

---

---

**WILLIAM GEMIO JACOBSEN TEIXEIRA**

**Estudo do efeito do fator estimulador de colônia de granulócitos associado a metilprednisolona na lesão medular aguda experimental em ratos**

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

Programa de Ortopedia e Traumatologia  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante

São Paulo  
2017

---

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Teixeira, William Gemio Jacobsen

Estudo do efeito do fator estimulador de colônia de granulócitos associado a metilprednisolona na lesão medular aguda experimental em ratos / William Gemio Jacobsen Teixeira -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Alexandre Fogaça Cristante.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal 2.Fator estimulador de colônias de granulócitos 3.Metilprednisolona 4.Ratos Wistar 5.Sinergismo farmacológico 6.Medula espinal

USP/FM/DBD-196/17

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Terminologia Anatômica em Português conforme a TERMINOLOGIA ANATÔMICA INTERNACIONAL DA FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY - FCAT (COMISSÃO FEDERATIVA DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1ª ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole Ltda 2001. 248p.

Utilizaram-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o GUIA PARA EXPRESSÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO, Segunda Edição Brasileira do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

## DEDICATÓRIA

À minha esposa, Luciana, pelo companheirismo e suporte. Às minhas filhas, Helena e Gabriela, fonte de inspiração para a minha vida.

Aos meus pais, Manoel e Magaly, pelo exemplo, orientação e oportunidades.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio à minha formação profissional e pelas oportunidades de desenvolvimento que me foram oferecidas.

Ao Professor Doutor Olavo Pires de Camargo, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo estímulo às atividades da preceptoria e à pós-graduação.

Ao Professor Doutor Gilberto Luis Camanho, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos durante minha formação.

Ao Doutor Reginaldo Perilo Oliveira, Diretor do Grupo de Coluna do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela dedicação aos cuidados dos doentes com traumatismo raquimedular.

Ao Professor Doutor Alexandre Fogaça Cristante, Chefe do Grupo de Coluna Cervical e Trauma Raquimedular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela formação cirúrgica e apoio à produção científica.

Ao Professor Doutor Raphael Martus Marcon, pelo desenvolvimento e divulgação do modelo experimental no nosso meio e pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

Ao Doutor Ricardo Ferreira, pela realização dos exames neurofisiológicos deste estudo.

Ao médico veterinário Gustavo Bispo dos Santos, vice-chefe do Laboratório de Investigação Médica LIM-41 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio ao trabalho experimental que viabilizou a realização desta pesquisa.

Ao estatístico Dr. Henry Dan Kiyomoto, pelo auxílio com a análise na interpretação dos resultados e análise estatística.

A todos os funcionários do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa (FAPESP – Processo número 2013/14230-8).

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Listas de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1.	Introdução.....	1
1.1.	Objetivo .....	3
2.	Revisão de literatura.....	4
2.1.	Modelos experimentais.....	4
2.2.	Estudos de fármacos para tratamento da lesão secundária.....	10
3.	Material e métodos .....	21
3.1.	Ética.....	21
3.2.	Modelo experimental de lesão medular .....	21
3.2.1.	Animais de experimentação .....	21
3.2.2.	Critérios de inclusão e exclusão .....	22
3.2.3.	Formação dos grupos experimentais.....	22
3.2.4.	Protocolo de anestesia e analgesia.....	23
3.2.5.	Procedimento cirúrgico .....	24
3.2.6.	Lesão medular (contusão moderada controlada pelo NYU Impactor) .....	25
3.2.7.	Procedimento após lesão .....	28
3.2.8.	Antibioticoterapia .....	28
3.2.9.	Manutenção .....	28
3.3.	Tratamento medicamentoso .....	29
3.3.1.	Fator estimulador de colônia de granulócitos .....	29
3.3.2.	Metilprednisolona.....	29
3.4.	Avaliação dos resultados.....	30
3.4.1.	Avaliação da capacidade locomotora pela escala BBB de avaliação funcional .....	30
3.4.2.	Avaliação neurofisiológica por potencial evocado motor .....	31
3.4.3.	Eutanásia.....	31
3.4.4.	Exame anatomopatológico .....	32
3.5.	Análise estatística.....	33

3.5.1.	Análise estatística da avaliação funcional BBB .....	33
3.5.2.	Análise estatística do potencial evocado motor .....	34
3.5.3.	Análise estatística da análise histológica.....	34
4.	Resultados.....	35
4.1.	Análise dos dados obtidos pela escala funcional BBB .....	35
4.2.	Análise dos dados obtidos através do exame do potencial evocado motor .....	40
4.3.	Análise histológica .....	41
5.	Discussão .....	46
6.	Conclusão.....	51
7.	Anexos.....	52
8.	Referências .....	60



**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

ANOVA	análise de variância
ASIA	American Spinal Injury Association
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
dp	desvio-padrão
g	grama
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
G(M1)	monogangliosídeo
h	hora
IOT-USP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo
JAK2	janus quinase 2
kg	quilograma
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
Mín	mínimo
Máx	máximo
mcg	micrograma
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetro
ms	milissegundo
mV	milivolt
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury
STAT3	transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TGF-β1	fator de transformação do crescimento beta 1
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
X <sup>2</sup>	chi-quadrado

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Distribuição das médias e desvios padrões das escalas da Escala Funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) dos animais tratados com fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) de acordo com os momentos das observações.....	36
<b>Tabela 2</b>	Comparações múltiplas entre os grupos da escala funcional da Escala Funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).....	38
<b>Tabela 3</b>	Distribuição dos valores das latências dos potenciais evocados de acordo com as suas médias, desvios padrões e valores mínimos e máximos das patas traseiras.....	40
<b>Tabela 4</b>	Distribuição dos valores das amplitudes dos potenciais evocados de acordo com as suas médias, desvios padrões e valores mínimos e máximos das patas traseiras.....	40
<b>Tabela 5</b>	Estatística descritiva dos dados obtidos com a análise histológica do local da lesão quanto a necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração do tecido nervoso e infiltrado celular .....	41
<b>Tabela 6</b>	Comparações múltiplas entre os grupos quanto à avaliação histológica.....	42

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Laminectomia com exposição do saco dural.....	25
<b>Figura 2</b>	Diagrama esquemático sem escala do equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso NYU Impactor .....	26
<b>Figura 3</b>	Posicionamento do rato no NYU Impactor com garras fixadas aos processos espinhosos de TVIII e TXI e checagem do posicionamento da haste .....	27
<b>Figura 4</b>	Fotografia da lâmina da região da medula espinal traumatizada revelando grau acentuado de degeneração da substância nervosa (aumento: 200 vezes; coloração: hematoxilina-eosina). .....	44
<b>Figura 5</b>	Fotografia da lâmina da região da medula espinal traumatizada revelando grau acentuado de hiperemia (aumento: 100 vezes; coloração: hematoxilina-eosina).....	44
<b>Figura 6</b>	Fotografia da lâmina da região do traumatismo revelando grau moderado de infiltrado celular e degeneração (aumento: 200 vezes; coloração: hematoxilina-eosina).....	45
<b>Figura 7</b>	Fotografia da lâmina de uma região sem alterações, proximal a lesão (aumento: 100 vezes; coloração: hematoxilina-eosina) .....	45

**LISTA DE GRÁFICOS**

**Gráfico 1** Evolução das médias das notas da Escala Funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) de cada um dos grupos em cada um dos tempos de observação.....37

## **RESUMO**

Teixeira WGJ. *Estudo do efeito do fator estimulador de colônia de granulócitos associado a metilprednisolona na lesão medular aguda experimental em ratos* [tese doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

**Introdução:** Várias são as propostas descritas para tratar farmacologicamente a lesão traumática da medula espinal. A metilprednisolona já foi padronizada para uso clínico. O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) tem sido promissor em estudos experimentais e clínicos. Não há pesquisas quanto ao efeito da associação dos dois fármacos. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento com o fator estimulador de colônia de granulócitos associado a metilprednisolona na lesão medular aguda experimental em ratos. **Material e métodos:** Foram avaliados 40 ratos Wistar submetidos a lesão medular moderada com o NYU-Impactor. Os animais foram divididos em quatro grupos de 10 ratos. O Grupo Controle não recebeu tratamento; o Grupo G-CSF, foi tratado com G-CSF no momento da lesão e diariamente ao longo dos cinco dias subsequentes; o Grupo Metilprednisolona, com metilprednisolona durante 24 horas; e o Grupo G-CSF/Metilprednisolona, com metilprednisolona durante 24 horas e G-CSF no momento da lesão e ao longo de cinco dias. Os animais foram mantidos vivos durante 42 dias; a avaliação funcional foi realizada com a aplicação da escala funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) nos dias 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 subsequentes à lesão. A avaliação dos potenciais evocados motores foi realizada no dia 42 e a avaliação histológica da lesão da região da medula espinal lesada, realizada logo após a eutanásia ocorrida no dia 42. **Resultados e conclusões:** A associação de metilprednisolona e G-CSF no tratamento do traumatismo medular contuso experimental em ratos promoveu melhora neurológica avaliada pela escala BBB superior à melhora promovida pela metilprednisolona e G-CSF quando utilizadas isoladamente. A associação teve também efeito sinérgico que resultou em melhora nos parâmetros histológicos no local da lesão. Não houve diferença entre os grupos quanto à avaliação neurofisiológica.

**Descritores:** traumatismos da medula espinal; fator Estimulador de colônias de granulócitos; metilprednisolona; ratos Wistar; sinergismo farmacológico; medula espinal

## **ABSTRACT**

Teixeira WGJ. *Study of the effect of granulocyte colony-stimulating factor associated with methylprednisolone in experimental acute spinal cord injury in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

**Introduction:** There are several proposals to pharmacologically treat traumatic spinal cord injury. Methylprednisolone has already been standardized for clinical use. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) has been promising in experimental and clinical studies. There is no research on the effect of the association of the two drugs. **Objective:** to evaluate the effect of combined treatment of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) associated with methylprednisolone in experimental acute spinal cord injury in rats. **Material and methods:** Forty male Wistar rats were submitted to a moderate spinal cord injury with the NYU-Impactor. The animals were divided into four groups of ten rats each. The Control Group was not treated; the G-CSF Group was treated with G-CSF at the time of injury and daily over the next five days; the Methylprednisolone Group was treated with methylprednisolone for 24 hours; the G-CSF/methylprednisolone Group, was treated with methylprednisolone for 24 hours and G-CSF at the time of injury and daily over the next five days. The animals were kept alive for 42 days; Functional evaluation was performed using the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) score on days 2, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 following the spinal cord injury. Evaluation of motor evoked potentials was held and histological examination of the lesion of the spinal cord was done immediately after euthanasia on day 42. **Results and conclusions:** The combination of methylprednisolone and G-CSF in the treatment of experimental spinal cord injury in rats promoted neurological improvement as assessed by BBB scale with greater improvement than with methylprednisolone or G-CSF when used alone. The combination of treatment had also a synergistic effect resulting in improvement in histological parameters at the injury site. There was no difference between groups regarding neurophysiological evaluation.

**Keywords:** spinal cord injuries; granulocyte colony-stimulating factor; methylprednisolone; rats, Wistar; drug synergism; spinal cord

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal resulta em sofrimento, déficit funcional e alto custo econômico e social. Barros Filho et al.<sup>1</sup> observaram que, dos 428 doentes atendidos pelo Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas com lesão da medula espinal entre 1982 a 1987, 94,3% eram do sexo masculino, com faixa etária entre 21 a 30 anos. Apenas 28% dos doentes foi atendida no hospital nas primeiras seis horas após o traumatismo. Nos Estados Unidos da América (EUA), ocorrem 54 casos novos por milhão de habitantes ao ano.<sup>2</sup> A lesão medular tem como causa mais frequente o traumatismo por causas externas, mas também pode ser produzida por tumores, infecção ou lesão vascular.<sup>2,3</sup>

A fisiopatologia do traumatismo raquimedular é complexa e multifatorial. As lesões dele decorrentes podem ser classificadas como primária e secundária.<sup>4,5</sup> A lesão primária é resultado direto da lesão estrutural causada pelo traumatismo e resulta na ruptura de axônios, morte imediata de neurônios e de células da glia.<sup>5</sup> De acordo com Allen, em 1911,<sup>6</sup> a lesão secundária decorre dos agentes nocivos no local da lesão que poderiam provocar dano adicional e progressivo ao tecido nervoso. Na primeira hora após a lesão, ocorre hemorragia e necrose na substância cinzenta central, acompanhada, nas horas subsequentes, da instalação de edema. Esses eventos desencadeiam reações bioquímicas que têm como cenário final a morte celular. Durante e ao final desse processo, células inflamatórias migram para o local da lesão, onde promovem proliferação glial e formação de tecido cicatricial, em um período que dura de uma a quatro semanas.<sup>7</sup>

Várias pesquisas foram realizadas nas últimas décadas visando tornar o tratamento e cuidado do doente com traumatismo raquimedular mais efetivo. A maioria das pesquisas concentra-se na descrição de métodos cirúrgicos, de procedimentos de medicina física e reabilitação ou de fármacos. Dentre essas modalidades, as estratégias farmacológicas são as mais estudadas. Elas têm como objetivo reduzir os efeitos nocivos da lesão secundária e estimular a regeneração tecidual.<sup>8</sup>

Os corticosteroides e os gangliosídeos foram protocolados em 2002 para uso em seres humanos.<sup>9</sup> Os corticosteroides mais pesquisados foram a dexametasona e

a metilprednisolona. De acordo com ensaios clínicos prospectivos, duplamente cegos e com amostras aleatorizadas, a metilprednisolona revelou-se clinicamente eficaz.<sup>10-12</sup> Acredita-se que a metilprednisolona aumente o fluxo sanguíneo, estabilize a membrana celular e iniba a peroxidação lipídica com redução da formação de radicais livres. Recentemente, entretanto, teve seu uso rotineiro suspenso, pois demonstrou-se que seu efeito era de benefício clínico limitado e com risco elevado de complicações, sendo muitas delas graves, principalmente quando a metilprednisolona é utilizada em altas doses.<sup>13-15</sup>

O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) é uma glicoproteína mais conhecida pelo seu papel como fator estimulador de crescimento para células progenitoras hematopoiéticas.<sup>16,17</sup> É comumente utilizado para tratamento de neutropenia e para mobilizar células-tronco hematopoiéticas em casos de transplante de medula óssea.<sup>16</sup> Há estudos que demonstraram que o G-CSF também exerce funções não hematopoiéticas, pois pode aumentar a regeneração tecidual de diversos órgãos como o cérebro e coração.<sup>17,18</sup> O G-CSF foi estudado no modelo animal de traumatismo raquimedular e demonstrou melhora neurológica.<sup>17,19-22</sup> Na fase aguda, estimula a mobilização de células derivadas da medula óssea para a medula espinal lesada, onde suprime diretamente a apoptose neuronal e dos oligodendrócitos, a expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 beta,<sup>19,23,24</sup> e a peroxidação lipídica,<sup>25</sup> além de estimular a produção de fatores neurotróficos.<sup>22</sup> Na fase subaguda, estimula a angiogênese<sup>26</sup> e suprime a formação de cicatriz glial.<sup>27</sup> Em dois estudos fase I/IIa no tratamento do traumatismo raquimedular em humanos, houve alguma recuperação neurológica na maioria dos doentes.<sup>28,29</sup>

Buscou-se compreender, em estudos experimentais, se há efeito sinérgico entre fármacos sobre o traumatismo raquimedular.<sup>30-32</sup> ou mesmo sinergia entre fatores farmacológicos e físicos,<sup>33,34</sup> pois é provável que, em doenças com mecanismos fisiopatológicos complexos, a melhora seja mais expressiva com o uso de fármacos que atuam em diferentes etapas da sua patogênese. Até o momento, não há trabalhos em que se avaliou o tratamento da lesão da medula espinal com a associação entre a metilprednisolona e o G-CSF.



### **1.1. Objetivo**

Avaliar o efeito funcional, neurofisiológico e anatomopatológico do tratamento com G-CSF associado à metilprednisolona em um modelo experimental padronizado de lesão de medula espinal em ratos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Modelos experimentais

Allen,<sup>6</sup> em 1911, é o primeiro a descrever um modelo experimental reprodutível de lesão medular em cães. Realiza laminectomia para exposição da medula espinal e posiciona sobre ela um dispositivo tubular, por onde um peso padronizado é liberado em queda livre, de modo a possibilitar mensurar a energia do traumatismo, calculando-se o produto do peso, em gramas, pela altura da queda, em centímetros (g.cm). Em 1914, Allen<sup>35</sup> demonstra que o impacto de 240 g.cm produz uma lesão com maior possibilidade de recuperação do que aquela provocada por uma queda de 400 g.cm. Observa que, durante os primeiros 15 minutos após o traumatismo, há a presença de edema e hemorragia nas substâncias cinzenta e branca da medula espinal e, após quatro horas, edema nos axônios nas colunas lateral e posterior da substância branca. Observa também que há melhora na recuperação funcional dos animais quando reduz a pressão intramedular após realizar a mielotomia. Postula que o aumento da pressão intramedular é causado pelo edema e hemorragia que agrava a necrose isquêmica após a lesão traumática inicial.

Ducker et al.<sup>36</sup> realiza um estudo prospectivo, com amostra de macacos-rhesus submetidos ao traumatismo da medula espinal com contusão por queda de peso, com energia entre 200 g.cm a 500 g.cm. Os animais são sacrificados em seis horas ou cinco dias para avaliação histológica. Os autores demonstram que a gravidade das alterações histológicas é determinada pela energia do traumatismo e que a substância cinzenta é mais vulnerável. Demonstram também que há relação direta entre os achados histológicos e clínicos, mas que, quando o traumatismo é leve e há recuperação funcional, as alterações são mais centrais; quando o traumatismo é moderado e há déficit significativo, ocorre o envolvimento da substância branca adjacente; e quando grave, causando paraplegia completa, as alterações envolvem toda a medula espinal.

Fairholm e Turnbull<sup>37</sup> avaliam a microcirculação medular 7 a 14 dias após o traumatismo em 34 coelhos e 5 cães, tratados após contusão medular experimental causada por queda de peso. Definem duas zonas de lesão na medula espinal: na zona 1, localizada na porção póstero-central da medula espinal, os capilares perdem progressivamente a capacidade de condução do sangue e, na zona 2, localizada ao redor da zona 1, o padrão microvascular permanece normal. Os autores concluem que a recuperação dos neurônios e dos axônios danificados dependem da preservação da microcirculação.

Wagner Jr. et al.<sup>38</sup> avaliam prospectivamente as características histológicas em 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas após a lesão medular de 27 macacos-rhesus adultos submetidos a traumatismo por impacto com força de contusão de 300 g\*cm. Alguns macacos foram mantidos vivos durante seis meses. Os autores observam que há recuperação funcional progressiva em 12 horas. Nos animais mantidos vivos, observam que, nos primeiros cinco minutos, a aparência da medula espinal não é muito alterada, os vasos permanecem intactos mas distendidos e com menos fibras musculares ao redor do canal central; em 15 minutos, há rupturas isoladas dos vasos mais finos e extravasamento de eritrócitos para os espaços perivasculares da substância cinzenta central e, em 30 minutos, há presença de eritrócitos e o fluido seroso em coleções discretas alocadas nos espaços perivasculares no interior e ao redor do parênquima. Essas alterações concentram-se principalmente na região do canal central e do corno dorsal da medula espinal. No período entre uma e quatro horas, as hemorragias perivasculares, inicialmente discretas, começam a coalescer e as alterações não mais se confinam ao canal central e ao corno dorsal, mas tornam-se evidentes na substância branca. É observado edema menos marcante nas camadas mais internas da substância branca, contrastando com as anormalidades hemorrágicas presentes na substância cinzenta, o que justifica, pelo menos em parte, a natureza transitória da paraplegia.

Dohrmann et al.<sup>39</sup> constroem um aparelho baseado no modelo de queda de peso com haste contida no interior de um tubo de plástico transparente, capaz de produzir lesão controlada da medula espinal de vários animais, o que possibilita monitorizar a graduação do traumatismo em relação à velocidade da deformação da medula espinal, ao impulso e à energia com maior acurácia para correlacionar a

quantidade de lesão, o grau de disfunção neurológica e a eficácia dos vários métodos de tratamento.

Balentine<sup>40</sup> avalia sequencialmente as alterações anatomopatológicas dos vasos sanguíneos e da necrose tecidual da medula espinal de ratos adultos submetidos à lesão experimental causada de acordo com o modelo de queda de peso. As avaliações são feitas 3 a 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas e 1 semana após o traumatismo. O autor confirma a existência de evolução sequencial do desenvolvimento da necrose, que se instala inicialmente na substância cinzenta e a seguir na substância branca da medula espinal, e demonstra que a necrose deve-se à ruptura dos vasos sanguíneos arteriais e veias principais lesadas imediatamente após o traumatismo.

Ducker et al.<sup>41</sup> mensuram as concentrações de oxigênio teciduais e o fluxo sanguíneo da medula espinal de cães paraplégicos em decorrência de traumatismo medular. Nos casos de lesão medular, observam que há grande redução do fluxo sanguíneo. Sugerem que o tratamento dessa condição deve ter como objetivo primordial a melhora da oxigenação tecidual e o aumento do fluxo sanguíneo da medula espinal.

Rivlin e Tator<sup>42</sup> avaliam prospectivamente o fluxo sanguíneo regional em 12 ratos Wistar, cinco minutos, duas e 24 horas após a lesão da medula espinal e concluem que as lesões causadas pela compressão grave causam isquemia pós-traumática medular, durante, pelo menos, 24 horas.

Em 1979, Tator e Rowed<sup>43</sup> avaliam o exame histológico da medula espinal traumatizada em momentos distintos e observam que se instalam pontos hemorrágicos na substância cinzenta e edema na substância branca e que, semanas após, ocorre a substituição do tecido necrótico por cavidades. Evidenciam também dois tipos de lesão vascular decorrente do traumatismo medular: o primeiro se manifesta imediatamente e acomete os vasos medulares finos, especialmente as vênulas da substância cinzenta, do que resulta hemorragia poucos minutos após o traumatismo, e o segundo cursa com isquemia grave e infarto das substâncias branca e cinzenta. Concluem que o tratamento deveria ser direcionado para a fase aguda a fim de impedir o infarto secundário e melhorar a recuperação. Sugerem o uso dos corticosteroides para bloquear a cascata secundária da lesão que ocorre após o traumatismo agudo.

Lohse et al.<sup>44</sup> observam que ocorre aumento da pressão arterial e arritmia cardíaca ao submeterem 24 gatos à lesão da quinta vértebra da coluna torácica causada por forças de 100 g.cm ou 260 g.cm. Demonstram que, nos gatos que sofrem traumatismo com 100 g.cm, não há diferença significativa quanto ao fluxo sanguíneo, enquanto, nos que sofrem traumatismo com 260 g.cm, há aumento do fluxo sanguíneo nas seis horas subsequentes. Concluem que não há isquemia da substância branca nos animais e que a paraplegia resultante deve ser transitória. Esses achados suportam o conceito de que a isquemia da substância branca observada na fase aguda do traumatismo medular grave deve relacionar-se à lesão secundária e, subsequentemente, à paraplegia permanente.

Gale et al.<sup>45</sup> descreve um método de análise comportamental de ratos submetidos a lesão por contusão da medula espinal, baseada no protocolo para avaliação do déficit funcional e realizada por pesquisadores treinados. O protocolo combina vários testes em que o componente principal foi a escala motora, que consiste de exame passivo das patas traseiras e de versão modificada da escala descrita por Tarlov.<sup>46</sup> Os animais são avaliados em campo aberto, sendo cada membro traseiro observado individualmente e graduado de acordo com os seguintes valores: 0 - nenhum movimento das patas traseiras e nem capacidade de suportar peso; 1 - movimento fracamente perceptível dos membros traseiros, mas sem capacidade de suportar peso; 2 - movimentos frequentes e/ou vigorosos nos membros traseiros, mas sem capacidade de suportar peso; 3 - capacidade de suportar o peso nos membros traseiros e possibilidade de executar um ou dois passos; 4 - capacidade de caminhar com déficit motor leve; 5 - caminhar normal.

Noble e Wrathall<sup>47</sup> avaliam as alterações morfométricas da medula espinal em 51 ratos Sprague-Dawley submetidos à lesão medular experimental causada com o método de queda de peso de 10 gramas, da altura de 2,5; 5,0; 7,5; 10; 17,5 cm. O volume, a extensão e as dimensões do tecido no epicentro da lesão (áreas da lesão, da substância branca e área da substância cinzenta) são mensurados quatro semanas após a lesão e as medidas, correlacionadas com a altura da queda do peso e com os resultados da avaliação dos déficits comportamentais, motores e sensitivos. Os pesquisadores concluem que o método da queda do peso pode ser utilizado em ratos para produzir lesões leves, moderadas ou graves e é apropriado para estudos para investigar a contusão da medula espinal.

Noble e Wrathall<sup>48</sup> constroem um aparelho dotado de pinças para fixar os processos espinhosos adjacentes, visando provocar lesão experimental contusão na medula espinal de ratos. Essas modificações possibilitam reduzir as variáveis que geram lesões assimétricas, ou seja, possibilitam que a energia do impacto seja melhor direcionada para a medula espinal e reduzem o efeito amortecedor da caixa torácica, da coluna vertebral e dos movimentos respiratórios. Esse se tornou assim um dos modelos mais utilizados atualmente.

Behrmann et al.<sup>49</sup> elaboram um aparelho para produzir contusão medular em ratos e avaliam os resultados observados em animais que sofrem contusão anatômica da medula espinal comparados com outras lesões medulares quanto aos achados histológicos e recuperação locomotora, de acordo com a escala de Tarlov et al.<sup>46</sup> Os autores concluem que há maior potencial de recuperação funcional nos animais que sofrem contusão medular.

Basso et al.<sup>50</sup> fazem uma modificação da escala locomotora desenvolvida por Tarlov et al.<sup>46</sup> e criam a escala funcional que ficou conhecida como de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Avaliam o comportamento de ratos que sofrem lesão contusa da medula espinal e concluem que a escala é válida e é uma medida preditiva da recuperação motora. A escala possibilita distinguir os resultados comportamentais decorrentes de várias lesões e prever as alterações anatômicas induzidas no centro da lesão. Testes de confiabilidade indicam que examinadores experientes na sua aplicação conseguem aplicá-la consistentemente e obtêm resultados similares. A escala oferece aos avaliadores uma medida mais discriminatória dos resultados comportamentais para avaliar os resultados dos tratamentos depois da lesão da medula espinal em ratos.

Basso et al.<sup>51</sup> padronizam o aparelho New York University Impactor (NYU Impactor), desenvolvido em 1992 por John Gruner<sup>52</sup> para realizar contusão medular em ratos e utilizam a escala funcional BBB para avaliar a recuperação da função locomotora. Observam que há aumento da movimentação dos membros traseiros duas semanas após a lesão compressiva ou transecção medular e que o equipamento causa contusão medular graduada, consistente e reprodutível em todos os ratos. Concluem que o exame dos efeitos terapêuticos para índices lentos e rápidos de recuperação é mais evidente nos animais que sofrem lesão com pesos lançados a 12,5 e 25 mm de altura de 10 g sobre a medula espinal. A maior

quantidade de tecido poupado é relacionada à melhor recuperação da função locomotora. Seu estudo também permite concluir que a escala BBB é aplicável para a utilização do sistema NYU para analisar a recuperação da função locomotora de ratos com contusão medular.

Rodrigues<sup>53</sup> padroniza o modelo de lesão contusa de medula espinhal em ratos Wistar provocada por equipamento computadorizado por impacto por queda de peso de acordo com parâmetros determinados pelo Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS) e verifica a existência de correlação entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Conclui que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos.

Vialle et al.<sup>54</sup> realizam lesão medular em ratos Long-Evans, utilizando o modelo de queda de peso com NYU-Impactor, e fazem avaliação histológica com a coloração com hematoxilina-eosina da lesão da medula espinhal dos animais sacrificados a cada 6 horas até 48 horas da lesão. Observam que ocorre redução volumétrica dos neurônios nos ratos sacrificados em 6 horas, redução no número de neurônios e indícios de vacuolização nos animais sacrificados em 24 horas pós-lesão e intensa degeneração neuronal e vacuolização em 48 horas.

Em 2000, Metz et al.<sup>55</sup> estudam ratos submetidos a traumatismo contuso da medula espinhal por queda de peso e comparam com dados de 85 doentes com traumatismo raquimedular crônico. Encontram similaridade nas características eletrofisiológicas, com redução da latência e amplitude nos potenciais evocados motor e somato-sensitivo, e ambos têm correlação com a incapacidade motora em ratos e humanos. Em ratos, a análise histológica e as imagens de ressonância magnética demonstram uma relação próxima entre a quantidade de substância branca preservada e capacidade de locomoção. Os autores concluem que as técnicas para avaliação da extensão e gravidade da lesão medular em humanos e ratos têm valor comparável e que o rato pode servir como modelo animal para pesquisa funcional e morfológica para desenvolver novas estratégias de tratamento.

Em 2011, Agrawal et al.<sup>56</sup> pesquisam a relação entre o resultado funcional da escala BBB com o estudo por potencial evocado somato-sensitivo (PESS), em ratos submetidos a traumatismo da medula espinhal pelo NYU Impactor, com queda de peso 10 g a 6,25 mm (lesão leve), 12,5 mm (moderada), 25 mm e 50 mm de altura (grave), avaliados semanalmente por sete semanas. O grau de atenuação das

amplitudes do PESS imediatamente após o traumatismo tem correlação direta com a gravidade da lesão. A progressão de recuperação funcional do PESS tem diferença significativa entre os grupos ao longo do tempo. O grupo de traumatismo com alta energia (25 e 50 mm) demonstra quase nenhuma recuperação. O grupo com energia menor (6,25 e 12,5 mm) tem melhora significativa entre uma e três semanas, quando se estabiliza, sem demonstrar recuperação neurológica completa. O padrão temporal de evolução da lesão ao longo de 7 semanas é diferente quando avaliada pelo BBB e pela análise do PESS. Os autores concluem que o PESS e o BBB são avaliações diferentes e complementares que são necessárias na análise da lesão medular experimental.

Ferreira et al.<sup>34,57</sup> padronizam o método de monitoração neurofisiológica para obtenção de potenciais evocados motores em 50 ratos através de estímulo elétrico transcraniano. Determinam a amplitude média das respostas de 3,0 mV e de 2,5 mV nos membros dianteiros e membros traseiros, respectivamente.

## **2.2. Estudos de fármacos para tratamento da lesão secundária**

Ducker e Hamit<sup>58</sup> avaliam o efeito da hipotermia local, da dexametasona por via intramuscular por sete dias e do uso de dose única de metilprednisolona por via intratecal comparada a um grupo controle na lesão medular experimental em cachorros. Utilizam a escala de função motora de Tarlov et al.<sup>46</sup> para avaliar seus resultados. Descrevem melhora neurológica estatisticamente significante nos grupos que recebem dexametasona intramuscular e hipotermia local.

Hansebout et al.<sup>59</sup> realizam lesão experimental da medula espinal causada pela compressão com balão em fêmeas adultas de cães divididas em cinco grupos de acordo com o tratamento realizado: laminectomia; laminectomia e aplicação de calor a 37°C; laminectomia e lesão; laminectomia, lesão e uso de corticosteroide; e laminectomia, lesão e resfriamento a 6°C durante quatro horas. Observam que os animais tratados com corticosteroide ou com resfriamento apresentam recuperação motora significativamente superior aos animais dos demais grupos.



De La Torre et al.<sup>60</sup> avaliam 32 cães submetidos a lesão experimental causada por queda de peso e tratados com manitol, dexametasona ou dimetil-sulfóxido ou solução fisiológica. Concluem que ocorre melhora parcial ou completa da função com o uso de dimetil-sulfóxido ou dexametasona.

Kuchner e Hansebout<sup>33</sup> tratam cães que sofreram lesão experimental da medula espinal por compressão com balão com dexametasona, hipotermia sem irrigação, ou associação de dexametasona e hipotermia sem irrigação. Concluem que o tratamento com a associação de hipotermia e dexametasona proporciona melhor recuperação motora.

Yeo et al.<sup>61</sup> avaliam as alterações anatomopatológicas associadas à necrose pós-traumática central da medula espinal de ovelhas submetidas à lesão experimental de acordo com o modelo de queda de peso, divididas em quatro grupos: as do grupo controle, as tratadas com metilprednisolona por via intratecal, alfa-metil-paratiroxina ou oxigênio hiperbárico. Concluem que, nos animais do grupo sem tratamento, há necrose intensa da substância cinzenta central, onde se instalam microcistos e desmielinização ao redor da lesão, vários graus de fibrose, gliose e extensa degeneração cística. Apesar do intenso grau de degeneração na substância branca, nos animais tratados com metilprednisolona por via intratecal, ocorre recuperação motora significativa, pois todos os animais desse grupo recuperam, pelo menos, os movimentos antigravitacionais. Entretanto, nenhum animal do grupo controle ou dos grupos tratados apresenta recuperação motora completa. O grau de degeneração cística central e de desmielinização é idêntico ao observado no grupo não tratado e, nos animais tratados com alfa-metil-paratiroxina, ocorre recuperação motora significativa e menor degeneração cística central e instalação de microcistos na substância branca. Nos animais tratados com oxigenoterapia hiperbárica, ocorre melhora significativa da recuperação motora durante o período de oito semanas após a lesão e menor degeneração cística central e de formação de microcistos nas colunas anterior e lateral.

Means et al.<sup>62</sup> observam que a metilprednisolona, em gatos submetidos a lesão medular aguda, é benéfica quanto à recuperação motora. Os autores avaliam os parâmetros morfométricos da medula lesada e a porcentagem da área cavitária e da área ocupada pela cavidade da medula e os comparam com a avaliação da

recuperação neurológica dos animais. Concluem que há correlação negativa entre a dimensão da cavidade e o índice de recuperação motora.

de La Torre<sup>63</sup> realiza uma revisão sobre as estratégias das pesquisas básicas e aplicadas em lesão medular. Analisa os modelos experimentais, as técnicas de avaliação do traumatismo medular experimental, os estudos neurofisiológicos e morfológicos, os mecanismos vasculares, o fluxo sanguíneo medular, as mudanças bioquímicas e metabólicas e os tratamentos das lesões medulares agudas e crônicas. Destaca que há três possíveis teorias para a regeneração axonal no sistema nervoso central: o brotamento colateral das fibras nervosas, a neuroplasticidade e a regeneração axonal. Vislumbra a possibilidade da regeneração com o transplante de tecido neural, com o uso de fatores de crescimento ou células fetais.

Anderson et al.<sup>64</sup> avaliam prospectivamente a microvascularização no local lesão da medula espinal de gatos que são tratados com metilprednisolona com doses altas (15 mg/kg/24 h), muito altas (60 mg/kg/24 h) ou não tratados. Observam que aqueles tratados com altas doses de metilprednisolona apresentam preservação significativa da perfusão microvascular em relação aos não tratados.

Young e Flamm<sup>65</sup> realizam estudo prospectivo envolvendo 15 gatos adultos submetidos à lesão medular traumática de acordo com o modelo de contusão de impacto causado por queda de peso de 400 g.cm. Os animais são divididos em três grupos: os sem tratamento, os tratados com 15 mg/kg de metilprednisolona 45 minutos após a lesão e os tratados com 30 mg/kg de metilprednisolona. Concluem que, nos animais tratados com doses elevadas de metilprednisolona (30 mg/kg), ocorre melhora do fluxo sanguíneo, mensurado com a técnica de depuração de hidrogênio na primeira hora após a lesão, e melhora da concentração do cálcio extracelular e dos potenciais somato-sensitivos evocados, com a estimulação do nervo ciático e registrados bipolarmente com eletrodos aplicados no espaço epidural sobre o córtex somato-sensitivo. De acordo com os autores, o tratamento com doses elevadas do corticosteroide proporciona vasodilatação na medula espinal, e o aumento do fluxo sanguíneo medular justifica os efeitos benéficos do tratamento na recuperação funcional.

Braughler e Hall<sup>66</sup> realizam laminectomia de L2 a L5 em 87 gatos e neles aplicam carga compressiva de 400 g.cm para produzir lesão medular. Depois, tratam

os animais com dose única variando de 7,5 a 60 mg/kg de metilprednisolona, em bolo 30 minutos após a lesão. Os autores verificam que a lesão causa elevação rápida duas vezes maior de lactato cinco minutos após o traumatismo e três vezes maior duas horas após. A concentração de lactato declina quatro e oito horas após a lesão. Ocorre também redução da concentração de piruvato na primeira hora após a lesão, seguida de aumento entre duas e oito horas após. Concluem que a metilprednisolona pode melhorar o fluxo sanguíneo nas lesões medulares.

Hall et al.<sup>67</sup> avaliam o fluxo sanguíneo medular em 25 gatos adultos submetidos à contusão medular padronizada ao nível de L3. Os animais são divididos em quatro grupos, o primeiro é o grupo controle, o segundo recebe 15 mg/kg de metilprednisolona, o terceiro, 30 mg/kg e o quarto, 60 mg/kg de metilprednisolona. Após a lesão, realizam estudo do fluxo sanguíneo em todos os animais em 10 minutos, 30 minutos, uma, duas, três e quatro horas após a lesão. Os autores demonstram que os gatos tratados com 30 mg/kg de metilprednisolona mantêm o fluxo sanguíneo normal; os tratados com 15 mg/kg usufruem de benefícios menores; os tratados com 60 mg/kg não usufruem de qualquer benefício. Os autores concluem que a metilprednisolona diminui a isquemia medular pós-traumática, quando administrada na dose de 30 mg/kg, dentro das primeiras horas após o traumatismo, mas não reverte a isquemia quando já instalada.

Anderson et al.<sup>68</sup> descrevem vários eventos fisiopatológicos que ocorrem no tecido medular lesado após o traumatismo raquimedular agudo e que acarretam destruição tecidual e paraplegia. Como eventos decorrentes e secundários ao traumatismo medular agudo, citam a necrose hemorrágica, a isquemia, o edema, a inflamação e a perda do cálcio do espaço extracelular e de potássio do espaço intracelular. Enfatizam a importância da peroxidação lipídica, que pode lesar direta ou indiretamente as células, e que a metilprednisolona, em concordância com outros estudos experimentais de lesão medular em animais, revela-se efetiva na prevenção da cascata de eventos secundários que resultam na lesão medular, ao atenuar a ação dos radicais livres de oxigênio na peroxidação.

O estudo NASCIS I<sup>69</sup> é o primeiro grande ensaio clínico com amostra aleatória sobre o uso da metilprednisolona em doentes que sofreram traumatismo da medula espinal, tratados com bolo de 100 mg de metilprednisolona de dose de ataque seguida da administração de 100 mg ao dia durante 10 dias ou de 1.000 mg dose de

ataque, seguida de 1.000 mg ao dia durante 10 dias. Conclui-se que não há melhora neurológica entre os doentes nas avaliações realizadas em seis semanas, seis meses<sup>69</sup> ou um ano<sup>70</sup> após o traumatismo.

No estudo NASCIS II, são avaliados os efeitos de doses maiores de metilprednisolona, ou seja, bolo de 30 mg/kg seguido de 5,4 mg/kg/h em 23 horas, e os resultados são comparados com o tratamento com naloxona e placebo instituídos até 12 horas após o traumatismo.<sup>10</sup> Conclui-se que os doentes tratados com metilprednisolona até oito horas após a lesão usufruem de melhora motora e sensitiva significativa em relação aos tratados com naloxona, placebo ou metilprednisolona após oito horas. Entretanto, há aumento da infecção pós-operatória e do sangramento gastrointestinal nos doentes tratados com metilprednisolona.

Bracken et al.<sup>11</sup> avaliam, prospectivamente, doentes com lesão medular aguda atendidos de acordo com estudo multicêntrico duplamente cego com amostras aleatórias e observaram que aqueles tratados com 30 mg/kg em bolo de metilprednisolona oito horas após a lesão, na primeira hora, e 5,4 mg/kg/h durante as próximas 23 horas apresentam melhora da função neurológica durante as primeiras seis semanas e no sexto mês; nos doentes tratados com naloxona, não há recuperação significativa; nos doentes tratados após oito horas, com metilprednisolona ou naloxona, há recuperação da função motora menor quando comparados ao grupo placebo. Concluem que o tratamento com doses altas de metilprednisolona está indicado para o traumatismo agudo da medula espinal em até oito horas da lesão.

De acordo com Hall,<sup>71</sup> o tratamento intensivo com doses altas de metilprednisolona nas primeiras oito horas após o traumatismo medular melhora a recuperação funcional de doentes e de animais de experimentação. Atribui a melhora à ação neuroprotetora da metilprednisolona, que inibe os radicais livres de oxigênio induzidos pela peroxidação lipídica, e sugere que devam ser desenvolvidas novas drogas ou associação de drogas com a finalidade de diminuir os efeitos adversos das doses elevadas dos corticosteroides.

Bracken e Holford<sup>72</sup> analisam os resultados dos estudos controlados do NASCIS I e II. Concluem que a metilprednisolona, desde que aplicada precocemente após a lesão medular completa ou incompleta, proporciona melhora da função

motora de doentes, e que o tratamento tardio associa-se à diminuição da recuperação neurológica.

Constantini e Young<sup>30</sup> observam que administração de dose única de metilprednisolona, 30 mg/kg, cinco minutos após a lesão do segmento TX da medula espinal de ratos causada com a queda de peso de 10 g a alturas de 12,5 mm, 25 mm e 50 mm, reduz significativamente o volume da lesão e impede a hiponatremia induzida, enquanto a administração isolada de 10 a 30 mg/kg de monogangliosídeo, G(M1), exerce pouco ou nenhum efeito. A associação de metilprednisolona com G(M1) bloqueia os efeitos da metilprednisolona. Os autores concluem que o G(M1) antagoniza os efeitos centrais e periféricos da metilprednisolona em ratos com lesão medular.

Chen et al.<sup>73</sup> observam melhora da regeneração axonal em enxertos de células de Schwann quando a metilprednisolona é administrada no momento da transecção medular e implantação de células de Schwann.

No estudo NASCIS III, Bracken et al.<sup>74</sup> pesquisam a eficácia da metilprednisolona administrada por 24 e 48 horas ou de metilprednisolona em bolo associada ao mesilato de tirilazade, administrado por 48 horas. Foi uma pesquisa clínica aleatorizada, duplamente cega e multicêntrica, em 499 doentes com lesão medular aguda diagnosticada dentro das primeiras oito horas. Concluem que doentes com lesão medular aguda que recebem metilprednisolona nas primeiras três horas devem manter o tratamento por 24 horas, enquanto, para aqueles que iniciam o tratamento entre três e oito horas após a lesão, a metilprednisolona deve ser mantida por 48 horas. Os doentes que são tratados com mesilato de tirilazade tem taxas de recuperação motora equivalentes às taxas daqueles que recebem metilprednisolona por 24 horas.

Gebrin et al.<sup>75</sup> publicam um artigo de revisão da literatura sobre as perspectivas de recuperação do doente com lesão da medula espinal. Apontam a metilprednisolona como o fármaco que melhora função neurológica; citam o G(M1) como tendo eficácia na recuperação de doentes com lesões crônicas do sistema nervoso central. Concluem que trabalhos experimentais demonstram que axônios íntegros, apesar de poucos, podem propiciar integridade de arco reflexos viscerais, como vesical, sexual e intestinal, e que 10% de axônios remanescentes podem oferecer condições de marcha.

Em 1998, Bracken et al.<sup>12</sup> publicam os resultados de recuperação funcional e neurológica e as taxas de morbidade e mortalidade com um ano de acompanhamento dos doentes tratados no NASCIS III.<sup>74</sup> Observam que ocorre recuperação neurológica similar nos três grupos quando recebem tratamento dentro das primeiras três horas após a lesão. Nos doentes tratados após três horas da lesão, o grupo que recebe metilprednisolona por 24 horas apresenta recuperação da função motora menor do que os que recebem metilprednisolona por 48 horas. As taxas de mortalidade e morbidade são iguais nos três grupos. Os autores concluem que, para os doentes que recebem tratamento dentro das primeiras três horas, a manutenção do tratamento por 24 horas é apropriada. Nos pacientes que iniciam o uso da metilprednisolona entre três e oito horas após a lesão, o tratamento deve ser mantido por 48 horas.

Delamarter e Coyle<sup>76</sup> recomendam como conduta o uso da metilprednisolona conforme o protocolo descrito no NASCIS III,<sup>74</sup> além da redução e estabilização rápida das lesões que provocaram a compressão medular como fatores críticos para melhores resultados neurológicos e funcionais no longo prazo.

Jeffery e Blakemore<sup>77</sup> afirmam que, até o momento, apenas a cirurgia descompressiva e o uso de metilprednisolona têm se mostrado eficazes no tratamento do traumatismo medular agudo.

Yoon et al.<sup>78</sup> pesquisam o tempo ideal para administração da metilprednisolona. Administram uma ou duas doses de metilprednisolona na dose de 30 mg/kg em 10, 30, 120, 150 e 240 minutos após lesão pelo NYU e avaliam o volume de lesão da medula espinal. Observam que a administração de dose única de 30 mg/kg de metilprednisolona, 10 minutos após o traumatismo, reduz significativamente o volume da lesão, mas não com tratamento com início após 30 minutos. Concluem que deve haver uma janela terapêutica muito curta nesse modelo experimental.

Bracken,<sup>79</sup> de acordo com a revisão sistemática sobre os fármacos destinados a tratar a lesão medular aguda, a metilprednisolona em doses elevadas é a única terapia farmacológica que demonstra eficácia. Contudo, de acordo com revisão sistemática sobre os trabalhos do uso da metilprednisolona em humanos e animais realizada por Short et al.,<sup>80</sup> o uso terapêutico da metilprednisolona não é recomendado.

Em 2001, Bracken<sup>81</sup> realiza uma revisão sistemática da literatura e conclui que a metilprednisolona, utilizada em até oito horas após a lesão medular aguda, é uma terapia segura e eficaz que pode proporcionar recuperação funcional importante em alguns doentes, mas que novos estudos com o uso de outros fármacos ou associação de fármacos deveriam ser realizados.

Matsumoto et al.<sup>13</sup> avaliam o potencial de complicações do uso da metilprednisolona como preconizado pelo protocolo NASCIS II<sup>10</sup> quando comparado ao placebo em um ensaio clínico prospectivo, com amostra aleatória e duplamente cego. A taxa de complicações é maior no grupo metilprednisolona (56,5% *versus* 34,8%). As principais complicações são respiratórias e gastrointestinais e expressam-se mais na população idosa.

Hall<sup>82</sup> demonstra que a maioria das lesões medulares não é completa, pois parte da substância branca permanece íntegra. Salieta que a recuperação neurológica depende da preservação das estruturas que permanecem íntegras após o traumatismo, principalmente os axônios descendentes e ascendentes presentes na substância branca, e da qualidade na mielinização. O autor analisa as estratégias farmacológicas focalizadas no controle do processo das lesões secundárias, primariamente a peroxidação lipídica e a manutenção do máximo da substância branca remanescente possível. Conclui que a metilprednisolona é o único fármaco que, em doses elevadas, melhora a função neurológica de animais.

Hurlbert<sup>14</sup> realiza uma revisão da literatura para avaliar o tratamento da lesão medular aguda com metilprednisolona. Conclui que a metilprednisolona não deve ser recomendada rotineiramente em casos de lesão medular aguda, que seu uso prolongado pode provocar riscos para o doente e que deve ser mantida como fármaco sob investigação.

Taoka e Okajima<sup>83</sup> salientam a importância dos eventos secundários ao traumatismo medular, como os fenômenos vasculares progressivos e dano endotelial. Enfatizam que poucos agentes farmacológicos atuam no sistema nervoso central lesado. Destacam a ação da metilprednisolona e do G(M1), que consideram como únicos disponíveis para o uso clínico.

Barros Filho et al.<sup>84</sup> avaliam 15 ratos adultos submetidos a lesão hemi-medular, em que foram transplantadas células do sistema nervoso fetal para o local da lesão, comparados a cinco animais como controle sem transplante. O exame histológico

realizado após 48 horas demonstra que, em 60% dos ratos, as células fetais transplantadas permanecem viáveis, e os autores observam que a reação inflamatória é maior no grupo controle.

Merola et al.<sup>85</sup> demonstram histologicamente que a metilprednisolona reduz o desenvolvimento do edema grave e preserva a arquitetura da medula espinal adjacente ao local da lesão, mas não altera o desenvolvimento da necrose ou reação astrocítica local.

Nishio et al.<sup>19</sup> demonstram que há receptores para o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) na medula espinal de animais. Em um estudo *in vitro*, demonstram que a administração de G-CSF confere neuroproteção contra a morte neuronal induzida pelo glutamato, de modo dependente de dose; o efeito é perdido após bloqueio do receptor de G-CSF por anticorpo antirreceptor de G-CSF ou pelo inibidor de JAK2/STAT, AG490 e PI3K. Demonstram também que a expressão de pSTAT3 aumenta, assim como de Bcl-2, um alvo antiapoptótico de STAT3. Em camundongos submetidos a lesão medular contusa, o G-CSF reduz o número de neurônios que sofrem apoptose na fase aguda e aumenta o número de neurônios sobreviventes na fase crônica, além de promover melhora funcional.

Cristante et al.<sup>31</sup> demonstram benefício do tratamento com a combinação das vitaminas C e E de ratos Wistar submetidos a traumatismo raquimedular com o NYU Impactor quanto à melhora histológica, mas não à funcional, pela escala BBB. Teorizam que o efeito benéfico na avaliação histológica deve estar relacionado ao efeito antioxidante, que reduz a magnitude da resposta inflamatória.

Cristante et al.<sup>86</sup> avaliam o efeito da infusão de células-tronco indiferenciadas autógenas no local de lesão através de arteriografia em doentes com lesão medular crônica, com mais de dois anos de evolução. Observam que 66,7% dos doentes apresentaram melhora do potencial evocado somato-sensitivo em dois anos e meio de seguimento. Não houve grupo controle.

Sanli et al.<sup>25</sup> avaliam, em ratos submetidos a traumatismo raquimedular agudo e tratados com metilprednisolona ou G-CSF, a atividade da mieloperoxidase, da peroxidação lipídica e os achados ultraestruturais ocorridos no período de 24 horas. A metilprednisolona tem melhor eficácia do que o G-CSF na redução da peroxidação lipídica e na redução das alterações ultraestruturais. Dose única de 50 mcg/kg de G-



CSF tem benefício na redução da atividade da mieloperoxidase e concentração do malondialdeído.

Marcon et al.<sup>87</sup> provocam lesão medular em ratos Wistar com o modelo de queda de peso com NYU-Impactor e utilizam a escala de avaliação funcional BBB para avaliar o potencial de efeito benéfico da metilprednisolona utilizada antes da ocorrência da lesão da medula espinal, como forma de reduzir o dano medular durante intervenções cirúrgicas. Não observam efeito benéfico da utilização do fármaco e relatam complicações associadas ao seu uso.

Dittgen et al.<sup>88</sup> estudam o efeito do G-CSF na lesão medular por impacto num modelo experimental com uma dose de ataque de 60 mcg endovenosa, seguida de 30 mcg/kg ao dia, por 14 dias, por bomba de infusão. Os autores concluem que houve melhora significativa da função motora de acordo com a escala funcional BBB.

Lee et al.<sup>20</sup> trataram ratos Sprague-Dawley com 100 mcg/kg de G-CSF por dia por cinco dias consecutivos após lesão medular contusa. Avaliam o potencial evocado somato-sensitivo dos nervos ciáticos e nervos medianos bilateralmente, imediatamente após a lesão e nos exames funcionais nos dias 9, 16, 23 e 37. Demonstram que a medula espinal foi mais preservada nos animais tratados do que nos controles, conforme verificado pela avaliação histológica e pelo melhor resultado neurofisiológico. A diferença na avaliação funcional pela escala BBB só é estatisticamente significativa entre o 30º e o 37º dia de tratamento. Ocorre redução da infiltração da micróglia e macrófagos na fase crônica da lesão medular. Os autores concluem que a ativação da microglia e dos macrófagos pode ser responsável pela desmielinização e lançam a hipótese de que o bloqueio da inflamação reduziria parcialmente a lesão da medula espinal e promoveria a melhora da função.

Kodata et al.<sup>21</sup> estudam ratos Sprague-Dawley submetidos a lesão medular por contusão e tratados com G-CSF na dose de 15 mcg/kg/dia por cinco dias e comparados a controles que recebem solução fisiológica. Concluem que o G-CSF promove melhora na função neurológica avaliada pelo BBB, protege os oligodendrócitos de morte celular pela supressão da expressão de citocinas inflamatórias e aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas.

Takahashi et al.<sup>28</sup> realizam um estudo fase I/IIa em 16 doentes com lesão medular aguda com tempo de lesão de até 48 horas, divididos em dois grupos. Um grupo de 5 doentes foi tratado com 5 mcg/kg/dia endovenoso de G-CSF e outro

grupo de 11 doentes foi tratado com 10 mcg/kg/dia endovenoso por cinco dias. Eles são comparados a um controle histórico de doentes tratados com metilprednisolona. Doentes que recebem 10 mcg/kg/dia têm melhora superior no escore motor da American Spinal Injury Association (ASIA) quando comparados ao controle histórico, mas não há diferença estatística.

Cristante et al.<sup>34</sup> demonstram efeito sinérgico do uso da fluoxetina combinada ao treinamento físico no tratamento do traumatismo medular contuso em ratos Wistar, com efeito superior ao uso de cada estratégia de forma isolada.

Guo et al.<sup>22</sup> demonstram que o G-CSF pode recrutar micróglia para o local de uma lesão por hemisseção da medula espinal em ratos nas primeiras 72 horas, e que G-CSF inibe a expressão de fatores pró-inflamatórios e promove a expressão de fatores neurotróficos. Sugerem que o uso do G-CSF é uma estratégia promissora no tratamento da lesão medular.

Chung et al.<sup>27</sup> demonstram que o G-CSF suprime a formação de cicatriz glial após lesão da medula espinal em ratos, possivelmente por restringir a expressão da proteína acídica fibrilar glial e proteoglicanos. Concluem que o efeito do G-CSF é similar ao efeito do fator estimulador de colônia granulócitos-macrofágica, de forma que o G-CSF seria um fármaco útil para o tratamento da lesão medular.

de Mesquita Coutinho<sup>32</sup> et al. tratam ratos Wistar submetidos a traumatismo raquimedular contuso com o NYU Impactor com a combinação de tacrolimus e eritropoietina e concluem que não há benefício histológico, neurofisiológico ou funcional com a associação dos fármacos.

Chen et al.,<sup>24</sup> em um estudo em ratos Wistar com traumatismo medular pelo NYU impactor, comparam o uso do G-CSF na dose intratecal de 10 mcg com a metilprednisolona por 24 horas. Demonstram que o G-CSF reduz a expressão de TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$  mas não a metilprednisolona. Os ratos tratados com G-CFS intratecal sofrem aumento de expressão de neurofilamentos além da cicatriz glial.

Kamiya et al.,<sup>29</sup> numa pesquisa clínica fase I/IIa, comparam o uso de G-CSF, na dose de 10 mcg/kg/dia por cinco dias consecutivos em doentes com até 48 horas de lesão, a controles históricos de doentes tratados com metilprednisolona. Concluem que os doentes que receberam G-CSF têm escore motor pela ASIA maior do que o grupo que recebe metilprednisolona. Recomendam um estudo prospectivo com amostra aleatória e controlado para comparar a eficácia do G-CSF com a metilprednisolona.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Ética

O protocolo de pesquisa para este estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), por meio da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo de pesquisa 180/13, **Anexo I**)

#### 3.2. Modelo experimental de lesão medular

##### 3.2.1. Animais de experimentação

Foram avaliados 40 ratos Wistar machos, com peso variando de 300 a 340 g, com 20 a 21 semanas de vida, oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O número de animais para a formação dos grupos baseou-se em pesquisas prévias em que se adotou modelo experimental semelhante.<sup>31,89</sup>

Todos os ratos foram avaliados quanto às condições gerais e acondicionados em número de até cinco animais de uma mesma ninhada por gaiola (40 x 60 cm). Foram mantidos em ambiente climatizado, sob condições de higiene, alimentação e hidratação adequadas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do IOT-HC-FMUSP.

O condicionamento dos animais foi realizado com o manuseio contínuo pelos pesquisadores e estímulos para movimentação antes da lesão medular, de modo a uniformizar a avaliação da sua capacidade motora após a lesão da medula espinal.

### **3.2.2. Critérios de inclusão e exclusão**

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão:

- Ratos da raça Wistar;
- Machos adultos jovens (20 a 21 semanas de vida inclusive);
- Peso entre 300 a 340 gramas, inclusive;
- Condições gerais (pelagem e estado clínico) e motricidade normais.

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão:

- Óbito após lesão da medula espinal;
- Anomalias da medula espinal observada macroscopicamente na área de lesão;
- Autofagia ou mutilação entre os animais;
- Movimentação normal na primeira avaliação após lesão ou 21 pontos na escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan<sup>50</sup>) de avaliação funcional.

### **3.2.3. Formação dos grupos experimentais**

Todos os ratos foram submetidos a lesão moderada da medula espinal com o sistema computadorizado para impacto medular por queda de peso – NYU Impactor com queda de peso de 10 g da altura de 12,5 mm. Os animais foram separados por sorteio formando quatro grupos contendo dez animais cada:

- Grupo controle – submetido ao traumatismo raquimedular para controle da evolução da lesão, sem tratamento;
- Grupo metilprednisolona – tratado com 30 mg/kg de metilprednisolona intravenosa 10 minutos, 6 horas e 24 horas após a lesão, conforme protocolo descrito por Park et al.;<sup>90</sup>
- Grupo G-CSF – tratado com 15 mcg/kg de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) por via subcutânea no momento da lesão e diariamente por 5 dias, conforme protocolo descrito por Kawabe et al.;<sup>26</sup>
- Grupo G-CSF/metilprednisolona – tratamento combinado com G-CSF no momento da lesão e diariamente por 5 dias associado a metilprednisolona por 24 horas.

#### **3.2.4. Protocolo de anestesia e analgesia**

Os ratos foram anestesiados com 50 mg/kg de pentobarbital por via intraperitoneal. O efeito anestésico geralmente se instala em cinco minutos e dura duas horas, aproximadamente, tempo suficiente para o procedimento de lesão. O nível da anestesia foi determinado pela avaliação do reflexo de retirada à compressão da cauda.

Durante o período do estudo, os animais receberam analgesia por via oral com cloridrato de tramadol na dose de 15 mg/kg dissolvidos na água conforme protocolo por Dittgen et al.<sup>88</sup>

### 3.2.5. Procedimento cirúrgico

Após anestesia, o rato foi submetido a tricotomia, antissepsia e assepsia na região dorsal. Foi realizada uma incisão na linha média para expor os arcos posteriores da coluna vertebral de TVIII a TXII. Os músculos paravertebrais foram descolados dos processos espinhosos e das lâminas de TIX a TXI. O processo espinhoso e a lâmina da vértebra de TX foram removidos com micro saca-bocados para expor o saco dural e permitir o posicionamento da ponta da haste do NYU Impactor (**Figura 1**).



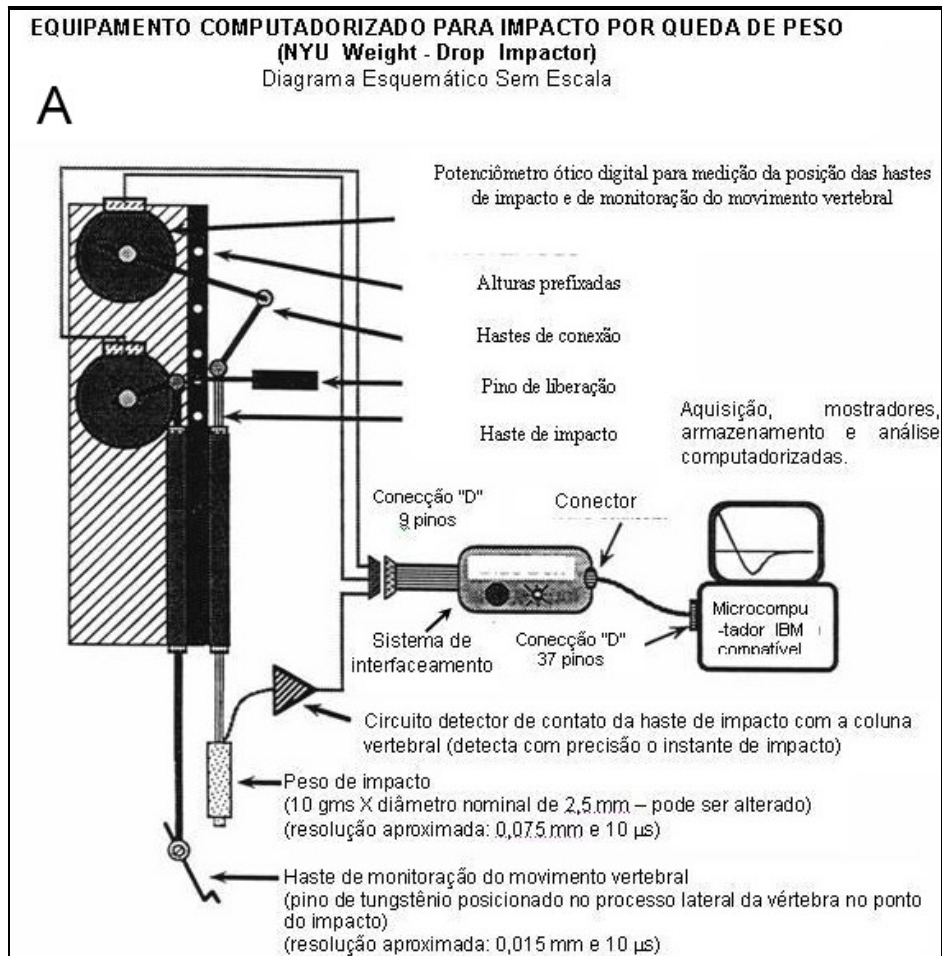
**Figura 1.** Laminectomia com exposição do saco dural.

Respeitaram-se todos os demais cuidados descritos por Rodrigues<sup>53</sup> e Rodrigues et al.<sup>91</sup> e padronizados por Santos et al.<sup>92</sup>

### **3.2.6. Lesão medular (contusão moderada controlada pelo NYU Impactor)**

Foi adotado o modelo experimental de lesão medular do MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study) padronizado para ratos Wistar.<sup>91</sup> A produção de lesões moderadas foi feita através do equipamento computadorizado para impacto por queda de peso NYU Impactor, de modo a causar déficit motor similar ao que ocorre em casos lesão medular contusa traumática em seres humanos.<sup>55</sup> O equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso monitorada NYU Impactor (**Figura 2**) é composto por:

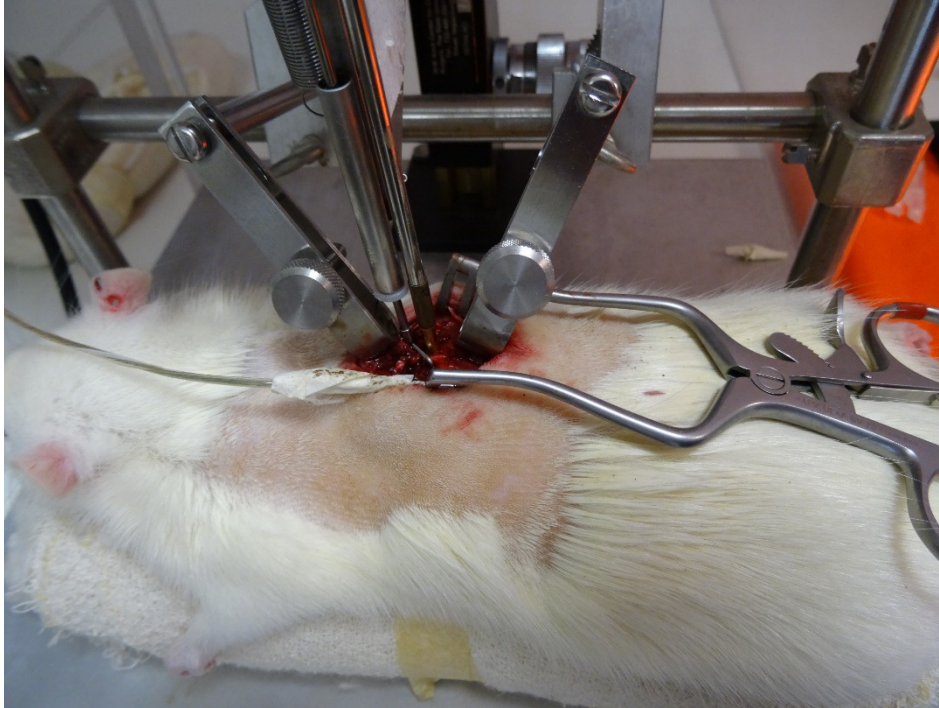
- Dispositivo de impacto (haste de 10 g, tubo guia e sistema de monitoração de posição, velocidade de queda, instante de contato, período de contato, deformação da coluna e deformação absoluta e relativa da medula);
- Microcomputador;
- Monitor de vídeo;
- Placa de interface com saída paralela e temporizador.



**Figura 2** - Diagrama esquemático sem escala do equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso NYU Impactor.

Os ratos foram posicionados no NYU Impactor de maneira a permitir o contato pleno da ponta da haste na superfície exposta da medula (folga de 0,2 mm de cada lado), na região de TX da medula espinal. As duas garras reguláveis foram ajustadas para a fixação da coluna vertebral e presas aos processos espinhosos das vértebras TVIII e TXI. As garras diminuiram a deformação do corpo do rato e, conseqüentemente, o movimento da coluna e dissipação de energia, quando ocorreu a queda do peso (**Figura 3**).





**Figura 3.** Posicionamento do rato no NYU Impactor com garras fixadas aos processos espinhosos de TVIII e TXI e checagem do posicionamento da haste.

O teste de impacto consistiu na queda de uma haste de impacto de 10 g de peso de uma altura predeterminada de 12,5 mm entre a ponta da haste e a superfície da medula espinal em queda livre, através de um tubo guia, monitorado por computador de maneira a reduzir os fatores de imprecisão. O monitoramento por computador permitiu controlar a velocidade da haste, a deformação absoluta e relativa da medula, o instante de contato efetivo e o tempo de contato. Foram adotados os procedimentos, cuidados, regulagens, controles, monitoração, limpeza e esterilização da haste constantes em seu manual e os recomendados por Constantini e Young,<sup>30</sup> Rodrigues<sup>53</sup> e Rodrigues et al.<sup>91</sup>

Após o impacto, inspecionou-se o local da lesão da contusão. Havendo hemorragia, realizou-se a hemostasia com coagulador bipolar. Em seguida, lavou-se o local da contusão com solução fisiológica a temperatura ambiente. Realizou-se a aproximação dos planos da fáscia e da pele com sutura de pontos simples com fio de *nylon* monofilamentado 2,0 e 3,0.

### **3.2.7. Procedimento após lesão**

Os ratos foram transferidos e mantidos por 30 minutos em câmaras com temperatura controlada entre 25°C a 28°C no pós-operatório imediato. A bexiga foi esvaziada por compressão vesical externa.

### **3.2.8. Antibioticoterapia**

Os ratos foram submetidos a antibioticoterapia para profilaxia de infecção na ferida cirúrgica e nas vias urinárias. Foram administrados 25 mg/kg de cefalotina por via subcutânea imediatamente antes da lesão e uma vez ao dia durante os sete dias subsequentes.

### **3.2.9. Manutenção**

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem (40 x 60 cm) e foram mantidos nos mesmos grupos de até cinco animais, nas mesmas condições ambientais (manejo, *ad libitum*, troca periódica da maravalha e limpeza da gaiola) até o 42º dia pós-operatório, quando então, foram submetidos a eutanásia.

Durante o período de avaliação realizado pela escala funcional BBB, os ratos foram observados quanto a mutilações, infecções ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações).

### **3.3. Tratamento medicamentoso**

#### ***3.3.1. Fator estimulador de colônia de granulócitos***

Os ratos incluídos nos grupos G-CSF e G-CSF/Metilprednisolona, receberam uma dose de 15 mcg/kg/dia por 5 dias, por via subcutânea, conforme método descrito por Kawabe e colaboradores.<sup>26</sup>

#### ***3.3.2. Metilprednisolona***

Os ratos incluídos nos grupos metilprednisolona e G-CSF/metilprednisolona receberam 30 mg/kg de metilprednisolona, 10 minutos, 6 horas e 24 horas após traumatismo, como protocolo descrito por Park e colaboradores.<sup>90</sup>

### 3.4. Avaliação dos resultados

#### 3.4.1. Avaliação da capacidade locomotora pela escala BBB de avaliação funcional

A recuperação da capacidade locomotora após a indução da lesão medular foi aferida pela escala BBB de avaliação funcional.<sup>50</sup> A escala BBB baseia-se em critérios observacionais específicos, definições simples e não ambíguas dos termos e possibilita descrição rápida e precisa do desempenho locomotor. É adotada pelas instituições que integram o MASCIS e o LETRAN. A avaliação de cada rato foi realizada por dois observadores adequadamente treinados, neutros, sem conhecimento do grupo de origem do rato, de maneira a não interferir nos resultados. Quando houve diferença na avaliação, considerou-se o menor valor. Todos os ratos foram avaliados no 2º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias de pós-operatório.

A avaliação consistiu em colocar o rato no centro de uma caixa de observação de 80 x 80 cm e borda com 17 cm de altura forrada com um campo cirúrgico azul escuro para maior contraste. Quando o rato, posicionado no centro da caixa, permanecia imóvel por 15 a 20 segundos, realizava-se o toque com a extremidade de um lápis como estimulação ao animal para movimentar-se.

Foi anotada em formulário apropriado a observação do movimento das articulações da pata posterior (quadril, joelho e tornozelo), a posição do tronco, do abdome, o deslocamento da pata (balanço), o modo de contato da pata com o solo, a coordenação, os dedos, o contato e a liberação da pata com o solo, a instabilidade do tronco e a posição relativa da cauda, em relação ao lado direito e esquerdo. O formulário permitiu o registro do rato sem a identificação da alocação, do número de dias pós-operatório e dos comentários (**Anexo II**).

### **3.4.2. Avaliação neurofisiológica por potencial evocado motor**

No 42º dia pós-lesão, os ratos foram submetidos a exame de potencial evocado motor. Os ratos foram anestesiados com 50 mg/kg de pentobarbital por via intraperitoneal. Foi colocado um eletrodo no couro cabeludo dos ratos para provocar um estímulo cortical. Através de eletrodos posicionados nas patas traseiras, mediu-se a amplitude e a latência da chegada desses impulsos, conforme padronizado por Ferreira et al.<sup>57</sup>

A captação das respostas musculares foi realizada com a colocação de pares de eletrodos de agulha monopolar (captador e referência), com distância inter-eletrodos definida e fixa, inseridos nos músculos semitendinosos e bíceps das coxas. O eletrodo terra foi colocado na região lombar através de um eletrodo de agulha monopolar. A estimulação elétrica transcraniana foi realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha tipo saca-rolhas, no couro cabeludo na região frontal (anodo) e occipital (catodo) na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea. Após a inserção dos eletrodos no rato, foi feita a verificação da impedância dos eletrodos e a calibração do aparelho: varredura, janela de 20 ms; sensibilidade, 2 mV/div.; filtro de baixa frequência, 10 Hz e filtro de alta frequência, 10 kHz, e a estimulação elétrica transcraniana através de estímulo único de 0,2 ms de duração. Durante o exame, a amplitude foi registrada em milivolts e a latência em milissegundos.

### **3.4.3. Eutanásia**

Ao final do período de experimentação, todos os ratos foram submetidos a eutanásia conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).<sup>93</sup> Utilizou-se dose letal de pentobarbital (140 mg/kg) por via intraperitoneal.

#### **3.4.4. Exame anatomopatológico**

A coluna foi retirada através de uma via de acesso dorsal extensa. Após a exposição, a coluna foi cortada do segmento de TVIII a TXII. Com uso de um micro saca-bocados, as estruturas ósseas e partes moles adjacentes à medula espinal foram ressecadas de modo a obter-se a exposição completa da medula espinal.

O segmento da medula espinal que foi submetido a análise histológica foi previamente aplicado a um papel cartão com a identificação topográfica. O local onde havia achados macroscópicos mais importantes de contusão da medula espinal foi identificado como área “L”; e as áreas proximal à lesão e caudal à lesão, como área “P” e área “C”. A medula espinal foi a seguir fixada com formaldeído a 10%.

Os cortes histológicos no plano axial da medula espinal foram feitos com intervalos de 2 mm de modo a representar toda a área lesada, numa extensão de 1 cm a partir do centro da lesão. Este material foi processado e desidratado em bateria de álcoois e, a seguir sofreu processo de diafanização em xilol, para posteriormente ser incluído em parafina. Uma vez contido no bloco de parafina, foram feitos cortes histológicos de cinco micras em um micrótomo (Leica RM 2055 – elétrico) e lâminas descartáveis. Estes cortes foram realizados meio centímetro acima e meio centímetro abaixo da área central da lesão. Estes foram fixado em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina-eosina.

A avaliação histológica foi feita por patologista cego quanto à alocação dos animais. A avaliação e graduação dos fragmentos quanto a necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa (degeneração cística) e infiltrado celular, com a seguinte graduação: 0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = acentuado.

### 3.5. Análise estatística

A formatação do banco de dados foi realizada através do programa de estatística Statistical Package for Social Sciences (SPSS, IBM, Chicago, IL, EUA), versão 19.

O desfecho primário foi o índice BBB na avaliação do 42º dia. Os desfechos anatomopatológicos e dos potenciais evocados motores também foram analisados como desfechos secundários. A estatística descritiva foi apresentada de acordo com a média e desvios padrões.

Para estatística inferencial, inicialmente foram observados os comportamentos dos dados, possíveis *outliers* identificados e submetidos ao teste Q de Dixon, como critério de exclusão. Posteriormente os dados foram submetidos ao teste de normalidade, Kolmogorov-Smirnov. Na presença de comportamento normal de distribuição de frequência, teste paramétricos, teste t de Student e análise de variância (ANOVA) foram realizados. Os números de fatores foram readequados para cada situação.

Para os dados com distribuição assimétrica, foram realizados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Partiu-se da hipótese nula, considerando-se a probabilidade do erro do tipo I de 5%.

#### **3.5.1. Análise estatística da avaliação pela escala funcional BBB**

Foram comparados os valores médios dos escores BBB utilizando-se um modelo de efeitos mistos com dois fatores (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores): quatro grupos e seis semanas de avaliação, considerando medidas repetidas ao longo das semanas. Foi também avaliado o efeito possível de interação entre esses fatores. O modelo de efeitos mistos foi ajustado considerando-se matrizes de covariâncias iguais nos diferentes grupos e de modo não estruturado.

### **3.5.2. Análise estatística do potencial evocado motor**

Inicialmente, foram comparadas as distribuições das medidas da amplitude e da latência nos quatro grupos de estudo utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise da amplitude e latência, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar verificar as diferenças entre os grupos.

### **3.5.3. Análise estatística da análise histológica**

A análise da histologia foi dividida em análises da degeneração, da hemorragia, da hiperemia, do infiltrado celular e da necrose. Todos os dados foram submetidos a análise da distribuição com o teste de Kolmogorov-Smirnov e apresentaram distribuição assimétrica. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação entre os grupos seguido pela análise de pares realizada com o teste de Mann-Whitney.



## 4. RESULTADOS

Foram operados dez animais em cada grupo. Houve exclusão de dois animais em cada grupo: no grupo Controle, houve uma exclusão por BBB normal à primeira avaliação e outra por autofagia no 22º dia pós-operatório; no grupo Metilprednisolona, houve uma exclusão por infecção no 8º dia pós-operatório e outra no 10º dia pós-operatório; no grupo G-CSF, houve uma exclusão por BBB normal à primeira avaliação e outra por infecção no 5º dia pós-operatório; no grupo G-CSF/metilprednisolona, um animal foi excluído por BBB normal à primeira avaliação e outro por autofagia no 10º dia pós-operatório. Deste modo, oito animais por grupo sobreviveram até a 42º dia de observação até quando a avaliação funcional foi realizada com a escala BBB e o exame de potencial evocado motor e anatomopatológico.

### 4.1. Análise dos dados obtidos pela escala funcional BBB

O teste t foi aplicado para avaliar se as notas aplicadas às patas pertencentes a um mesmo animal foram equivalentes. Deste modo, cada pata foi incluída como um indivíduo para realizar os demais testes estatísticos.

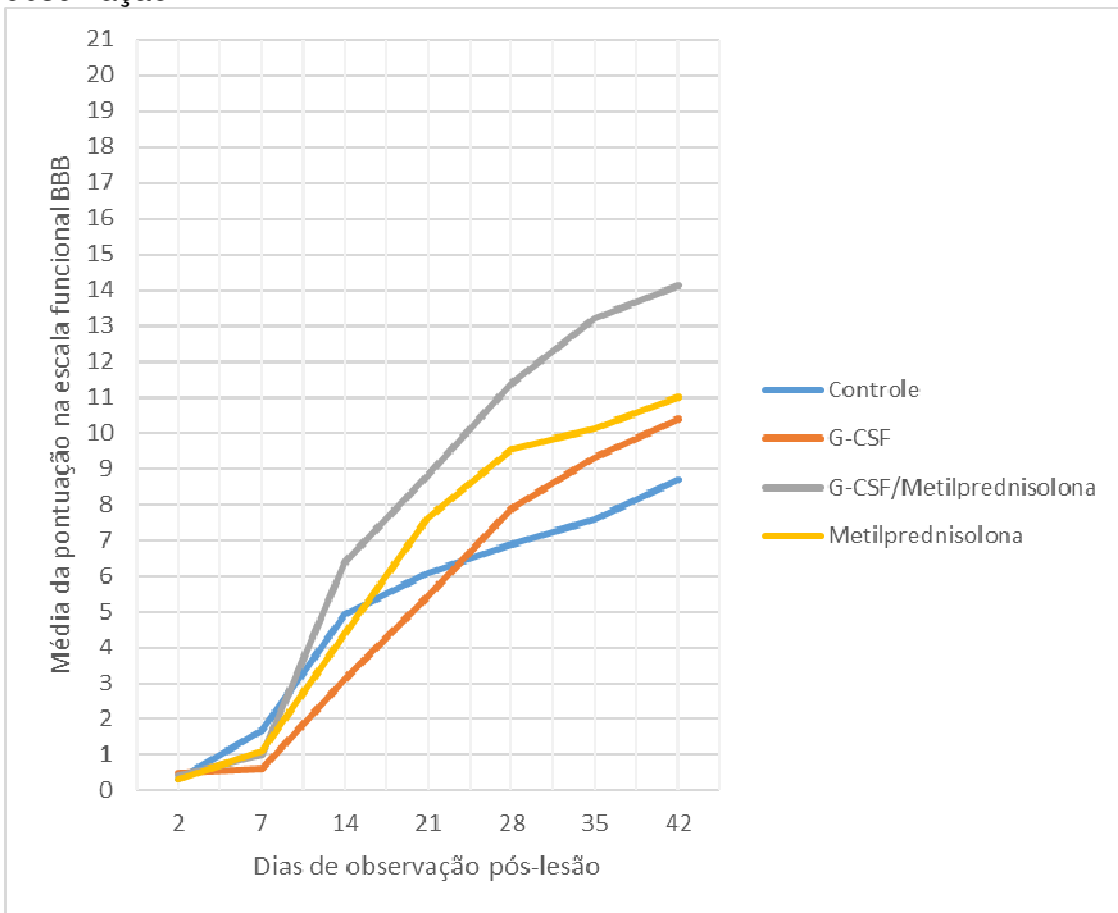
Não houve diferença no score do BBB entre os grupos na primeira semana de avaliação. A partir da segunda semana de avaliação, a diferença entre os grupos passou a ser estatisticamente significativa. Na **Tabela 1**, estão apresentadas as medidas descritivas da pontuação da escala funcional BBB para cada grupo de estudo e os momentos das avaliações e, no **Gráfico 1**, a evolução da média da pontuação BBB ao longo do tempo.

**Tabela 1** – Distribuição das médias e desvios padrões das escalas da Escala Funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) dos animais tratados com fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) de acordo com os momentos das observações

Dias do seguimento	Grupos	N (patas)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	$\chi^2$	GL	p*
2	Controle	16	0,31	0,60	0,0	2,0	0,905	3	0,824
	Metilprednisolona	16	0,31	0,60	0,0	2,0			
	G-CSF	16	0,50	0,73	0,0	2,0			
	G-CSF/metilprednisolona	16	0,44	0,73	0,0	2,0			
7	Controle	16	1,69	2,89	0,0	9,0	4,938	3	0,176
	Metilprednisolona	16	1,13	0,62	0,0	3,0			
	G-CSF	16	0,63	0,89	0,0	2,0			
	G-CSF/metilprednisolona	16	1,00	1,71	0,0	5,0			
14	Controle	16	4,94	2,11	1,0	8,0	16,634	3	<b>0,001</b>
	Metilprednisolona	16	4,38	2,33	1,0	9,0			
	G-CSF	16	3,13	1,59	1,0	5,0			
	G-CSF/metilprednisolona	16	6,38	1,78	3,0	8,0			
21	Controle	16	6,06	2,69	2,0	11,0	16,126	3	<b>0,001</b>
	Metilprednisolona	16	7,63	3,32	1,0	14,0			
	G-CSF	16	5,44	1,71	2,0	8,0			
	G-CSF/metilprednisolona	16	8,81	2,14	5,0	12,0			
28	Controle	16	6,88	2,39	4,0	11,0	21,408	3	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	16	9,56	1,82	7,0	12,0			
	G-CSF	16	7,88	1,36	5,0	10,0			
	G-CSF/metilprednisolona	16	11,38	3,46	5,0	15,0			
35	Controle	16	7,56	2,78	5,0	12,0	21,204	3	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	16	10,13	1,63	8,0	12,0			
	G-CSF	16	9,31	1,62	8,0	12,0			
	G-CSF/metilprednisolona	16	13,19	3,37	8,0	18,0			
42	Controle	16	8,69	2,09	6,0	12,0	21,644	3	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	16	11,00	1,83	8,0	14,0			
	G-CSF	16	10,38	1,59	8,0	12,0			
	G-CSF/metilprednisolona	16	14,13	3,59	8,0	18,0			

\*Teste de Kruskal-Wallis

**Gráfico 1.** Evolução das médias das notas da Escala Funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) de cada um dos grupos em cada um dos tempos de observação



Foram realizados os testes de comparações múltiplas (*post hoc*) para identificar quais os grupos que apresentaram resultados díspares (**Tabela 2**), pelo teste de Mann-Whitney, a partir dos dados da segunda semana de avaliação.

**Tabela 2** - Comparações múltiplas entre os grupos da escala funcional da Escala Funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

Seguimento (dias)	Grupo	Grupo	p
14	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	0,37
		G-CSF	<b>0,02</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	0,07
	Metilprednisolona	Controle	0,37
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	0,17
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,01</b>
	G-CSF	Controle	<b>0,02</b>
		Metilprednisolona	0,17
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
G-CSF/metilprednisolona	Controle	0,07	
	Metilprednisolona	<b>0,01</b>	
	G-CSF	<b>&lt; 0,001</b>	
	G-CSF/Metilprednisolona	---	
21	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	0,20
		G-CSF	0,51
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,01</b>
	Metilprednisolona	Controle	0,20
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	<b>0,02</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	0,14
	G-CSF	Controle	0,51
		Metilprednisolona	<b>0,02</b>
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
G-CSF/metilprednisolona	Controle	<b>0,01</b>	
	Metilprednisolona	0,14	
	G-CSF	<b>&lt; 0,001</b>	
	G-CSF/Metilprednisolona	---	
28	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
		G-CSF	0,14
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	Controle	<b>&lt; 0,001</b>
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	<b>0,02</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,05</b>
	G-CSF	Controle	0,14
		Metilprednisolona	<b>0,02</b>
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
G-CSF/metilprednisolona	Controle	<b>&lt; 0,001</b>	
	Metilprednisolona	<b>0,05</b>	
	G-CSF	<b>&lt; 0,001</b>	
	G-CSF/Metilprednisolona	---	

continua

continuação

<b>35</b>	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	<b>0,01</b>
		G-CSF	<b>0,04</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	Controle	<b>0,01</b>
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	0,13
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,01</b>
	G-CSF	Controle	<b>0,04</b>
		Metilprednisolona	0,13
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
G-CSF/metilprednisolona	Controle	<b>&lt; 0,001</b>	
	Metilprednisolona	<b>0,01</b>	
	G-CSF	<b>&lt; 0,001</b>	
	G-CSF/Metilprednisolona	---	
<b>42</b>	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
		G-CSF	<b>0,02</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	Controle	<b>&lt; 0,001</b>
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	0,27
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,01</b>
	G-CSF	Controle	<b>0,02</b>
		Metilprednisolona	0,27
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
G-CSF/metilprednisolona	Controle	<b>&lt; 0,001</b>	
	Metilprednisolona	<b>0,01</b>	
	G-CSF	<b>&lt; 0,001</b>	
	G-CSF/Metilprednisolona	---	

\* Teste de Mann-Whitney

Ao final do experimento, os grupos Metilprednisolona, G-CSF e G-CSF tiveram resultado do BBB significativamente maior do que no grupo Controle. Não houve diferença entre o grupo Metilprednisolona e G-CSF. O grupo G-CSF/metilprednisolona teve score do BBB significativamente maior do que dos demais grupos.

## 4.2. Análise dos dados obtidos através do exame do potencial evocado motor

O exame do potencial evocado motor forneceu medidas de latência e amplitude. Na análise entre os lados, não houve diferença estatisticamente significativa (teste t,  $p > 0,05$ ). Desta forma, cada pata foi utilizada como um indivíduo para os demais cálculos estatísticos para comparação entre grupos. Na **Tabela 3**, estão apresentados os dados das latências das patas traseiras e na **Tabela 4**, das amplitudes.

**Tabela 3** – Distribuição dos valores das latências dos potenciais evocados de acordo com as suas médias, desvios padrões e valores mínimos e máximos das patas traseiras

Patras traseiras	Grupos	N (patas)	Média (ms)	dp	Mín	Máx	X <sup>2</sup>	GL	P*
Latência	Controle	16	27,83	8,77	15,80	40,30	6,626	3	0,85
	Metilprednisolona	16	23,71	3,74	16,30	29,10			
	G-CSF	16	22,36	7,30	12,50	34,20			
	G-CSF/metilprednisolona	16	21,30	8,20	12,40	40,30			

\*Teste de Kruskal-Wallis.

**Tabela 4** – Distribuição dos valores das amplitudes dos potenciais evocados de acordo com as suas médias, desvios padrões e valores mínimos e máximos das patas traseiras

Patras traseiras	Grupos	N (patas)	Média (mV)	dp	Mín	Máx	X <sup>2</sup>	GL	P*
Amplitude	Controle	16	26,86	14,78	6,00	50,10	6,898	3	0,075
	Metilprednisolona	16	43,98	65,22	4,70	276,80			
	G-CSF	16	64,71	92,85	10,90	312,10			
	G-CSF/metilprednisolona	16	97,43	115,58	4,70	483,00			

\*Teste de Kruskal-Wallis.

Não houve diferença estatística no exame do potencial evocado motor na latência e nem na amplitude das patas traseiras entre os grupos.

### 4.3. Análise histológica

Os resultados das médias, desvios padrões, mínimo e máximo da pontuação dos grupos quanto a necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa e infiltrado celular estão descritos na **Tabela 5**. Houve diferença estatística entre os grupos com relação à hemorragia, hiperemia, degeneração do tecido nervoso e infiltrado celular. A única característica em que não houve diferença entre os grupos foi na avaliação da necrose.

**Tabela 5** - Estatística descritiva dos dados obtidos com a análise histológica do local da lesão quanto a necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração do tecido nervoso e infiltrado celular

	Grupos	N	Média	dp	Mín	Máx	$\chi^2$	GL	p*
<b>Necrose</b>	Controle	8	1,33	0,87	0	3	6,858	3	0,077
	Metilprednisolona	8	0,92	0,50	0	2			
	G-CSF	8	1,04	0,46	0	2			
	G-CSF/metilprednisolona	8	0,83	0,48	0	2			
<b>Hemorragia</b>	Controle	8	1,54	0,72	1	3	14,226	3	<b>0,003</b>
	Metilprednisolona	8	1,08	0,65	0	2			
	G-CSF	8	0,96	0,55	0	2			
	G-CSF/metilprednisolona	8	0,83	0,48	0	2			
<b>Hiperemia</b>	Controle	8	1,83	0,64	1	3	22,506	3	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	8	1,38	0,65	0	2			
	G-CSF	8	1,25	0,61	1	3			
	G-CSF/metilprednisolona	8	0,96	0,46	0	2			
<b>Degeneração do tecido nervoso</b>	Controle	8	1,92	0,65	1	3	16,903	3	<b>0,001</b>
	Metilprednisolona	8	1,42	0,65	0	2			
	G-CSF	8	1,29	0,62	0	2			
	G-CSF/metilprednisolona	8	1,08	0,65	0	2			
<b>Infiltrado celular</b>	Controle	8	1,92	0,78	1	3	19,009	3	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	8	1,29	0,81	0	3			
	G-CSF	8	1,54	0,59	1	3			
	G-CSF/metilprednisolona	8	0,92	0,65	0	2			

\*Teste de Mann-Whitney

As variáveis em que foram identificadas diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio do teste de comparações múltiplas (Mann-Whitney) para identificar quais foram os grupos responsáveis pelas diferenças. Os resultados estão descritos na **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Comparações múltiplas entre os grupos quanto à avaliação histológica

Grupos	Comparação entre grupos	p*	
<b>Hiperemia</b>	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	0,608
		G-CSF	<b>0,002</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	Controle	0,608
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	0,311
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,011</b>
	G-CSF	Controle	<b>0,002</b>
		Metilprednisolona	0,311
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	0,077
G-CSF/Metilprednisolona	Controle	<b>&lt; 0,001</b>	
	Metilprednisolona	<b>0,011</b>	
	G-CSF	0,077	
	G-CSF/Metilprednisolona	---	
<b>Hemorragia</b>	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	<b>0,047</b>
		G-CSF	<b>0,005</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	Controle	<b>0,047</b>
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	0,466
		G-CSF/Metilprednisolona	0,144
	G-CSF	Controle	<b>0,005</b>
		Metilprednisolona	0,466
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	0,419
G-CSF/Metilprednisolona	Controle	<b>&lt; 0,001</b>	
	Metilprednisolona	0,144	
	G-CSF	0,419	
	G-CSF/Metilprednisolona	---	

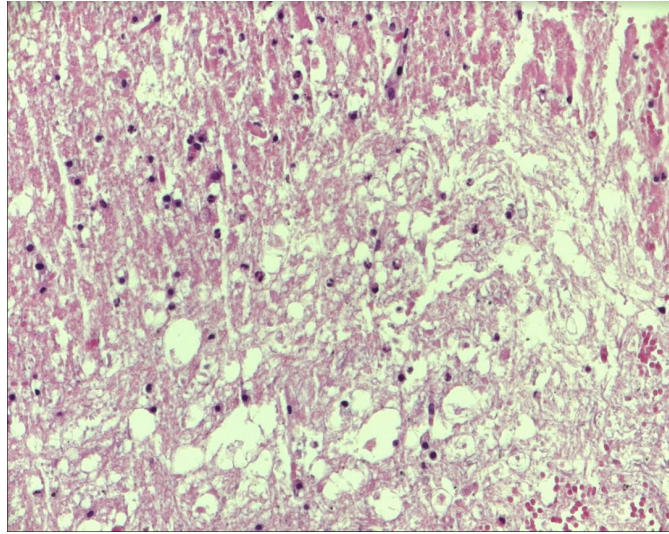
continua



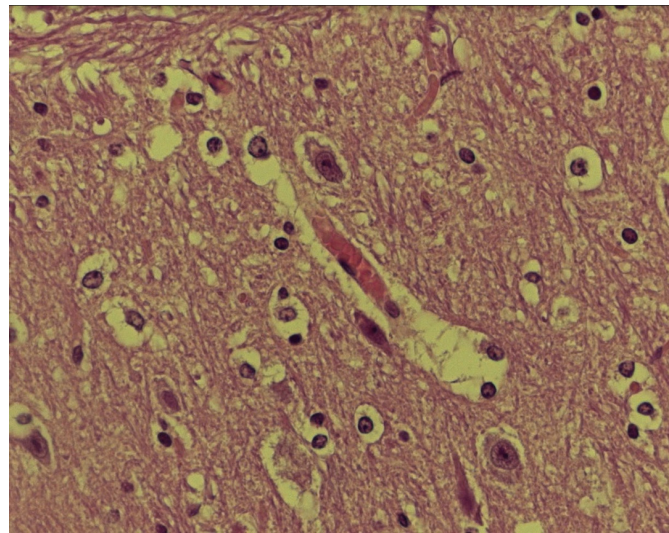
continuação			
<b>Degeneração</b>	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	<b>0,019</b>
		G-CSF	<b>0,003</b>
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0001</b>
	Metilprednisolona	Controle	<b>0,019</b>
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	0,448
	G-CSF	G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,076</b>
		Controle	<b>0,003</b>
		Metilprednisolona	0,448
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	0,265
G-CSF/Metilprednisolona		Controle	<b>&lt; 0,001</b>
		Metilprednisolona	0,076
		G-CSF	0,265
	G-CSF/Metilprednisolona	---	
<b>Infiltrado celular</b>	Controle	Controle	---
		Metilprednisolona	<b>0,016</b>
		G-CSF	0,088
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>&lt; 0,001</b>
	Metilprednisolona	Controle	<b>0,016</b>
		Metilprednisolona	---
		G-CSF	0,288
	G-CSF	G-CSF/Metilprednisolona	0,089
		Controle	0,088
		Metilprednisolona	0,288
		G-CSF	---
		G-CSF/Metilprednisolona	<b>0,002</b>
G-CSF/Metilprednisolona		Controle	<b>&lt; 0,001</b>
		Metilprednisolona	0,089
		G-CSF	<b>0,002</b>
	G-CSF/Metilprednisolona	---	

\*Teste de Mann-Whitney

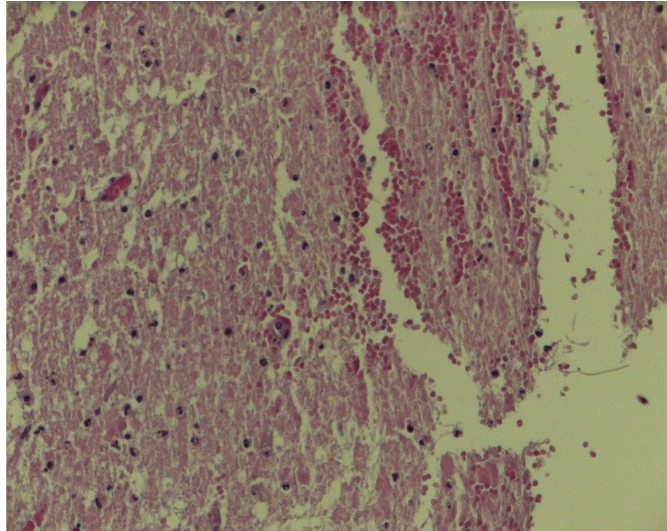
Nas **Figuras 4, 5 e 6** são apresentadas as fotografias das lâminas do tecido da medula espinal traumatizado, revelando, respectivamente, degeneração da substância nervosa, hiperemia e tecidual infiltrado celular e degeneração do tecido lesado e na **Figura 7**, fotografia de uma região sem alterações histológicas.



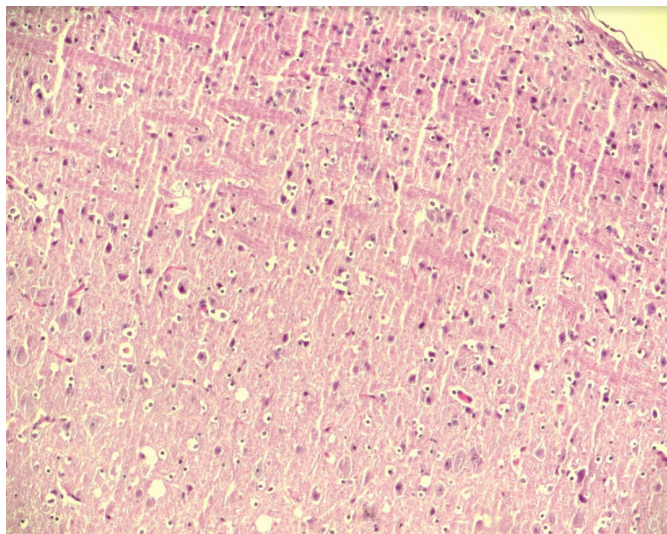
**Figura 4** - Fotografia da lâmina da região da medula espinal traumatizada revelando grau acentuado de degeneração da substância nervosa (aumento: 200 vezes; coloração: hematoxilina-eosina).



**Figura 5** - Fotografia da lâmina da região da medula espinal traumatizada revelando grau acentuado de hiperemia (aumento: 100 vezes; coloração: hematoxilina-eosina).



**Figura 6** - Fotografia da lâmina da região do traumatismo revelando grau moderado de infiltrado celular e degeneração (aumento: 200 vezes; coloração: hematoxilina-eosina).



**Figura 7** - Fotografia da lâmina de uma região sem alterações, proximal a lesão (aumento: 100 vezes; coloração: hematoxilina-eosina).

## 5. DISCUSSÃO

O traumatismo raquimedular ocorre predominantemente em pessoas jovens, ou seja, na fase mais produtiva de suas vidas. Há até 80 casos por milhão de pessoas em todo o mundo e cerca de 500.000 novos casos por ano.<sup>1,2</sup>

Nas últimas décadas, houve evolução nos métodos diagnósticos e na compreensão do conceito de instabilidade mecânica, além do desenvolvimento de materiais para reconstrução da coluna vertebral, que foram fundamentais para melhorar o tratamento e reabilitação desses doentes. A possibilidade da descompressão da medula espinal precoce e da estabilização cirúrgica permitiu a mobilização precoce do doente, sem a necessidade de imobilização externa. Protocolos de reabilitação e de tratamento clínico reduziram a morbidade e mortalidade relacionadas a complicações respiratórias, cutâneas, viscerais, vasculares, infecciosas e osteomusculares. Entretanto, apesar dos avanços dos métodos de tratamento farmacológico, não há tratamento disponível que permita o reestabelecimento funcional completo após a lesão da medula espinal.

A patogênese da lesão da medula espinal é complexa. Inicialmente ocorre a lesão primária, decorrente do traumatismo físico e que resulta em dano tecidual. A seguir, ocorrem vários fenômenos biológicos que promovem lesões secundárias que resultam em comprometimento progressivo de tecido ainda viável, resultando em necrose ou apoptose neuronal.<sup>94</sup> Os tratamentos farmacológicos têm como objetivo evitar ou reduzir a magnitude das lesões secundárias, ou seja, a inflamação, a peroxidação lipídica e a excitotoxicidade.<sup>95</sup>

Muitos fármacos foram e são utilizados nos estudos experimentais e clínicos.<sup>31,34,87</sup> Apesar de grande quantidade de fármacos ter sido considerada promissora nos estudos experimentais em animais, poucos deles revelaram eficácia em seres humanos. Dentre esses, a metilprednisolona, o mesilato de tirilazade, o naloxene e o gangliosídeo GM-1 foram submetidos a estudos clínicos controlados e randomizados em humanos com lesão da medula espinal.<sup>9</sup>

No desenvolvimento de novas estratégias de tratamento farmacológico, os modelos animais de lesão medular são indispensáveis. Devem ser reprodutíveis e permitir a comparação de resultados entre diversos centros de estudo.

É possível que a combinação de várias estratégias de tratamento, com base em mecanismos de atuação independentes, aditivos e sinérgicos, possibilite resultados superiores à aplicação de procedimentos isolados,<sup>34</sup> especialmente em doenças de fisiopatologia complexa. O presente estudo objetivou a avaliação do efeito da associação do uso da metilprednisolona com o G-CSF.

A metilprednisolona foi um dos fármacos utilizados nesta pesquisa por ter sido o mais estudado.<sup>9,15,11,81,96</sup> Apesar de seu mecanismo de ação não ser plenamente conhecido, há evidência de que estabilize as membranas e mantenha a integridade da barreira hemato-medular, potencialmente reduzindo o edema vasogênico, de que aumente o fluxo sanguíneo medular, de que altere as concentrações eletrolíticas no local da lesão, de que iniba a liberação de endorfinas, de que reduza a disponibilidade de radicais livres e de que limite a resposta inflamatória.<sup>9,96,97</sup>

Apesar de ter tido aceitação mundial no tratamento do traumatismo raquimedular, problemas metodológicos nos ensaios clínicos e evidências dos novos estudos e revisões da literatura tornaram questionável a magnitude dos possíveis benefícios e demonstraram o risco de complicações decorrentes do seu uso.<sup>9,15</sup> Há recomendação de que sejam feitos estudos de agentes farmacológicos promissores, incluindo, mas não limitados à metilprednisolona, o mesilato de tirilazade, o naloxene e o GM-1.<sup>9</sup>

O G-CSF é uma glicoproteína mais conhecida pelo seu papel como fator estimulador de crescimento para células progenitoras hematopoiéticas e para mobilização de células-tronco hematopoiéticas para transplante.<sup>16</sup> Estudos demonstram que o G-CSF também tem funções não hematopoiéticas: aumenta a regeneração tecidual de diversos órgãos, como o cérebro e o coração.<sup>18</sup> O G-CSF revelou-se promissor em pesquisas realizadas em seres humanos que sofreram traumatismo raquimedular<sup>28,29</sup> e doença mielopática torácica.<sup>98</sup>

Para a realização da presente pesquisa, optou-se pela experimentação em ratos Wistar pela padronização adotada pelo Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN)<sup>53</sup> e por ter disponibilidade alta pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os ratos Wistar apresentam desfechos da lesão medular provocada

experimentalmente similares aos da lesão traumática em humanos com relação a função, neurofisiologia e morfologia.<sup>55</sup>

O número de animais para composição dos grupos experimentais foi fundamentado na padronização pelo MASCIS e em pesquisas anteriores que adotaram um modelo experimental semelhante.<sup>31,32,34,87,92</sup> Para aumentar a homogeneidade da amostra e reduzir o número necessário de animais, houve um critério de inclusão rígido: raça e sexo únicos, idade entre 20 e 21 semanas, peso entre 300 e 400 g, sem alterações de motricidade ou estado geral. A perda de animais de 20% da amostra teve distribuição simétrica nos grupos. Este dado é compatível com a experiência do LETRAN em outros estudos.<sup>34,92</sup>

Optou-se pelo modelo de lesão medular causado por traumatismo contuso pois este reproduz o mecanismo de traumatismo mais comum em seres humanos.<sup>2,99</sup> Para provocar a lesão medular, utilizamos o mesmo aparelho adotado pelo MASCIS. É hoje amplamente utilizado e produz uma contusão medular em ratos reprodutível e validada,<sup>51,93,100</sup> de modo a possibilitar a comparação de resultados observados com os de outros centros. O NYU Impactor causa lesões de gravidade variada, com a queda de peso de 10 g em diferentes alturas. Optamos por impacto moderado, ou seja, causado pela queda de 10 g a 12,5 mm de altura, de modo a reproduzir uma lesão incompleta, por ser mais adequada para estudos de intervenção sobre os mecanismos de lesão secundária.

O desfecho primário utilizado neste estudo foi funcional por ser mais relevante para exploração de fármacos do que parâmetros neurofisiológicos, bioquímicos ou histopatológicos. A escolha da escala funcional BBB<sup>50</sup> foi importante por ter boa reprodutibilidade e concordância inter e intraobservador.<sup>50,92</sup> É a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora de ratos com lesão medular, além de oferecer a possibilidade de comparação dos resultados com estudos realizados pelo MASCIS e pelo LETRAN. A avaliação dos resultados, tendo sido cega, foi importante para reduzir a interferência da opinião do observador sobre os resultados.

A magnitude da melhora da escala funcional BBB no grupo G-CSF foi similar à encontrada em estudos com a mesma metodologia.<sup>21,88</sup> Assim como Kadota et al.,<sup>21</sup> utilizamos a dose de 15 mcg/kg/dia por 5 dias; Dittgen et al.<sup>88</sup> utilizaram doses maiores, de 60 mcg de ataque e manutenção de 30 mg/kg/dia em bomba de infusão. Considerando que os resultados funcionais entre todos os estudos foram similares, é

provável que o efeito benéfico do fármaco seja obtido com doses menores, por menos tempo e com maior simplicidade do que preconizado por Dittgen et al.<sup>88</sup>

A combinação do uso da metilprednisolona e do G-CSF demonstrou resultados funcionais superiores ao uso de cada fármaco de forma isolada neste estudo e também quando comparado com os demais estudos experimentais que utilizaram G-CSF isoladamente.<sup>21,88</sup> Este dado indica um efeito sinérgico na associação dos fármacos.

Muitos estudos utilizam o potencial evocado somato-sensitivo para avaliação da recuperação neurológica. Entretanto, optou-se pelo uso do potencial evocado motor por permitir avaliação neurofisiológica do trato corticoespinal. É possível que a ausência de diferença estatística na latência ou na amplitude do potencial evocado motor encontrada neste estudo tenha ocorrido pela melhora funcional em todos os grupos, numa magnitude em que as diferenças neurofisiológicas não pudessem mais ser identificadas. Houve também o óbito de um animal do grupo G-CSF/metilprednisolona (Rato 1 – **Anexo V**), grupo de melhor resultado funcional, antes da realização do potencial evocado motor. Optou-se por utilizar os piores valores obtidos no estudo para fins de análise estatística, o que pode ter resultado na impossibilidade de demonstrar diferença estatística entre este e demais grupos.

Na análise histológica, os grupos que receberam G-CSF, com ou sem metilprednisolona, melhoraram o parâmetro hiperemia. Todos os grupos de tratamento tiveram melhora de hemorragia e degeneração quando comparados ao controle. Os grupos que fizeram uso de metilprednisolona, com ou sem G-CSF, tiveram melhora do infiltrado celular. Quando a metilprednisolona foi combinada ao G-CSF, houve melhora em todos os parâmetros, reforçando o efeito sinérgico entre os dois fármacos na redução da inflamação e manutenção da arquitetura tecidual.

Este experimento reforça a importância da combinação de diferentes modalidades de tratamento ou fármacos no tratamento de doenças com fisiopatologia complexa como o traumatismo raquimedular. Diferentes fármacos podem ter efeito sinérgico e, eventualmente, ser utilizados em menor dose quando em associação com outros e assim reduzir efeitos colaterais com acréscimo de eficácia.

O G-CSF já foi pesquisado em seres humanos em estudos fase I/IIa com resultado satisfatório no tratamento de traumatismo raquimedular<sup>28,29</sup> e na mielopatia torácica.<sup>98</sup> O potencial desse fármaco deve ser explorado em pesquisas fase III. Estudos experimentais ainda devem ser feitos com a combinação do G-CSF

associado à metilprednisolona para compreender os mecanismos de ação da combinação dos fármacos e confirmar nossos achados antes de estudos fase I em seres humanos.



## 6. CONCLUSÃO

A associação de metilprednisolona e G-CSF no tratamento do traumatismo medular contuso experimental em ratos promoveu melhora neurológica avaliada pela escala BBB superior à melhora promovida pela metilprednisolona e G-CSF quando utilizados isoladamente. A associação teve também efeito sinérgico que resultou em melhora nos parâmetros histológicos no local da lesão. Não houve diferença entre os grupos quanto à avaliação neurofisiológica.

## 7. ANEXOS

### Anexo I. Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais



## APROVAÇÃO

O **Coordenador da CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **21.06.2013**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **180/13** intitulado: **"Estudo do Efeito do Fator Estimulador de Colônia de Ganulócitos associado a Metilprednisolona na Lesão Medular Aguda Experimental em Ratos"** que utilizará **48 Ratos Wistar**, apresentado pelo **Departamento de Ortopedia e Traumatologia**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, ( Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794-8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Alexandre Fogaça Cristante**

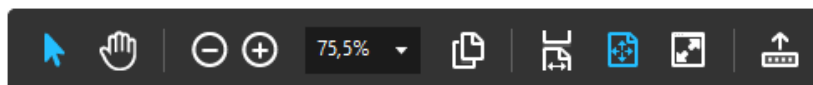
**Pesquisador (a) Executante: William Gemio Jacobsen Teixeira**

CEP-FMUSP, 21 de Junho de 2013.

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

Prof. Dr. Roger Chammas  
 Coordenador  
 Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa  
 Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



**Anexo II. Escala BBB de avaliação funcional<sup>50</sup>**

Rato: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Dias pós-operatório: \_\_\_\_\_ Pontuação: \_\_\_\_\_ Esquerdo: \_\_\_\_\_ Direito: \_\_\_\_\_

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

**Comentários:** \_\_\_\_\_

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

### Anexo III. Escala de avaliação funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) de 21 pontos

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (isto é, quando estático) <u>ou</u> passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de piso frequente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso), bem como antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha; a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha; a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha; a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e o animal apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha; a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e o animal apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.

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

**Anexo IV.** Tabela de notas resultante da aplicação da Escala de avaliação funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

	2 dias		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias		35 dias		42 dias	
<b>Grupo controle</b>	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
Rato 1	0	0	2	2	4	4	5	5	9	9	11	12	12	11
Rato 2	1	1	0	0	5	6	11	10	11	11	12	12	12	11
Rato 3	0	0	0	0	8	8	5	5	5	5	5	5	7	7
Rato 4	2	0	0	0	1	4	2	3	4	5	5	5	8	8
Rato 5	1	0	0	0	6	6	8	8	8	8	6	6	6	6
Rato 6	0	0	8	9	8	5	9	5	8	5	6	8	7	8
Rato 7	0	0	3	3	5	5	6	8	5	4	5	8	9	7
Rato 8	0	0	0	0	2	2	2	5	5	8	6	9	9	11
	2 dias		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias		35 dias		42 dias	
<b>Grupo metilprednisolona</b>	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
Rato 1	0	0	1	1	4	3	9	9	9	9	9	9	9	9
Rato 2	0	1	1	0	5	7	14	14	12	12	12	12	14	13
Rato 3	0	0	1	1	3	4	4	7	7	8	8	8	10	10
Rato 4	0	2	2	3	5	7	8	9	12	11	10	11	12	12
Rato 5	1	0	1	1	1	1	1	5	7	9	10	10	11	11
Rato 6	0	0	1	1	1	4	8	8	9	9	12	11	12	12
Rato 7	1	0	1	1	7	9	8	8	11	12	12	12	12	13
Rato 8	0	0	1	1	5	4	5	5	8	8	8	8	8	8
	2 dias		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias		35 dias		42 dias	
<b>Grupo C-GFS</b>	E	D	E	D	E	D	E	E	D	E	D	E	D	E
Rato 1	0	0	0	1	1	1	5	5	8	8	8	8	12	12
Rato 2	1	0	0	0	2	2	2	2	6	8	8	8	8	8
Rato 3	0	0	2	2	5	5	5	5	6	8	8	8	10	10
Rato 4	1	0	1	0	5	5	7	8	9	10	10	10	11	12
Rato 5	1	0	0	0	3	3	5	5	7	7	8	8	8	8
Rato 6	2	0	0	0	5	5	5	5	9	9	12	12	12	12
Rato 7	0	0	0	0	2	2	7	7	9	9	11	11	11	11
Rato 8	1	2	2	2	2	2	7	7	8	5	11	8	11	10
	2 dias		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias		35 dias		42 dias	
<b>Grupo C-GFS/ metilprednisolona</b>	E	D	E	D	E	D	E	E	D	E	D	E	D	E
Rato 1	0	1	0	0	5	5	8	8	9	10	10	12	14	14
Rato 2	0	0	5	5	8	8	12	12	15	15	18	18	18	18
Rato 3	2	0	0	0	8	8	9	9	10	10	15	15	18	18
Rato 4	0	1	0	0	3	4	8	10	15	15	15	15	15	15
Rato 5	2	0	0	0	5	6	7	7	12	12	11	11	11	12
Rato 6	0	0	0	0	8	8	10	10	9	10	8	8	8	8
Rato 7	0	0	2	2	5	5	10	11	15	15	18	15	18	17
Rato 8	0	1	1	1	8	8	5	5	5	5	11	11	11	11

**Anexo V.** Tabela dos valores de latência obtidos na análise por potencial evocado motor em milissegundos

<b>Grupo controle</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	6,7	5,1	35,1	38,4
Rato 2	5,3	5,5	32,7	40,1
Rato 3	3,9	2,8	40,3	34,2
Rato 4	3,3	4,1	22,1	28,7
Rato 5	4,7	4,5	21	17,6
Rato 6	3,6	3,1	18,7	20,9
Rato 7	3,9	2,8	33,3	29,7
Rato 8	4,1	3,8	16,7	15,8
<b>Grupo metilprednisolona</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	5,6	3,5	16,3	23,8
Rato 2	2,8	7,8	24,5	21
Rato 3	3,2	4,2	25,9	28,8
Rato 4	4,6	4,2	19,2	20,2
Rato 5	2,4	3,2	19,2	27,4
Rato 6	4,9	3,9	24,5	28,1
Rato 7	2,4	4,2	23,4	29,1
Rato 8	4,9	4,6	24,5	23,4
<b>Grupo C-GSF</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	4,2	5,3	18,7	22,1
Rato 2	3,9	4,5	26,2	31,7
Rato 3	3,6	3,8	22,5	28,9
Rato 4	4,9	4,1	34,2	29,5
Rato 5	5,8	5,6	16	18,1
Rato 6	2,7	5,8	32,1	12,5
Rato 7	2,9	4,9	12,7	13,7
Rato 8	3,1	3,8	16,9	21,9
<b>Grupo C-GSF/metilprednisolona</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	2,6	3	12,4*	12,4*
Rato 2	4,2	5,6	12,4	12,4
Rato 3	2,8	3,5	18,5	18,5
Rato 4	2,4	3,2	22,4	22,4
Rato 5	3,9	2,8	16,7	16,7
Rato 6	2,8	4,2	14,9	14,9
Rato 7	3,2	3,9	21	21
Rato 8	2,8	3,9	16	16

\*Dados não puderam ser obtidos por complicação anestésica; considerado o pior resultado no estudo para fins de análise estatística.

**Anexo VI.** Tabela dos valores de amplitude obtidos na análise por potencial evocado motor em microvolts

<b>Grupo Controle</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	218,5	240,7	29,5	30,7
Rato 2	376,4	390,1	42,4	50,1
Rato 3	320,1	330,7	12,1	13,2
Rato 4	197,2	202	22	29,9
Rato 5	145,9	162,3	39,5	40,3
Rato 6	485,5	507,5	43,3	39,7
Rato 7	396	407,2	10	12,1
Rato 8	215,1	301,1	6	8,9
<b>Grupo metilprednisolona</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	140,6	326,2	46,3	276,8
Rato 2	374,3	618,5	38,2	66,2
Rato 3	284,9	721,6	20,6	13,9
Rato 4	96,4	162,7	40,5	23,5
Rato 5	109,7	142,8	19,8	12,5
Rato 6	86,8	229	25	8,1
Rato 7	50	97,2	74,3	16,9
Rato 8	99,5	168,1	4,7	16,3
<b>Grupo C-GSF</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	160,3	170,8	13,1	10,9
Rato 2	344,8	412,4	287,9	312,1
Rato 3	127,1	210,1	32,1	35,9
Rato 4	60,8	90	26,9	28,1
Rato 5	163,7	168,7	61,9	50,2
Rato 6	108,2	112,5	37,1	42,9
Rato 7	261,4	287	25,9	22,3
Rato 8	273	310,1	24,1	23,9
<b>Grupo C-GSF/metilprednisolona</b>	<b>Membro dianteiro esquerdo</b>	<b>Membro dianteiro direito</b>	<b>Membro traseiro esquerdo</b>	<b>Membro traseiro direito</b>
Rato 1	173,9	218	4,70*	4,70*
Rato 2	50	52	120	11,1
Rato 3	344,6	284,2	483	132,5
Rato 4	173,7	263,6	25	66,2
Rato 5	170,1	190,7	32,4	42,7
Rato 6	261,4	387,3	64,8	151,6
Rato 7	159,7	254	39,7	162
Rato 8	106	581,7	116,8	101,6

\*Dados não puderam ser obtidos por complicação anestésica; considerado o pior resultado no estudo para fins de análise estatística



**Anexo VII.** Dados do exame anatomopatológico no local da lesão medular

<b>Grupo Controle</b>	<b>Necrose</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Hiperemia</b>	<b>Degeneração</b>	<b>Infiltrado celular</b>
Rato 1	1	1	2	2	2
Rato 2	1	1	1	2	2
Rato 3	2	2	3	3	3
Rato 4	1	1	2	2	2
Rato 5	1	1	2	2	2
Rato 6	3	3	3	2	2
Rato 7	1	1	2	2	2
Rato 8	2	2	2	2	3
<b>Grupo Metilprednisolona</b>	<b>Necrose</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Hiperemia</b>	<b>Degeneração</b>	<b>Infiltrado celular</b>
Rato 1	2	2	1	2	1
Rato 2	2	2	1	1	2
Rato 3	1	1	1	1	2
Rato 4	1	2	2	2	1
Rato 5	1	1	2	2	2
Rato 6	1	1	1	1	0
Rato 7	1	0	0	1	2
Rato 8	1	1	2	2	2
<b>Grupo C-GSF</b>	<b>Necrose</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Hiperemia</b>	<b>Degeneração</b>	<b>Infiltrado celular</b>
Rato 1	1	1	2	1	2
Rato 2	1	0	1	1	1
Rato 3	2	2	2	1	1
Rato 4	1	0	1	1	1
Rato 5	1	0	0	2	2
Rato 6	1	1	3	2	2
Rato 7	1	1	1	1	1
Rato 8	1	1	2	2	2
<b>Grupo C-GSF/metilprednisolona</b>	<b>Necrose</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Hiperemia</b>	<b>Degeneração</b>	<b>Infiltrado celular</b>
Rato 1	1	1	0	0	0
Rato 2	0	0	1	2	2
Rato 3	1	1	1	0	2
Rato 4	0	0	1	1	0
Rato 5	1	1	1	2	2
Rato 6	2	2	1	1	1
Rato 7	0	0	1	1	1
Rato 8	1	1	2	1	1

## 7. REFERÊNCIAS

1. Barros Filho TEP, Taricco MA, Oliveira RP, Greve JMA, Santos LCR, Napoli MMM. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo da coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP [Epidemiological study of patients with spinal cord injuries and neurologic deficit, admitted in the Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]. *Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo*. 1990;45(3):123-6.
2. Jain NB, Ayers GD, Peterson EN, Harris MB, Morse L, O'Connor KC, et al. Traumatic spinal cord injury in the United States, 1993-2012. *JAMA*. 2015;313(22):2236-43.
3. Pereira CU, Jesus RM. Epidemiologia do traumatismo raquimedular [Epidemiology of spinal injury in Aracaju: a prospective series]. *J Bras Neurocir*. 2011;22(2):26-31.
4. Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma*. 2004;21(4):429-40.
5. Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*. 2008;25(5):E2.
6. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *JAMA*. 1911;LVII(11):878-80. Disponível em: <http://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/448138>. Acessado em 2017 (13 fev).
7. Kakulas BA. Pathology of spinal injuries. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1984;1(2):117-29.

8. Ramer LM, Ramer MS, Bradbury EJ. Restoring function after spinal cord injury : towards clinical translation of experimental strategies. *Lancet Neurol.* 2014;13(12):1241-56.
9. Hadley MN, Walters BC, Grabb PA, Oyesiku NM, Przybylski GJ, Resnick DK, et al. Guidelines for the management of acute cervical spine and spinal cord injuries. *Clin Neurosurg.* 2002;49:407-98.
10. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med.* 1990;322(20):1405-11.
11. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1992;76(1):23-31.
12. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg.* 1998;89(5):699-706.
13. Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, Yoshida M, Ando M, Yamada H. Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment in the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(4):426-30.
14. Hurlbert RJ. The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S39-46.
15. Botelho VR, Daniel JW, Boulosa JL, Colli BO, Farias Rde L, Moraes OJ, et al. [Effectiveness of methylprednisolone in acute spinal cord injury – a systematic review of randomized controlled trials]. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2009;55(6):729-37.

16. Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*. 2005;23(1):33-41.
17. Wallner S, Peters S, Pitzer C, Resch H, Bogdahn U, Schneider A. The Granulocyte-colony stimulating factor has a dual role in neuronal and vascular plasticity. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:48.
18. Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2003;34(3):745-51.
19. Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(8):724-31.
20. Lee JS, Yang CC, Kuo YM, Sze CI, Hsu JY, Huang YH, et al. Delayed granulocyte colony-stimulating factor treatment promotes functional recovery in rats with severe contusive spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(1):10-7.
21. Kadota R, Koda M, Kawabe J, Hashimoto M, Nishio Y, Mannoji C, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats. *PLoS One*. 2012;7(11):e50391.
22. Guo Y, Zhang H, Yang J, Liu S, Bing L, Gao J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor improves alternative activation of microglia under microenvironment of spinal cord injury. *Neuroscience*. 2013;238:1-10.
23. Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res*. 2007;1149:223-31.

24. Chen WF, Chen CH, Chen NF, Sung CS, Wen ZH. Neuroprotective Effects of Direct Intrathecal Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Rats with Spinal Cord Injury. *CNS Neurosci Ther.* 2015;21(9):698-707.
25. Sanli AM, Serbes G, Calışkan M, Kaptanođlu E, Sargon MF, Kilingç K, et al. Effect of granulocyte-colony stimulating factor on spinal cord tissue after experimental contusion injury. *J Clin Neurosci.* 2010;17(12):1548-52.
26. Kawabe J, Koda M, Hashimoto M, Fujiyoshi T, Furuya T, Endo T, et al. Neuroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor and relationship to promotion of angiogenesis after spinal cord injury in rats: laboratory investigation. *J Neurosurg Spine.* 2011;15(4):414-21.
27. Chung J, Kim MH, Yoon YJ, Kim KH, Park SR, Choi BH. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on glial scar formation after spinal cord injury in rats. *J Neurosurg Spine.* 2014;21(6):966-73.
28. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, et al. Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. *Eur Spine J.* 2012;21(12):2580-7.
29. Kamiya K, Koda M, Furuya T, Kato K, Takahashi H, Sakuma T, et al. Neuroprotective therapy with granulocyte colony-stimulating factor in acute spinal cord injury: a comparison with high-dose methylprednisolone as a historical control. *Eur Spine J.* 2015;24(5):963-7.
30. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97-111.

31. Cristante A, Barros Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR, et al. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2009;47(6):458-63.
32. de Mesquita Coutinho PR, Cristante AF, de Barros Filho TE, Ferreira R, Dos Santos GB. Effects of tacrolimus and erythropoietin in experimental spinal cord lesion in rats: functional and histological evaluation. *Spinal Cord*. 2016;54(6):439-44.
33. Kuchner EF, Hansebout RR. Combined steroid and hypothermia treatment of experimental spinal cord injury. *Surg Neurol*. 1976;6(6):371-6.
34. Cristante AF, Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*. 2013;51(6):501-7.
35. Allen AR. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 1914;41(3):141-7. Disponível em: [http://journals.lww.com/jonmd/Citation/1914/03000/Remarks\\_on\\_the\\_Histopathological\\_Changes\\_in\\_the.2.aspx](http://journals.lww.com/jonmd/Citation/1914/03000/Remarks_on_the_Histopathological_Changes_in_the.2.aspx). Acessado em 2017 (13 fev).
36. Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*. 1971;35(6):700-8.
37. Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. *J Neurosurg*. 1971;35(3):277-86.
38. Wagner FC Jr, Dohrmann GJ, Bucy PC. Histopathology of transitory traumatic paraplegia in the monkey. *J Neurosurg*. 1971;35(3):272-6.
39. Dohrmann GJ, Panjabi MM, Wagner FC Jr. An apparatus for quantitating experimental spinal cord trauma. *Surg Neurol*. 1976;5(5):315-8.
40. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest*. 1978;39(3):236-53.

41. Ducker TB, Salzman M, Perot PL Jr, Ballantine D. Experimental spinal cord trauma, I: Correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg Neurol.* 1978;10(1):60-3.
42. Rivlin AS, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J Neurosurg.* 1978;49(6):844-53.
43. Tator CH, Rowed DW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453-64.
44. Lohse DC, Senter HJ, Kauer JS, Wohns R. Spinal cord blood flow in experimental transient traumatic paraplegia. *J Neurosurg.* 1980;52(3):335-45.
45. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol.* 1985;88(1):123-34.
46. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1953;70(6):813-9.
47. Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol.* 1985;88(1):135-49.
48. Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. *Exp Neurol.* 1987;95(2):530-3.
49. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma.* 1992;9(3):197-217.
50. 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.

51. Basso D, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996;139(2):244-56.
52. Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 1992;9:123-6.
53. Rodrigues NR. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.
54. Vialle LRG, Fischer J, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos [Histologic study of experimental spinal cord lesion in rats]. *Rev Bras Ortop*. 1999;34(2):85-9.
55. Metz GA, Curt A, van de Meent H, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17(1):1-17.
56. Agrawal G, Kerr C, Thakor NV, All AH. Characterization of graded multicenter animal spinal injury study contusion spinal cord injury using somatosensory-evoked potentials. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;35(11):1122-7.
57. Ferreira R, Oliveira AR, Barros Filho TEP. Padronização da técnica para captação do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana [Standardization of motor evoked potential captivation technique in rats through transcranial electric stimulus]. *Acta Ortop Bras*. 2005;13(3):112-4.
58. Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1969;30(6):693-7.



59. Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg Neurol*. 1975;4(6):531-6.
60. De La Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evaluation of permanent experimental spinal cord trauma. *Neurology*. 1975;25(6):508-14.
61. Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep's spinal cord. *Paraplegia*. 1977;14(4):276-85.
62. Means ED, Anderson DK, Waters TR, Kalaf L. Effect of methylprednisolone in compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg*. 1981;55(2):200-8.
63. de la Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1981;6(4):315-35.
64. Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg*. 1982;56(1):106-13.
65. Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg*. 1982;57(5):667-73.
66. Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1983;59(2):256-61.
67. Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis. *J Neurosurg*. 1984;61(1):124-30.

68. Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1985;2(4):257-67.
69. Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, Shepard MJ, Wagner FW, Silten RM, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA*. 1984;251(1):45-52.
70. Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, et al. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury. Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg*. 1985;63(5):704-13.
71. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1992;76(1):13-22.
72. Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg*. 1993;79(4):500-7.
73. Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol*. 1996;138(2):261-76.
74. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *National Acute Spinal Cord Injury*. *JAMA*. 1997;277(20):1597-604.
75. Gebrin AS, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TEP, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular [Perspectives of recuperation of spinal cord injuries]. *Rev Bras Ortop*. 1997;32(2):103-8.

76. Delamarter RB, Coyle J. Acute management of spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg.* 1999;7(3):166-75.
77. Jeffery ND, Blakemore WF. Spinal cord injury in small animals 2. Current and future options for therapy. *Vet Rec.* 1999;145(7):183-90.
78. Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J.* 1999;40(4):313-20.
79. Bracken MB. Pharmacological interventions for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD001046.
80. Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord.* 2000;38(5):273-86.
81. Bracken MB. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S47-54.
82. Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *J Spinal Cord Med.* 2001;24(3):142-6.
83. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma.* 2001;18(5):533-43.
84. Barros Filho TEP, Oliveira RP, Tsanaclis AM, Barros EMKP, Cristante AF, Palma RM, Santos CV, Marcon RM. An experimental model for the transplantation of fetal central nervous system cells to the injured spinal cord in rats. *Revista do Hospital das Clínicas* 2002; 57:257-264.
85. Merola A, O'Brien MF, Castro BA, Smith DA, Eule JM, Lowe TG, et al. Histologic characterization of acute spinal cord injury treated with intravenous methylprednisolone. *J Orthop Trauma.* 2002;16(3):155-61.

86. Cristante AF, Barros-Filho TE, Tatsui N, Mendrone A, Caldas JG, Camargo A, et al. Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord*. 2009;47(10):733-8.
87. Marcon RM, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Cristante AF, Taricco MA, Colares G, et al. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [Experimental study on the action of methylprednisolone on Wistar rats before spinal cord injury]. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(1):26-30.
88. Dittgen T, Pitzer C, Plaas C, Kirsch F, Vogt G, Laage R, et al. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) improves motor recovery in the rat impactor model for spinal cord injury. *PLoS One*. 2012;7(1):e29880.
89. Marcon RM. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.
90. Park SJ, Oh IS, Kwon JY, Ha KY. The effect of irradiation and methylprednisolone in spinal cord injured rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(6):434-40.
91. Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar [Standardization of spinal cord injury in Wistar rats]. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(4):182-6.
92. Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar [Spinal cord injury experimental model and motion evaluation protocol in wistar rats]. *Acta Ortop Bras*. 2011;19(2):87-91.

93. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. COBEA. Princípios éticos. Available from: [http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65) Acessado em 2017 (22 mar).
94. Borgens RB, Liu-Snyder P. Understanding secondary injury. *Q Rev Biol.* 2012;87(2):89-127.
95. Cheung V, Hoshide R, Bansal V, Kasper E, Chen CC. Methylprednisolone in the management of spinal cord injuries: Lessons from randomized, controlled trials. *Surg Neurol Int.* 2015;6(2):142.
96. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1999;44(5):1027-39; discussion 1039-40.
97. Hurlbert RJ. Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(11 Suppl):S16-21; discussion S36.
98. Sakuma T, Yamazaki M, Okawa A, Takahashi H, Kato K, Hashimoto MM, et al. Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for patients with worsening symptoms of thoracic myelopathy: a multicenter prospective controlled trial. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012;37(17):1475-8.
99. Campos MF De, Ribeiro AT, Listik S, Pereira CADB, Andrade Sobrinho J, Rapoport A. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral [Epidemiology of spine injuries]. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(2):88-93.
100. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyan J, Paul JC, Lafage V, et al. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord.* 2014;52(8):588-95.