

ARTIGO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Influência do estreitamento do canal vertebral e do tempo para a descompressão na recuperação locomotora de ratos

The influence of spinal canal narrowing and timing of decompression on locomotion recovery of rats

Influencia del estrechamiento del canal vertebral y del tiempo para la descompresión en la recuperación locomotora de ratas

Albert Schiaveto de Souza¹
Felipe Barros de Escobar²
Elaine Aparecida Del Bel³

RESUMO

Objetivo: o objetivo deste trabalho foi estudar as consequências da lesão por contusão da medula espinhal, associada ao estreitamento do canal vertebral, no comportamento motor de ratos, avaliando-se o efeito do tempo para descompressão na recuperação neurológica dos animais. **Métodos:** foram utilizados ratos Wistar machos (n=6 por grupo), subdivididos nos seguintes grupos experimentais: laminectomia (T9-T10, Grupo Controle), contusão por queda de peso (10 g de peso, 15 cm de altura), estreitamento do canal vertebral em 35% (hastes de policarbonato; espessura de 0,78 mm) e contusão associada ao estreitamento do canal vertebral. O grupo de lesão associada foi ainda subdividido em sem ou com descompressão 24 ou 72 horas após a cirurgia. Os animais foram sacrificados sete dias após os procedimentos cirúrgicos. A função locomotora dos animais foi avaliada por meio do teste do campo aberto, do

ABSTRACT

Objective: the aim of this study was to investigate the consequences of contusion injury of spinal cord associated with narrowing of vertebral canal on motor behavior of rats, as assessing the effect of decompression time on the neurologic recovery of the animals. **Methods:** male Wistar rats (n=6 per group) were divided into three experimental groups: submitted to laminectomy (T9-T10, Control Group), contusion due to weight drop (10 g from a height of 15 cm), 35% narrowing of the vertebral canal obtained with 0.78 mm thick polycarbonate rods and contusion injury associated with narrowing of the vertebral canal. In this last group, decompression was not performed or it was made after 24 or 72 hours of the surgery, as the animals were divided into subgroups. Rats were sacrificed seven days after surgical procedures. The motor behavior of the animals was assessed

RESUMEN

Objetivo: estudiar las consecuencias de la lesión por contusión de la médula espinal, asociada al estrechamiento del canal vertebral en el comportamiento de ratas, evaluando el efecto del tiempo para la descompresión en la recuperación neurológica de los animales. **Métodos:** fueron utilizadas ratas Wistar machos (n=6, por grupo), subdivididos en los siguientes grupos experimentales: laminectomía (T9-T10, Grupo Control), contusión por caída de peso (10 g de peso, 15 cm de altura), estrechamiento del canal vertebral de 35% (astas de policarbonato; espesura de 0.78 mm) y contusión asociada al estrechamiento del canal vertebral. El grupo de lesión asociada fue subdividido en sin o con descompresión, 24 o 72 horas después de la cirugía. Los animales fueron sacrificados siete días después de los procedimientos quirúrgicos. La función locomotora de los animales fue evaluada por medio del teste de

Trabalho realizado no Departamento de Morfofisiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS – Campo Grande (MS) Brasil; Departamento de Fisioterapia da Universidade Católica Dom Bosco – Campo Grande (MS), Brasil; Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

¹Doutor; Professor adjunto do Departamento de Morfofisiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS – Campo Grande (MS), Brasil.

²Pós-graduando (Mestrado) do Departamento de Fisioterapia da Universidade Católica Dom Bosco; Professor da Faculdade Estácio de Sá de Campo Grande – FESCG – Campo Grande (MS), Brasil.

³Livre-docente; Professora do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

teste do plano inclinado e pela aplicação da escala BBB, antes da cirurgia, 24 e 72 horas depois da cirurgia e após 7 dias do procedimento cirúrgico. **Resultados:** a lesão por queda de peso e compressão da medula espinhal, bem como a lesão mista, prejudicaram o comportamento motor dos animais, sendo que a descompressão cirúrgica após 24 e 72 horas da cirurgia não melhorou a recuperação motora dos animais, como mostram os resultados da avaliação de campo aberto, no plano inclinado e pela escala BBB. Por outro lado, os animais que sofreram lesão medular por queda de peso apresentaram melhores escores na escala BBB e ângulos maiores no plano inclinado do que aqueles que sofreram lesão por estreitamento do canal vertebral ou lesão mista. **Conclusões:** a lesão por queda de peso ou estreitamento do canal vertebral provocou alterações no comportamento motor dos animais, sendo que a descompressão não trouxe melhora funcional significativa.

in open arena, inclined plane and by means of Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) locomotor rating scale, before and after 24, 48 hours and 7 days of surgical procedures. Results: contusion injury, narrowing of the spinal canal and mixed injury impaired the motor behavior of the animals. Surgical decompression (24 and 72 hours) did not improve motor recovery as assessed in open arena, BBB scale and inclined plane test. On the other hand, animals injured with weight drop showed better scores on BBB scale and higher angles in the inclined plane when compared to the ones that were injured with narrowing of the vertebral canal and mixed lesion. Conclusions: spinal cord injury by weight drop and narrowing of the vertebral canal induced alterations on the motor behavior, which did not significantly improve with decompression.

campo abierto, del plano inclinado y por la aplicación de la escala BBB, antes de la cirugía, 24, 72 horas y 7 días después del procedimiento quirúrgico. Resultados: la lesión por caída de peso y compresión de la médula espinhal, así como la lesión mixta perjudicaron el comportamiento motor de los animales, siendo que la descompresión quirúrgica 24 y 72 horas después de la cirugía no mejoró la recuperación motora de los animales, cuando los mismos fueron evaluados en el campo abierto, en el plano inclinado y por la escala BBB. Por otro lado, los animales que sufrieron lesión medular por caída de peso presentaron mejores índices en la escala BBB y ángulos mayores en el plano inclinado, cuando comparados con aquellos que sufrieron lesión por estrechamiento del canal vertebral o la lesión mixta. Conclusiones: la lesión por caída de peso o estrechamiento del canal vertebral provocó alteraciones en el comportamiento motor de los animales, siendo que la descompresión no trajo mejoría funcional significativa.

DESCRITORES: Compressão da medula espinhal; Traumatismos da medula espinhal/complicações; Medula espinhal/lesões; Canal vertebral; Ratos Wistar

KEYWORDS: Spinal cord compression; Spinal cord injuries/complications; Spinal cord/injuries; Spinal canal; Rats, Wistar

DESCRIPTORES: Compresión de la médula espinhal; Traumatismos de la médula espinhal/complicaciones; Médula espinhal/lesiones; Conducto vertebral; Ratas Wistar

INTRODUÇÃO

A lesão traumática da medula espinhal, além de trazer consequências catastróficas para a vítima, é problema desafiador tanto para os cientistas quanto para os clínicos. As consequências frequentemente persistem por toda a vida e influenciam não só a vítima, mas também a família e a sociedade como um todo. O maior afã das pesquisas básicas da área, atualmente, é o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas para prevenir ou reduzir as sequelas decorrentes do trauma¹.

As pesquisas relacionadas à lesão da medula espinhal podem ser divididas em duas grandes categorias: relacionadas aos problemas da fase aguda e relacionadas à fase crônica. Na fase aguda, arbitrariamente definida como as primeiras 48 horas após a lesão, as investigações são feitas no sentido de estudar a fisiopatologia associada ao trauma da

medula espinhal, observando-se as causas e os efeitos da lesão. O objetivo seria desenvolver terapias que interrompam ou revertam a progressão das disfunções sensório-motoras. Nas terapias, estariam inclusos procedimentos cirúrgicos, intervenções farmacológicas e manipulações bioquímicas dos componentes celulares no tecido nervoso. A fase crônica, por outro lado, mostra a necessidade de reversão de quadro neurológico estável por dias, meses, ou anos após a lesão. Para tanto, manipulações cirúrgicas e farmacológicas têm sido de pouca ajuda no retorno de disfunções. Uma área que tem crescido muito no estudo da lesão medular crônica está relacionada à regeneração do tecido nervoso central após lesão. De fato, este é um dos maiores desafios da pesquisa biomédica acerca deste assunto².

Embora esteja claro que a lesão primária seja induzida pela contusão da medula espinhal produzida pela ruptura

da membrana, lesão vascular e hemorragia, o quadro patológico final vai muito além do que aquele identificado nas primeiras horas após a lesão. Imagina-se que a propagação da lesão seja devido à ativação de eventos bioquímicos, levando a uma franca destruição celular (necrose) e lesão excitotóxica.

A ideia de que os eventos bioquímicos secundários contribuem para a lesão da medula espinhal, especialmente aquelas causadas por contusão, tem sido a força impulsora para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de lesões medulares agudas em humanos³. Além da necrose secundária, processos ativos de morte celular programada (apoptose) podem ser importantes na produção da lesão secundária do Sistema Nervoso Central (SNC) causadas tanto pela isquemia, quanto pelo trauma⁴.

O entendimento detalhado dos mecanismos que sublinham os processos secundários à lesão é esparso, contudo, é um processo dinâmico e complexo. A lesão celular mobiliza uma sequência de modificações moleculares e celulares que ocorrem poucos minutos após a lesão e continuam por horas, dias e semanas, ampliando a gravidade da lesão, tais como mudanças no fluxo sanguíneo e isquemia, edema, acúmulo de cálcio intracelular e de potássio no espaço extracelular, hidrólise de fosfolípidos, formação de radicais livres, liberação de aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato, migração de células inflamatórias, ativação da micróglia, presença de fatores inibitórios, entre outros⁵.

O desenvolvimento de uma terapêutica racional para o tratamento de lesões traumáticas agudas da medula espinhal em humanos requer modelo animal padronizado e reprodutível, no qual um estímulo lesivo que pode ser quantificado possa ser correlacionado à recuperação funcional e à morfologia da lesão medular.

Vários métodos experimentais têm sido desenvolvidos para simular o tipo de compressão aguda do trauma medular⁶, sendo que o primeiro descrito foi através da técnica de queda de peso em cachorros, introduzido por Allen⁷, em 1911. Embora vários pesquisadores tenham utilizado este método ou métodos semelhantes, muitos outros têm sido desenvolvidos. Em 1953, Tarlov et al.⁸ introduziram a técnica de compressão medular em cachorros por meio da implantação de um balão inflável no espaço extradural. O desenvolvimento de balões infláveis menores tornou possível estudar um maior número de pequenos animais, os quais são mais facilmente disponíveis. Na década de 1970, Rivilin e Tator⁹ descreveram um novo método de lesão aguda da medula espinhal em ratos, utilizando “clip” de aneurisma modificado. Esse método tem sido adotado por vários pesquisadores por ser fidedigno e barato.

Mais recentemente, Dimar et al.¹⁰ desenvolveram um método experimental para estreitar gradualmente o canal vertebral de ratos usando pequenos espaçadores de Teflon, inseridos no espaço epidural sob a lâmina vertebral. Por meio deste método, foi possível produzir uma compressão persistente da medula espinhal com comprometimento

neurológico progressivo, de acordo com a proporção de estreitamento do canal vertebral causada pelo espaçador.

Atualmente, paradigmas experimentais envolvem desde células neuronais em cultura a segmentos anatomicamente intactos da medula espinhal, sujeitos a vários tipos de insultos mecânicos ou isquêmicos, tais como aqueles produzidos por queda de peso, compressão focal ou circunferencial por balão extradural, estreitamento do canal vertebral com espaçador epidural, compressão por “clip”, lesões térmicas ou fotoquímicas, forças de distração ou ainda lesões por pistonamento. Com estes métodos, a fisiopatologia dos eventos secundários à lesão e à intervenção terapêutica tem sido extensivamente investigada em vários laboratórios¹¹.

Assim, a utilização de modelos de laboratório tem se mostrado extremamente relevante no entendimento e desenvolvimento de novas terapêuticas para lesões da medula espinhal em humanos. A utilização de ratos como animal experimental parece ser satisfatória, pois eles são resistentes o suficiente para a experimentação, além de serem facilmente disponíveis¹¹.

Em humanos, é comum que o trauma medular por contusão venha acompanhado por um estreitamento do canal vertebral, levando a uma compressão persistente da medula espinhal, o que poderia afetar a recuperação neurológica a longo prazo. Todavia, resultados de estudos prévios são contraditórios quanto ao fato de a intensidade de estreitamento do canal vertebral e o tempo para a descompressão após uma lesão na medula espinhal afetarem o grau de recuperação neurológica ou não¹⁰.

Este dilema clínico tem sido difícil de ser resolvido por causa da dificuldade em avaliar o grau da lesão medular inicial e o efeito imprevisível de vários outros fatores, tais como as mudanças metabólicas secundárias, a extensão do estreitamento do canal vertebral, o grau de instabilidade espinhal e as lesões não espinhais associadas. Esforços para o desenvolvimento de um modelo animal têm sido dificultados pela inabilidade em se reproduzirem os múltiplos parâmetros que simulem a situação clínica. A despeito destas dificuldades, o valor da determinação se a descompressão após lesão da medula espinhal é benéfica para a recuperação neurológica e o tempo ótimo para os procedimentos cirúrgicos para descompressão justificam os estudos acerca do tema.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as consequências da lesão por contusão da medula espinhal, associada ao estreitamento do canal vertebral, no comportamento motor e circulação sanguínea espinhal de ratos, avaliando-se o efeito do tempo para descompressão na recuperação neurológica dos animais.

MÉTODOS

Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos machos da raça Wistar, com peso corporal variando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério da Universidade Católica Dom

Bosco. Os animais foram mantidos, até ao término do experimento, em gaiolas contendo três animais, alimentados com uma dieta padrão do biotério e água *ad libitum*, com temperatura controlada ($24\pm 2^\circ\text{C}$), e com um ciclo claro/escuro de 12 x 12 horas, sendo o início do período claro às 6:00 horas.

Previamente ao início do experimento, todos os animais foram pesados, identificados e numerados através de um código de marcas em suas orelhas; o desenvolvimento dos animais foi acompanhado por meio de pesagens semanais.

Anestesia

A anestesia usada para o procedimento cirúrgico foi o tribromo-etanol, na dose de 250 mg/kg de peso do animal (volume, 10 mL/kg). No dia do sacrifício do animal, para a retirada da medula espinhal, a anestesia utilizada foi uretana na dose de 1,5 g/kg de peso do animal (volume, 4 mL/kg).

Analgesia pós-cirúrgica

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam aplicação de buprenorfina na dose de 0,05 mg/kg (via subcutânea) a cada 12 horas durante as primeiras 72 horas.

Grupos experimentais

1. Grupo laminectomia (n=6): neste grupo, após a anestesia, em cada animal foi feita uma pequena incisão (± 2 cm) na linha média da região posterior do animal, na região correspondente à coluna torácica inferior. A musculatura foi, então, divulsionada, expondo-se as vértebras T8 a T12. Em seguida, a lâmina da vértebra T10 foi cuidadosamente retirada, usando-se uma lupa cirúrgica, com aumento de 10 vezes. Após a laminectomia, a musculatura e a pele foram suturadas separadamente. Em seguida, o animal foi colocado em local apropriado para se recuperar;

2. Grupo contusão da medula espinhal por queda de peso (n=6): neste grupo, após a laminectomia da vértebra T10, cada animal foi submetido a uma lesão medular por contusão, por meio da queda de um cilindro de 10 g de massa, de uma altura de 15 cm, sobre a medula espinhal exposta;

3. Grupo estreitamento de 35% do canal vertebral (n=6): neste grupo, após a laminectomia da vértebra T10, em cada animal foi colocado um espaçador de policarbonato de 0,78 mm de espessura sob a lâmina da vértebra T9, no espaço epidural, estreitando-se o diâmetro do canal vertebral em 35%. Em seguida, o animal foi colocado em um local apropriado para se recuperar;

4. Grupo contusão da medula espinhal (queda de peso) + estreitamento de 35% do canal vertebral, com descompressão após 24 horas (n=6): neste grupo, após a laminectomia da vértebra T10, cada animal foi submetido a uma lesão medular por contusão por meio da queda de um cilindro de 10 g de massa, de uma altura de 15 cm, sobre a medula espinhal exposta. Em seguida, colocou-se um espaçador de policarbonato de 0,78 mm de espessura sob a

lâmina da vértebra T9 no espaço epidural, estreitando-se o diâmetro do canal vertebral em 35%. Nesses animais, os espaçadores utilizados para o estreitamento do canal vertebral foram retirados após 24 horas do final do procedimento cirúrgico;

5. Grupo contusão da medula espinhal (queda de peso) + estreitamento de 35% do canal vertebral, com descompressão após 72 horas (n=6): neste grupo, após a laminectomia da vértebra T10, cada animal foi submetido a uma lesão medular por contusão por meio da queda de um cilindro de 10 g de uma altura de 15 cm, sobre a medula espinhal exposta. Em seguida, colocou-se um espaçador de policarbonato de 0,78 mm de espessura sob a lâmina da vértebra T9, no espaço epidural, estreitando-se o diâmetro do canal vertebral em 35%. Nesses animais, os espaçadores utilizados para o estreitamento do canal vertebral foram retirados após 72 horas do final do procedimento cirúrgico;

6. Grupo contusão da medula espinhal (queda de peso) + estreitamento de 35% do canal vertebral, sem descompressão (n=6): neste grupo, após a laminectomia da vértebra T10, cada animal foi submetido a uma lesão medular por contusão por meio da queda de um cilindro de 10 g de massa, de uma altura de 15 cm, sobre a medula espinhal exposta. Em seguida, colocou-se um espaçador de policarbonato de 0,78 mm de espessura sob a lâmina da vértebra T9, no espaço epidural, estreitando-se o diâmetro do canal vertebral em 35%. Nesses animais, os espaçadores utilizados para o estreitamento do canal vertebral não foram retirados até o momento da eutanásia.

Um desenho ilustrativo do aparato utilizado para a contusão da medula espinhal por queda de peso está apresentado na Figura 1. Uma ilustração dos espaçadores utilizados para a compressão da medula espinhal por estreitamento do canal vertebral está apresentada na Figura 2.

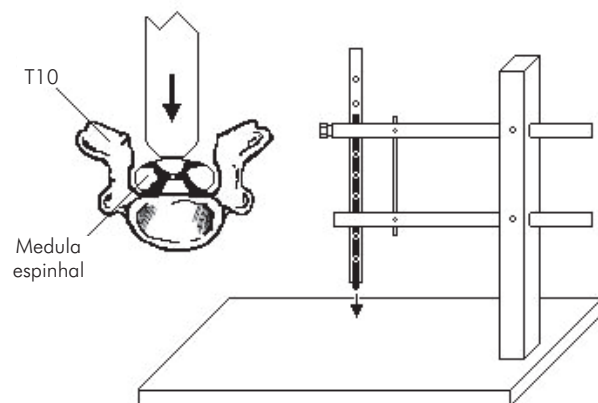


Figura 1
Desenho ilustrando o aparelho utilizado para a produção da lesão da medula espinhal por meio da queda de peso.

Todas as cirurgias foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Católica Dom Bosco. Após o procedimento cirúrgico, os ratos receberam dose única de pentabiótico na dosagem de 240000 UI das penicilinas por kg e 100 mg de estreptomicina e



Figura 2
Desenho ilustrando forma e as dimensões dos espaçadores de policarbonato utilizados para a produção da compressão de 35% do canal vertebral.

diidroestreptomicina por kg (Forte Dodge®; volume, 0,1 mL/100 g de peso do animal).

Nos dias subsequentes ao procedimento experimental, cada animal foi manipulado diariamente com massagem vesical e abdominal, para facilitar a eliminação de urina e fezes, e teve as articulações dos membros posteriores mobilizadas para se evitarem contraturas musculares e outras alterações vasculares.

Todos os animais foram mantidos vivos para a avaliação funcional (por sete dias), praticando-se a eutanásia em seguida. O descarte dos animais foi congelado e encaminhado para incineração pelos responsáveis pelo lixo biológico da UCDB.

Avaliação funcional dos animais

A avaliação sensorio-motora dos animais após a lesão medular por estreitamento do canal vertebral, bem como a quantificação da recuperação funcional dos animais no decorrer do tempo, foi realizada por meio do teste do campo aberto^{12,13}, da avaliação do comportamento locomotor, por meio da escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan¹⁴, e do teste do plano inclinado⁹. Os testes de comportamento foram realizados no pré-teste, bem como 4, 24, 48, 72, 96 e 168 horas (7 dias) após o procedimento experimental, sempre no mesmo horário e local, como descritos a seguir.

Teste do campo aberto

Em nosso laboratório, os parâmetros avaliados durante a realização do teste do campo aberto foram: a frequência dos comportamentos de exploração horizontal e vertical, em uma arena cilíndrica, de 72 cm de diâmetro, com paredes de acrílico translúcido de 49 cm de altura, posicionada sobre uma base de madeira recoberta de fórmica na cor branca, a qual é subdividida em 12 quadrantes de 339,3 cm² cada.

Escala de avaliação locomotora BBB

Os animais também foram avaliados pela escala de avaliação locomotora BBB¹⁴, em que a função locomotora do animal foi avaliada por meio da observação de alguns parâmetros comportamentais, enquanto se locomovia no mesmo aparato utilizado para o teste do campo aberto. O animal foi classificado por meio de uma escala que variava de 0 a 21 pontos, refletindo as condições locomotoras do animal, em que o escore 0 representava plegia total do

membro, e o escore 21 representava atividade locomotora normal do membro.

Teste do plano inclinado

Neste teste, cada animal foi avaliado pela habilidade de se manter sobre um plano inclinado. O plano inclinado era constituído por duas tábuas retangulares de madeira compensada unidas por uma dobradiça. Uma das tábuas era a base e a outra, um plano inclinado móvel. Duas tábuas laterais graduadas, fixas na base, foram utilizadas para medir os graus de inclinação do plano móvel. Para avaliar o animal, ele foi colocado sobre o plano móvel de maneira que o eixo do seu corpo estivesse perpendicular ao eixo do plano inclinado. O ângulo (em graus) do plano inclinado foi determinado como o ângulo máximo no qual o rato pôde se manter por si mesmo durante pelo menos cinco segundos⁹.

Análise estatística

Os resultados obtidos por meio dos testes de comportamento foram analisados estatisticamente pelos softwares SPSS para Windows®, na versão 4.0 ou pelo SigmaStat para Windows®, na versão 2.0. Em todos os testes utilizados, consideraram-se estatisticamente significativas as diferenças em que $p < 0,05$.

Para os resultados obtidos, as médias dos fatores tratamento e tempo foram comparadas por análise de variância de duas vias de medidas repetitivas paramétrico (ANOVA), para se verificar o efeito de cada fator e a possível interação entre eles. Após o teste, se houve efeito e/ou interação entre os fatores, as médias de cada fator foram comparadas por análise de variância de uma via (ANOVA de uma via, independente e/ou de medidas repetitivas), seguido pelo pós-teste de Duncan ou ainda pelo teste *t* de Student^{15,16}.

RESULTADOS

Os resultados gerais obtidos pelo teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas referentes às variáveis peso corporal, exploração horizontal e vertical, ângulo no plano inclinado e escore na escala BBB, estão apresentados na Tabela 1. Para todas as variáveis avaliadas, houve um efeito significativo do Grupo Experimental e do momento de avaliação dos animais. Além disso, houve uma interação para os fatores grupo e momento em todas as variáveis avaliadas, com exceção da exploração dos animais, e houve apenas uma tendência de interação ($p = 0,054$).

Os resultados referentes à mensuração do peso dos animais, em cada grupo experimental e em cada momento avaliado, estão apresentados na Tabela 2. Os animais dos grupos experimentais laminectomia, compressão de 35% do canal medular, queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24 horas e queda de peso + compressão de 35% sem descompressão apresentaram ganho de peso significativo no decorrer do tempo (ANOVA de uma via de medidas repetitivas, $p < 0,05$), o que não foi observado para os animais dos grupos queda de peso somente e queda de peso + compressão de 35%

TABELA 1 - Resultados gerais obtidos pelo teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, referentes às variáveis peso corporal, exploração horizontal e vertical, ângulo no plano inclinado e escore na Escala BBB.

Variável	Efeito dos fatores		Interação entre os fatores (Grupo e Momento)
	Grupo	Momento	
Peso	<0,001	<0,001	<0,001
Exploração horizontal	0,03	<0,001	0,054
Exploração vertical	<0,001	<0,001	<0,001
Ângulo no plano inclinado	<0,001	<0,001	<0,001
Escore na Escala BBB	<0,001	<0,001	<0,001

Teste ANOVA.

TABELA 2 - Resultados referentes à mensuração do peso dos animais, nos diversos momentos avaliados neste estudo.

Grupo experimental	Peso dos animais nos momentos avaliados				Valor de p (entre tempos) *
	Pré-teste	24 horas	72 horas	7 dias	
Laminectomia	293,33±10,77 a ab	297,17±10,30 a a	315,00±10,24 a b	332,33±9,30 a c	<0,001
Queda de peso	282,67±8,42 a a	281,50±6,14 a a	285,17±7,26 a a	286,83±7,63 a a	0,15
Compressão de 35%	323,33±13,96 a ab	325,50±9,47 a b	304,00±9,59 a a	329,00±8,37 a b	0,02
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24h	379,50±10,52 b a	393,00±11,95 b ab	393,17±12,01 b ab	396,83±11,82 b b	0,02
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 72h	309,50±16,76 a a	312,67±11,94 a a	313,50±11,17 a a	306,00±12,75 a a	0,48
Queda de peso + compressão de 35%, sem descompressão	294,50±13,87 a a	310,00±14,11 a b	295,00±16,38 a a	308,33±17,49 a ab	0,01
Valor de p (entre grupos) **	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Os valores estão expressos em média±erro padrão da média;

* Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey;

** Teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey;

Letras diferentes (mesma cor) indicam diferença significativa entre os grupos/momentos (pós-teste de Tukey, p<0,05).

com descompressão após 72 horas. Na comparação entre grupos, em todos os momentos avaliados, inclusive no pré-teste, o grupo de animais com queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24 horas, apresentou um peso significativamente maior do que os demais grupos (teste ANOVA, p<0,001). Esses resultados indicam que os animais do grupo de animais com queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24 horas já iniciaram o experimento com mais peso do que os animais dos demais grupos e, portanto, não podem ser utilizados na comparação com os demais grupos experimentais.

Os resultados referentes à exploração horizontal dos animais no campo aberto, em cada grupo experimental e em cada momento avaliado, estão apresentados na Tabela 3. Com exceção dos animais do grupo compressão de 35% do canal medular, os animais dos demais grupos experimentais apresentaram uma diminuição do comportamento de exploração horizontal com a reexposição dos animais ao campo aberto (ANOVA de uma via de medidas repetitivas, p<0,05). Na comparação

entre grupos, apenas no pré-teste houve diferença significativa entre eles (teste ANOVA, p=0,02), o que não era esperado, pois, teoricamente, todos os animais estavam em condições semelhantes. Nos demais momentos avaliados, não houve diferença entre os grupos experimentais (p>0,05), indicando que a lesão medular não influenciou o comportamento de exploração horizontal dos animais.

Os resultados referentes à exploração vertical dos animais no campo aberto, em cada grupo experimental e em cada momento avaliado, estão apresentados na Tabela 4. Os animais de todos os grupos experimentais apresentaram uma diminuição do comportamento de exploração vertical com a reexposição dos animais ao campo aberto (ANOVA de uma via de medidas repetitivas, p<0,001). Na comparação entre grupos, houve diferença em todos os momentos avaliados, inclusive no pré-teste (teste ANOVA, p=0,02), o que não era esperado, pois, teoricamente, todos os animais estavam em condições semelhantes. Nos demais momentos avaliados, os animais dos grupos que sofreram lesão

TABELA 3 - Resultados referentes à mensuração do comportamento de exploração horizontal dos animais, nos diversos momentos avaliados neste estudo.

Grupo experimental	Exploração horizontal dos animais nos momentos avaliados				Valor de p (entre tempos)*
	Pré-teste	24 horas	72 horas	7 dias	
Laminectomia	43,00±3,59 ab a	14,83±3,66 a b	13,67±3,45 a b	16,83±13,47 a b	<0,001
Queda de peso	29,00±3,72 ab a	12,17±2,27 a b	15,83±2,17 a b	19,17±3,02 a ab	0,003
Compressão de 35%	28,00±8,28 ab a	11,33±4,51 a a	11,83±2,94 a a	11,00±4,11 a a	0,11
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24h	45,00±5,95 a a	9,83±1,85 a b	11,83±1,38 a b	12,33±1,73 a b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 72h	22,83±3,57 b a	9,67±1,50 a b	8,67±1,20 a b	10,83±1,30 a b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35%, sem descompressão	36,50±3,36 ab a	5,33±1,80 a b	12,83±2,94 a b	11,50±3,13 a b	<0,001
Valor de p (entre grupos)**	0,02	0,31	0,49	0,41	

Os valores estão expressos em média±erro padrão da média;

* Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey;

** Teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey;

Letras diferentes (mesma cor) indicam diferença significativa entre os grupos/momentos (pós-teste de Tukey, p<0,05).

TABELA 4 - Resultados referentes à mensuração do comportamento de exploração vertical dos animais, nos diversos momentos avaliados neste estudo.

Grupo experimental	Exploração vertical dos animais nos momentos avaliados				Valor de p (entre tempos)*
	Pré-teste	24 horas	72 horas	7 dias	
Laminectomia	21,17±2,86 a a	4,50±1,02 a b	5,67±2,58 a b	5,83±2,50 a b	<0,001
Queda de peso	10,17±1,66 bc a	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	<0,001
Compressão de 35%	8,50±2,04 c a	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24h	14,33±1,67 abc a	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 72h	5,83±1,45 c a	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35%, sem descompressão	17,83±2,87 ab a	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	0,00±0,00 b b	<0,001
Valor de p (entre grupos)**	<0,001	<0,001	0,002	0,001	

Os valores estão expressos em média±erro padrão da média;

* Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey;

** Teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey;

Letras diferentes (mesma cor) indicam diferença significativa entre os grupos/momentos (pós-teste de Tukey, p<0,05).

medular (queda de peso e todos os grupos compressão) não apresentaram qualquer exploração vertical durante a realização do teste, o que evidencia a dificuldade destes animais em se colocarem sobre as patas posteriores após lesão.

Os resultados referentes ao maior ângulo em que os animais se mantiveram no plano inclinado, em cada grupo experimental e em cada momento avaliado, estão apresentados na Tabela 5. Os animais do grupo laminectomia mantiveram um ângulo no plano inclinado de

aproximadamente 80°, em todos os momentos avaliados neste estudo (ANOVA de uma via de medidas repetitivas, p=0,17). Os animais dos demais grupos apresentaram uma diminuição significativa no ângulo máximo de permanência no plano inclinado, após a lesão da medula espinhal (queda de peso e compressão – ANOVA de uma via de medidas repetitivas, p<0,001). Na comparação entre grupos, houve diferença em todos os momentos avaliados, inclusive no pré-teste (teste ANOVA, p<0,001), o que não era esperado, pois, teoricamente, todos os animais estavam em

TABELA 5 - Resultados referentes á mensuração do ângulo máximo no plano inclinado, sustentado pelos animais, nos diverso momentos avaliados neste estudo.

Grupo experimental	Ângulo máximo no plano inclinado para os animais nos momentos avaliados				Valor de p (entre tempos)*
	Pré-teste	24 horas	72 horas	7 dias	
Laminectomia	86,67±1,79 a a	82,08±1,76 a a	82,08±0,77 a a	83,75±1,91 a a	0,17
Queda de peso	89,58±0,42 a a	36,67±2,30 b b	44,58±2,69 b c	55,00±1,83 b d	<0,001
Compressão de 35%	87,92±1,50 a a	29,58±1,50 bc b	34,58±1,19 c bc	38,75±2,64 c c	<0,001
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24h	89,17±0,83 a a	29,58±3,19 bc b	30,83±2,01 c b	35,42±2,53 c b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 72h	90,00±0,00 a a	31,67±1,67 bc c	36,25±1,41 c b	38,75±1,07 c b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35%, sem descompressão	77,08±2,69 b a	27,08±1,87 c b	29,58±0,77 c bc	36,25±1,07 c c	<0,001
Valor de p (entre grupos)**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Os valores estão expressos em média±erro padrão da média;

* Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey;

** Teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey;

Letras diferentes (mesma cor) indicam diferença significativa entre os grupos/momentos (pós-teste de Tukey, p<0,05).

condições semelhantes. Nos demais momentos avaliados, os animais do grupo que sofreram lesão medular por queda de peso apresentaram ângulos significativamente maiores do que aqueles dos demais grupos com lesão medular, o que indica uma maior recuperação funcional (motora) desses animais.

Os resultados referentes aos escores obtidos na avaliação pela escala BBB, em cada grupo experimental e em cada momento avaliado, estão apresentados na Tabela 6. Os animais do grupo laminectomia mantiveram escores

que correspondem à normalidade das funções locomotoras, ou seja, escore de 21 pontos. Os animais dos demais grupos apresentaram uma diminuição significativa nos escores da escala BBB após a lesão da medula espinhal (queda de peso e compressão – ANOVA de uma via de medidas repetitivas, p<0,001). Na comparação entre grupos, não houve diferença significativa apenas no pré-teste, no qual todos os animais se apresentavam com função locomotora normal (21 pontos). Todavia, nos demais momentos, houve diferença entre eles (teste ANOVA, p<0,001),

TABELA 6 - Resultados referentes aos escores obtidos pelos animais, na Escala BBB, nos diversos momentos avaliados neste estudo.

Grupo experimental	Pontuação pela Escala BBB para os animais nos momentos avaliados				Valor de p (entre tempos)*
	Pré-teste	24 horas	72 horas	7 dias	
Laminectomia	21,00±0,00 a a	21,00±0,00 a a	21,00±0,00 a a	21,00±0,00 a a	1,00
Queda de peso	21,00±0,00 a a	2,83±0,31 b b	5,67±0,84 b c	8,50±0,50 b d	<0,001
Compressão de 35%	21,00±0,00 a a	0,33±0,21 c b	1,00±0,26 d bc	2,83±0,31 d c	<0,001
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 24h	21,00±0,00 a a	1,17±0,54 c b	2,00±0,45 cd b	4,83±0,79 cd b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35% com descompressão após 72h	21,00±0,00 a a	0,33±0,33 c c	3,00±0,36 c b	6,50±0,56 bc b	<0,001
Queda de peso + compressão de 35%, sem descompressão	21,00±0,00 a a	0,17±0,17 c b	1,17±0,31 cd b	2,17±0,48 e b	<0,001
Valor de p (entre grupos)**	1,00	<0,001	<0,001	<0,001	

Os valores estão expressos em média±erro padrão da média;

* Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey;

** Teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey;

Letras diferentes (mesma cor) indicam diferença significativa entre os grupos/momentos (pós-teste de Tukey, p<0,05).

sendo que os animais do grupo que sofreu lesão medular por queda de peso apresentaram escores significativamente maiores do que aqueles dos demais grupos com lesão medular, o que indica uma maior recuperação funcional (motora) dos animais. Esses resultados são semelhantes àqueles observados no plano inclinado.

DISCUSSÃO

Por várias décadas, a avaliação do comportamento locomotor de ratos foi baseada na escala criada por Tarlov e Klinger¹⁷ e suas modificações ao longo dos anos. Em meados dos anos 1990, Basso, Beattie e Bresnahan¹⁴ desenvolveram uma nova escala de avaliação motora. Essa nova escala foi criada com o intuito de ampliar a escala de Tarlov de 0 a 5 pontos para uma escala de 0 a 21 pontos, avaliando-se um maior repertório de movimentos. A escala BBB faz combinações de movimentos de modo a formar categorias que representem os estágios sequenciais de recuperação após lesão medular em ratos¹⁴. Na avaliação do comportamento motor pela escala BBB, observou-se a habilidade motora do animal para caminhar livremente por uma arena semelhante à do Teste do Campo Aberto, porém com dimensões maiores. Este sistema de pontuação usa uma escala ordinal não linear, na qual a parte inicial de recuperação concerne a aspectos grosseiros da locomoção, enquanto as partes superiores incluem aspectos discretos da habilidade motora dos animais¹⁸. A escala poderia ser dividida em três fases: 1) o ganho de movimentos das articulações dos membros posteriores, mas incapacidade de caminhar; 2) capacidade de dar passadas e ganho de qualidade na caminhada; e 3) ganho de posicionamento correto das patas e cauda e estabilidade de tronco¹⁴. Além disso, a escala BBB demonstrou correlação com o grau de lesão e comprometimento histológico¹⁹, e alta reprodutibilidade tanto intra quanto interobservador^{14,18,19}. Desse modo, a escala difundiu-se amplamente e proporcionou um parâmetro de comparação entre estudos de diferentes laboratórios no estudo da lesão medular.

É recomendado o uso de estatística paramétrica para avaliar os resultados da escala BBB^{14,19}. A unificação de

metodologia facilita a interpretação e correlação dos dados com outros estudos²⁰.

Os resultados da escala BBB, neste estudo, indicaram que a lesão por queda de peso e o estreitamento do canal espinal em 35% induz lesão medular em ratos. Estes resultados estão em oposição aos de Dimar et al.¹⁰, que não observaram déficit motor após o estreitamento do canal espinal de 35% em ratos. Neste estudo, o déficit motor só foi encontrado após a associação do estreitamento com contusão medular. Tal discrepância pode ser devido à diferença de espécie utilizada para o estudo (Wistar x Sprague Dawley) ou às dimensões do espaçador de 35% adequadas para ratos adultos Wistar.

O procedimento de descompressão cirúrgica 24 e 72 horas após a compressão não melhorou a recuperação motora dos animais, como mostrado pela pontuação BBB e pelo ângulo alcançado no plano inclinado. Por outro lado, os animais que sofreram lesão medular por queda de peso apresentaram melhores escores e ângulos maiores no plano inclinado do que aqueles que sofreram lesão por compressão do canal vertebral, ou lesão mista, combinado queda de peso e estreitamento do canal medular.

Existe uma correlação positiva entre o estreitamento do canal espinal e a severidade do déficit neurológico em humanos²¹. Tem sido demonstrado que a descompressão precoce pode reduzir o grau de lesão secundária em humanos²², coelhos²³ e cães²⁴⁻²⁶.

CONCLUSÕES

O procedimento de descompressão cirúrgica 24 e 72 horas após a compressão não melhorou a recuperação motora dos animais, como mostrado pela pontuação BBB e pelo ângulo alcançado no plano inclinado. Por outro lado, os animais que sofreram lesão medular por queda de peso apresentaram melhores escores na escala BBB e ângulos maiores no plano inclinado do que aqueles que sofreram lesão por compressão do canal vertebral, ou lesão mista, combinado queda de peso e estreitamento do canal medular.

REFERÊNCIAS

1. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol.* 1998;56(3):341-58.
2. De La Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine.* 1981;6(4):315-35.
3. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1992;76(1):13-22.
4. Johnson EM Jr, Greenlund LJ, Akins PT, Hsu CY. Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *J Neurotrauma.* 1995;12(5):843-52.
5. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 1996;76(2):319-70.
6. Fehlings MG, Tator CH. Spinal cord dysfunction: assessment. A review of experimental models of acute spinal cord injury. New York: Oxford University Press; 1988. p. 3-33.
7. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. *J Am Med Assoc.* 1911; 57:878-80.
8. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies: I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *Arch Neurol Psychiat.* 1953;70:813-9.

9. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol.* 1978;10(1):38-43.
10. Dimar JR 2nd, Glassman SD, Raque GH, Zhang YP, Shields CB. The influence of spinal canal narrowing and timing of decompression on neurologic recovery after spinal cord contusion in a rat model. *Spine.* 1999;24(16):1623-33.
11. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1999;44(5):1027-39.
12. Walsh R, Cummins RA. The open-field test: A critical review. *Psychol Bull.* 1976;83(3):482-504.
13. Whimbey AE, Denenberg VH. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol.* 1967;63(3):500-4.
14. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1-21.
15. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics the bare essentials.* London: Mosby; 1994.
16. Shott S. *Statistics for health professionals.* London: WB Saunders ; 1990.
17. Tarlov IM, Klinger H. Spinal cord compression studies. II. Time limits for recovery after acute compression in dogs. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1954;71(3):271-90.
18. Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.* 2000;883(2):165-77.
19. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma.* 1996;13(7):343-59.
20. SCheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma.* 2002;19(10):1251-60.
21. Meves R, Avanzi O. Correlation between neurological deficit and spinal canal compromise in 198 patients with thoracolumbar and lumbar fractures. *Spine.* 2005;30(7):787-91.
22. Shields CB, Zhang YP, Shields LB, Han Y, Burke DA, Mayer NW. The therapeutic window for spinal cord decompression in a rat spinal cord injury model. *J Neurosurg Spine.* 2005;3(4):302-7.
23. Jarmundowicz W, Tosik D, Chlebinski J, Gorkiewicz Z. The effect of early decompression on the extent of changes in spinal cord microcirculation in experimental traumatic injury to the cord in rabbits [abstract]. *Neurol Neurochir Pol.* 1997;31(6):1167-75.
24. Carlson GD, Gorden CD, Nakazawa S, Wada E, Smith JS, Lamanna JC. Sustained spinal cord compression: part II: effect of methylprednisolone on regional blood flow and recovery of somatosensory evoked potentials. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85(1):95-101.
25. Carlson GD, Gorden CD, Oliff HS, Pillai JJ, Lamanna JC. Sustained spinal cord compression: part I: time-dependent effect on long-term pathophysiology. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(1):86-94.
26. Delamarter RB, Sherman J, Carr JB. Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(7):1042-9.

Correspondência

Albert Schiaveto de Souza
 Rua Maracajú, 1136 – Centro
 CEP: 79002-212 – Campo Grande
 (MS), Brasil
 Fone: (67) 3345-7517
 Fax: (16) 633-0999
 E-mail: albertss@hotmail.com
