuN-positivos semelhante aos grupos sem lesão. Animal do GVI (dantrolene - oito dias) - 23,3x; G) Detalhe de neurônios NeuN-positivos (setas) com núcleo marcado pelo anticorpo monoclonal anti-NeuN - 374,6x.





**Figura 17** - Gráfico das médias e desvios padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em medula espinhal de ratos Wistar. (GI – controle positivo - 32 horas; GII – controle negativo - 32 horas; GIII – dantrolene - 32 horas; GIV – controle positivo - oito dias; GV – controle negativo - oito dias; GVI – dantrolene - oito dias). Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

## 6 - CONCLUSÕES

O modelo de trauma medular compressivo em ratos adultos com 70,5g durante cinco minutos reproduz, de maneira homogênea, incapacidade funcional sensorial e motora graves.

Dantrolene sódico, em dose única de 10mg/kg, pela via intraperitoneal, para tratamento de ratos submetidos a trauma medular agudo, é um protocolo seguro e não apresenta efeitos sistêmicos deletérios.

O dantrolene sódico é capaz de auxiliar no esvaziamento vesical e diminuir a intensidade das lesões originadas pelo trauma medular agudo.

O dantrolene sódico diminui a morte neuronal secundária por apoptose o que limita a extensão da lesão causada pelo

trauma medular agudo e, conseqüentemente, permite preservação da integridade dos neurônios.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, S.; OHNISHI, H.; TSUCHIYA, K. et al. Calcium and reactive oxygen species mediated  $Zn^{2+}$  -induced apoptosis in PC12 cells. *J. Pharmacol. Sci.*, v.102, n.1, p.103-111, 2006.

AMAR, A.P.; LEVY, M.L. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*, v.44, n.5, p.1027-1039, 1999.

ARAÚJO, I.S. Presence of free radicals in spinal cord injury. Experimental evidence in

- rats. *Rev. Bras. Neurol.*, v.41, n.1, p.23-29, 2005.
- AYAR, A.; KELESTIMUR, H. The inhibitory effects of dantrolene on action potential-induced calcium transients in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Physiol. Res.*, v.51, n.4, p.341-346, 2002.
- AYAS, S.; LEBLEBICI, B.; SÖZAY, S. et al. The effect of abdominal massage on bowel functional in patients with spinal cord injury. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, v.85, n.12, p.951-955, 2006.
- BAGLEY, R.S.; HARRINGTON, M.L.; SILVER, G.M. et al. Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. *Vet. Neurol.*, v.21, n.12, p.1138-1144, 1999.
- BAGLEY, R.S. Spinal fracture or luxation. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.30, n.1, p.133-153, 2000.
- BALLOUGH, G.P.H.; FILBERT, M.G. A viable neuroprotection strategy following soman-induced status epilepticus. USAMRICD-TR-03-09, U.S. Army Medical Research Institute of Chemical Defense, Aberdeen Proving Ground, MD 2003.
- BANKS, W.J. *Applied veterinary histology*. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1993. 527p.
- BAREYRE, F.M.; KERSCHENSTEINER, M.; RAINETEAU, O. et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat. Neurosci.*, v.7, n.3, p.269-277, 2004.
- BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transaction. *Exp. Neurol.*, v.139, n.98, p.244-256, 1996.
- BASSO, D.M. Neuroanatomical substrates of functional recovery after experimental spinal cord injury: implications of basic science research for human spinal cord injury. *Phys. Ther.*, v.80, n.8, p.808-817, 2000.
- BEATTIE, M.S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends Mol. Med.*, v.10, n.12, p.580-583, 2004.
- BEATTIE, M.S.; SHUMAN, S.L.; BRESNAHAN, J.C. Review: Apoptosis and spinal cord injury. *Neurosci.*, v.4, n.3, p.163-171, 1998.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. *Vet. Med.*, v.95, n.11, p.855-866, 2000a.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. *Vet. Med.*, v.95, n.11, p.846-849, 2000b.
- BOWMAN, W.C.; HOUSTON, J.; KHAN, H.H. et al. Effects of dantrolene sodium on respiratory and other muscles and on respiratory parameters in the anaesthetised cat. *Eur. J. Pharmacol.*, v.55, n.3, p.293-303, 1979.
- BRANDOM, B.W.; LARACH, M.G. The North American Malignant Hyperthermia Registry. Reassessment of the safety and efficacy of dantrolene. *Anesthesiol.* 2002; 96: A1199.
- BRAUND, K.G.; SHARP, N.J. Neurological examination and localization. In: Slatter, D. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.1092-1107.
- BRAUND, K.G.; SHORES, A.; BRAWNER, W.R. Recovering from spinal cord trauma: the rehabilitative steps,

complications, and prognosis. *Vet. Med.*, v.85, p.740-743, 1990a.

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

BRECHTEL, K.; TURA, A.; ABDIBZADEH, M. et al. Intrinsic locomotor outcome in dorsal transection of rat spinal cord: predictive value of minimal incision depth. *Spinal Cord*, v.44, n.10, p.605-613, 2006.

BÜYÜKOKUROGLU, M.E.; GULÇIN, I.; OKTAY, M. et al. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol. Res.*, v.44, n.6, p.491-494, 2001.

BÜYÜKOKUROGLU, M.E.; TAYSI, S.; POLAT, F. et al. Mechanisms of the beneficial effects of dantrolene sodium on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Pharmacol. Res.*, v.45, n.5, p.421-425, 2002.

BÜYÜKOKUROGLU, M.E. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of dantrolene sodium in rats and mice. *Pharmacol. Res.*, v.45, n.6, p.455-460, 2002.

CAO, Q.; ZHANG, Y.P.; IANNOTTI, C. et al. Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat. *Exp. Neurol.*, v.191, suppl.1, p.S3-S16, 2005.

CARLSON, S.; PARRISH, M.E.; SPRINGER, J.E. et al. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.*, v.151, n.1, p.77-88, 1998.

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.

CASELLA, G.T.B.; BUNGE, M.B.; WOOD, P.M. Improved immunocytochemical identification of neural, endothelial, and inflammatory cell types in paraffin-embedded injured adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Methods*, v.139, v.1, p.01-11, 2004.

CHACÓN, S.C.; NIETO-SAMPEDRO, M. Pathophysiology of spinal cord injury. A review. *Vet. Mex.*, v.36, n.1, p.75-86, 2005.

CHAN, C.H. Dantrolene sodium and hepatic injury. *Neurol.*, v.40, p.1427-1432, 1990.

CHRISMAN, C.L. *Problems in small animal neurology*. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 526p.

CHUCKOWREE, J.A.; DICKSON, T.C.; VICKERS, J.C. Intrinsic regenerative ability of mature CNS neurons. *Neurosci.*, v.10, n.4, p.280-285, 2004.

COLTER, S.; RUCKER, N. C. Acute injury to the central nervous system. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.18, n.3, p.545-563, 1988.

CORONA, J.C.; TAPIA, R. Mecanismos de neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico*, v.29, p.17-28, 2005.

COWGILL, L.D.; ELLIOTT, D.A. Acute renal failure. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2000. p.1615-1633.

DELAMANTER, R.B.; SHERMAN, J.; CARR, J.B. Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.77, n.7, p.1042-1049, 1995.

DENISELLE, M.C.G.; COSTA, J.J.L.; GONZALEZ, S.L. et al. Basis of progesterone protection in spinal cord

- neurodegeneration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.83, p.199–209, 2003.
- DOWD, D.R. Calcium regulation of apoptosis. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, v.30, p.255-279, 1995.
- DUMONT, A.S.; DUMONT, R.J.; OSKOUIAN, R.J. Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? *Curr. Opin. Neurol.*, v.15, n.6, p.713-720, 2002.
- DUMONT, R.J.; VERMA, S.; OKONKWO, D.O. et al. Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacol.*, v.24, n.5, p.265-279, 2001.
- DÜZENLI, S.; BAKURIDZE, K.; GEPIREMEN, A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicol. In Vitro*, v.19, n.5, p.589-594, 2005.
- EDWARDS, J.G.T.; NEWTON, J.R.; RAMZAN, R.C. et al. The efficacy of Dantrolene sodium in controlling exertional rhabdomyolysis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet. J.*, v.35, n.7, p.707-711, 2003.
- EIDELBERG, E.; STRAEHLEY, D.; ERSPAMER, R. et al. Relationship between residual hindlimb-assisted locomotion and surviving axons after incomplete spinal cord injuries. *Exp. Neurol.*, v.56, n.2, p.312-322, 1977.
- EL MASRI, W.S. Traumatic spinal cord injury: the relationship between pathology and clinical implications. *Trauma*, v.8, p.29-46, 2006.
- ELLIS, K.O.; CARPENTER, J.F. A comparative study of dantrolene sodium and other skeletal muscle relaxants with the Straub tail mouse. *Neuropharmacol.*, v.13, p.211-214, 1974.
- FADEN, A.I.; JACOBS, T.P.; PATRICK, D.H. et al. Megadose corticosteroid therapy following experimental traumatic spinal injury. *J. Neurosurg.*, 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 Neuropathol.*, v.100, n.1, p.13-22, 2000.
- FEE, D.B.; SWARTZ, K.R.; JOY, K.M. et al. Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Res.*, v.1137, n.1, p.146-152, 2007.
- FEHLINGS, M.G.; BAPTISTE, D.C. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury*, v.36, p.S-B113-S-B122, 2005.
- FEHLINGS, M.G.; TATOR, C.H. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual. Neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.132, p.220-228, 1995.
- FERNANDEZ, E.; MANNINO, S.; TUFO, T. et al. The Adult “paraplegic” rat: treatment with cell graftings. *Surg. Neurol.*, v.65, n.3, p.223-237, 2006.
- FERRARI, G.; BATISTATOU, A.; GREENE, L.A. Gangliosides rescue neuronal cells from death after trophic factor deprivation. *J. Neurosci.*, v.13, n.5, p.1879-1887, 1993.
- FORD, R.W.J. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J. Neurosurg.*, v.59, p.268-275, 1983.

- FOUAD, K.; METZ, G.A.S.; MERKLER, D. et al. Treadmill training in complete spinal cord injured rats. *Behav. Brain Res.*, v.115, p.107-113, 2000.
- FOURNIER, P. Dossier toxicologique, pharmacologique, pharmacocinétique du Dantrium IV. *Dantrium et hyperthermie maligne*. Lyon, Laboratoire Oberval (Unpublished internal report), 1982.
- GAVIRIA, M.; PRIVAT, A.; D'ARBIGNY, P. et al. Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, Gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res.*, v.874, n.2, p.200-209, 2000.
- GEISLER, F.H.; DORSEY, F.C.; COLEMAN, W.P. Past and current clinical studies with gm-1 ganglioside in acute spinal cord injury. *Ann. Emerg. Med.*, v.22, n.6, p.1041-1047, 1993.
- GENOVESE, T.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R. et al. Increased oxidative-related mechanisms in the spinal cord in old rats. *Neurosci. Lett.*, v.393, n.2, p.141-146, 2006.
- GEPDIREMEN, A.; DÜZENLI, S.; HACIMÜFTÜOĞLU, A. et al. The effects of dantrolene alone or in combination with nimodipine in glutamate-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell cultures of rat pups. *Pharmacol. Res.*, v.43, n.3, p.241-244, 2001.
- GIGLIO, C.A.; DEFINO, H.L.A.; DA SILVA, C.A. et al. Behavioral and physiological methods for early quantitative assessment of spinal cord injury and prognosis in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.39, n.12, p.1613-1623, 2006.
- GOLDBERG, J.L. How does axon grow? *Genes Dev.*, v.17, n.8, p.941-958, 2003.
- GREENSTEIN, B.; GREENSTEIN, A. *Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and neurophysiology*. Stuttgart: Theime, 2000. 438p.
- GRUNER, J.A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma*, v.9, n.2, p.123-126, 1992.
- GRUNER, J.A.; YEE, A.K.; BLIGHT, A.R. Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression. *Brain Res.*, v.729, n.1, p.90-101, 1996.
- GÜLÇİN, I.; BEYDEMİR, S.; BÜYÜKOKUROĞLU, M.E. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biol. Pharrm. Bull.*, v.27, n.5, p.613-616, 2004.
- HACKLER, R.H.; BROECKER, B.H.; KLEIN, F.A. et al. A clinical experience with dantrolene sodium for external urinary sphincter hypertonicity in spinal cord injured patients. *J. Urol.*, v.124, n.1, p.78-81, 1980.
- HALL, E.D. Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Ann. Emerg. Med.*, v.22, n.6, p.1022-1027, 1993.
- HALL, E.D.; SPRINGER, J.E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx.*, v.1, n.1, p.80-100, 2004.
- HARKEY III, H.L.; WHITE IV, E.A.; TIBBS JR., R.E. et al. A clinician's view of spinal cord injury. *Anat. Rec. B New Anat.*, v.271B, p.41-48, 2003.
- HARRISON, G.G. Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br. J. Anaesth.*, v.81, n.4, p.626-629, 1998.
- HAYASHI, T.; SAKURAI, M.; ABE, K.Y. et al. Apoptosis of motor neurons with

- induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke*, v.29, p.1007-1013, 1998.
- HOOPER, C.; BORGES, C.A.; LEMOS, R.C. et al. *Biochemical profiles of rats Wistar at Laboratory Animal Breeding Center*. In: International Congress on Laboratory Animal Science, 2007, São Paulo. International Congress on Laboratory Animal Science, 2007.
- HOTCHKISS, R.S.; OSBORNE, D.F.; LAPPAS, G.D. et al. Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 alpha in a mouse model of endotoxin. *Shock*, v.3, n.5, p.337-342, 1995.
- HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol. Educ.*, v.26, n.1-4, p.238-255, 2002.
- JANSSENS, L.A.A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. *J. Small Anim. Pract.*, v.32, p.572-578, 1991.
- JEFFERY, N.D.; BLAKEMORE, W.F. Spinal cord injury in small animals. Mechanisms of spontaneous recovery. *Vet. Rec.*, v.144, n.15, p.407-413, 1999.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.
- KAPTANOGLU, E.; BESKONAKLI E.; OKUTAN, O. et al. Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. *J. Clin. Neurosci.*, v.10, n.3, p.329-334, 2003.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v.26, n.4, p.239-257, 1972.
- KHALAF, I.M.; FOLEY, G.; ELHILALI, M.M. The effect of dantrium on the canine urethral pressure profile. *Invest. Urol.*, v.17, n.3, p.188-190, 1979.
- KOBAYASHI, S.; BANNISTER, M.L.; GANGOPADHYAY, J.P. et al. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, v.280, n.8, p.6580-6587, 2005.
- KRASSIOUKOV, A.V.; ACKERY, A.; SCHWARTZ, G. et al. An *in vitro* model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Res. Protoc.*, v.10, n.2, p.60-68, 2002.
- KRAUS, K.H. The pathophysiology of spinal cord injury and its clinical implications. *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, v.11, n.4, p.201-207, 1996.
- KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M.U.; FIEGE, M.; et al. Dantrolene – A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesth.*, v.59, n.4, p.364-373, 2004.
- KWON, B.K.; FISHER, C.G.; DVORAK, M.F. et al. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*, v.30, n.17S, p.S03-S13, 2005.
- KWON, B.K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J.N. et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.*, v.4, n.4, p.451-464, 2004.
- LANG-LAZDUNSKIA, L.; HEURTEAUXB, C.; DUPONT, H. et al. Prevention of ischemic spinal cord injury: Comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J. Vasc. Surg.*, v.32, n.1, p.179-189, 2000a.

- LANG-LAZDUNSKIA, L.; HEURTEAUXB, C.; MIGNONC, A. et al. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Euro. J. Cardiothorac. Surg.*, v.18, n.2, p.174-181, 2000b.
- LEONARD, E.; KIRBY, R. The role of glutamate, calcium and magnesium in secondary brain injury. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, v.12, n.1, p.17-32, 2002.
- LEUNG, P.Y.; JOHNSON, C.S.; WRATHALL, J.R. Comparison of the effects of complete and incomplete spinal cord injury on lower urinary tract function as evaluated in unanesthetized rats. *Exp. Neurol.*, v.208, n.1, p.80-91, 2007.
- LI, G.L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M. et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.55, n.3, p.280-289, 1996.
- LI, F.; HAYASHI, T.; JIN, G. et al. The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers. *Brain Res.*, v.1048, n.1-2, p.59-68, 2005.
- LORENZ, M.D.; KORNEGAY, J.N. *Handbook of veterinary neurology*. 4. ed. New York: Saunders, 2004. 480p.
- LOY, D.N.; TALBOTT, J.F.; ONIFER, S.M. et al. Both dorsal and ventral spinal cord pathways contribute to overground locomotion in the adult rat. *Exp. Neurol.*, v.177, n.2, p.575-580, 2002.
- 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.
- LUNA, L.G. *Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258p.
- MA, M.; BASSO, D.M.; WALTERS, P. et al. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57BI/6 mouse. *Exp. Neurol.*, v.169, n.2, p.239-254, 2001.
- MAKAREWICZ, D.; ZIEMIŃSKA, E.; ŁAZAREWICZ, J.W. Dantrolene inhibits NMDA-induced <sup>45</sup>Ca uptake in cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.*, v.43, n.4-5, p.273-278, 2003.
- MATSUMOTO, T.; TAMAKI, T.; KAWAKAMI, M. et al. Early complications of high-dose methylprednisolone sodium treatment in the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine*, v.26, n.4, p.426-430, 2001.
- MATSUSHITA, K.; WU, Y.; QIU, J. et al. FAS receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J. Neurosci.*, v.20, n.18, p.6879-6887, 2000.
- MATTSON, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature*, v.1, p.120-129, 2000.
- MCKENZIE, E.C.; VALBERG, S.J.; GODDEN, S.M. et al. Effect of oral administration of dantrolene sodium on serum creatine kinase activity after exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Am. J. Vet. Res.*, v.65, n.1, p.74-79, 2004.
- MCKINLEY, W.; MEADE, M.A.; KIRSHBLUM, S. et al. Outcomes of early surgical management versus late or no surgical intervention after acute spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, v.85, p.1818-1825, 2004.
- MEINTJES, E.; HOSGOOD, G.; DANILOFF, J. Pharmaceutical treatment of

- acute spinal cord trauma. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.18, n.6, p.625-635, 1996.
- METZ, G.A.S.; MERKLER, D.; DIETZ, V. et al. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.*, v.883, n.2, p.165-177, 2000.
- MEYER, F.; VIALLE, L.R.; VIALLE, E.N. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v.18, n.3, p.203-208, 2003.
- MOCCHETTI, I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.62, n.19-20, p.2283-2294, 2005.
- MODY, I.; MACDONALD, J.F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Trends Pharmacol. Sci.*, v.16, n.10, p.356-359, 1995.
- MOORE, M.P. Approach to the patient with spinal disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.22, n.4, p.751-781, 1992.
- MORI, F.; OKADA, M.; TOMIYAMA, M. et al. Effects of ryanodine receptor activation on neurotransmitter release and neuronal cell death following kaianic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.*, v.65, p.59-70, 2005.
- MUIR, G.D.; WEBB, A.A. Assessment of behavioral recovery following spinal cord injury in rats. *Eur. J. Neurosci.*, v.12, n.9, p.3079-3086, 2000.
- MULLEN, R.J.; BUCK, C.R.; SMITH, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.*, v.116, n.1, p.201-211, 1992.
- NAKAYAMA, R.; YANO, T.; USHIJIMA, K. et al. Effects of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia. *Anesthesiol.*, v.96, n.3, p.705-710, 2002.
- NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, v.23, n.2/3, p.173-180, 1998.
- NIEBAUER, M.; GRUENTHAL, M. Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental status epilepticus. *Neuropharmacol.*, v.38, n.9, p.1343-1348, 1999.
- OLBY, N.; JEFERRY, N. Pathogenesis of diseases of the central nervous system. In: SLATTER, D. *Textbook of small animal surgery*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.1132-1147.
- PAGALA, M.; AMALADEVI, B.; BERNSTEIN, A. et al. Dantrolene Sodium Reduces the Enhanced Leakage of Creatine Kinase Caused by Ethanol, Cocaine, and Electrical Stimulation in Isolated Fast and Slow Muscles of Rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.21, n.1, p.63-67, 1997.
- 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.
- PASTÓ CARDONA, L.; CASALS CAUS, P.; BARROSO DE FUENMAYOR, E. et al. Dantroleno intravenoso en hipertermia maligna y síndrome neuroleptico maligno: protocolo de utilización. *Farm. Hosp.*, v.19, n.2. p.95-98, 1995.
- PAUL-PLATZER, K.; YAMAMOTO, T.; IKEMOTO, N. et al. Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor. *Biochem. J.*, v.387, p.905-909, 2005.
- PEDERSEN, E.; HARVING, H.; KLEMAR, B. Effect of dantrolene sodium on the spastic external urethral sphincter recorded

- by sphincterometry. *J. Urol.*, v.119, n.3, p.403-405, 1978.
- PLATT, S.R. The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review. *Vet. J.*, v.173, n.2, p.278-286, 2007.
- POPESCU, B.O.; OPRICA, M.; SAJIN, M. et al. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Med.*, v.6, n.4, p.555-569, 2002.
- QÍAO, F.; ATKINSON, C.; SONG, H. et al. Complement plays an important role in spinal cord injury and represents a therapeutic target for improving recovery following trauma. *Am. J. Pathol.*, v.169, n.3, p.1039-1047, 2006.
- QUENCER, R.M.; BUNGE, R.P. The injured spinal cord: Imaging, histopathologic, clinical correlates, and basic science approaches to enhancing neural function after spinal cord injury. *Spine*, v.21, n.18, p.2064-2066, 1996.
- RADOJICIC, M.; REIER, P.J.; STEWARD, O. et al. Septations in chronic spinal cord injury cavities contain axons. *Exp. Neurol.*, v.196, p.339-341, 2005.
- RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J. Neurosurg.*, v.47, n.4, p.577-581, 1977.
- ROSENZWEIG, E.S.; MCDONALD, J.W. Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Curr. Opin. Neurol.*, v.17, p.121-131, 2004.
- ROUSSOS, I.; RODRÍGUEZ, M.; VILLÁN, D. et al. Development of a rat model of spinal cord injury and cellular transplantation. *Transplant. Proc.*, v.37, n.9, p.4127- 4130, 2005.
- SCHRAMM, J.; HASHIZUME, K.; FUKUSHIMA, T. et al. Experimental spinal cord injury produced by slow, graded compression. *J. Neurosurg.*, v.50, p.48-57, 1979.
- SCHMITT, C.; MIRANPURI, G.S.; DHODDA, V.K. et al. Changes in spinal cord injury-induced gene expression in rat are strain-dependent. *Spine J.*, v.6, n.2, p.113-119, 2006.
- SHORES, A.; BRAUND, K.G.; BRAWNER, W.R. Management of acute spinal cord trauma. *Vet. Med.*, v.85, p.724-739, 1990.
- SHORT, D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr. Opin. Neurol.*, v.14, p.759-763, 2001.
- SIDDALL, P.J.; MIDDLETON, J.W. A proposed algorithm for the management of pain following spinal cord injury. *Spinal Cord*, v.44, p.67-77, 2006.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.3, 2008.
- SILVERMAN, H.; HIKIDA, R.S. Membrane systems of avian hepatocytes during chronic exposure to dantrolene sodium: a morphometric, ultrastructural and histochemical study. *Tissue Cell.*, v.9, n.3, p.507-520, 1977.
- SNYDER, H.R.; DAVIS, C.S.; BICKERTON, R.K. et al. 1-((5-arylfurfurylidene) amino)-hydantoin. A new class of muscle relaxants. *J. Med. Chem.*, v.10, p.807-810, 1967.
- SOBLOSKY, J.S.; SONG, J.H.; DINH, D.H. Graded unilateral cervical spinal cord injury in the rat: evaluation of forelimb

- recovery and histological effects. *Behav. Brain Res.*, v.119, n.1, p.01-13, 2001.
- SOLAROGLU, I.; KAPTANOGLU, E.; OKUTAN, O. et al. Magnesium sulfate treatment decreases caspase-3 activity after experimental spinal cord injury in rats *Surg. Neurol.*, v.64, suppl.2, p.17-21, 2005.
- SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; DELAHUNTA, A. Injuries to the central nervous system. In:\_\_\_\_. *Veterinary neuropathology*. St. Louis: Ed. Mosby, 1995. p.189-207.
- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.*, v.56, n.3, p.341-358, 1998.
- TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J.Neurosurg.*, v.75, p.15-26, 1991
- THOMAS, A.J.; NOCKELS, R.P.; PAN, H.Q.; SHAFFREY, C.I.; CHOPP, M. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine*, v.24, n.20, p.2134–2138, 1999.
- THOMAS, W.B. Initial assessment of patients with neurologic dysfunction. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.30, n.1, p.1-23, 2000.
- THRALL, M.A. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 518p.
- THURET, S.; L MOON, L.D.F.; GAGE, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature*, v.7, p.628-643, 2006.
- TSUTSUMI, S.; UETA, T.; SHIBA, K. et al. Effects of the second national acute spinal cord injury study of high-dose methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury—results in spinal injuries center. *Spine*, v.31, n.26, p.2992-2996, 2006.
- UCUNCU, H.; TAYSI, S.; AKTAN, B. et al. Effect of dantrolene on lipid peroxidation, luthathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with efusión in guinea pigs. *Hum. Exp. Toxicol.*, v.24, n.11, p.567-571, 2005.
- Ünal-Çevik, I.; Kılınc, M.; Gürsoy-Özdemir, Y. et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.*, v.1015, n.1-2, p.169-174, 2004.
- 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. *Exp. Neurol.*, v.137, n.2, p.242-254, 1996.
- VON EULER, M.; SEIGER, A.; SUNDSTRÖM, E. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp. Neurol.*, v.145, n.2, p.502- 510, 1997.
- XU, G.P.; DAVE, K.R.; VIVERO, R. et al. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res.*, n.952, p.153-158, 2002.
- WARD, A.; CHAFFMAN, M.O.; SORKIN, E.M. Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs.*, v.32, n.2, p.130-168, 1986.
- WAXMAN, S.G.; KOCSIS, J.D. Spinal cord repair: Progress towards a daunting goal. *Neuroscientist*, v.3, n.4, p.263-269, 1997.

- WAXMAN, E.A.; LYNCH, D.R. N-methyl-D-aspartate Receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist*, v.11, n.1, p.37-49, 2005.
- WEI, H.; PERRY, D.C. Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J. Neurochem.*, v.67, n.6, p.2390-2398, 1996.
- WEI, H.; LEEDS, P.; CHEN, R.W. et al. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *J. Neurochem.*, v.75, n.1, p.81-90, 2000.
- WHEELER, S.J.; SHARP, N.J.H. *Small animal spinal disorders: Diagnosis and surgery*. 2. ed. London: Mosby, 2005. 379p.
- WUERMSER, L.A.; HO, C.H.; CHIODO, A.E. et al. Spinal cord injury medicine. 2. Acute care management of traumatic and nontraumatic injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, v.88, suppl.1, 2007.
- YANO, T.; NAKAYAMA, R.; IMAIZUMI, T. et al. Dantrolene ameliorates delayed cell death and concomitant DNA fragmentation in the rat hippocampal CA1 neurons subjected to mild ischemia. *Resuscitation*, v.50, n.1, p.117-125, 2001.
- YEZIERSKI, R.P. Spinal cord injury: A model of central neuropathic pain. *Neurosignals*, v.14, n.4, p.182-193, 2005.
- YOSHIDA, M.; SAKAI, T. Dantrolene, a calcium-induced calcium release inhibitor, prevents the acquisition of amygdaloid kindling in rats, a model of experimental epilepsy. *Tohoku J. Exp. Med.* v.209, n.4, p.303-310, 2006.
- ZHANG, L.; ANDOU, Y.; MASUDA, S. et al. Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci. Lett.*, v.58, n.1, p.105-108, 1993.
- ZHAO, F.; LI, P.; WAYNE CHEN, S.R. et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanisms and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.17, p.13810-13816, 2001.