



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

WALTHER AUGUSTO DE CARVALHO

AJUSTES MOTORES COMPENSATÓRIOS APÓS LESÃO

ISQUÊMICA FOCAL UNILATERAL DO TRATO

CORTICOESPINHAL

BELÉM - PARÁ

2017

WALTHER AUGUSTO DE CARVALHO

**AJUSTES MOTORES COMPENSATÓRIOS APÓS LESÃO ISQUÊMICA
FOCAL UNILATERAL DO TRATO CORTICOESPINHAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pereira Junior

Coorientador: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

BELÉM – PARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Carvalho, Walther Augusto de

Ajustes motores compensatórios após lesão isquêmica focal unilateral do trato corticoespinal / Walther Augusto de Carvalho ; Orientador, Antônio Pereira Junior ; Co-orientador, Carlomagno Pacheco Bahia. - 2017.

98 f.: il.

Inclui bibliografia

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Medula espinal – ferimentos e lesões. 2. Trato piramidal. 3. Capacidade motora. I. Pereira Junior, Antônio, orientador. II. Bahia, Carlomagno Pacheco. III. Título.

CDD – 22 ed. 616.73

WALTHER AUGUSTO CARVALHO

**AJUSTES MOTORES COMPENSATÓRIOS APÓS LESÃO ISQUÊMICA FOCAL
UNILATERAL DO TRATO CORTICOESPINHAL**

Tese de doutorado apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, como requisito para a obtenção do título de doutor em NEUROCIÊNCIAS pelo programa de pós-graduação em neurociências de biologia celular do Instituto de Ciências Biológicas.

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Vânia Corrêa Castro
Instituto de Ciências da Saúde - FO

Prof. Dr. Enio Mauricio Neri dos Santos
Instituto de Ciências Biológicas - FB

Prof. Dr. Marcelo Marques Cardoso
Instituto de Ciências da Saúde – FFTO

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
Instituto de Ciências da Saúde – FFTO
Professor Coorientador

Prof. Orientador Dr. Antônio Pereira Júnior
Instituto de Tecnologia - FEED
Professor Orientador – Presidente da Banca Examinadora

Belém, trinta de junho de 2017

DEDICATÓRIAS

Dedico essa tese aos meus pais Antônio Rodrigues de Carvalho e Neuza Diniz de Carvalho. Foi um caminho muito longo e não teria sido possível sem o amor, a dedicação e o carinho de vocês. Obrigado por proverem minhas necessidades materiais, afetivas e espirituais. A maior herança que meus queridos pais me deixam eu usufruo diariamente, quais sejam a educação e o carácter.

Dedico essa tese aos meus irmãos Fátima Cristina de Carvalho e Antônio Augusto de Carvalho, que de maneira diferente sempre me incentivaram a voar mais alto. Sinto-me um privilegiado de poder apresentar a vocês os resultados deste trabalho.

Dedico à minha esposa Cláudia Pires Rothbarth e filha Rafaela Rothbarth de Carvalho, minhas maiores incentivadoras e que estão ao meu lado por todos os momentos de felicidade e dificuldade. Meu amor por vocês cresce a cada dia.

Dedico em especial ao meu tio José Augusto de Carvalho (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Pará, instituição que permitiu-me cursar todas as etapas da formação profissional e acadêmica, pela oportunidade de participar deste programa de pós-graduação.

Agradeço ao Centro Universitário do Estado do Pará pela oportunidade, apoio e incentivo incondicional de participar desta capacitação profissional. Isto confirma sua preocupação com o desenvolvimento de um corpo docente qualificado.

Agradeço ao meu orientador e amigo de quase duas décadas, Prof. Dr. Antônio Pereira pela paciência e tenacidade. Já se foram muitas garrafas de vinho de convívio e confiança. Sem o seu incentivo eu certamente teria desistido.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, que contribuiu de maneira especial para a elaboração e execução deste trabalho. Nosso convívio no Laboratório de Neuroplasticidade permitiu-me o desenvolvimento de inúmeras habilidades profissionais.

Aos professores que tive a oportunidade de conviver durante o processo de doutoramento e que são egressos deste mesmo Programa de Pós-Graduação: Prof. Dr. Enio Maurício Nery dos Santos, Prof. Dr. Marcelo Marques Cardoso, Prof. M.Sc. Otávio Augusto de Araújo Folha, Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima e Prof^a. Dra. Vânia Corrêa. Cada um de vocês deu alguma contribuição para a execução desta tese.

Agradeço ao prof. Dr. Wallace Gomes Leal, que nos recebeu em seu laboratório nos primeiros e mais difíceis momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimento especial à M.Sc. Gisele Aguiar, ao M.Sc. Mário Santos Barbosa Júnior, a M.Sc. Sussiane Suely Santos da Fonseca e a Prof^a. M.Sc. Ivanira Amaral Dias pelo laço de amizade, paciência e apoio nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

Aos amigos de pós-graduação: Celice Cordeiro de Souza, Soanne Chyara Silva Soares, Rosana Telma Lopes Afonso, Nelson Elias Abrahão da Penha e Klebson de Jesus Araújo Rodrigues. A jornada foi mais leve e divertida na companhia de vocês.

Agradecimento especial à Jéssica Costa Teixeira, “filha” única sobrevivente da minha orientação de iniciação científica. Obrigado por todas as contribuições que você deu a esse trabalho. Não teria sido possível sem sua ajuda.

Aos amigos, colegas e parceiros do LNP: Vanessa Marinho, Erika Oliveira, Natacha Medeiros de Souza Port's, Gabriel Mesquita Bahia e vários dos que já foram citados acima, obrigado pelas conversas divertidas, pelos protocolos trocados, pela companhia nas longas horas de cirurgia e bancada, pelos lanches coletivos, pelas festas de aniversário, confraternizações de fim de ano, parcerias em retiros e congressos científicos, enfim pelo convívio ao longo destes anos. A amizade de vocês está guardada de maneira indelével do lado esquerdo do peito.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, agradeço a todos em nome de Maria do Socorro Sales de Andrade. Obrigado pela receptividade, carinho e amizade.

“ A essência de um homem do meu tipo
reside no que penso, não no que sinto”
ALBERT EINSTEIN

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo modelo de lesão química da medula espinhal causada por isquemia transitória focal e unilateral após microinjeção de endotelina-1 (ET-1) no funículo dorsal e avaliar as alterações sensório-motoras da pata anterior de ratos (*Wistar*). Dos cinquenta (n = 50) animais (CEPAE/UFPA protocolo BIO0079-12), que foram treinados, trinta e três (n = 33) foram selecionados para compor os grupos controle (n = 15), sham (n = 6) e lesão (n = 12). Pelo uso de micropipeta foi injetado a profundidade de 1 mm a partir da superfície pial da medula espinhal o volume de 250 nL de solução salina (sham) ou ET-1 (lesão) próximo à artéria dorsal média da medula espinhal, no segmento cervical C4. A ET-1 provocou formação de cavidade cística amórfica de $0,421 \text{ mm}^2 (\pm 0,035 \text{ mm}^2, n=3)$ sobre o trato corticoespinhal e substância branca suprajacente, ipsilateral ao sítio de microinjeção que pode ser medido em cortes transversais (50 μm) corados pela técnica de Nissl. As funções motoras das patas anteriores foram avaliadas por testes sensório-motores específicos antes e após lesão em 3, 7 e 14 dias. Os resultados foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA com análise post-hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados mostram, através do teste do manuseio do macarrão, que após a lesão ocorre um comportamento motor de compensatório onde a pata não-preferencial assume as funções da pata preferencial. O teste do “*Staircase*” revelou decréscimo da capacidade apreensão do objeto com a pata preferencial e o teste de extensão da pata mostrou que houve diminuição da sensibilidade.

Palavras-chave: Lesão química. Endotelina-1. Tracto corticoespinhal. Alterações sensório-motoras.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a new model of spinal cord injury caused by focal and unilateral transient ischemia after ET-1 microinjection in the dorsal funiculus and to evaluate the sensorimotor alterations of the anterior paw of rats (Wistar). Fifty (n = 50) animals (CEPAE / UFPA protocol BIO007912), who were trained, thirty-three (n = 33) were selected to compose control (n = 15), sham (n = 6) and injury (n = 12) groups. By using a micropipette, we injected the volume of 250 nL of saline (sham) or endothelin-1 (lesion) near the medial dorsal artery of the cervical segment C4 at a depth of 1 mm from the pial surface of the spinal cord. ET-1 induced cystic cavity formation of 0.421 mm² (\pm 0.035 mm², n = 3) on the corticospinal tract and suprajacent white matter, ipsilateral to the microinjection site that can be measured in cross-sections (50 μ m) stained by the Nissl technique. The motor functions of the forepaw were evaluated by specific sensorimotor tests before and after injury at 3, 7 and 14 days. The results were evaluated by the ANOVA statistical test with Tukey post-hoc analysis (α = 0.05). Our results show in pasta test that after injury there is a compensatory motor behavior in which the non-preferential forepaw assumes the functions of the preferential forepaw. The Staircase test revealed a decrease in the ability to grasp the object with the preferred paw and the Contact test showed a decrease in sensitivity of the preferred paw

Keywords: Chemical lesion. Endotelin-1. Corticospinal tract. Sensory-motor imperments.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Desenho esquemático das estruturas da medula espinhal. À direita, comunicação de via dupla entre a medula espinhal e a periferia. À esquerda, informações dentro da medula espinhal trafegam para e a partir de centros encefálicos superiores. Adaptado de DARBY (2014).....	20
Figura 02: Desenho esquemático do suprimento sanguíneo arterial da medula espinhal mostrando as artérias espinhal e radículo medular. Em A, vista anterior. Em B, vista posterior. Adaptado de DARBY (2014).....	22
Figura 03: Desenho esquemático de secção transversal da medula espinhal mostrando o suprimento sanguíneo arterial. Em A, artérias radículo medulares suprem as artérias espinhais. Em B, notar as áreas da medula espinhal vascularizadas pela artéria espinhal anterior e posterior. Adaptado de DARBY (2014).....	23
Figura 04: Representação esquemática da correlação entre lesão traumática da medula espinhal nas diferentes regiões da medula espinhal e suas consequências funcionais (Adaptado de NSCISC, 2014).	26
Figura 05: Equipamento computadorizado para impacto na medula espinhal por queda de peso <i>NUY Impactor</i> . Em A, vista geral dos equipamentos necessários para controle do dispositivo de impacto. Em B, vista frontal do dispositivo de impacto. Em C, vista lateral do dispositivo de impacto. Adaptado de Galvão <i>et al.</i> (2011).	29
Figura 06: Mecanismos de LME por compressão. Em A, desenho esquemático da aplicação do clipe de aneurisma FEJOTA™, 13 mm de comprimento. Em B, desenho esquemático do local da laminectomia, posição do catéter com o balão na extremidade e a extensão da análise histológica. Em C, desenho esquemático da região torácica da medula espinhal onde foi aplicada compressão lateral com fórceps do tipo Dumont 0,35 mm de espaço. Em D, estrangulamento com fio de sutura. Adaptado de JOSHI e FEHLINGS (2002), VANICKY <i>et al</i> (2001), STREIJGER <i>et al.</i> (2011) e da COSTA <i>et al.</i> (2008).....	30
Figura 07: Grampos ajustáveis utilizados para fixação do corpo da vértebra. Em A o grampo aberto e em B o fechado no corpo vertebral, logo abaixo do processo transversal. Em C, a seta indica o sentido do movimento capaz de gerar a lesão medular pelo alongamento das vértebras. Adaptado de Choo <i>et al.</i> (2009).	31
Figura 08: Dispositivo de lesão por deslocamento. Em A o desenho esquemático e em B a fotografia do rato posicionado no estereotáxico e o sistema de eixos utilizados para produzir o deslocamento lateral da coluna vertebral. Em C, uma representação esquemática das linhas de tensão que provocam a lesão medular. Adaptado de Fiford <i>et al.</i> (2004).....	32
Figura 09: Desenho esquemático do modelo experimental. Notar o curso temporal do experimento, desde o período de adaptação dos animais no biotério de manutenção do Laboratório de Neuroplasticidade até o estágio de processamento histológico do tecido nervoso da medula espinhal.	40
Figura 10: Desenho esquemático do modelo experimental de lesão focal do tracto corticoespinhal por isquemia após microinjeção do peptídeo vasoconstrictor ET-1.	44

Figura 11: Teste do macarrão. Um ensaio experimental mostrando a sequência típica dos movimentos de manipulação. (A-F) O animal usa um padrão de preensão assimétrico para manusear o macarrão. As patas direita e esquerda neste exemplo são designadas como pata de "segurar" e de "guiar", respectivamente. A pata preferencial (PP) é a que segura o macarrão (pata direita). A pata que guia o macarrão é a pata não-preferencial (PNP) (pata esquerda). (Fonte: do Autor).....	45
Figura 12: Teste do <i>staircase</i> . Animais deslizavam pela superfície de uma plataforma de onde tinham acesso à duas escadarias (lados esquerdo e direito). Em cada degrau das escadarias foram colodados duas pelotas de açúcar. O animal permaneceu no aparato de teste por 15 min. (Fonte: do Autor).....	48
Figura 13: Teste de extensão da pata. O teste consiste em tocar o dorso da pata anterior em uma superfície sólida (seta em A) e observar se o animal estende a pata, estende e abduz os dedos para tocar na superfície da mesa (círculo em B). (Fonte: do Autor).....	49
Figura 14: Registro de base do teste do macarrão comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para os ajustes por peça. Em A, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0.04211$ e $P = 0.9589$). e em B, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 1.455$ e $P = 0.2646$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os grupos para o registro de base.....	53
Figura 15: Registro de base do teste do macarrão comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o tempo necessário para comer cada peça de macarrão ($F_{(2,24)} = 1,036$ e $P = 0,3703$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os grupos para o registro de base.....	53
Figura 16: Registro de base do teste do macarrão comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para taxa de ajustes. Em A, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,06649$ e $P = 0,9358$) e em B, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,732$ e $P = 0,0853$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os grupos no resgitro de base.....	54
Figura 17: Registro de base do teste do “ <i>Staircase</i> ” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de pelotas de açúcar recuperadas com as patas. Em A, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,2727$ e $P = 0,7636$) e em B, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,283$ e $P = 0,1236$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.	55
Figura 18: Registro de base do teste do “ <i>Staircase</i> ” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de pelotas de açúcar recuperadas com a boca. Em A, lado da pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,6161$ e $P = 0,5484$) e em B, lado da pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 1,333$ e $P = 0,2824$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados. ...	56
Figura 19: Registro de base do teste do “ <i>Staircase</i> ” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número total de pelotas de açúcar alcançadas. Em A, lado da pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,003244$ e $P = 0,9968$) e em B, lado da pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,563$ e $P = 0,0980$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.	57
Figura 20: Registro de base do teste do “ <i>Staircase</i> ” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número total de pelotas de açúcar deixadas no aparato de teste. Em A, lado da pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,3311$ e $P = 0,7214$) e em B, lado da pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,726$ e $P = 0,0857$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.	58
Figura 21: Registro de base do teste do “ <i>Staircase</i> ” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de pelotas derrubadas. Em A, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,7434$ e $P =$	

0,4861) e em B, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 0,07414$ e $P = 0,9288$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.....	59
Figura 22: Registro de base do teste de extensão da pata comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de respostas. Em A, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,9639$ e $P = 0,3957$) e em B, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 1,737$ e $P = 0,1974$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.....	60
Figura 23: Fotomicrografias de secções coronais da medula espinhal (50 μ m), na região cervical C4, coradas pela técnica de Nissl. Em A um animal do grupo sham, mostrando o H medular preservado. Em B e C animal do grupo lesão, mostrando a presença de uma cavitação (*) cística sobre o trato corticoespinhal e substância branca suprajacente. Barra de escala de 1 mm.....	61
Figura 24: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do macarrão, com base no número médio de ajustes motores realizados com as patas preferencial (PP) e não-preferencial (PN), tanto no grupo sham (A-D, E-H) quanto lesão (I-M, O-R), respectivamente. Ratos costumam usar a pata preferencial para fazer movimentos de flexão/extensão (Ex/FI) e abdução/adução (Ab/Ad). A pata não-preferencial, por outro lado, realiza movimentos de liberar/contactar (L/C). Em A $F_{(3,44)} = 509,9$ e $P < 0,0001$. Em B $F_{(3,44)} = 3.338$ e $P < 0,0001$. Em C $F_{(3,44)} = 384,1$ e $P < 0,0001$. Em D $F_{(3,44)} = 929,8$ e $P < 0,0001$. Em I $F_{(3,44)} = 460,1$ e $P < 0,0001$. Em N $F_{(3,44)} = 673,0$ e $P < 0,0001$. Em O $F_{(3,44)} = 423,3$ e $P < 0,0001$. Em P $F_{(3,44)} = 792,1$ e $P < 0,0001$	64
Figura 25: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no tempo (em s) necessário para o animal comer cada pedaço de macarrão, tanto no grupo sham ($F_{(3,20)} = 18,80$ e $P < 0,0001$) quanto lesão ($F_{(3,20)} = 31,15$ e $P < 0,0001$).....	65
Figura 26: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do macarrão, com base na taxa de ajustes motores das patas. Em A pata preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 97,07$ e $P < 0,0001$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 118,2$ e $P < 0,0001$). Em B pata não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 9,522$ e $P = 0,0004$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 59,21$ e $P < 0,0001$).....	66
Figura 27: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do “Staircase”, para o total de pelotas recuperadas. Em A pata preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 2,465$ e $P = 0,0920$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 44,36$ e $P < 0,0001$). Em B pata não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,2479$ e $P = 0,8618$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 1,213$ e $P = 0,03307$).	67
Figura 28: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do “Staircase”, para o total de pelotas recuperadas com a boca. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,1905$ e $P = 0,9016$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 2,637$ e $P = 0,0777$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,8835$ e $P = 0,4664$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 3,797$ e $P = 0,0264$).	68
Figura 29: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do “Staircase”, para o total de pelotas alcançadas. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 3,151$ e $P = 0,0476$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 46,23$ e $P < 0,001$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,2427$ e $P = 0,8655$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 5,377$ e $P = 0,0070$).	69
Figura 30: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do “Staircase”, para o total de pelotas deixadas. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 2,204$ e $P = 0,1192$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 3,720$ e $P = 0,0283$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,6479$ e $P = 0,5934$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 2,512$ e $P = 0,0878$).	70
Figura 31: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do “Staircase”, para o total de pelotas derrubadas. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 1,190$ e $P = 0,3386$) e grupo lesão	

($F_{(3,20)} = 14,06$ e $P < 0,001$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,8709$ e $P = 0,4726$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 3,846$ e $P = 0,0253$). 70

Figura 32: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinal no teste do “*Staircase*”, para o percentual de sucesso na tarefa motora de recuperar as pelotas de açúcar. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 3,150$ e $P = 0,0476$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 46,15$ e $P < 0,001$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,9090$ e $P = 0,4543$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 5,390$ e $P = 0,0070$). 71

Figura 33: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinal no teste de extensão da pata comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de respostas. Em A, lado preferencial ($F_{(2,24)} = 168,0$ e $P < 0,0001$) e em B, lado não-preferencial ($F_{(2,24)} = 0,2871$ e $P = 0,7530$). 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos das LME nos EUA segundo NSCISC (2014)	25
Tabela 2: Modelos de lesão medular por indução química.....	34

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Ab/Ad - Abdução/Adução

AVD - Atividades da vida diária

DPL – dia(s) pós lesão

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ET-1 - Endotelina 1

EUA - Estados Unidos da América

Ex/FI - Extensão/Flexão

IH – Infinite horizonte

L/C - Liberar/Contatar

LME – Lesão (ões) da medula espinhal

MASCIC – Multicenter animal spinal corf injury study

NSCISC - National Spinal Cord Injury Statistical Center

NSCISC – National spinal cord injury statistical center

OSU – Ohio State university

PNP - Pata não-preferencial

PP - Pata preferencial

s – segundo(s)

SfN – Society of Neuroscience

SNC – Sistema nervoso central

TCE - Trato corticoespinhal

TNT – tecido não-tecido

UBC – Iniversity of British Columbia

UTA – University of Texas at Arlington

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 ASPECTOS ANATÔMICOS DA MEDULA ESPINHAL.....	19
1.2 EPIDEMIOLOGIA, CONSEQUÊNCIAS E TRATAMENTO PRIMÁRIO DE LESÕES DA MEDULA ESPINHAL	24
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL	27
1.4 HABILIDADE MOTORA DE MEMBRO ANTERIOR EM PEQUENOS ROEDORES	35
1.6 JUSTIFICATIVA.....	36
1.7 HIPÓTESE EXPERIMENTAL	37
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	39
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	39
3.2.1 Adaptação e Treinamento	41
3.2.2 Procedimentos Cirúrgicos	41
3.2.2.1 Indução de Isquemia Transitória Focal no Trato Corticoespinal	43
3.2.3 Teste do Macarrão.....	45
3.2.4 Teste do “ <i>Staircase</i> ”.....	47
3.2.5 Teste de Extensão da Pata.....	49
3.3 PERFUSÃO E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	50
3.3.1 Análise Histológica.....	50
3.3.2 Desidratação e Montagem das Lâminas Histológicas.....	51
3.5 ESTATÍSTICA	51
4. RESULTADOS	52
4.1 TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO EM ANIMAIS INTACTOS	52
4.2 TESTE DO “ <i>STAIRCASE</i> ” EM ANIMAIS INTACTOS	55
4.3 TESTE DE EXTENSÃO DA PATA EM ANIMAIS INTACTOS	59
4.4 LESÃO MEDULAR POR ISQUEMIA FOCAL APÓS MICROINJEÇÃO DE ET-1	60
4.5 TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR	61

4.6 TESTE DO “ <i>STAIRCASE</i> ” EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR.....	66
4.6 TESTE DE EXTENSÃO DA PATA EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR.....	72
5. DISCUSSÃO.....	73
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	73
5.1.1 Considerações Técnicas	74
5.2 TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO EM ANIMAIS INTACTOS	74
5.3 TESTE DO “ <i>STAIRCASE</i> ” EM ANIMAIS INTACTOS	75
5.4 LESÃO MEDULAR POR ISQUEMIA FOCAL APÓS MICROINJEÇÃO DE ET-1	76
5.5 TESTE DE MANUSEIO DO MACARRÃO EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR.....	77
5.6 TESTE DO “ <i>STAIRCASE</i> ” EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR.....	78
5.6 TESTE DE EXTENSÃO DA PATA EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR.....	79
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS ANATÔMICOS DA MEDULA ESPINHAL

A medula espinhal (ou medula espinal) é a parte do sistema nervoso central (SNC) localizada no interior do canal da coluna vertebral, revestida pelas meninges e participa do controle da musculatura esquelética e recebe as vias de informações sensoriais dos membros e tronco (WATSON e KAYALIOGLU, 2009). Controla também vísceras e vasos sanguíneos do tórax, abdômen e pélvis. É descrita como sendo constituída de uma série de componentes segmentares, mas em adultos é na verdade um cilindro contínuo de tecido nervoso. Seu padrão segmentar é determinado pela emergência dos nervos espinhais. Raízes desses nervos agrupam-se de tal sorte que cada par emerge de um segmento vertebral (CRAVEN, 2004; DARBY, 2014).

Em seres humanos, o comprimento da medula espinhal é, em média, 45 cm em homens e 42 cm em mulheres, podendo apresentar variações de forma e tamanho em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (BARSON, 1970). Na superfície ventral da medula espinhal existe uma fissura longitudinal profunda na posição da linha média, denominada fissura mediana ventral ou fissura anterior que se estende por aproximadamente um terço do comprimento rostrocaudal e contém um prolongamento de pia-máter e ramos da artéria espinhal anterior. Em seres humanos, essa fissura mediana ventral tem aproximadamente 3 mm de profundidade, sendo mais profunda no segmento cervical C5 (DARBY, 2014; FOUNTAS *et al.*, 1998).

O assoalho da medula espinhal é formado pela comissura ventral e na superfície dorsal existe um sulco raso denominado sulco mediano dorsal ou sulco posterior. O septo dorsal, composto de tecido pial, estende-se da base deste sulco até bem próximo à substância cinzenta comissural. No porção lateral da medula espinhal existe um sulco ventrolateral indistinto e um sulco dorsolateral profundo que correspondem às origem das raízes ventral e dorsal, respectivamente (ver Figura 01). Os segmentos mais extensos da medula espinhal são encontrados na região cervical, seguidos da dos segmentos das regiões lombar, torácica e sacral, respectivamente (BARSON e SANDS, 1977; DARBY, 2014).

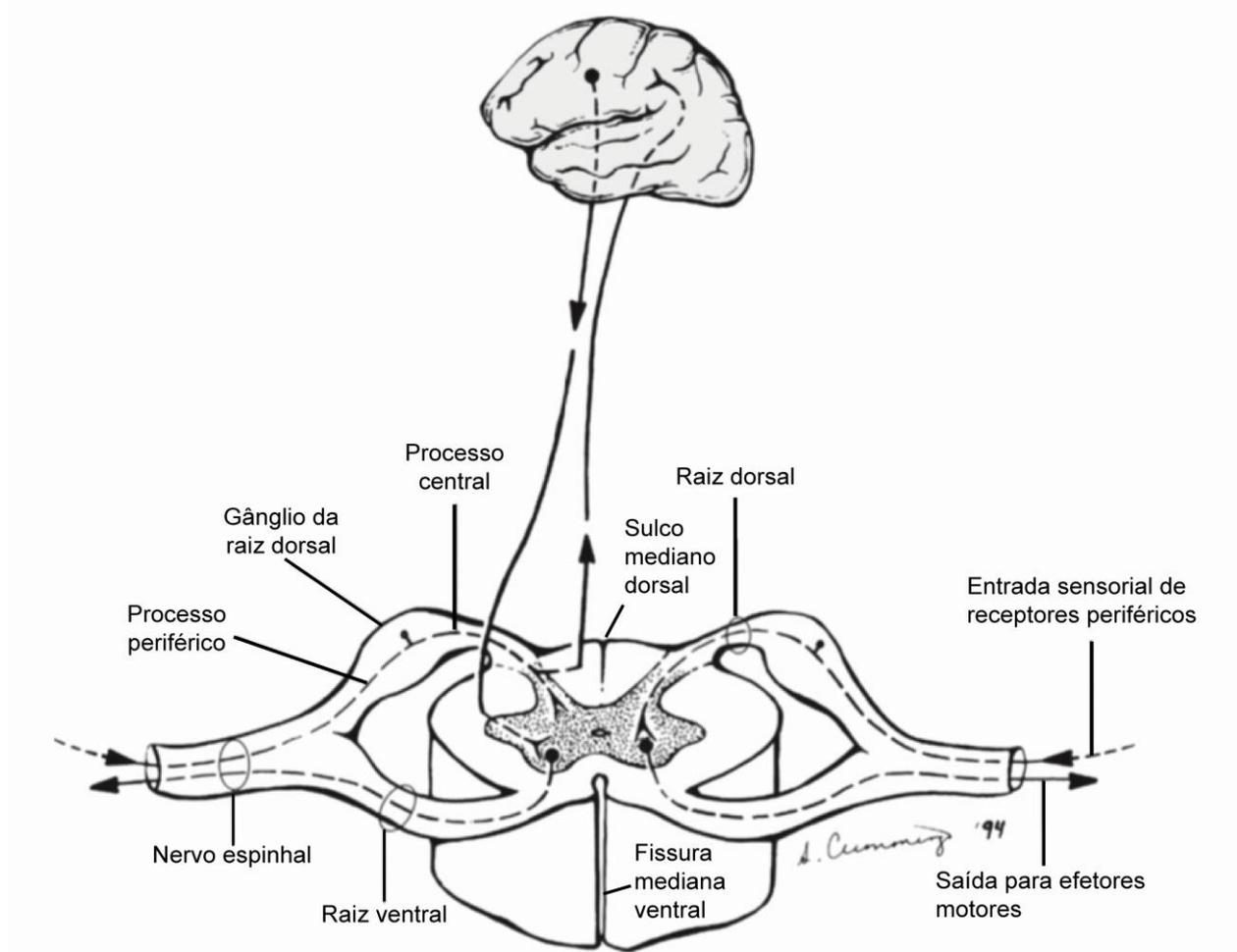


Figura 01: Desenho esquemático das estruturas da medula espinhal. À direita, comunicação de via dupla entre a medula espinhal e a periferia. À esquerda, informações dentro da medula espinhal trafegam para e a partir de centros encefálicos superiores. Adaptado de DARBY (2014).

O segmento mais extenso da medula espinhal corresponde à sétima vértebra torácica (T7), e os segmentos rostrais e caudais a partir deste são progressivamente menores; exceto para o segmento C5, correspondente à quinta vértebra cervical, que é ligeiramente maior que os outros segmentos cervicais (MALINSKA, 1972). O comprimento rostrocaudal dos segmentos da medula espinhal em humanos diminui gradualmente a partir dos segmentos cervicais superiores em direção aos segmentos T1 e T2, permanecendo constantes nos segmentos torácicos, e gradualmente aumentando entre T12 a L3 (KO *et al.*, 2004). A área da secção transversal da medula espinhal em seres humanos aumenta de C1 a C6 e então decresce rapidamente entre C8 e T2. A substância branca ocupa a maior parte da secção transversal do abaulamento cervical (KAMEYAMA *et al.*, 1996). A área da secção transversal da medula espinhal permanece constante ao longo dos

segmentos torácicos médios e inferiores, mas aumentam de novo em T12 a L4, e então começam a diminuir rapidamente abaixo de S1 (KAMEYAMA *et al.*, 1996).

A substância cinzenta da medula espinhal é muito ampliada nas regiões onde os nervos que seguem para os membros (plexos braquial e lombossacral) têm origem. Essas regiões são denominadas de abaulamento cervical e lombar, respectivamente. A área de secção transversal da região cervical da medula espinhal, em seres humanos, é de 122 mm² em C4, enquanto que é de 110 mm² em C2 e 85 mm² em C7 (SHERMAN *et al.*, 1990). Este abaulamento é devido a um aumento no diâmetro transversal (FOUNTAS *et al.*, 1998) por conter quantidade maior de substâncias branca e cinzenta. A área de secção transversal do abaulamento lombar é cerca de 50 mm² (KO *et al.*, 2004).

Externamente, a medula espinhal é vascularizada por ramos da artéria vertebral e de vasos segmentares. A artéria vertebral é um ramo da artéria subclávia que cursa através do forame dos processos transversos de vértebras cervicais (C1-C6) para entrar na fossa posterior do crânio através do forame magno. Dentro desta fossa, a artéria espinhal anterior é formada. Além disso, vasos segmentares contribuem para fornecer sangue para a medula espinhal, tendo origem fora da coluna vertebral (ver Figura 02) (BOSMIA *et al.*, 2015; DARBY, 2014).

Internamente, o tecido nervoso que constitui a medula espinhal é vascularizado por ramos da artéria espinhal anterior, segmentos anastomosantes da artéria espinhal posterior e seus vasos comunicantes. A artéria espinhal anterior dá origem a um único ramo, chamado de ramo central ou sulcal (ver Figura 03). Na região cervical da medula espinhal, esse ramo central percorre uma distância maior que aquela evidenciada nas regiões torácica, lombar e sacral. Esse ramo central penetra profundamente na fissura ventral (~ 4,5mm) e é responsável pelo suprimento sanguíneo arterial da maior parte da região ventral da medula espinhal. A artéria espinhal posterior, em conjunto com o plexo pial, vasculariza o restante da medula espinhal, incluindo os cornos e funículo dorsal e o aro mais externo dos funículos lateral e ventral (BOSMIA *et al.*, 2015). Entre os segmentos medulares C3 e T1, o topo do corno dorsal é particularmente bem vascularizado, revelando a necessidade de suprimento energético dessa região (DARBY, 2014).

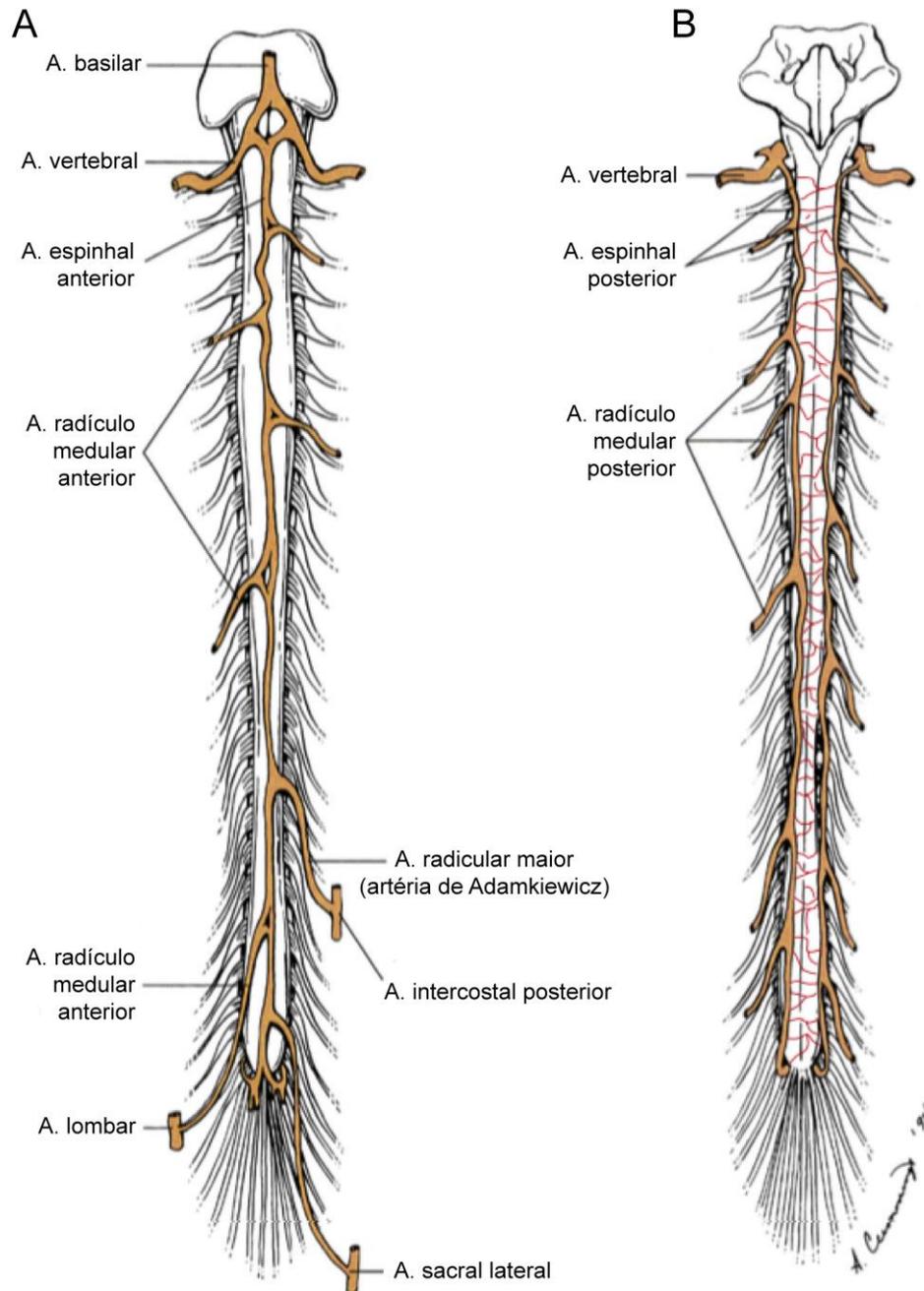


Figura 02: Desenho esquemático do suprimento sanguíneo arterial da medula espinhal mostrando as artérias espinhal e radículo medular. Em **A**, vista anterior. Em **B**, vista posterior. Adaptado de DARBY (2014).

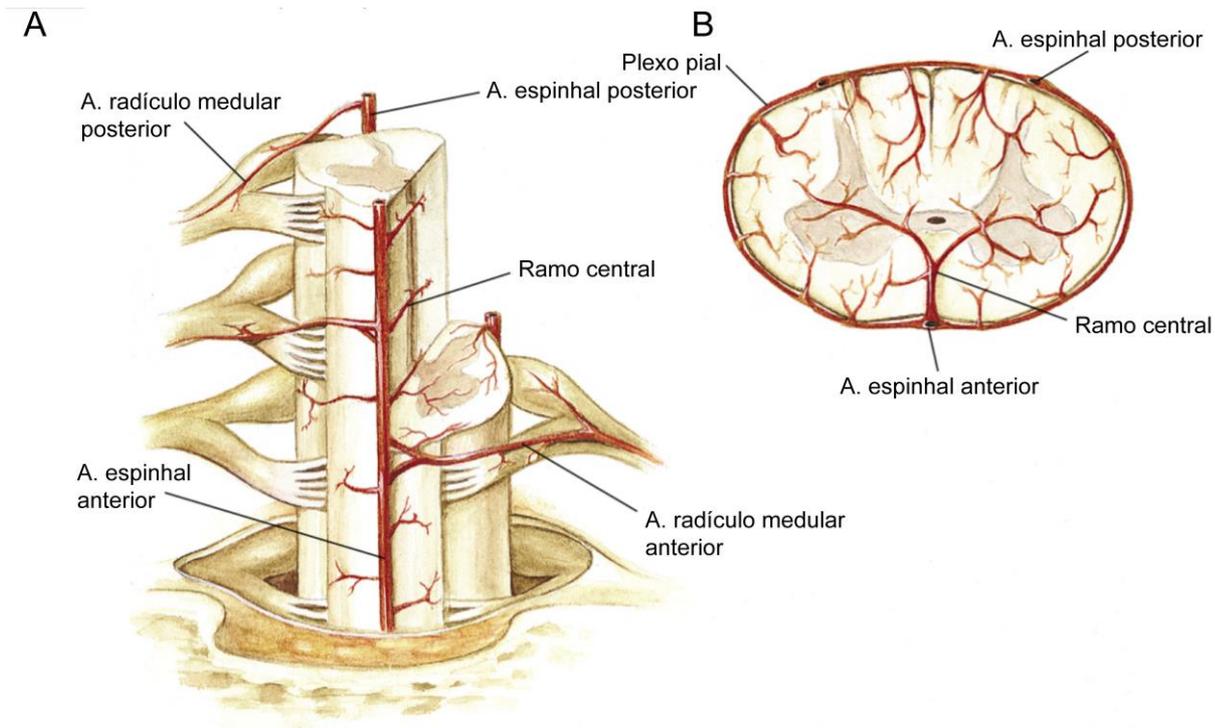


Figura 03: Desenho esquemático de secção transversal da medula espinhal mostrando o suprimento sanguíneo arterial. Em **A**, artérias radículo medulares suprem as artérias espinhais. Em **B**, notar as áreas da medula espinhal vascularizadas pela artéria espinhal anterior e posterior. Adaptado de DARBY (2014).

Estudos detalhados do suprimento sanguíneo arterial da medula espinhal demonstram que há relação direta de proporcionalidade entre o tamanho das artérias da medula espinhal anterior e radículo medular e a sua quantidade de substância cinzenta (DARBY, 2014; SCREMIN, 2009). Como a substância cinzenta tem uma demanda energética maior, a densidade capilar desta é maior que aquela observada na substância branca. Em adição, estudos anatômicos demonstraram que a densidade de neurônios nas regiões cervical e lombar da medula espinhal é maior que aquela encontrada nas regiões torácica e sacral (DUGGAL e LACH, 2002). De modo semelhante, a substância branca dessas regiões acompanha essa demanda energética sendo, portanto, mais vascularizada nas regiões cervical e lombar também (BOSMIA *et al.*, 2015).

Qualquer interrupção do suprimento sanguíneo arterial da medula espinhal, seja pela aorta, artérias segmentares, ramos radículo espinhais, artérias espinhais (anterior ou posterior) e vasos intrínsecos, pode levar à isquemia e morte celular por necrose, resultando em sérios défices funcionais.

1.2 EPIDEMIOLOGIA, CONSEQUÊNCIAS E TRATAMENTO PRIMÁRIO DE LESÕES DA MEDULA ESPINHAL

Lesões da medula espinhal (LME) podem causar prejuízos permanentes das funções sensório-motoras e autonômicas e, eventualmente, estão associadas com disfunções vitais ou sequelas neurológicas permanentes. Tais prejuízos podem resultar em distúrbios homeostáticos graves, aumentando o risco de morte durante as fases aguda ou crônica da LME (DEVIVO, 2012).

Os défices neurológicos resultantes de uma LME geralmente são permanentes, causando ônus elevado ao indivíduo, à família, aos sistemas públicos de saúde e previdenciário. Deste modo, dados epidemiológicos acurados e atualizados são indispensáveis para o planejamento e decisão das estratégias de prevenção à LME, assim como previsão de investimentos em tratamento médico e serviços de assistência social (VAN DEN BERG *et al.*, 2010).

No Brasil, a escassez de dados epidemiológicos e trabalhos científicos sobre os índices de LME impõe dificuldade à compreensão da extensão epidemiológica e consequências socioeconômicas do problema. Mesmo assim, estima-se que ocorram anualmente mais de 10 mil novos casos de LME (CAMPOS *et al.*, 2008). Segundo o *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC)¹, sediado na Universidade do Alabama (Birmingham, EUA), atualmente existem nos EUA cerca de 273 mil pessoas com alguma LME. O relatório mais recente diz que anualmente ocorrem cerca de 12 mil novos casos só nos EUA (NSCISC, 2014). Não existe informação epidemiológica suficiente para se estabelecer a prevalência global do problema.

A média de idade dos pacientes que sofreram LME é de 34,7 anos e a maioria dos casos ocorre em homens (80,7%), que se envolveram em acidentes automobilísticos (42,4%), quedas (21,8%), vítimas de violência (17,4%) ou acidente durante a prática esportiva/recreativa (10,3%) (ver Tabela 1). Pouco mais da metade das LME ocorre na região cervical da medula espinhal (53,9%) (NSCISC, 2014).

Quanto mais superior na medula espinhal for a lesão, mais severas serão as perdas funcionais do paciente (ver Figura 04). Por exemplo, uma lesão na região cervical pode resultar em

¹ <https://www.nscisc.uab.edu>

déficits sensoriais e motores tanto em membros inferiores quanto superiores, causando uma condição conhecida como tetraplegia completa (19,3%) ou incompleta (31,6%) (NSCISC, 2014), podendo prejudicar significativamente as funções sensório-motoras da mão e impor dificuldades à realização de atividades da vida diária (AVD). Lesões na região torácica, lombar ou sacral podem resultar em paraplegia completa (24,6%) ou incompleta (18,6%). Menos de 1% das vítimas de LME apresentam recuperação funcional completa após alta hospitalar (NSCISC, 2014).

Tabela 1: Dados epidemiológicos das LME nos EUA segundo NSCISC (2014)

Idade (anos)	· Faixa etária mais comum - entre 16 e 30 · Média – 34,7
Sexo	· Homem (80,7%)
Nível da lesão	· Cervical (53,9%) · C4 (14,8%), C5 (15,3%), C6 (10,3%) e C7 (5,1%)
Etiologia	· Acidente automobilístico (42,4%) · Queda (21,8%) · Violência (17,4%) · Esporte/Recreação (10,3%) · Outros/Desconhecido (8,1%)
Dano neurológico na alta hospitalar	· Tetraplegia completa (19,3%) · Tetraplegia incompleta (31,6%) · Paraplegia completa (24,6%) · Paraplegia incompleta (18,6%) · Desconhecido (≈ 4,9%) · Recuperação completa (<1%)

Em seres humanos, a habilidade de manusear objetos tem grande importância e pode ser interrompida de maneira permanente após LME cervical, com perda da capacidade de executar tarefas simples como escovar os dentes, usar talheres ou pentear os cabelos. Portanto, não surpreende que vítimas de LME cervical considerem que a recuperação das funções sensório-motoras do braço e da mão sejam de importância primordial (ANDERSON, 2004).

Há mais de seis décadas os princípios básicos para o tratamento hospitalar primário de pacientes com LME são os mesmos e consistem em proteger a medula espinhal de lesões secundárias, estabilizar a coluna vertebral para minimizar o risco de incapacitação a longo prazo e criar um ambiente favorável a recuperação neurológica máxima (FORSYTH *et al.*, 1959). A proteção do tecido nervoso por agentes farmacológicos que diminuem ou impedem a cascata secundária, lesão molecular/celular decorrente da lesão primária está bem estabelecida em modelos experimentais, no entanto, apesar dos avanços ocorridos, pouca coisa foi incorporada no tratamento de seres humanos (CHEN *et al.*, 2013; KWON *et al.*, 2010).

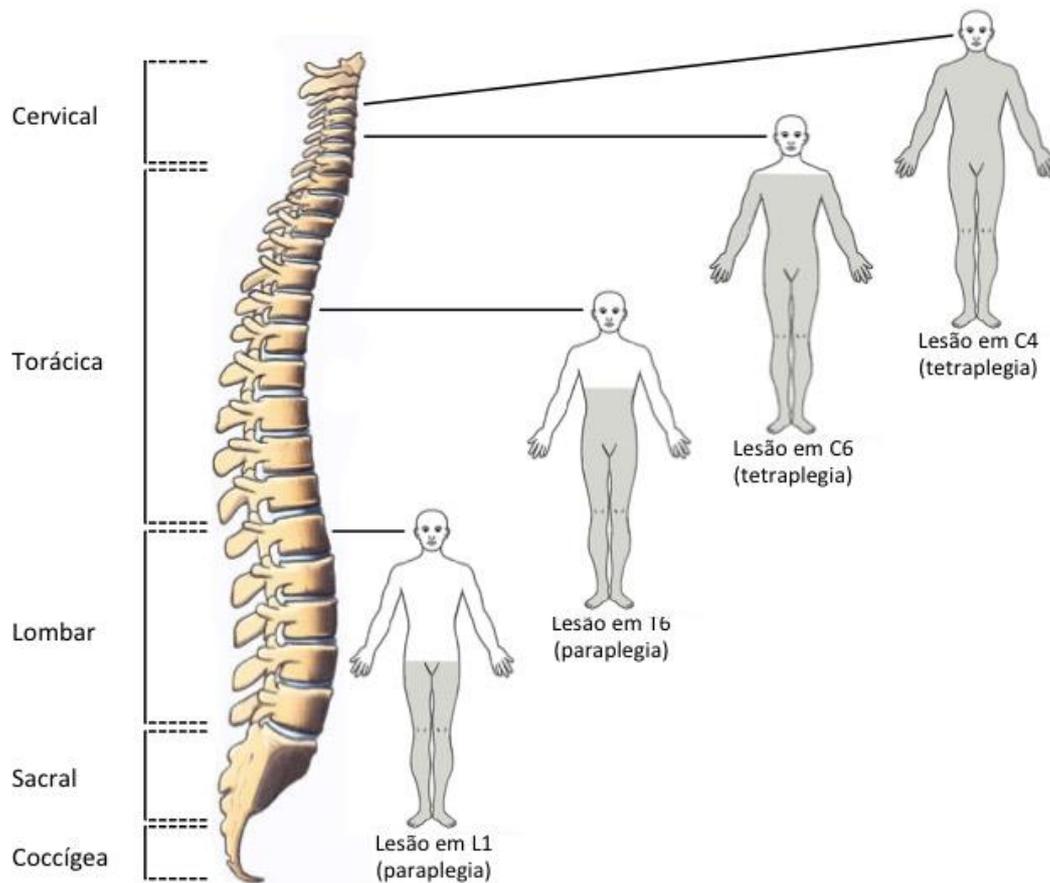


Figura 04: Representação esquemática da correlação entre lesão traumática da medula espinhal nas diferentes regiões da medula espinhal e suas consequências funcionais (Adaptado de NSCISC, 2014).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL

Modelos experimentais de lesão da medula espinhal (LME) são ferramentas largamente utilizadas com o objetivo de compreender a amplitude e as consequências, agudas ou crônicas, das diversas alterações moleculares e celulares relacionadas à LME. Com efeito, o acúmulo dessas informações oferece oportunidade para o desenvolvimento e teste de novas intervenções terapêuticas de reabilitação, objetivando a máxima recuperação anatômica e funcional dos pacientes que sofreram LME.

Por pressuposto, todo e qualquer modelo experimental deveria recriar, o mais próximo possível, as mesmas condições existentes em uma LME experimentada pelo ser humano. No entanto, há muitas diferenças entre o sistema nervoso de humanos e animais de experimentação, comumente utilizados em estudos de LME que devem ser levados em consideração. Questões como tamanho das estruturas anatômicas, aspectos gerais do funcionamento, características comportamentais, diferentes padrões de movimento e até mesmo, diferenças nas respostas imunológicas e de inflamação devem ser cuidadosamente observados, a fim de permitir o processo adequado de interpretação e translação dos resultados (COURTINE *et al.*, 2007).

Diferentes modelos experimentais podem variar quanto à espécie utilizada, local da LME e mecanismo de lesão (CHERIYAN *et al.*, 2014). Acerca das espécies mais comumente utilizadas como modelo experimentais, o rato (*Rattus norvegicus*) é de longe o animal mais utilizado para a implementação e aplicação de modelos experimentais de LME, sendo muito útil em estudos preliminares (CHERIYAN *et al.*, 2014). Sua utilização confere importante vantagem financeira devido a fácil obtenção e por reproduzirem-se de maneira eficiente em cativeiro (CENCI *et al.*, 2002). Além disso, quando comparados aos seres humanos, ratos apresentam semelhanças funcionais, eletrofisiológicas e morfológicas (CENCI *et al.*, 2002). Camundongos compartilham com ratos as mesmas vantagens, mas são particularmente úteis em estudos de genética (BLANCO *et al.*, 2007).

Há modelos de LME que utilizam primatas não humanos, como o sagui, o saimiri e o *Rhesus* (IWANAMI *et al.*, 2005). Acredita-se que esses animais apresentam semelhanças anatômicas e funcionais mais preservadas quando comparados aos humanos, permitindo a observação de variáveis de recuperação e aplicação de diferentes terapias de reabilitação (NOUT *et*

al., 2012). Macacos do novo mundo são mais vantajosos que os do velho mundo por serem menores e mais fáceis de serem manipulados e criados em colônia experimental. Há poucos trabalhos que utilizam o porco ou o cachorro como modelo experimental.

Considerando a relevância clínica, a maioria dos trabalhos experimentais de LME induzem lesão nas regiões cervical e torácica da medula espinhal (DUNHAM *et al.*, 2010). Como foi dito anteriormente, traumas cervicais compreendem mais da metade dos casos de lesão medular em seres humanos (NSCISC, 2014). Quando comparamos modelos de LME cervical com os de LME torácica, é obvio e ululante que os déficits neurológicos resultantes são diferentes e, portanto, deve-se ter cuidado com os critérios de escolha dos procedimentos terapêuticos que serão testados. Trabalhos experimental de LME na região lombar são menos comuns, mas importantes quando se deseja estudar déficits do controle vesical, da evacuação e disfunções sexuais (MAGNUSON *et al.*, 1999). Em última instância, a decisão do local da LME e do procedimento experimental de reabilitação, dependem de informações epidemiológicas e dos objetivos terapêuticos do trabalho (CHERIYAN *et al.*, 2014).

Quanto aos mecanismos de LME, existem diversos modelos experimentais que utilizam força mecânica para gerar contusão, compressão, tração ou deslocamento da medula espinhal (CHERIYAN *et al.*, 2014). Existem procedimentos cirúrgicos para causar transecção parcial, ou completa da medula, e modelos que utilizam agentes químicos (CHERIYAN *et al.*, 2014).

O modelo de lesão por contusão mais sofisticado foi criado na Universidade de Nova Iorque e foi denominado de *Impactor* (GALVÃO *et al.*, 2011; GRUNER, 1992). Neste modelo, o animal é posicionado em um dispositivo que permite fixar e estabilizar a coluna vertebral e, após laminectomia, um bastão de metal é derrubado sobre a medula espinhal criando a lesão. Diversos parâmetros podem ser utilizados e modificados tais como altura e massa do bastão, tempo e velocidade do impacto, para se estabelecer o grau de lesão e a correlação das alterações morfológicas com os déficits sensoriais e motores resultantes (ver Figura 05).

Este equipamento foi adotado pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* e passou a ser chamado de *MASCIC Impactor* (CHERIYAN *et al.*, 2014). Embora tenha sido originalmente desenvolvido para uso em ratos, este equipamento já foi adaptado para camundongo (PAN *et al.*, 2002) e sagui (IWANAMI *et al.*, 2005). Outras versões desse modelo experimental de LME foram desenvolvidas por diferentes grupos de pesquisa, resultando no *Ohio State University* (OSU)

Impactor (STOKES, 1992), no *Infinite horizon (IH) Impactor* (SCHEFF *et al.*, 2003), e no *Air Gun Impactor* (MARCOL *et al.*, 2012).

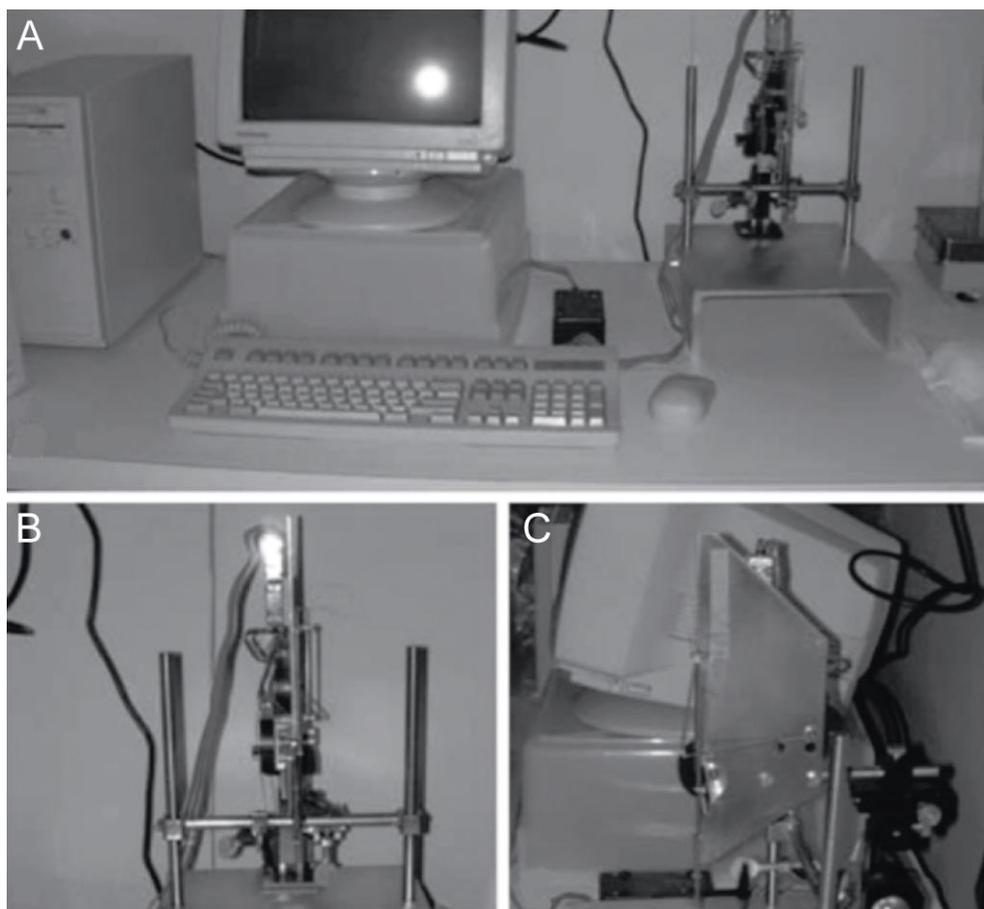


Figura 05: Equipamento computadorizado para impacto na medula espinhal por queda de peso *NUY Impactor*. Em **A**, vista geral dos equipamentos necessários para controle do dispositivo de impacto. Em **B**, vista frontal do dispositivo de impacto. Em **C**, vista lateral do dispositivo de impacto. Adaptado de Galvão *et al.* (2011).

É muito comum ocorrer acidentes que atingem a medula espinhal após fratura de vértebra e o fragmento fraturado torna-se o objeto compressor do tecido nervoso da medula espinhal. Com efeito, alguns modelos experimentais de LME por compressão são, na verdade, modelos mistos, de contusão-compressão já que envolvem um pequeno impacto agudo seguido de uma compressão prolongada da medula espinhal (CHERIYAN *et al.*, 2014). As maneiras mais comuns de se fazer uma LME experimental por compressão envolvem a utilização de clipe de aneurisma (FEHLINGS *et al.*, 1989; JOSHI e FEHLINGS, 2002; POON *et al.*, 2007), balão (BOUHY *et al.*, 2006; VANICKY *et al.*, 2001), fórceps (BRADBURY *et al.*, 1999; CAGGIANO *et al.*, 2005; GARCIA-

ALIAS *et al.*, 2008; PLEMEL *et al.*, 2008; STREIJGER *et al.*, 2011) ou estrangulamento com fio de sutura (DA COSTA *et al.*, 2008) (ver Figura 06).

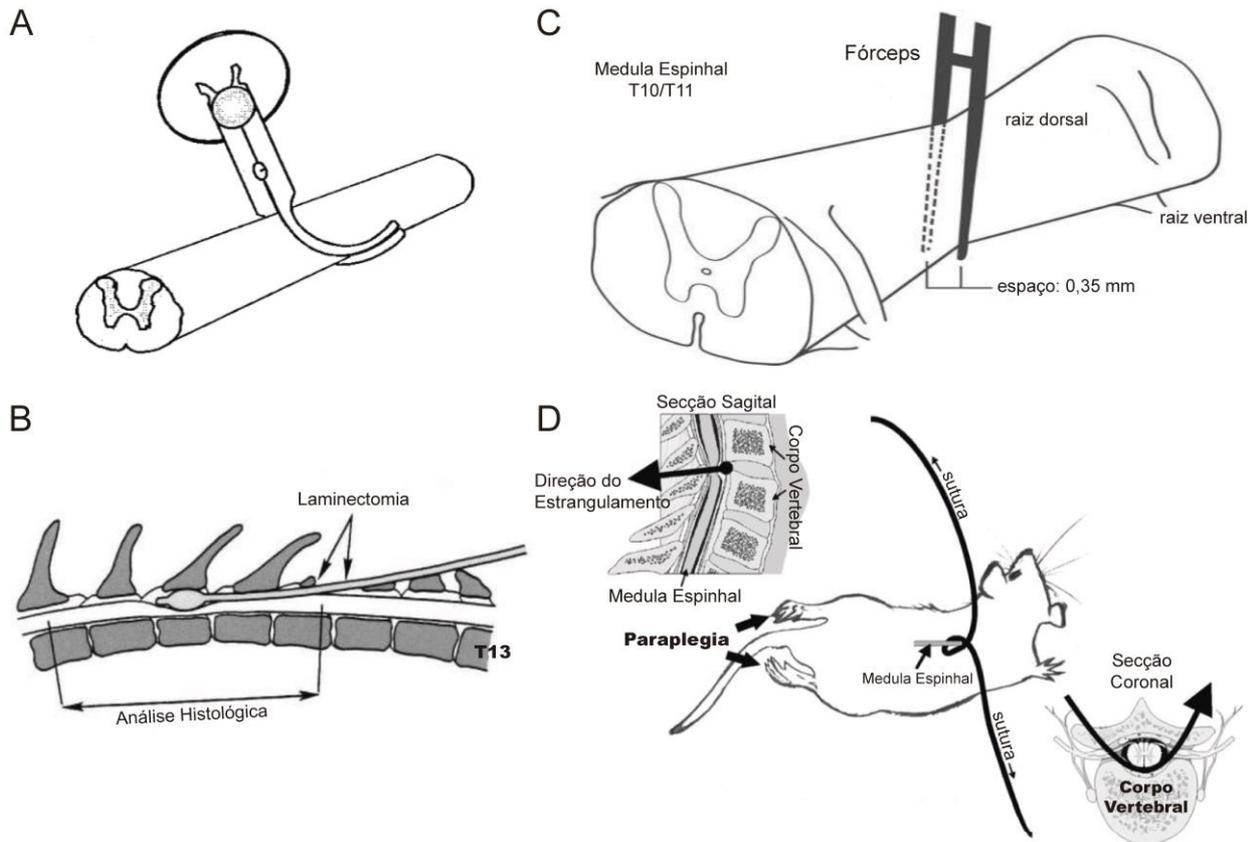


Figura 06: Mecanismos de LME por compressão. Em **A**, desenho esquemático da aplicação do clipe de aneurisma FEJOTA™, 13 mm de comprimento. Em **B**, desenho esquemático do local da laminectomia, posição do catéter com o balão na extremidade e a extensão da análise histológica. Em **C**, desenho esquemático da região torácica da medula espinhal onde foi aplicada compressão lateral com fórceps do tipo Dumont 0,35 mm de espaço. Em **D**, estrangulamento com fio de sutura. Adaptado de JOSHI e FEHLINGS (2002), VANICKY *et al* (2001), STREIJGER *et al.* (2011) e da COSTA *et al.* (2008).

Modelos de tração da medula espinhal envolvem o uso de uma força controlada para alongar a coluna vertebral e, deste modo, simular a tensão capaz de causar LME por alongamento. O uso deste modelo experimental de lesão é comum em gatos, cachorros, primatas e porcos (CHERIYAN *et al.*, 2014). No modelo de tração de *Harrington*, após laminectomia do segmento de interesse, um par de ganchos *Harrington* é colocado uma vértebra acima (rostral) e uma abaixo (caudal) do local da laminectomia e se utiliza um motor de passo para controlar o comprimento, a

velocidade e duração da tração (DABNEY *et al.*, 2004). Modelos mais sofisticados de lesão por tração foram desenvolvidos pela *University of British Columbia (UBC) multimechanism device* (CHOO *et al.*, 2009) e pela *University of Texas at Arlington (UTA) distractor* (SEIFERT *et al.*, 2011) (ver Figura 07).

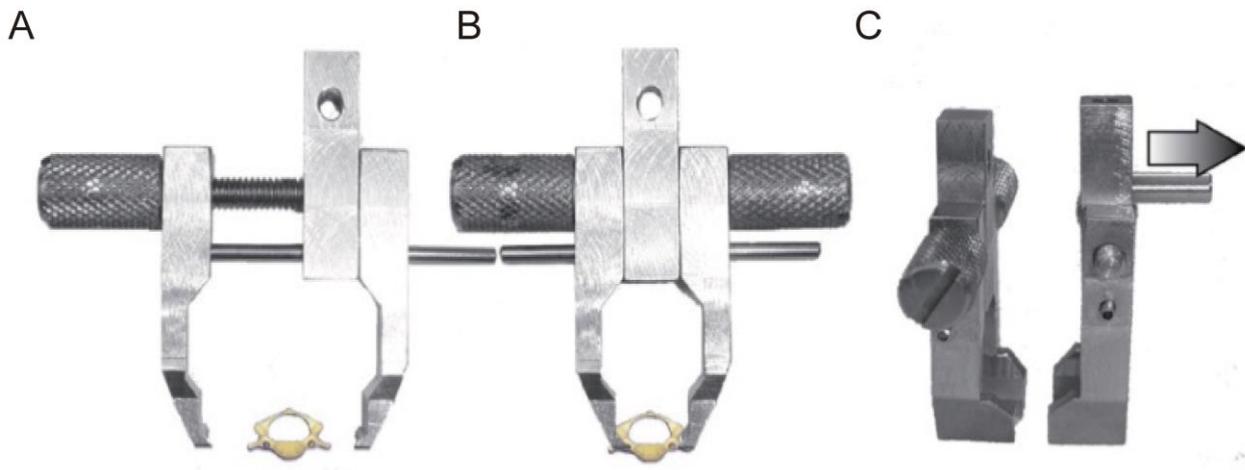


Figura 07: Grampos ajustáveis utilizados para fixação do corpo da vértebra. Em **A** o grampo aberto e em **B** o fechado no corpo vertebral, logo abaixo do processo transversal. Em **C**, a seta indica o sentido do movimento capaz de gerar a lesão medular pelo alongamento das vértebras. Adaptado de Choo *et al.* (2009).

No modelo de lesão por deslocamento, utiliza-se um dispositivo acoplado ao estereotáxico capaz de produzir um movimento vertebral comumente visto em uma lesão medular traumática (ver Figura 08). Este dispositivo é formado por dois eixos horizontais que podem ser fixados à superfície lateral do corpo de vértebras adjacentes através de cliques ajustáveis. Enquanto um eixo fica imóvel, o outro é usado para produzir um deslocamento lateral da vértebra inferior ao ponto de fixação a uma distância (1-20 mm) e velocidade específicas ($50-150 \text{ mm s}^{-1}$) por um período de 1 s (FIFORD *et al.*, 2004).

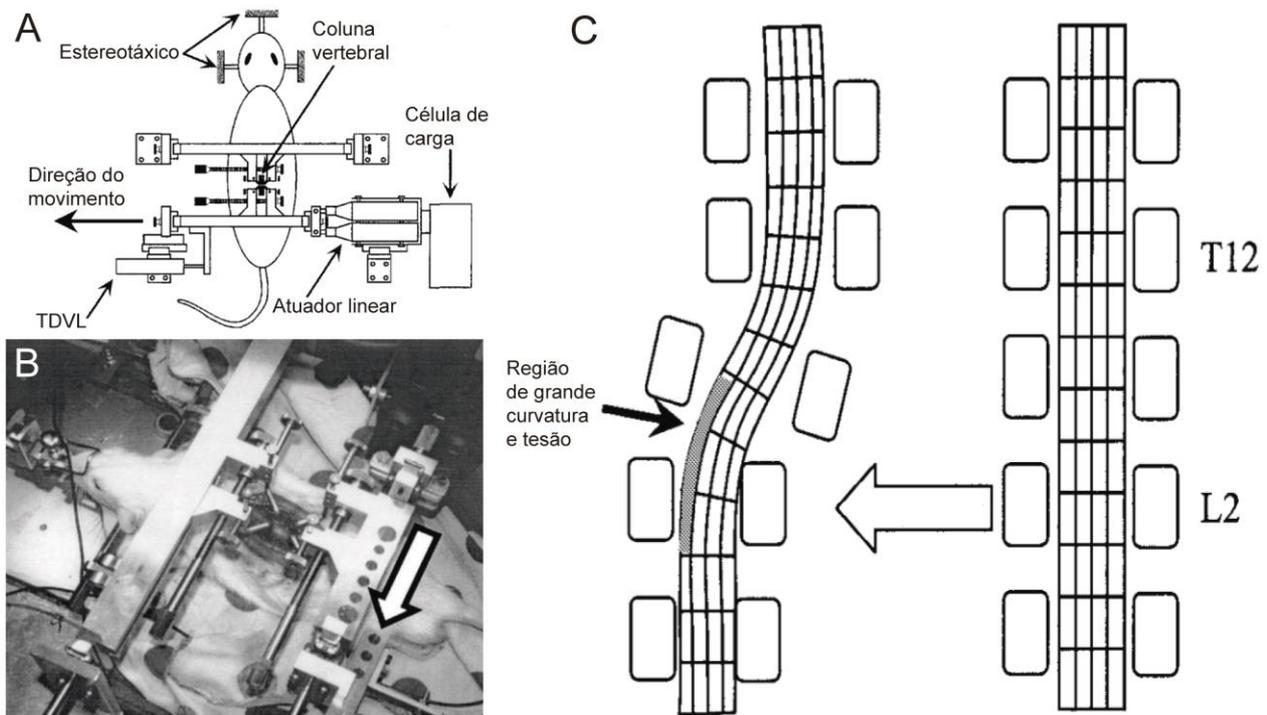


Figura 08: Dispositivo de lesão por deslocamento. Em **A** o desenho esquemático e em **B** a fotografia do rato posicionado no estereotático e o sistema de eixos utilizados para produzir o deslocamento lateral da coluna vertebral. Em **C**, uma representação esquemática das linhas de tensão que provocam a lesão medular. Adaptado de Fiford *et al.* (2004).

Modelos experimentais por transecção completa ou incompleta da medula espinhal são importantes em trabalhos de regeneração tecidual, onde se pretende estudar os mecanismos de plasticidade anatômica e funcional após LME. Contudo, este tipo de modelo experimental não é adequado para a investigação dos aspectos fisiopatológicos da lesão por se tratar de ocorrência clínica incomum (CHERIYAN *et al.*, 2014). O modelo de transecção completa corta completamente a comunicação entre os segmentos caudal e cranial da medula espinhal, tornando-se um tanto mais fácil avaliar a eficácia das intervenções terapêuticas (KWON *et al.*, 2002). Uma enorme desvantagem do modelo de transecção completa são os cuidados com o esvaziamento da bexiga urinária e a ocorrência de infecção no trato urinário (REID *et al.*, 2000). No modelo de transecção parcial é feito um corte seletivo de uma parte da medula espinhal. Dependendo da gravidade da lesão, o déficit neurológico resultante pode ser relativamente leve, tornando-se mais fácil os cuidados com o animal no pós-operatório, em especial às necessidades vesicais. Modelos de transecção parcial permitem a comparação da resposta funcional do lado lesionado com o lado contralateral saudável (LU *et al.*, 2012).

Diversos modelos de LME por indução química já foram desenvolvidos através do uso de substâncias que imitam algum aspecto específico da sequência de eventos moleculares e celulares de lesão secundária consequente do trauma na medula espinhal. Modelos dessa natureza são úteis à investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na LME, bem como o efeito de diferentes agentes terapêuticos em vias metabólicas específicas. De uma maneira geral, o uso desses modelos químicos resulta em lesão por isquemia (PIAO *et al.*, 2009; WATSON *et al.*, 1986), excitotoxicidade (LIU *et al.*, 1999), estresse oxidativo (BAO e LIU, 2002), inflação (LIU *et al.*, 2006), desmielinização (DENIC *et al.*, 2011; LINKER e LEE, 2009) ou siringomielia (LEE *et al.*, 2005). Uma limitação importante a ser considerada neste tipo de lesão experimental está relacionada a reprodutibilidade exata do local, extensão e caracterização do tipo de lesão que é produzida (CHERIYAN *et al.*, 2014).

Infelizmente, nenhum desses modelos experimentais individualmente é capaz de reproduzir de modo fiel toda a complexidade de condições físico-químicas encontradas em uma LME após acidente traumático. Este fato motiva a busca de novos modelos experimentais de lesão da medula espinhal, centrados na região cervical, e meios para avaliar a função motora do membro anterior afetado e, em particular, da mão.

Tabela 2: Modelos de lesão medular por indução química.

MODELO	MECANISMO DE AÇÃO	ANIMAL	FONTE
ISQUEMIA			
- Rosa Bengal - Eythrosin	Injeção intravenosa ou aplicação direta de corante atóxico, fotopolimerizável, seguido de irradiação da área de interesse. A extensão da lesão depende da área de irradiação.	Rato Camundongo	WATSON <i>et al.</i> , 1986 PIAO <i>et al.</i> , 2009
EXCITOTOXICIDADE			
- Glutamato - Aspartato - <i>N</i> -Metil- <i>D</i> -Aspartato - Cainato (antagonista glutamatérgico)	Injeção por técnica de microdiálise diretamente no local de interesse. A extensão da lesão depende da quantidade e concentração de droga injetada.	Rato	LIU <i>et al.</i> , 1999
ESTRESSE OXIDATIVO			
- Supeóxido - Radical de hidroxila - Peroxinitrato	Administração de agentes produtores de espécies reativas de oxigênio. A extensão da lesão depende da quantidade e concentração da droga administrada.	Rato	BAO e LIU, 2002
INFLAMAÇÃO			
- Zymosan - Fosfolipase A ₂	Injeção de partículas de levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) que ativam resposta fagocitária e cascata de inflamação diretamente no local de interesse. Injeção diretamente no local de interesse. Ativa cascata de inflamação.	Rato	LUI <i>et al.</i> , 2006
DESMIELINIZAÇÃO			
- Brometo de etídio - Lisolectina - Vírus da hepatite murina - Coquetel de anticorpos anti-mielina - Cuprizona	Injeção diretamente no local de interesse. Administrado na alimentação.	Rato Camundongo	LINKER e LEE, 2009 DENIC <i>et al.</i> , 2011
SIRINGOMIELIA			
- Caolim - Ácido quisquálico	Injeção diretamente no local de interesse. Forma uma cavidade cística preenchida de líquido.	Rato	LEE <i>et al.</i> , 2005

1.4 HABILIDADE MOTORA DE MEMBRO ANTERIOR EM PEQUENOS ROEDORES

Em ratos, a medula espinhal é constituída de 34 segmentos: 8 cervicais (C1 – C8), 13 torácicos (T1 – T13), 6 lombares (L1 – L6) 4 sacrais (S1 – S4) e 3 Coccígeos (Co1 – Co3) (HARRISON *et al.*, 2013). A maioria dos mamíferos tem um padrão segmentar regional semelhante à este pequeno roedor, exceção aqueles com caudas longas, que possuem mais segmentos coccígeos. A medula espinhal de seres humanos difere do rato por ter 8 segmentos cervicais, 12 segmentos torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e apenas 1 coccígeo, totalizando 31 segmentos (WATSON e KAYALIOGLU, 2009). O abaulamento cervical (braquial) em muitos mamíferos (incluindo roedores e primatas) se estende de C5 a T1. O abaulamento lombosacral se estende de L2 a L6 em roedores e de L2 a S2 em seres humanos. A porção mais caudal da medula espinhal se afina para formar o cone medular (*conus medullaris*). A continuação caudal do cone da medula espinhal é um longo cordão de fibras nervosas, denominado filo terminal (*filum terminale*), que se espalha desde o final da medula espinhal até o segmento vertebral L1 para se unir ao cóccix. A parte superior do filo terminal, o filo terminal intermediário, desce o saco dural circundando a cauda equina. Ela, usualmente, inicia na metade do nível L1 (coluna vertebral) e se funde com a duramáter no nível superior de S2 (WATSON e KAYALIOGLU, 2009).

Diversos trabalhos mostram que os roedores utilizam as patas anteriores de modo semelhante aos seres humanos para manusear e comer alimentos com formas, tamanhos e texturas variadas (CENCI *et al.*, 2002; IWANIUK e WHISHAW, 2000), incluindo sementes, castanhas, cereais, pequenos invertebrados, vegetais e alimentos industrializados (WHISHAW *et al.*, 1998b).

Ratos podem alcançar e agarrar objetos utilizando apenas uma das patas anteriores, apertando o objeto com movimento em pinça enquanto usam o dedo polegar opositor e o primeiro dedo ou em semi-pinça quando o objeto é mantido entre o terceiro e o quarto dedo (WHISHAW e COLES, 1996). Também são capazes de utilizar uma variedade de padrões motores assimétricos para alcançar, agarrar e guiar objetos em direção a boca, incluindo movimentos de pronação e supinação das patas anteriores, bem como extensão e flexão, adução e abdução dos dedos (ALLRED *et al.*, 2008b; WHISHAW *et al.*, 1998a).

Os movimentos voluntários especializados da pata anterior dos ratos são resultados da interação entre as aferências sensoriais periféricas e as vias supraespinhais, em especial o trato

corticoespinal dorsal (WATSON e HARVEY, 2009). Deste modo, diferentes estruturas do sistema nervoso central e periférico contribuem para a execução e sucesso de movimentos voluntários especializados.

Este repertório motor variado envolvendo a pata anterior qualifica os roedores como um modelo experimental importante para o estudo de disfunções de movimentos da mão/dedos decorrentes de LME. Em termos clínicos, certamente o estudo com primatas não-humanos é essencial. Entretanto, tendo em vista o custo e os aspectos éticos associados com a utilização de primatas como modelos experimentais, o trabalho com roedores é uma abordagem inicial válida e importante (CENCI *et al.*, 2002).

No presente estudo, propõe-se o desenvolvimento de um novo modelo experimental de lesão da medula espinal em pequenos roedores (*Rattus Novergicus*), com lesão específica e restrita ao trato corticoespinal.

1.6 JUSTIFICATIVA

Lesões da medula espinal podem causar sequelas neurológicas permanentes. Mais da metade das lesões ocorre na região cervical com perda das funções motoras dos membros superiores e prejuízos severos à execução das AVD. Apesar de existirem diversos modelos experimentais de LME, a maioria deles é excessivamente agressivo e severo com o tecido nervoso, causando muitas lesões funcionais simultâneas que dificultam diferenciar preservação, recuperação espontânea e resultado de tratamento experimental. Além disso, a maioria dos estudos concentra-se nos mecanismos de lesão da região torácica da medula espinal, com testes sensório-motores que avaliam apenas a recuperação funcional da pata posterior.

Estes fatos motivam a busca de novos modelos experimentais focados em lesão da região cervical da medula espinal, com perda mínima de função, capazes de serem avaliados com testes sensório-motores para discriminar as funções do membro anterior e sensíveis à terapias farmacológicas e não-farmacológicas diversas.

1.7 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

A isquemia transitória focal causada por microinjeção de endotelina-1 (ET-1) no funículo dorsal da medula espinhal de ratos é capaz de provocar LME e causar alteração do comportamento sensório-motor restrito à pata anterior.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um novo modelo de lesão química da medula espinhal por meio de isquemia transitória focal unilateral causada por microinjeção de ET-1 no funículo dorsal de ratos da linhagem *Wistar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Apresentar as alterações histológicas após lesão química do trato corticoespinhal de ratos da linhagem *Wistar* causada por isquemia focal transitória após microinjeção de ET-1 no funículo dorsal.

2. Medir a área de secção transversal média da lesão causada pela microinjeção de ET-1 no funículo dorsal da medula espinhal de ratos da linhagem *Wistar*.

3. Avaliar as alterações sensório-motoras induzidas pelo modelo de lesão em questão, a partir de testes sensório-motores já descritos na literatura científica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Neste projeto foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*) adultos da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central da UFPA, com massa corporal variando entre 250 e 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 3 animais, sob condições ambientais controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), luminosidade (12h de claro e 12h de escuro) e acesso à água e ração (Labina – Purina) *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (Parecer BIO 0079-12, ver em anexo A) e seguiram os cuidados de manipulação estabelecidos pela *Society for Neuroscience (Handbook for Use of Animals in Neuroscience Research*. Washington, D.C.: SfN, 1991).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Animais recebidos do Biotério Central da Universidade Federal do Pará foram transferidos e adaptados ao Biotério de Manutenção do Laboratório de Neuroplasticidade, onde foram aleatoriamente subdivididos em 10 grupos de cinco animais para serem treinados. Destes 50 animais, 33 foram selecionados para compor os três grupos experimentais. Esse processo de seleção consistiu em observar o comportamento motor dos animais durante a manipulação das peças de macarrão e selecionar aqueles que em dez seções consecutivas apresentassem pelo menos 80% de preferência de pegada. Com isso, foi excluída a possibilidade de trabalhar com animais ambidestros ou que não tivessem habilidade suficiente para desempenhar as tarefas motoras. Outros 15 animais foram selecionados com as mesmas características para compor o grupo controle. O restante dos animais foi devolvido para o Biotério Central da UFPA. Na Figura 09 é possível ver o desenho experimental deste trabalho.

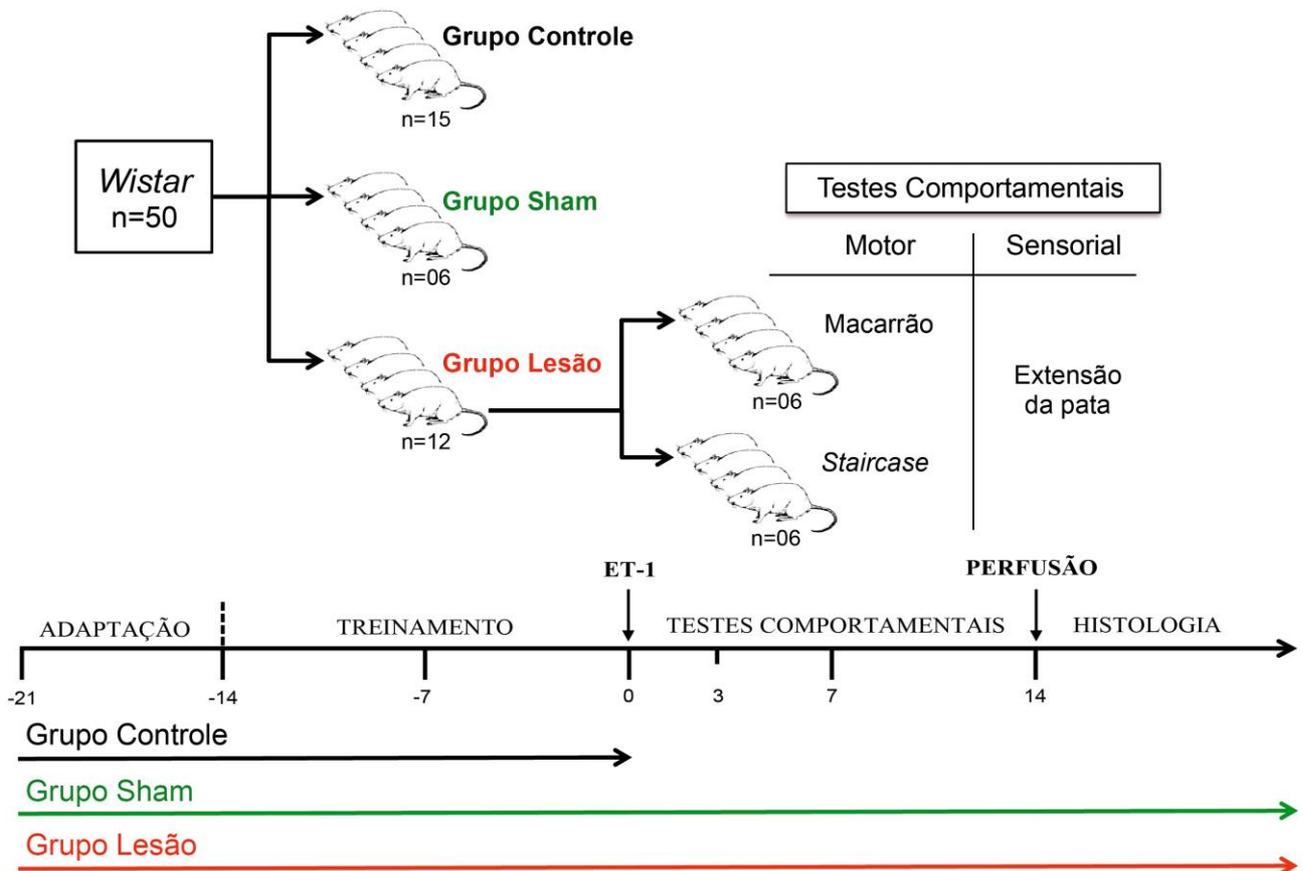


Figura 09: Desenho esquemático do modelo experimental. Notar o curso temporal do experimento, desde o período de adaptação dos animais no biotério de manutenção do Laboratório de Neuroplasticidade até o estágio de processamento histológico do tecido nervoso da medula espinhal.

Os grupos experimentais podem ser assim descritos:

Grupo controle (G_C) – quinze animais ($n = 15$) submetidos a adaptação e treinamento para avaliar habilidades motoras em diferentes testes sensório-motores de manuseio do macarrão, do “*Staircase*” e de extensão da pata.

Grupo sham (G_S) – seis animais ($n = 6$) adaptados e treinados para avaliar habilidades motoras em testes sensório-motores de manuseio do macarrão, “*Staircase*” e extensão da pata, submetidos à exposição da medula espinhal, no segmento cervical C4, que receberam microinjeção de solução salina estéril no TCE (lado preferencial).

Grupo lesão (G_L) – doze animais ($n = 12$) adaptados e treinados para avaliar habilidades motoras em testes sensório-motores de manuseio do macarrão ($n = 6$), do “*Staircase*” ($n = 6$) e de

extensão da pata (n = 12), submetidos à exposição da medula espinhal, no segmento cervical C4, que receberam microinjeção de solução salina estéril com ET-1 no TCE (lado preferencial).

3.2.1 Adaptação e Treinamento

Para habituação, durante o período de uma semana, os animais foram colocados numa caixa de vidro (medindo 20 cm de largura x 25 cm de altura x 30 cm de profundidade) e no aparato do “*Staircase*”, de 10-15 minutos por dia com objetivo de diminuir os comportamentos neofóbicos do animal de experimentação. Nas duas semanas seguintes, os animais foram submetidos ao treinamento de manipulação de pedaços de macarrão cru (Spaghetini nº 9, DIVELLA), de aproximadamente 7 cm de comprimento, marcados a intervalos de 1,75 cm (teste do macarrão). Neste período, foram oferecidos 5 pedaços de macarrão para cada animal por sessão de treinamento (TENNANT *et al.*, 2010b). O comportamento de manipulação foi filmado, avaliado *off line* e utilizado para se estabelecer a linha de base para avaliar o efeito da lesão (ALLRED *et al.*, 2008a). Procedimento semelhante foi realizado com os animais submetidos ao teste do “*Staircase*” (MONTTOYA *et al.*, 1991). Durante o período de treinamento, foi avaliado o lado preferencial de uso da pata anterior, estabelecendo-se assim, pata preferencial (PP) e pata não-preferencial (PNP) (BALLERMANN *et al.*, 2001).

3.2.2 Procedimentos Cirúrgicos

Vinte e quatro horas antes da cirurgia, os animais foram tratados com 1,0 mg/Kg intramuscular de dexametasona (DECADRON[®], ACHÉ, 4mg/ml) e 1,0 mg/Kg de vitamina K (KANAKION[®] MM, ROCHE, 10mg/ml), para prevenir a formação de edema e sangramento excessivo durante o procedimento cirúrgico.

Os animais foram submetidos a jejum nas 12 horas antecedentes ao procedimento cirúrgico para facilitar a indução anestésica com cloridrato de cetamina (VETANARCOL[®], KÖNIG, 80mg/kg) e cloridrato de xilazina (KENSOL[®], KÖNIG, 9mg/kg). Para potencializar o efeito anestésico, foi administrada uma dose única de 0,3 ml/kg de diazepam (VALIUM[®], ROCHE, 5mg/ml). Para diminuir a produção de muco nas vias respiratórias, induzido pelo procedimento anestésico, foi administrada dose única de 0,1 mg/Kg de sulfato de atropina (PASMDEX[®], ISOFARMA, 0,25mg/ml). Todos esses medicamentos foram injetados por via intramuscular.

Os estágios de indução anestésica foram monitorados e mantidos em plano cirúrgico, para evitar supra ou superdose (WHO, 2011). A caracterização do plano anestésico foi estimada pela observação dos seguintes parâmetros:

- a) Movimento das vibrissas e orelhas em resposta a estímulos leves – sedação mínima;
- b) Não retração da cauda ou das patas em resposta a pressão de um dos dedos – anestesia cirúrgica;
- c) Reflexo respiratório – movimentos respiratórios de aspecto regular e superficial com frequência observada em torno de 60 incursões respiratórias por minuto.

Depois do procedimento anestésico, os animais foram higienizados e preparados para o procedimento cirúrgico. Foi feita tricotomia ampla na região dorsal, por toda a extensão das vértebras cervicais e imediatamente acima do local da cirurgia. Em seguida, foi feita assepsia da região de incisão cirúrgica com solução de iodo 1% ativo (RIODEINE[®], RIOQUÍMICA).

A mesa cirúrgica e o aparelho estereotáxico (INSIGHT[®], EFF-336) foram previamente desinfetados com álcool 70% e cobertos com campo cirúrgico de tecido não-tecido (TNT). Como a cirurgia foi realizada na região cervical, os animais foram fixados em estereotáxico de crânio (INSIGHT[®], EFF-336) apenas pelas barras auriculares. Depois da fixação, a região cervical foi flexionada entre 30° e 45°. Esse procedimento de elevar as vértebras cervicais facilita o acesso cirúrgico à vértebra C4. Todos os instrumentais cirúrgicos utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (GNATUS, 12L).

3.2.2.1 Indução de Isquemia Transitória Focal no Trato Corticoespinal

A isquemia transitória focal foi realizada através da microinjeção do peptídeo vasoconstritor ET-1 (Sigma) no funículo dorsal da medula espinhal do segmento vertebral cervical C4. Estudos prévios mostram que a ET-1 é eficaz em induzir lesão, com cavitação cística, no SNC de roedores adultos (FROST *et al.*, 2006; HUGHES *et al.*, 2003).

Após o posicionamento adequado do animal no aparelho estereotáxico, realizou-se uma incisão cirúrgica utilizando-se lâmina de bisturi nº 15 (FREE-BAC), que se iniciou na base do crânio e se estendeu no sentido craniocaudal por cerca de 3 cm. A musculatura do dorso do animal e aquelas que se inserem nas vértebras cervicais, de ambos os lados do corpo, foram desinseridas e mantidas afastadas lateralmente por um afastador cirúrgico (ABC INSTRUMENTOS CIRÚRGICOS - COD 0386). Sempre que se observou sangramento ou ressecamento dos tecidos, foi feita a lavagem do campo cirúrgico com solução salina estéril.

Após exposição das vértebras cervicais foi feita laminectomia da quarta vértebra (C4) para se ter acesso às meninges e medula espinhal. As meninges foram seccionadas com auxílio de pinça dente-de-rato e agulha hipodérmica.

Após exposição da medula espinhal, 40 pMol de endotelina-1 (ET-1, SIGMA-ALDRICH) diluído em 250 nL de solução salina estéril e corante vital (azul de colanil), foi injetada com o auxílio de uma micropipeta graduada de vidro (SIGMA-ALDRICH, HIRSCHMANN). A microinjeção foi feita à uma profundidade de 1 mm da superfície pial, paramedialmente a artéria medular dorsal. Após a microinjeção da ET-1, a micropipeta permaneceu inserida na medula espinhal por mais cinco minutos, antes de ser retirada, para evitar refluxo (ver Figura 10).

Em seguida, os músculos subjacentes à coluna vertebral foram reposicionados e suturados com agulha e fio de sutura (5.0, SHALON) apropriados para suturas internas (CATGUT). A pele foi reposicionada e suturada com fio de nylon (5.0, PROCARE).

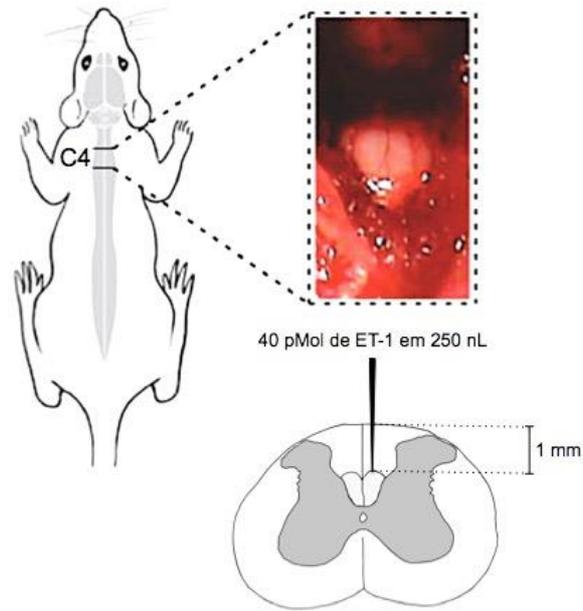


Figura 10: Desenho esquemático do modelo experimental de lesão focal do tracto corticoespinal por isquemia após microinjeção do peptídeo vasoconstrictor ET-1.

3.2.3 Teste do Macarrão

Caracterizações do comportamento alimentar de pequenos roedores demonstram que estes animais são capazes de utilizar movimentos coordenados das patas anteriores para manusear pedaços de alimentos (IVANCO *et al.*, 1996; WHISHAW e COLES, 1996). É possível através do teste de manipulação do macarrão (ALLRED *et al.*, 2008b; TENNANT *et al.*, 2010a) qualificar e quantificar os movimentos dos dedos e das patas anteriores destes animais, demonstrando deficiências sensório-motoras associadas a lesões da medula espinhal (ver Figura 11).

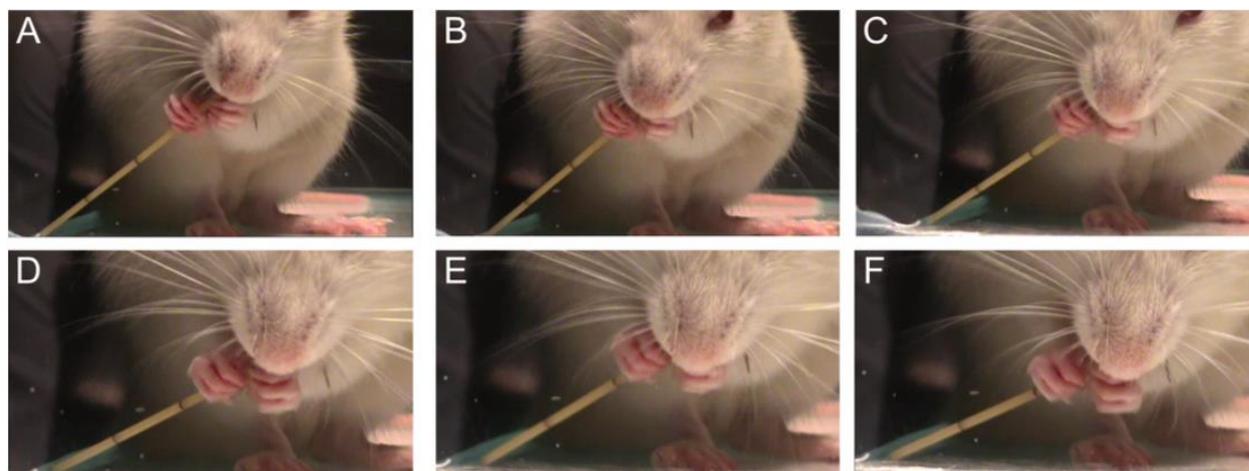


Figura 11: Teste do macarrão. Um ensaio experimental mostrando a sequência típica dos movimentos de manipulação. (A-F) O animal usa um padrão de preensão assimétrico para manusear o macarrão. As patas direita e esquerda neste exemplo são designadas como pata de "segurar" e de "guiar", respectivamente. A pata preferencial (PP) é a que segura o macarrão (pata direita). A pata que guia o macarrão é a pata não-preferencial (PNP) (pata esquerda). (Fonte: do Autor).

Neste trabalho de pesquisa, os animais foram previamente treinados, colocando-os no aparato de teste do macarrão para adaptação, a poucos centímetros de distância de uma câmera filmadora (SONY, HANDYCAM, DCR-SR45) e o registro de imagens durante o manuseio de pequenos pedaços de macarrão foi realizado. Através das lentes de aproximação (zoom) da câmera,

foi possível visualizar em detalhes os movimentos dos dedos das patas anteriores no momento da manipulação do alimento (ver Figura 11).

Em condições normais, os animais utilizam a pata preferencial (PP) para fazer os seguintes ajustes motores durante a manipulação do macarrão: Extensão/Flexão (Ex/FI) e Abdução/Adução (Ab/Ad). Em contrapartida, o uso da pata não-preferencial (PNP) faz movimentos de Liberar/Contatar (L/C) apenas (ver Figura 11). A reprodução *off line* das filmagens em câmera lenta permitiu a identificação e quantificação dos ajustes motores das patas anteriores.

O teste de manipulação do macarrão permitiu fazer ainda a quantificação dos ajustes das patas anteriores em condição normal ou após lesões do SNC (ALLRED *et al.*, 2008a; WHISHAW e COLES, 1996). A quantificação se iniciou quando o animal colocou um pedaço de macarrão na boca pela primeira vez e se encerrou quando o último pedaço desapareceu no interior da boca. A reprodução do vídeo em câmera lenta (~ 50% do tempo real), ou passo-a-passo (*frame-by-frame*) permitiu identificar os ajustes motores.

Cada ajuste motor foi contado sempre que o animal manipulava a peça de macarrão. Caso o animal soltasse a peça de macarrão no aparato, a contagem era interrompida e retomada quando o macarrão era apanhado e reposicionado com movimentos de extensão-flexão e/ou abdução-adição dos dedos. Os ajustes motores de cada pata anterior (preferencial e não-preferencial) foram registrados separadamente. Não foi contado como ajuste motor quando o pedaço de macarrão deslizou na pata sem movimento dos dedos ou quando ocorreram movimentos livres dos dedos sem contato físico com o pedaço de macarrão. A quantificação foi interrompida e excluída da análise sempre que o pedaço de macarrão esteve encoberto, quando derrubado e deixado na superfície do aparato de teste por tempo prolongado, quebrado em pedaços menores ou quando aconteceu alteração no padrão de manipulação.

O tempo total que o animal levou para comer o pedaço de macarrão foi quantificado. Normalmente o animal comia o pedaço de macarrão numa sequência ininterrupta de movimentos, produzindo sons típicos do alimento sendo triturado pelos dentes. Neste caso, foi fácil determinar o início e o término da contagem de tempo. Por outro lado, sempre que o animal parava de se alimentar, mas continuava segurando o pedaço de macarrão a contagem do tempo era interrompida e era retomada quando o animal voltava a se alimentar do macarrão. Como foi dito anteriormente, utilizando o recurso da câmera lenta ou reprodução passo-a-passo foi possível dirimir as dúvidas na quantificação do tempo total.

Depois de determinar a quantidade e a qualidade dos ajustes motores de cada uma das patas anteriores e o registro do tempo total necessário para que o animal se alimentasse do pedaço de macarrão, foi possível calcular a taxa dos ajustes motores. Essa informação foi obtida dividindo-se o número de ajustes motores de cada pata separadamente pelo tempo necessário para o animal comer o pedaço de macarrão.

Por fim, foram registrados também os ajustes motores atípicos. Foi considerado um ajuste motor atípico sempre que o animal alternava entre as patas preferencial e não-preferencial a preensão da peça de macarrão (“*guide and grasp switch*”), sempre que deixava o pedaço de macarrão cair no assoalho do aparato de teste e em seguida o apanhava novamente (“*drop*”) fazendo uma pausa no padrão de manipulação, sem contato físico com o objeto (ALLRED *et al.*, 2008b) ou quando ele quebrava a peça de macarrão e a mantinha segura enquanto comia o pedaço quebrado, fazendo a preensão com as duas patas (“*break and eat while grasp*”).

A análise quantitativa do teste de manipulação do macarrão será apresentada como, (1) média dos ajustes motores das patas por peça manipulada, (2) tempo médio necessário para comer cada pedaço de macarrão, (3) taxa de ajustes motores (número de ajustes motores dividido pelo tempo necessário para comer cada peça) e (4) dados absolutos dos ajustes motores atípicos (ALLRED *et al.*, 2008b; TENNANT *et al.*, 2010b).

3.2.4 Teste do “*Staircase*”

O teste do “*Staircase*” consiste em colocar o animal em uma caixa de acrílico (28,5 cm de comprimento x 9 cm altura x 6 cm largura) que ao longo de dois terços do seu comprimento (cerca de 16,5 cm) possui uma plataforma da mesma largura em ambos os lados do aparato de teste. Da superfície da plataforma até o teto existe uma distância de 2,7 cm, suficiente para que o animal penda o corpo para ambos os lados, mas que o impede de apanhar o alimento (pelotas de açúcar) raspando ao lado da plataforma. Duas escadarias são colocadas no final do aparato, dispondo-se uma de cada lado da plataforma central. Em cada escadaria existem sete degraus, cada degrau com um poço central de 3 mm de profundidade onde é colocado uma ou mais pelotas de alimento Na

outra extremidade da caixa, compreendendo o terço que não tem plataforma, o piso é vasado para facilitar a inserção e/ou remoção do animal do aparato. Há também um corte na parede do aparato para permitir a passagem da cauda do animal (ver figura 12) (GARCIA-ALIAS *et al.*, 2009; GARCIA-ALIAS *et al.*, 2008; MONTOYA *et al.*, 1991; PAGNUSSAT *et al.*, 2009; SAMSAM *et al.*, 2004)

As escadarias foram removidas da caixa e duas pelotas de açúcar foram colocadas em cada poço. Os ratos foram colocados no aparato através do espaço vazado no piso e a caixa colocada na superfície de uma mesa. O teste padrão consistiu em deixar o animal por 15 minutos no aparato, para que o mesmo apanhasse tantas pelotas quantas fosse capaz de ambos os lados do aparato. Ao final do tempo estabelecido, as escadarias foram removidas e o número de pelotas restantes nos poços foi contado para se estabelecer o número total de pelotas recuperadas, derrubadas e deixadas.

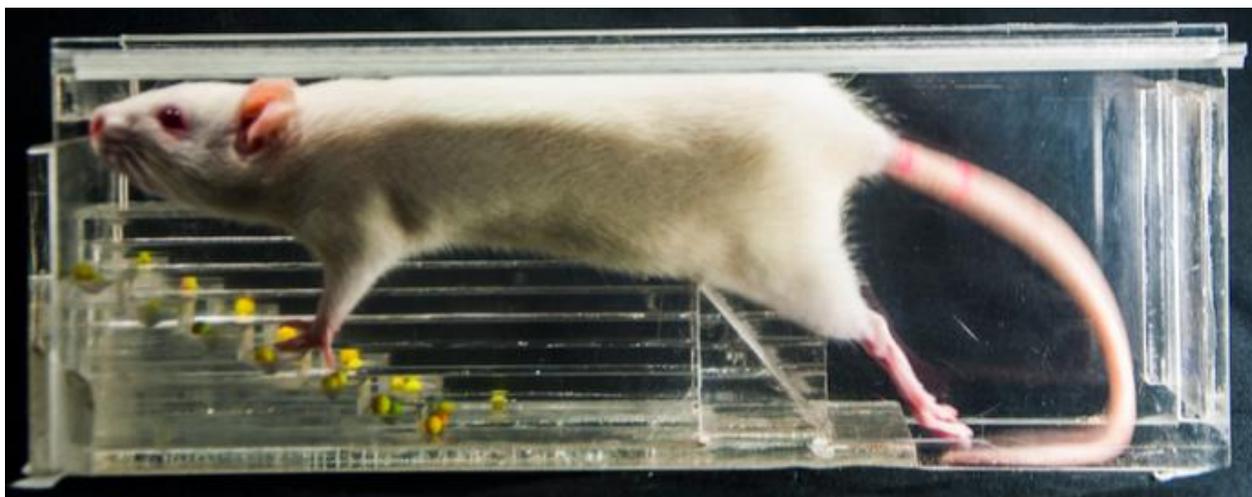


Figura 12: Teste do *staircase*. Animais deslizavam pela superfície de uma plataforma de onde tinham acesso à duas escadarias (lados esquerdo e direito). Em cada degrau das escadarias foram colocadas duas pelotas de açúcar. O animal permaneceu no aparato de teste por 15 min. (Fonte: do Autor).

3.2.5 Teste de Extensão da Pata

A lesão do trato corticoespinhal dorsal, na região cervical da medula espinhal, pode afetar comportamentos motores menos complexos, como o reflexo de extensão da pata (“*contact placing response*”) ao tocar o dorso desta em uma superfície sólida. Para avaliar este reflexo, utilizamos o teste de extensão da pata (KUNKEL-BAGDEN *et al.*, 1993; METZ *et al.*, 2000) (ver Figura 13).

Neste teste, os animais foram mantidos horizontalmente com os membros anteriores suspensos. Em seguida, lentamente eles foram levados a tocar a pele do dorso das patas anteriores, preferencial (lado ipsilateral a lesão) e não-preferencial (lado contralateral à lesão), na borda de uma mesa e o reflexo de extensão da pata foi observado, separadamente para cada pata anterior e, registrado em dez tentativas consecutivas por animal. Os dados foram tabulados e apresentados como média e desvio padrão.

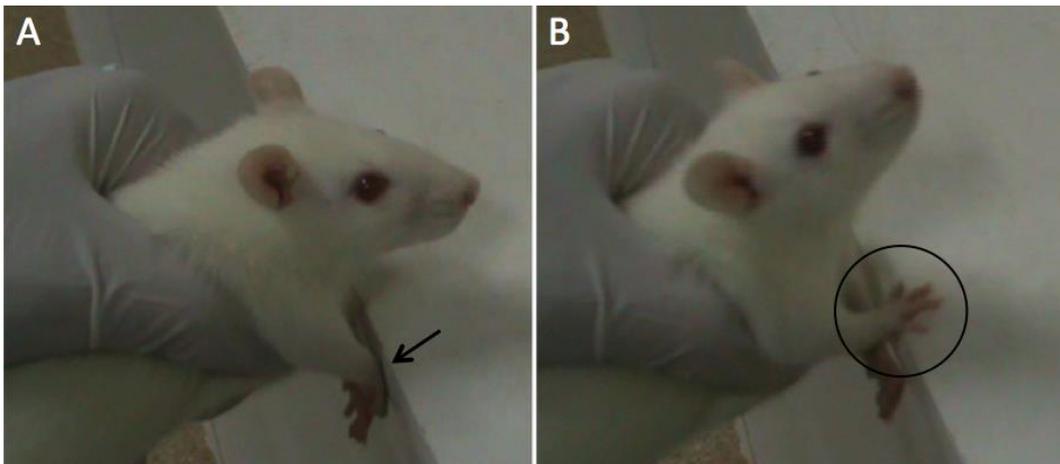


Figura 13: Teste de extensão da pata. O teste consiste em tocar o dorso da pata anterior em uma superfície sólida (seta em A) e observar se o animal estende a pata, estende e abduz os dedos para tocar na superfície da mesa (círculo em B). (Fonte: do Autor).

3.3 PERFUSÃO E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Concluídos os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uma dose letal de Cloridrato de Cetamina 80 mg/kg (VETANARCOL[®], KÖNING) e Cloridrato de Xilazina 9 mg/kg (KENSOL[®], KÖNING) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 250-300 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparinizada, seguido de 250-300 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2–7,4). Depois de removidas, as medulas espinhais foram pós-fixadas por 24h na mesma solução de fixação (paraformaldeído 4% em tampão fosfato). Em seguida, as medulas foram crioprotegidas em soluções com concentrações crescentes de sacarose diluída em glicerina com tampão fosfato (PB 0,05M; pH 7,2–7,4).

Após crioproteção, as medulas foram incluídas em Tissue-Tek[®] (O.C.T.TM, SAKURA) e seccionados com auxílio de um criostato (MICRON, MOD. HM505E) no plano transversal. Para investigar a existência de lesão e possível formação de cicatriz glial no funículo dorsal, induzido por lesão isquêmica focal, as medulas espinhais foram cortadas em secções de 50 µm de espessura e em seguida coradas pela técnica de Nissl. Os cortes foram montados em lâminas histológicas gelatinizadas.

3.3.1 Análise Histológica

A análise histológica foi realizada com a coloração pela técnica de Nissl, o que permitiu a visualização de corpos celulares e a perda dos mesmos em situações patológicas (p. ex. lesão do tecido nervoso). Para identificarmos precisamente o epicentro da lesão isquêmica, foram observadas secções coradas em diferentes posições do local de lesão, tanto anterior como posterior ao sítio de injeção de ET-1. Secções mais próximas ao epicentro da lesão foram escolhidas para se medir a área de secção transversal média da lesão com auxílio do programa *ImageJ*⁶⁴ (NIH, versão 64-bit).

3.3.2 Desidratação e Montagem das Lâminas Histológicas

As secções montadas em lâminas gelatinizadas foram deixadas no ambiente do laboratório por pelo menos 8 horas para que o tecido nervoso secasse e colasse na lâmina. Em seguida, as secções foram desidratadas em bateria com concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 100%), e clareadas em xileno (100%). As lâminas foram então cobertas com lamínula limpa e desengordurada com o auxílio de um meio de inclusão (ENTELLAN, MERK).

3.5 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por análise de variância um critério e teste de correção de *Tukey*. O nível de significância estipulado foi de $p \leq 0,05$ (ANOVA, um critério, *posthoc Tukey*, $p \leq 0,05$). A construção de gráficos e a análise estatística foram realizadas no programa *GraphPad* (*Prism* 6.0). Os resultados serão apresentados em média \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1 TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO EM ANIMAIS INTACTOS

Rattus norvegicus da linhagem *Wistar* facilmente aprendem a tarefa de manusear peças de macarrão para fins de alimentação, mas ao fazerem, o fazem de maneira assimétrica agarrando a peça de macarrão com uma pata (“*grasping paw*”) e guiando em direção à boca com a outra pata (“*guide paw*”; ver Figura 11).

Para caracterizar o comportamento motor normal de manipulação do macarrão, sem qualquer interferência do procedimento experimental de cirurgia, um grupo de 15 ratos saudáveis foi treinado e testado. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Em média, esses animais (considerados grupo Controle), fizeram $20,40 \pm 2,53$ ajustes por peça de macarrão com a pata preferencial, sendo $17,67 \pm 2,55$ Ex/Fl e $2,73 \pm 1,22$ Ab/Ad. Com a pata não-preferencial esses animais fizeram $12,47 \pm 1,89$ ajustes por peça de macarrão, sendo tudo L/C (ver Figura 14 A e B). Esse resultado ressalta a existência de assimetria nas ações motoras das patas preferencial e não-preferencial.

Em média animais do grupo controle levaram $19,47 \pm 2,61$ s para comer cada peça de macarrão e houve uma preferência pelo uso da pata direita (73,33%) como pata preferencial quando comparado ao uso da pata esquerda (26,66%) como pata preferencial (ver Figura 15). A taxa de manipulação foi de $1,07 \pm 0,22$ ajustes por segundo com a pata preferencial e $0,65 \pm 0,12$ ajustes por segundo com a pata não-preferencial (ver Figura 16).

Animais do grupo sham fizeram, em média, $20,50 \pm 2,26$ ajustes por peça de macarrão com a pata preferencial, sendo $18,00 \pm 2,28$ Ex/Fl e $2,5 \pm 1,05$ Ab/Ad e, $14,00 \pm 1,41$ ajustes por peça de macarrão com a pata não-preferencial, sendo tudo L/C (ver figura 15 A e B). Em média, animais desse grupo experimental levaram $18,83 \pm 2,14$ s para comer cada peça de macarrão (ver Figura 15) e fizeram $1,10 \pm 0,15$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,74 \pm 0,03$ ajustes por peça com a pata não-preferencial. Todos os animais deste grupo experimental utilizaram a pata direita como pata preferencial (ver Figura 16 A e B).

TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO

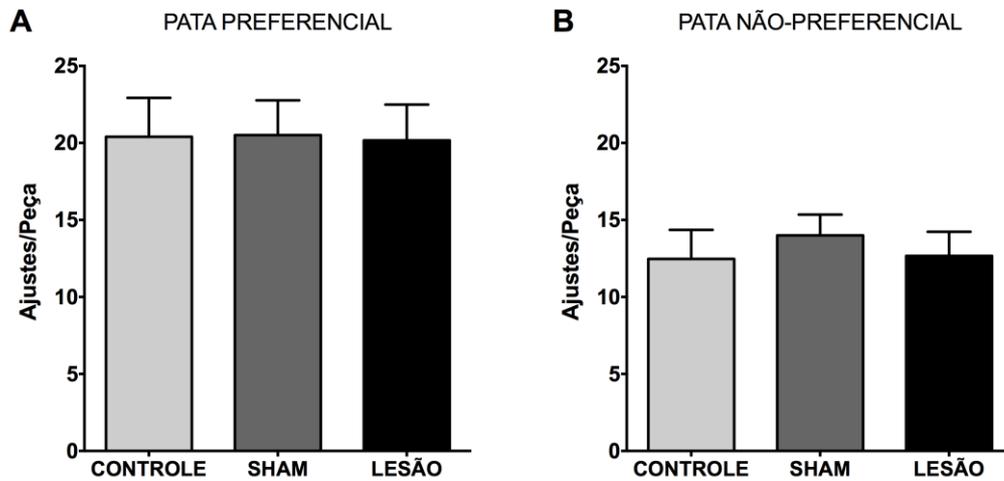


Figura 14: Registro de base do teste do macarrão comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para os ajustes por peça. Em **A**, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0.04211$ e $P = 0.9589$), e em **B**, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 1.455$ e $P = 0.2646$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os grupos para o registro de base.

TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO

TEMPO PARA COMER

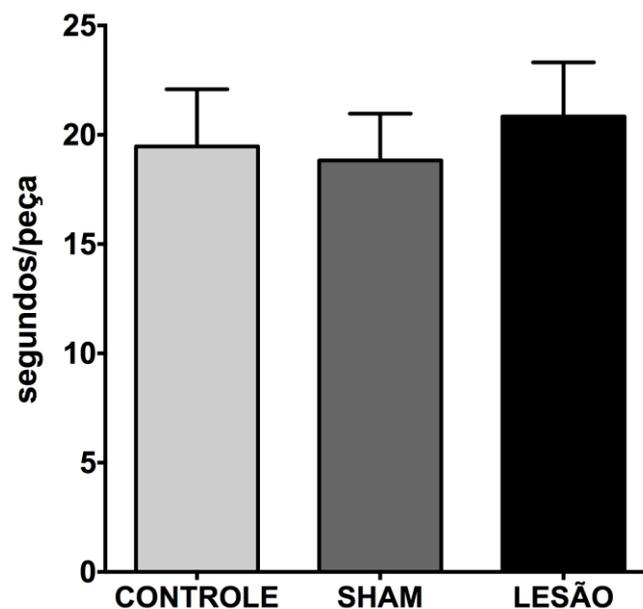


Figura 15: Registro de base do teste do macarrão comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o tempo necessário para comer cada peça de macarrão ($F_{(2,24)} = 1,036$ e $P = 0,3703$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os grupos para o registro de base.

Animais do grupo lesão fizeram, em média, $20,17 \pm 2,32$ ajustes por peça de macarrão com a pata preferencial, sendo $17,33 \pm 2,07$ Ex/FI e $2,83 \pm 1,47$ Ab/Ad e, $12,67 \pm 1,63$ ajustes por peça de macarrão com a pata não-preferencial, sendo todos L/C (ver figura 14 A e B). Em média, animais desse grupo experimental levaram $20,83 \pm 2,48$ s (ver Figura 15) para comer cada peça de macarrão e fizeram $0,99 \pm 0,20$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,61 \pm 0,08$ ajustes por peça com a pata não-preferencial (ver Figura 16 A e B). Neste grupo experimental também houve uma preferência pelo uso da pata direita (83,33%) como pata preferencial quando comparado ao uso da pata esquerda (16,66%) como pata preferencial.

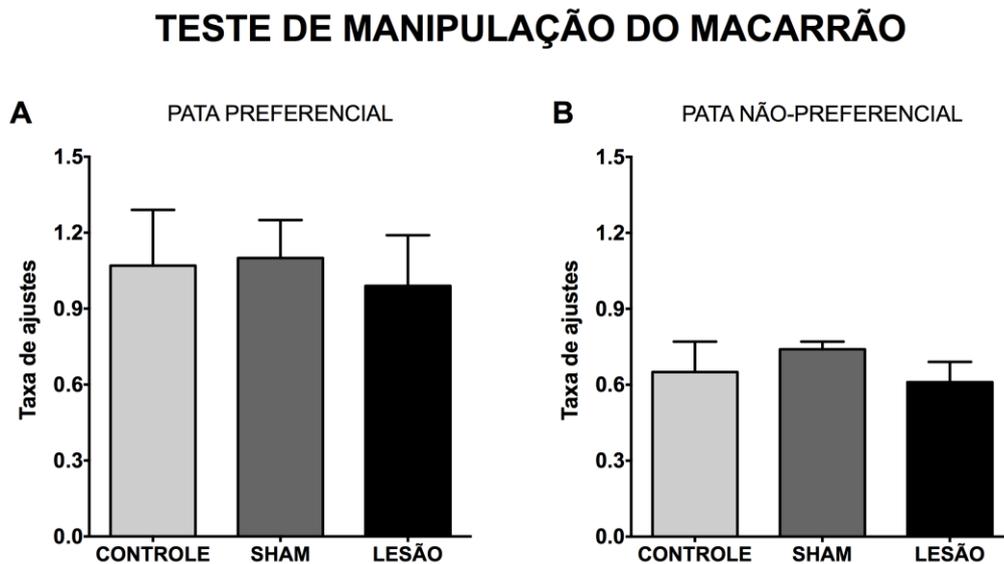


Figura 16: Registro de base do teste do macarrão comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para taxa de ajustes. Em **A**, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,06649$ e $P = 0,9358$) e em **B**, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,732$ e $P = 0,0853$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os grupos no resgistro de base.

Não existe diferença estatística significativa entre os resultados dos grupos Controle, Sham e Lesão para o registro de base, reforçando que ratos da linhagem *Wistar* manipulam as peças de macarrão de maneira assimétrica, utilizando uma pata para agarrar (PP) e outra para guiar (PNP) a peça de macarrão. De maneira consistente, a pata preferencial faz ajustes de extensão e flexão (Ex/FI), abdução e adução (Ab/Ad) dos dedos, ao passo que a pata não-preferencial faz ajustes de liberar contatar (L/C) apenas.

4.2 TESTE DO “STAIRCASE” EM ANIMAIS INTACTOS

A semelhança do que foi feito no teste de manipulação do macarrão, para caracterizar o comportamento motor normal no teste do “Staircase”, sem qualquer interferência do procedimento experimental de cirurgia, um grupo de 15 ratos saudáveis foi treinado e testado (grupo Controle). Em média, esses animais recuperaram um total de $9,80 \pm 1,42$ pelotas com a pata preferencial e $6,53 \pm 1,41$ pelotas com a pata não-preferencial. Animais do grupo sham recuperaram $9,33 \pm 0,82$ pelotas com a pata preferencial e $6,00 \pm 1,26$ pelotas com a pata não-preferencial. Animais do grupo lesão recuperaram $9,67 \pm 1,37$ pelotas com a pata preferencial e $5,17 \pm 1,17$ pelotas com a pata não-preferencial (ver figura 17 A e B).

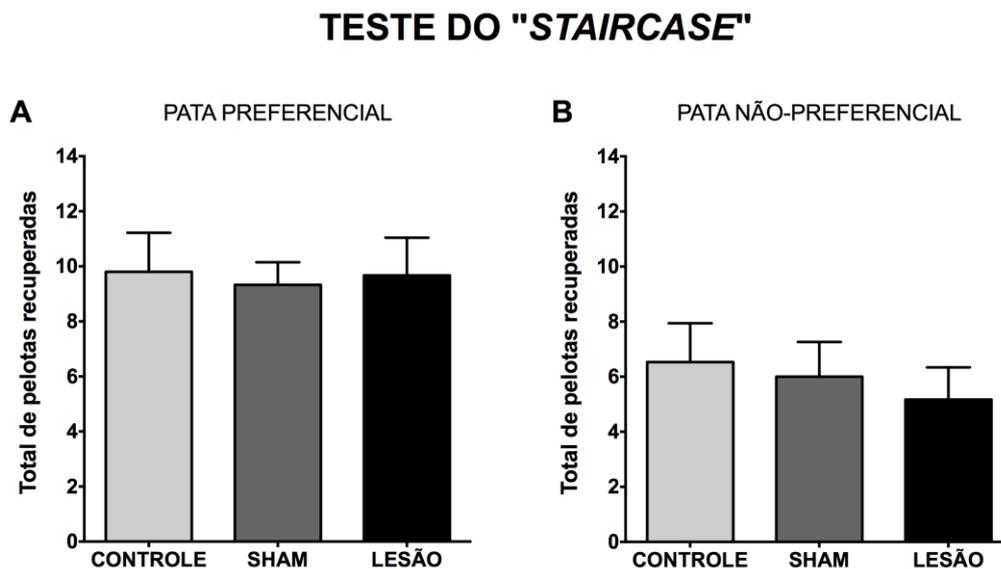


Figura 17: Registro de base do teste do “Staircase” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de pelotas de açúcar recuperadas com as patas. Em **A**, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,2727$ e $P = 0,7636$) e em **B**, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,283$ e $P = 0,1236$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.

Os dois degraus superiores do aparato de teste são rasos o suficiente para que os animais alcancem as pelotas de açúcar estendendo a língua. Neste experimento todos os animais mostraram-se capazes de recuperar algumas pelotas de açúcar nesses dois degraus, de ambos os lados,

utilizando a boca. Todos os degraus subsequentes estão além do alcance da língua, onde as pelotas de açúcar só podem ser alcançadas pelo uso das patas anteriores. Animais de todos os grupos experimentais recuperaram algumas pelotas de açúcar desses dois degraus superiores. No grupo Controle houve uma recuperação, em média, de $1,07 \pm 0,96$ pelotas no lado da pata preferencial e $1,73 \pm 0,96$ pelotas do lado da pata não-preferencial. No grupo sham houve uma recuperação, em média, de $1,50 \pm 1,05$ pelotas do lado da pata preferencial e $2,33 \pm 1,21$ pelotas do lado não-preferencial. No grupo lesão houve uma recuperação, em média, de $1,33 \pm 1,21$ pelotas com o lado da pata preferencial e $1,33 \pm 1,21$ pelotas do lado da pata não-preferencial (ver Figura 18).

TESTE DO "STAIRCASE"

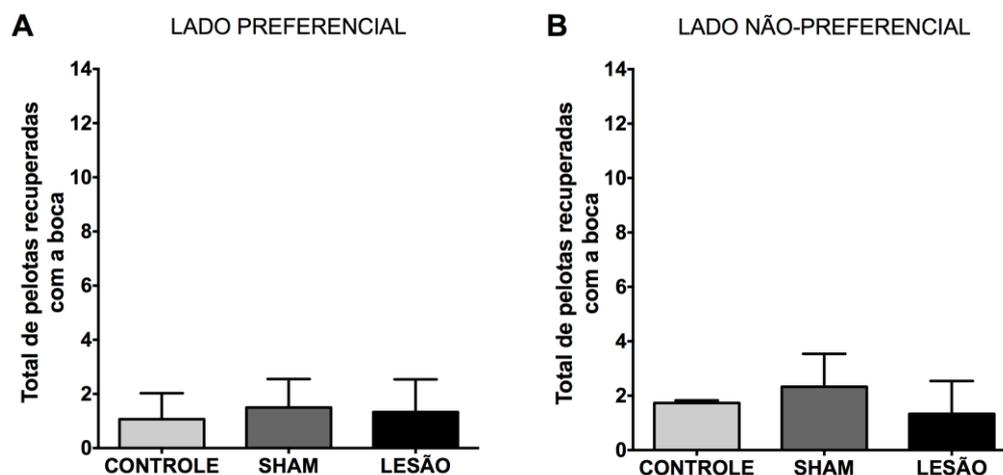


Figura 18: Registro de base do teste do “Staircase” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de pelotas de açúcar recuperadas com a boca. Em **A**, lado da pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,6161$ e $P = 0,5484$) e em **B**, lado da pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 1,333$ e $P = 0,2824$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.

O número de pelotas recuperadas com a pata somado ao número de pelotas recuperadas com a boca resulta no número total de pelotas alcançada pelo animal. Deste modo, animais do grupo controle alcançaram, em média, um total de $10,87 \pm 1,13$ pelotas com o lado preferencial e $8,27 \pm 1,75$ pelotas com o lado não-preferencial. Animais do grupo sham alcançaram, em média, $10,83 \pm 0,75$ pelotas com o lado preferencial e $8,33 \pm 1,63$ pelotas com o lado não-preferencial.

Animais do grupo lesão alcançaram, em média, $11,00 \pm 1,41$ pelotas com o lado preferencial e $6,50 \pm 1,64$ pelotas com o lado não-preferencial (ver Figura 19).

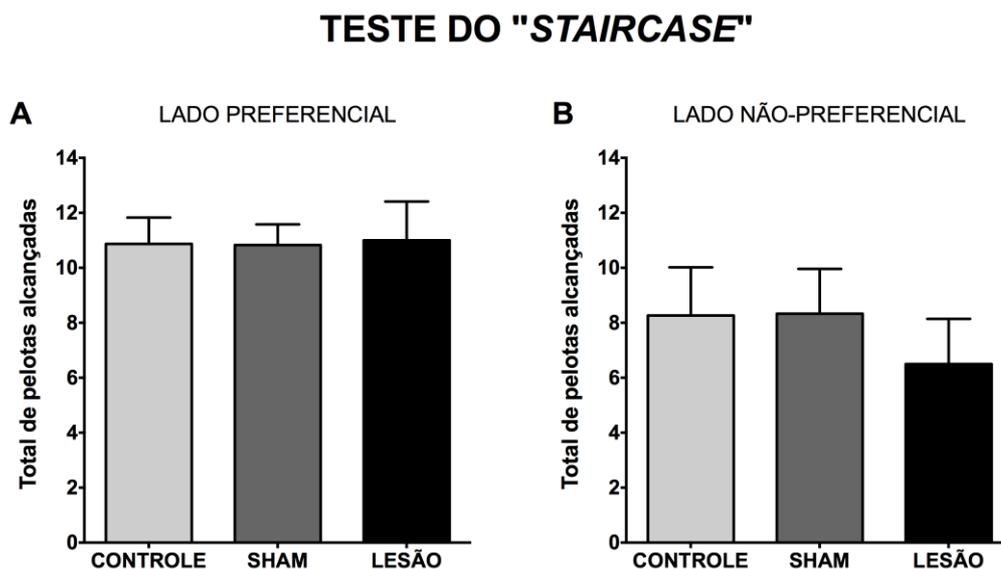


Figura 19: Registro de base do teste do “*Staircase*” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número total de pelotas de açúcar alcançadas. Em **A**, lado da pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,003244$ e $P = 0,9968$) e em **B**, lado da pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,563$ e $P = 0,0980$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.

Durante todo o período de treinamento observou-se que o sexto e sétimo degraus do aparato de teste são mais difíceis de serem alcançados, exigindo extensão máxima do membro anterior, bem como, a habilidade motora de agarrar as pelotas. Por essa razão, animais de todos os grupos experimentais deixaram algumas pelotas de açúcar no aparato de teste. Animais do grupo controle, em média, deixaram $1,93 \pm 1,03$ pelotas com o lado preferencial e $1,73 \pm 0,96$ pelotas com o lado não-preferencial. Animais do grupo sham, em média, deixaram $1,50 \pm 1,05$ pelotas com o lado preferencial e $2,33 \pm 1,21$ pelotas com o lado não-preferencial. Animais do grupo lesão, em média, deixaram $1,33 \pm 1,21$ pelotas com o lado preferencial e $1,33 \pm 1,21$ com o lado não-preferencial (ver Figura 20).

A redução do número de pelotas de açúcar de um degrau não significa que a pelota foi agarrada e recuperada com sucesso. Com efeito, durante a tentativa de alcançar e recuperar,

algumas pelotas de açúcar são derrubadas um ou mais degraus. A existência de três ou mais pelotas no sétimo degrau indicam que pelo menos uma pelota foi derrubada de um degrau superior até um ponto em que o animal não é mais capaz de alcançá-la e recuperá-la. Animais do grupo controle, em média, derrubaram $1,20 \pm 0,94$ pelotas do lado preferencial e $3,60 \pm 1,18$ pelotas do lado não-preferencial. Animais do grupo sham, em média, derrubaram $1,33 \pm 0,52$ pelotas do lado preferencial e $3,67 \pm 1,63$ pelotas do lado não-preferencial. Animais do grupo lesão, em média, derrubaram $1,83 \pm 0,75$ pelotas do lado preferencial e $3,83 \pm 0,98$ pelotas do lado não-preferencial (ver Figura 21).

TESTE DO "STAIRCASE"

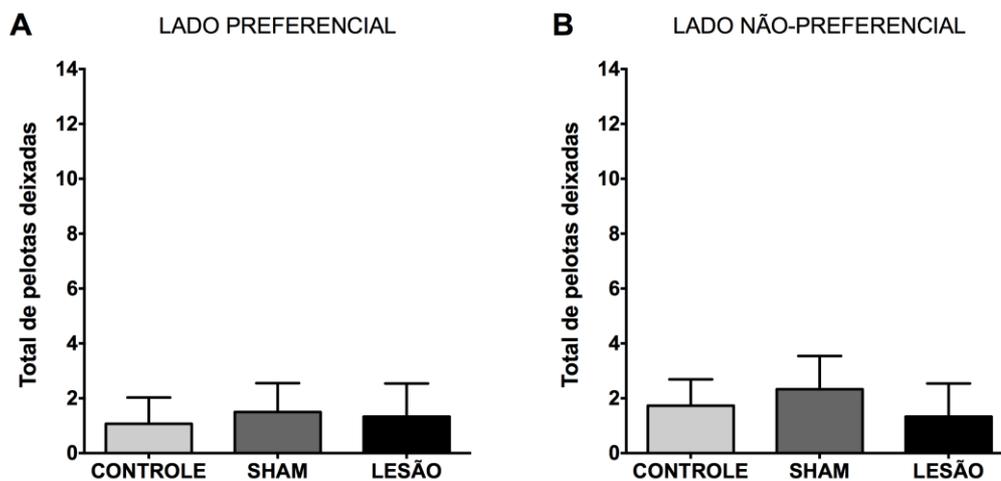


Figura 20: Registro de base do teste do “Staircase” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número total de pelotas de açúcar deixadas no aparato de teste. Em A, lado da pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,3311$ e $P = 0,7214$) e em B, lado da pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 2,726$ e $P = 0,0857$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.

Esses resultados também demonstram a existência de uma assimetria nas ações motoras das patas preferencial e não-preferencial, não existindo diferença estatística significativa entre os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o registro de base no que se refere ao número de pelotas recuperadas.

TESTE DO "STAIRCASE"

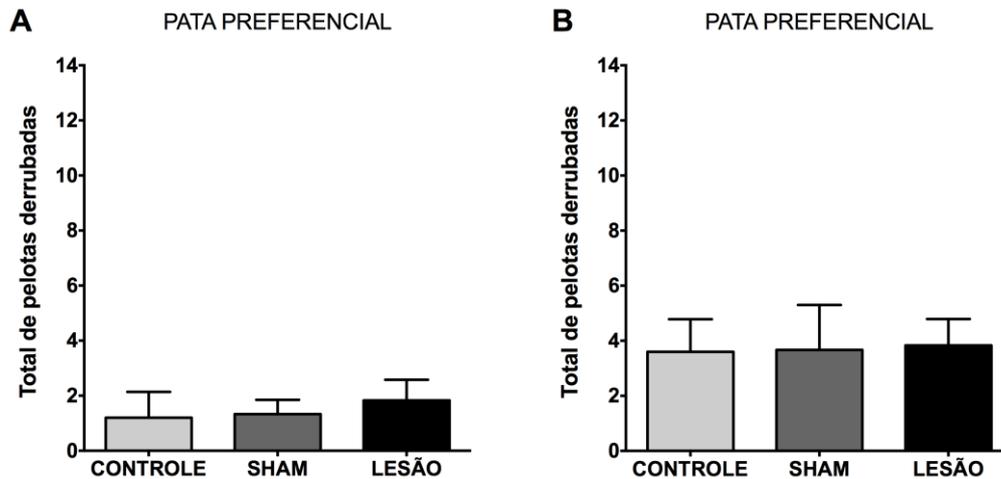


Figura 21: Registro de base do teste do “*Staircase*” comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de pelotas derrubadas. Em **A**, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,7434$ e $P = 0,4861$) e em **B**, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 0,07414$ e $P = 0,9288$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.

4.3 TESTE DE EXTENSÃO DA PATA EM ANIMAIS INTACTOS

Tarefas motoras menos qualificadas do membro anterior também podem ser afetados por lesões do trato corticoespinhal. Na resposta de extensão da pata, que requer funcionamento adequado do trato corticoespinhal, os ratos estendem e abduzem os dedos da pata anterior colocando-os em uma superfície rígida (p. ex. uma mesa) quando o dorso da pata anterior é tocado na borda dessa superfície (rever Figura 13).

Durante todo o período de treinamento e no registro de base, todos os animais apresentaram resposta de extensão da pata quando o dorso desta era tocado em uma superfície rígida. Animais do grupo controle, em média, apresentaram $8,80 \pm 0,77$ respostas de extensão com a pata preferencial e $8,87 \pm 0,83$ respostas com a pata não-preferencial. Animais do grupo sham, apresentaram $8,50 \pm 0,84$ respostas de extensão com a pata preferencial e $8,17 \pm 0,41$ respostas de extensão com a pata não-preferencial. Animais do grupo lesão, apresentaram $8,33 \pm 0,52$ respostas de extensão com a pata preferencial e $8,83 \pm 0,98$ respostas de extensão com a pata não-preferencial (ver Figura 22).

TESTE DE EXTENSÃO DA PATA

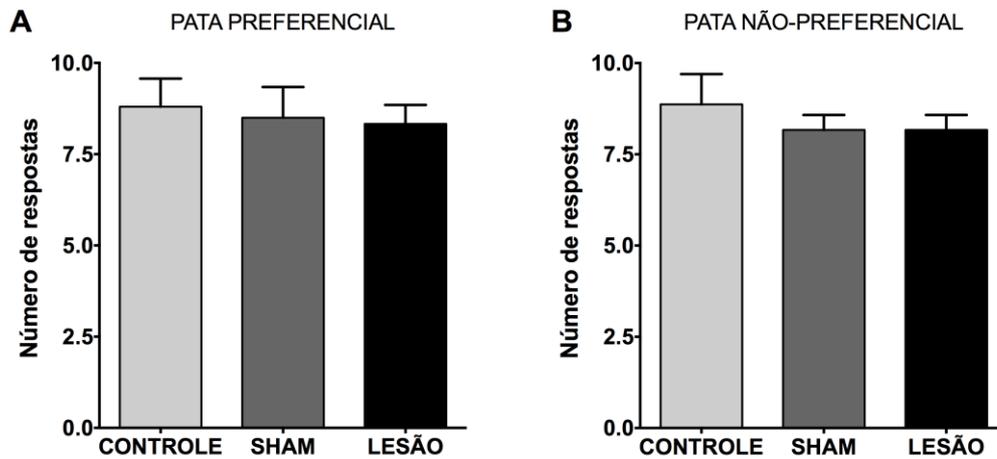


Figura 22: Registro de base do teste de extensão da pata comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de respostas. Em **A**, pata preferencial ($F_{(2,24)} = 0,9639$ e $P = 0,3957$) e em **B**, pata não-preferencial ($F_{(2,24)} = 1,737$ e $P = 0,1974$). Os gráficos mostram que não há diferença estatística significativa entre os resultados.

4.4 LESÃO MEDULAR POR ISQUEMIA FOCAL APÓS MICROINJEÇÃO DE ET-1

Como pode ser visto na Figura 23 (A), a análise histológica de animais do grupo sham, 14 dias após a microinjeção de solução salina estéril mostrou que não houve alteração morfológica da medula espinhal. Neste grupo de animais, o H medular foi preservado, assim como os funículos dorsal, ventral e lateral e os cornos dorsal e ventral da substância cinzenta.

Em animais do grupo lesão, a análise histológica da medula espinhal, 14 dias após a microinjeção de ET-1, mostrou que a ET-1 foi capaz de criar uma lesão circunscrita no funículo dorsal, ipsilateral ao sítio de injeção (ver Figura 23 B e C), formando uma cavidade cística amórfica sobre o trato corticoespinhal e substância branca suprajacente (*). Uma lesão quase completa do trato corticoespinhal pode ser vista em secção transversal da medula corada pela técnica de Nissl.

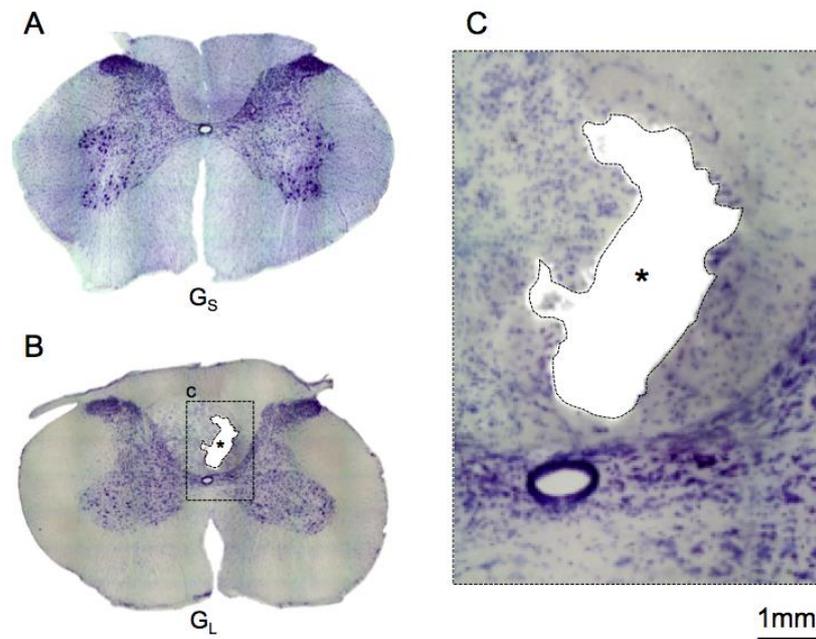


Figura 23: Fotomicrografias de secções coronais da medula espinhal (50 μm), na região cervical C4, coradas pela técnica de Nissl. Em **A** um animal do grupo sham, mostrando o H medular preservado. Em **B** e **C** animal do grupo lesão, mostrando a presença de uma cavitação (*) cística sobre o trato corticoespinhal e substância branca suprajacente. Barra de escala de 1 mm.

O tamanho da cavidade cística e sua forma variou em diferentes animais do grupo lesão ($n=3$). Utilizando-se o programa de processamento de imagem ImageJ⁶⁴ (NIH, versão 64-bit), foi possível medir, no epicentro da lesão, uma cavitação de $0,421 \text{ mm}^2 (\pm 0,035 \text{ mm}^2, n=3)$ de área de secção transversal (ver Figura 23 B e C).

4.5 TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR

Como dito anteriormente, apenas animais dos grupos sham e lesão foram operados para exposição do segmento C4 da medula espinhal e microinjeção de solução salina estéril ou ET-1, respectivamente. Deste modo, seguem os resultados desses tratamentos nos terceiro, sétimo e décimo quarto dias após lesão para o teste de manipulação do macarrão (ver Figura 24).

No terceiro dia após lesão, animais do grupo sham apresentaram um comportamento motor semelhante aquele observado no registro de base fazendo um total de $16,67 \pm 0,82$ ajustes por peça de macarrão, sendo $16,00 \pm 0,64$ ajustes de Ex/FI e $0,67 \pm 0,52$ de Ab/Ad com a pata preferencial. Com a pata não-preferencial esses animais fizeram $15,83 \pm 1,47$ ajustes de L/C (ver Figura 24 B e F). Em média, animais desse grupo experimental levaram $44,67 \pm 5,89$ s (ver Figura 25) para comer cada peça de macarrão e fizeram $0,38 \pm 0,05$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,36 \pm 0,03$ ajustes por peça com a pata não-preferencial (ver Figura 26).

Quando comparamos os resultados dos ajustes totais no registro de base desse grupo experimental com os ajustes totais no terceiro dia após lesão, observa-se que esses animais apresentaram uma diminuição dos ajustes da pata preferencial e um aumento dos ajustes da pata não-preferencial, no entanto, essas diferenças não são estatisticamente significativas. Quando observamos a qualidade desses ajustes motores, embora tenha ocorrido uma diminuição dos ajustes de Ex/FI e Ab/Ad, essas diferenças também não são estatisticamente significativas. No entanto, o tempo necessário para os animais comerem cada peça de macarrão aumentou bastante, contribuindo para uma significativa diminuição da taxa de ajuste de ambas as patas.

Ainda no terceiro dia após lesão, animais do grupo lesão apresentaram um comportamento motor diferente daquele observado no registro de base, fazendo um total de $3,83 \pm 1,84$ ajustes por peça de macarrão, sendo tudo L/C com a pata preferencial. Com a pata não-preferencial, no entanto, esses animais fizeram $13,83 \pm 1,47$ ajustes, sendo $12,83 \pm 1,33$ Ex/FI e $1,00 \pm 0,63$ Ad/Ab (ver Figura 24 J e P). Ou seja, esse grupo de animais apresentou uma inversão das atividades motoras após lesão com ET-1, de tal sorte que a pata lesionada passou a fazer os ajustes motores correspondentes a pata não-preferencial e a pata não lesionada a fazer ajustes motores da pata preferencial. Em média, animais desse grupo experimental levaram $50,33 \pm 7,47$ s (ver Figura 25) para comer cada peça de macarrão e fizeram $0,07 \pm 0,03$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,28 \pm 0,04$ ajustes por peça com a pata não-preferencial (ver Figura 26).

TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO

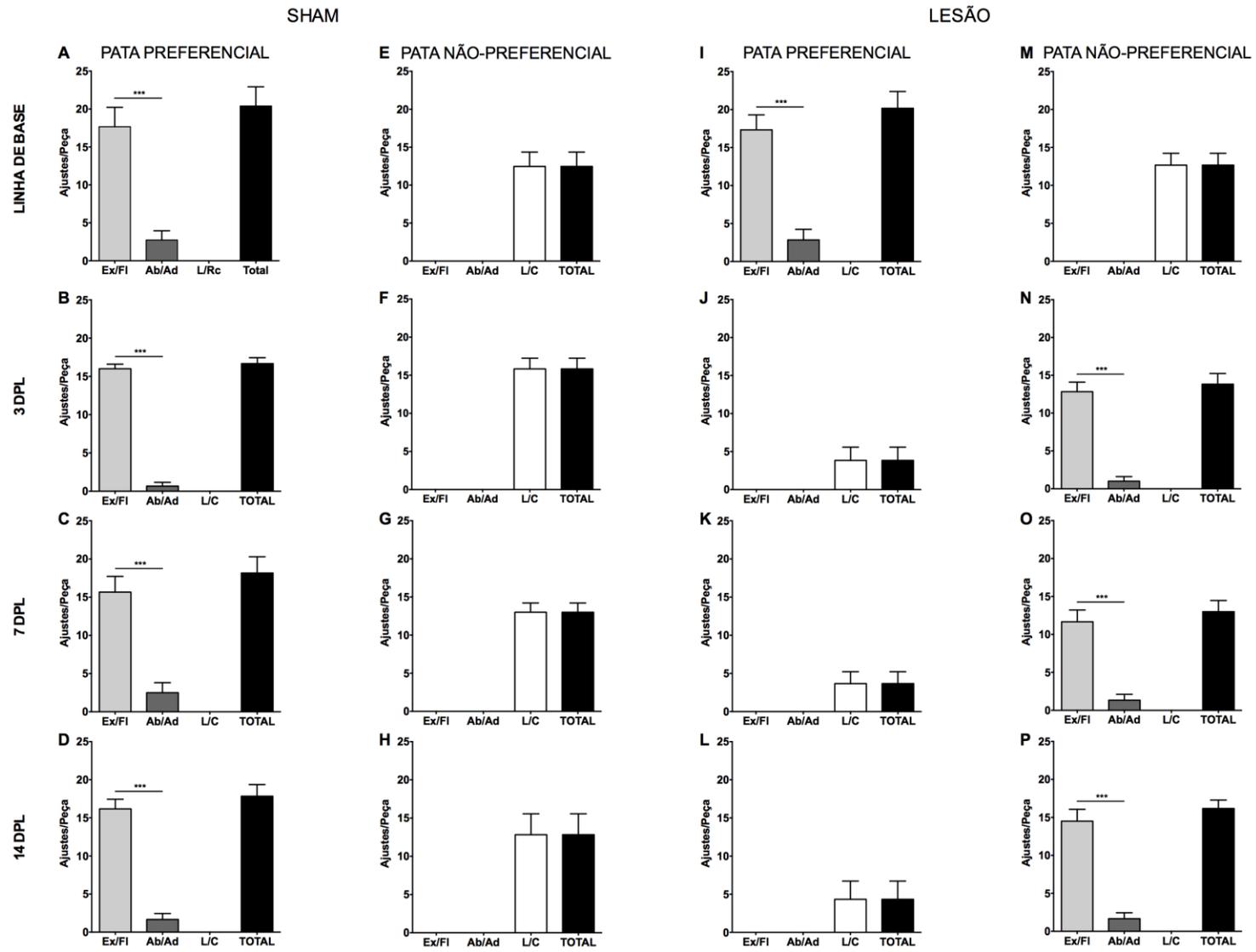


Figura 24: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do macarrão, com base no número médio de ajustes motores realizados com as patas preferencial (PP) e não-preferencial (PN), tanto no grupo sham (**A-D, E-H**) quanto lesão (**I-M, O-R**), respectivamente. Ratos costumam usar a pata preferencial para fazer movimentos de flexão/extensão (Ex/FI) e abdução/adução (Ab/Ad). A pata não-preferencial, por outro lado, realiza movimentos de liberar/contactar (L/C). Em **A** $F_{(3,44)} = 509,9$ e $P < 0,0001$. Em **B** $F_{(3,44)} = 3.338$ e $P < 0,0001$. Em **C** $F_{(3,44)} = 384,1$ e $P < 0,0001$. Em **D** $F_{(3,44)} = 929,8$ e $P < 0,0001$. Em **I** $F_{(3,44)} = 460,1$ e $P < 0,0001$. Em **N** $F_{(3,44)} = 673,0$ e $P < 0,0001$. Em **O** $F_{(3,44)} = 423,3$ e $P < 0,0001$. Em **P** $F_{(3,44)} = 792,1$ e $P < 0,0001$.

No sétimo dia após lesão, animais do grupo sham continuaram apresentando um comportamento motor semelhante aquele observado no registro de base, fazendo um total de $18,17 \pm 2,23$ ajustes por peça de macarrão, sendo $15,67 \pm 2,16$ ajustes de Ex/FI e $2,50 \pm 1,38$ de Ab/Ad com a pata preferencial. Com a pata não-preferencial esses animais fizeram $13,00 \pm 1,26$ ajustes de L/C (ver Figura 24 C e G). Em média, animais desse grupo experimental levaram $30,17 \pm 7,96$ s (ver Figura 25) para comer cada peça de macarrão e fizeram $0,63 \pm 0,15$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,45 \pm 0,09$ ajustes por peça com a pata não-preferencial (ver Figura 26).

O mesmo aconteceu no décimo quarto dia após lesão, onde animais do grupo sham apresentaram comportamento motor semelhante aquele observado no registro de base, fazendo um total de $17,83 \pm 1,60$ ajustes por peça de macarrão, sendo $16,17 \pm 1,33$ ajustes de Ex/FI e $1,67 \pm 0,82$ de Ab/Ad com a pata preferencial. Com a pata não-preferencial esses animais fizeram $12,83 \pm 1,63$ ajustes de L/C (ver Figura 24 D e H). Em média, animais desse grupo experimental levaram $25,17 \pm 7,19$ s (ver Figura 25) para comer cada peça de macarrão e fizeram $0,75 \pm 0,20$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,56 \pm 0,24$ ajustes por peça com a pata não-preferencial (ver Figura 26).

Ainda no sétimo dia após lesão, animais do grupo lesão continuaram apresentando um comportamento motor diferente daquele observado no registro de base, fazendo um total de $3,67 \pm 1,83$ ajustes por peça de macarrão, sendo tudo L/C com a pata preferencial. Com a para não-preferencial, no entanto, esses animais fizeram $13,00 \pm 1,55$ ajustes, sendo $11,67 \pm 1,63$ Ex/FI e $1,33 \pm 0,82$ Ad/Ab (ver Figura 24 K e Q). Ou seja, a semelhança do ocorrido no terceiro dia após lesão, esse grupo de animais continuou apresentando uma inversão das atividades motoras após lesão com ET-1, de tal sorte que a pata lesionada passou a fazer os ajustes motores correspondentes a pata não-preferencial e a pata não lesionada a fazer ajustes motores da pata preferencial. Em

média, animais desse grupo experimental levaram $57,17 \pm 10,15$ s (ver Figura 25) para comer cada peça de macarrão e fizeram $0,07 \pm 0,03$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,23 \pm 0,05$ ajustes por peça com a pata não-preferencial (ver Figura 26).

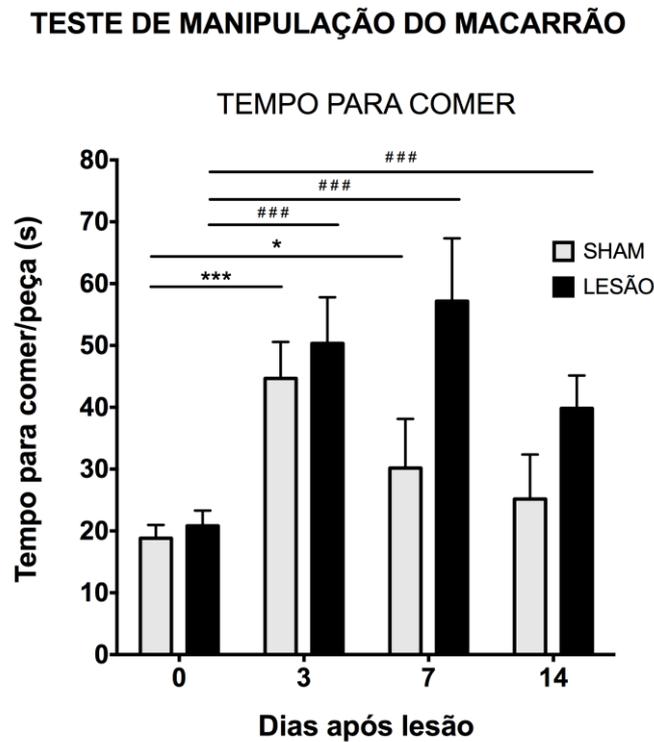


Figura 25: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no tempo (em s) necessário para o animal comer cada pedaço de macarrão, tanto no grupo sham ($F_{(3,20)} = 18,80$ e $P < 0,0001$) quanto lesão ($F_{(3,20)} = 31,15$ e $P < 0,0001$).

O mesmo aconteceu no décimo quarto dia após lesão, onde animais do grupo lesão apresentaram comportamento motor semelhante aquele observado no terceiro e sétimo dias após lesão, fazendo um total de $4,33 \pm 2,50$ ajustes por peça de macarrão, sendo tudo L/C com a pata preferencial (ver Figura 24 M e R). Com a pata não-preferencial, no entanto, esses animais fizeram $16,17 \pm 1,17$ ajustes, sendo $14,50 \pm 1,64$ Ex/Fl e $1,67 \pm 0,82$ Ad/Ab. Em média, animais desse grupo experimental levaram $39,83 \pm 5,31$ s (ver Figura 25) para comer cada peça de macarrão e fizeram $0,11 \pm 0,06$ ajustes por peça com a pata preferencial e $0,41 \pm 0,03$ ajustes por peça com a pata não-preferencial (ver Figura 26).

TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO

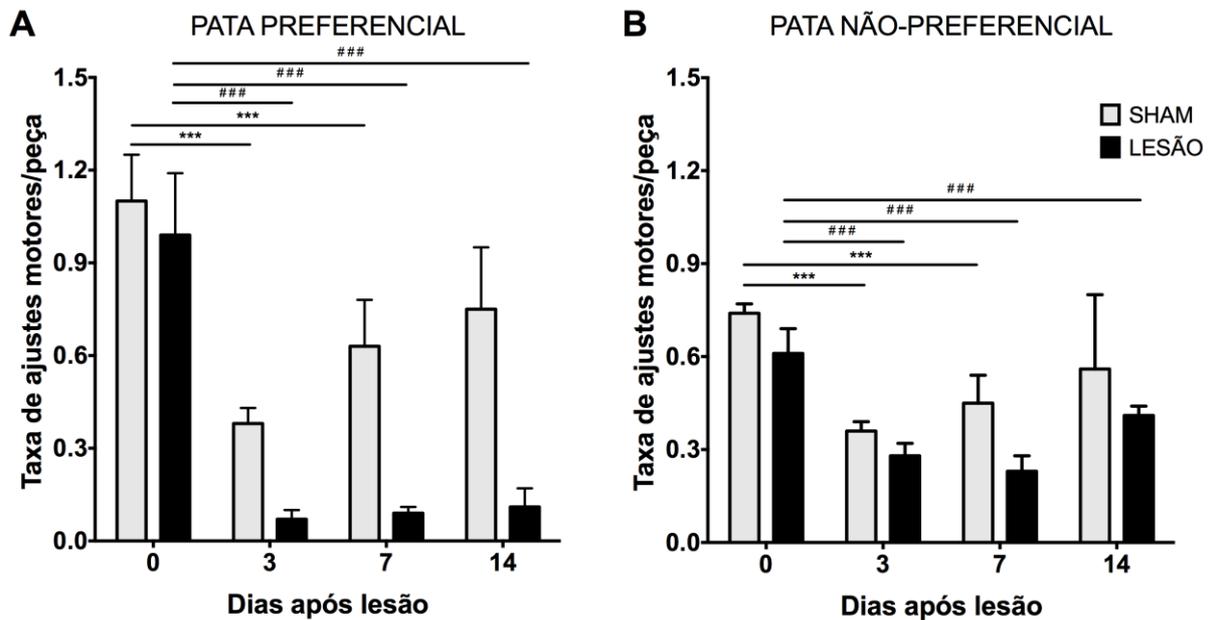


Figura 26: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do macarrão, com base na taxa de ajustes motores das patas. Em A pata preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 97,07$ e $P < 0,0001$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 118,2$ e $P < 0,0001$). Em B pata não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 9,522$ e $P = 0,0004$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 59,21$ e $P < 0,0001$).

4.6 TESTE DO “STAIRCASE” EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR

A semelhança do que foi feito no teste de manipulação do macarrão, apenas animais dos grupos sham e lesão foram operados para exposição do segmento C4 da medula espinhal e microinjeção de solução salina estéril ou ET-1, respectivamente. Deste modo, seguem os resultados desses tratamentos nos terceiro, sétimo e décimo quarto dias após lesão para o teste do “Staircase”.

Animais do grupo sham apresentaram um decréscimo na capacidade de recuperar pelotas de açúcar com a pata preferencial no terceiro dia pós lesão ($7,50 \pm 2,25$) e em seguida, uma melhora desse comportamento motor no sétimo ($7,50 \pm 1,47$) e décimo quarto dias ($7,67 \pm 1,97$) quando comparados ao registro de base. Com a pata não-preferencial não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dias pós lesão quando comparados ao registro de base (ver Apêndice B).

Animais do grupo lesão apresentaram um decréscimo significativo na capacidade de recuperar pelotas de açúcar com a pata preferencial no terceiro ($2,33 \pm 1,03$) e sétimo dias ($2,67 \pm 0,52$) e, em seguida, uma tendência de recuperação espontânea no décimo quarto ($5,67 \pm 1,75$) dia após lesão. Com a pata não-preferencial não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dias pós lesão quando comparados ao registro de base (ver Apêndice B).

TESTE DO "STAIRCASE"

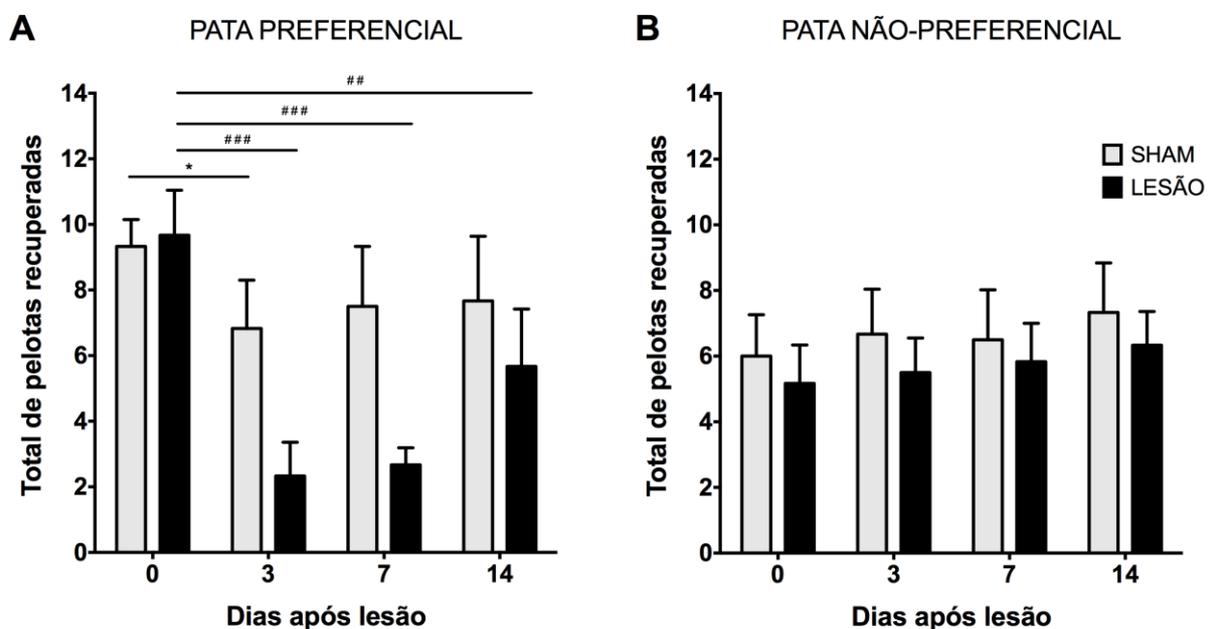


Figura 27: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do “Staircase”, para o total de pelotas recuperadas. Em A pata preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 2,465$ e $P = 0,0920$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 44,36$ e $P < 0,0001$). Em B pata não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,2479$ e $P = 0,8618$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 1,213$ e $P = 0,03307$).

Animais dos grupos sham e lesão não apresentaram mudança significativa na capacidade de recuperar pelotas de açúcar com a boca, tanto do lado preferencial (ver Figura 28 A) quanto do lado não-preferencial (ver Figura 28 B).

Quando somada quantidade de pelotas de açúcar recuperada com a pata à quantidade de pelotas recuperadas com a boca (do mesmo lado) obtêm-se o número total de pelotas alcançadas. Deste modo, animais do grupo sham apresentaram um decréscimo na capacidade de alcançar

pelotas de açúcar do lado preferencial no terceiro dia ($8,00 \pm 2,00$), com recuperação espontânea no sétimo ($9,17 \pm 1,33$) e décimo quarto ($8,33 \pm 2,42$) dia após lesão (ver Figura 29 A). Do lado não-preferencial não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dias após lesão quando comparados ao registro de base (ver Apêndice B).

Animais do grupo lesão apresentaram um decréscimo significativo na capacidade de alcançar pelotas de açúcar no lado preferencial no terceiro ($3,67 \pm 1,21$) e sétimo dias ($4,33 \pm 1,37$) e, em seguida, uma recuperação espontânea no décimo quarto dia ($8,67 \pm 1,21$) após lesão. Do lado não-preferencial não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dias após lesão quando comparados ao registro de base (ver Apêndice B).

TESTE DO "STAIRCASE"

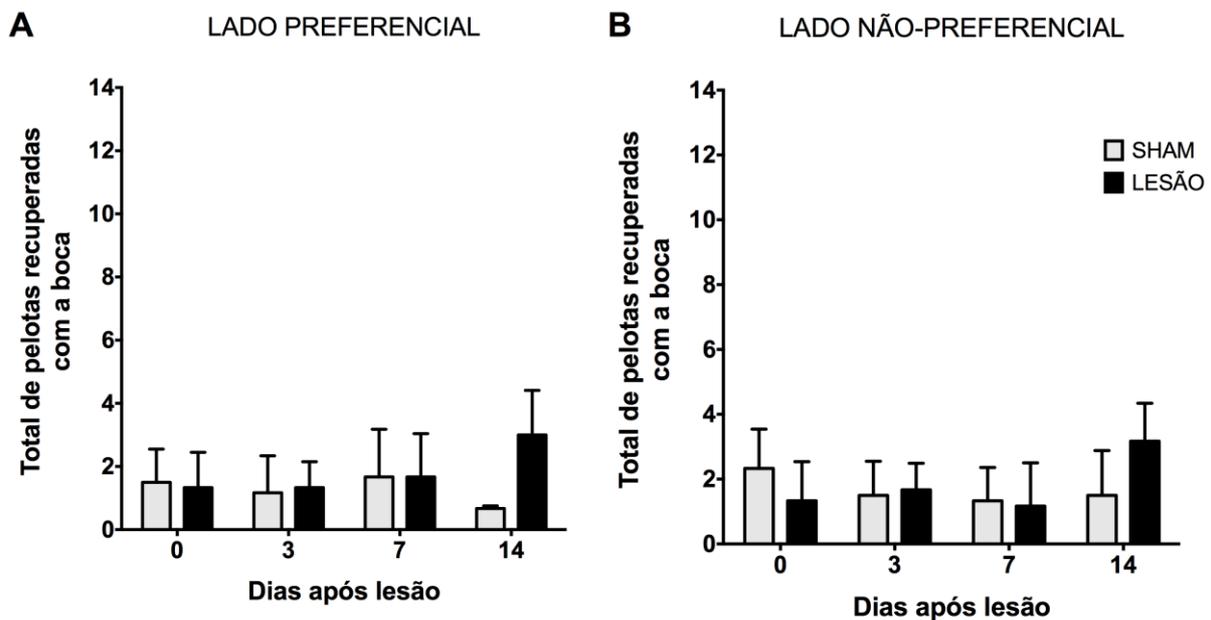


Figura 28: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinal no teste do “*Staircase*”, para o total de pelotas recuperadas com a boca. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,1905$ e $P = 0,9016$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 2,637$ e $P = 0,0777$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,8835$ e $P = 0,4664$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 3,797$ e $P = 0,0264$).

TESTE DO "STAIRCASE"

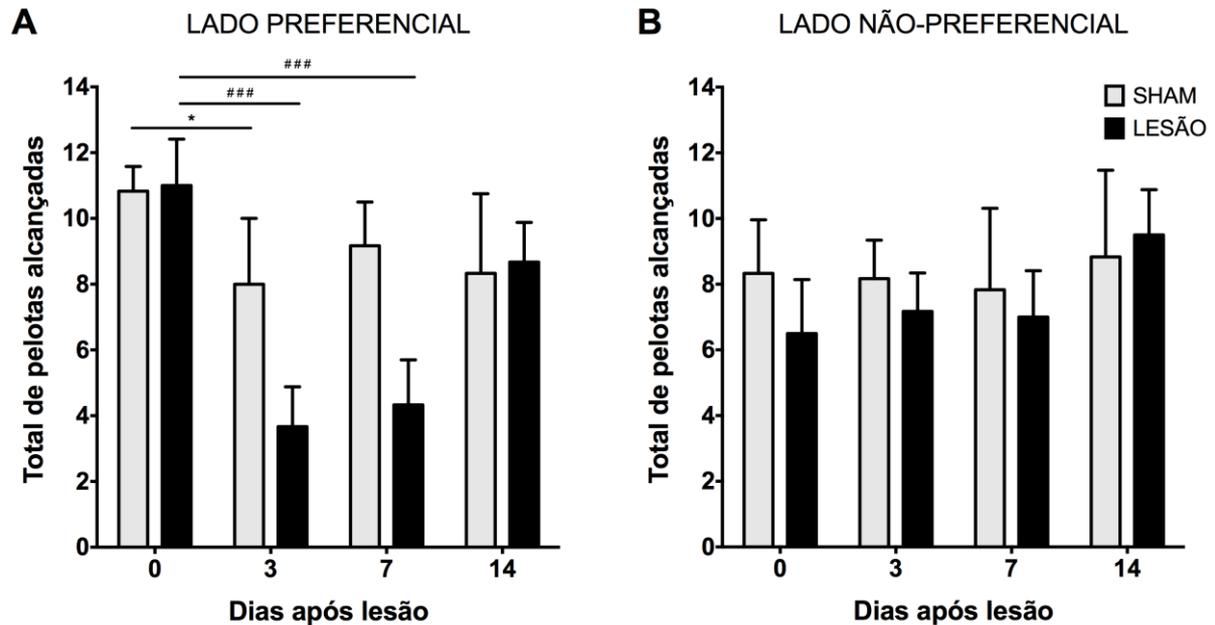


Figura 29: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinal no teste do “*Staircase*”, para o total de pelotas alcançadas. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 3,151$ e $P = 0,0476$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 46,23$ e $P < 0,001$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,2427$ e $P = 0,8655$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 5,377$ e $P = 0,0070$).

Animais dos grupos sham e lesão não apresentaram mudança significativa na quantidade de pelotas de açúcar deixadas (ver Figura 30) no aparato de teste, tanto do lado preferencial quanto do lado não-preferencial. No entanto, animais do grupo lesão derrubaram um número maior de pelotas de açúcar nos dias 3 e 7 após lesão (ver Figura 31).

TESTE DO "STAIRCASE"

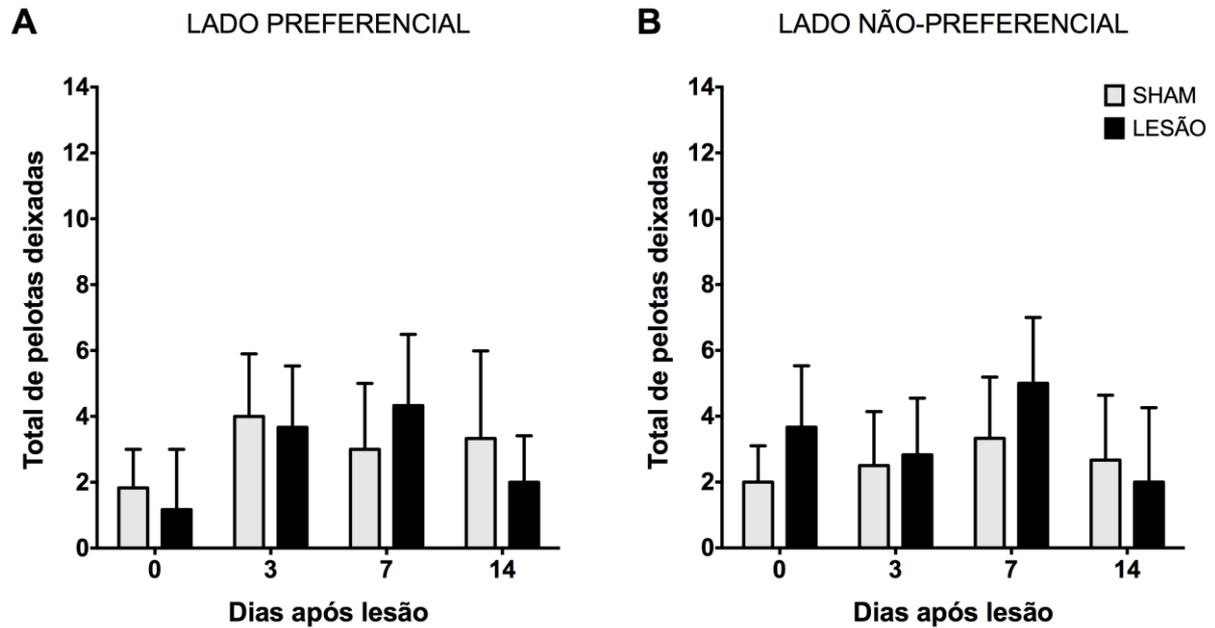


Figura 30: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinal no teste do "Staircase", para o total de pelotas deixadas. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 2,204$ e $P = 0,1192$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 3,720$ e $P = 0,0283$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,6479$ e $P = 0,5934$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 2,512$ e $P = 0,0878$).

TESTE DO "STAIRCASE"

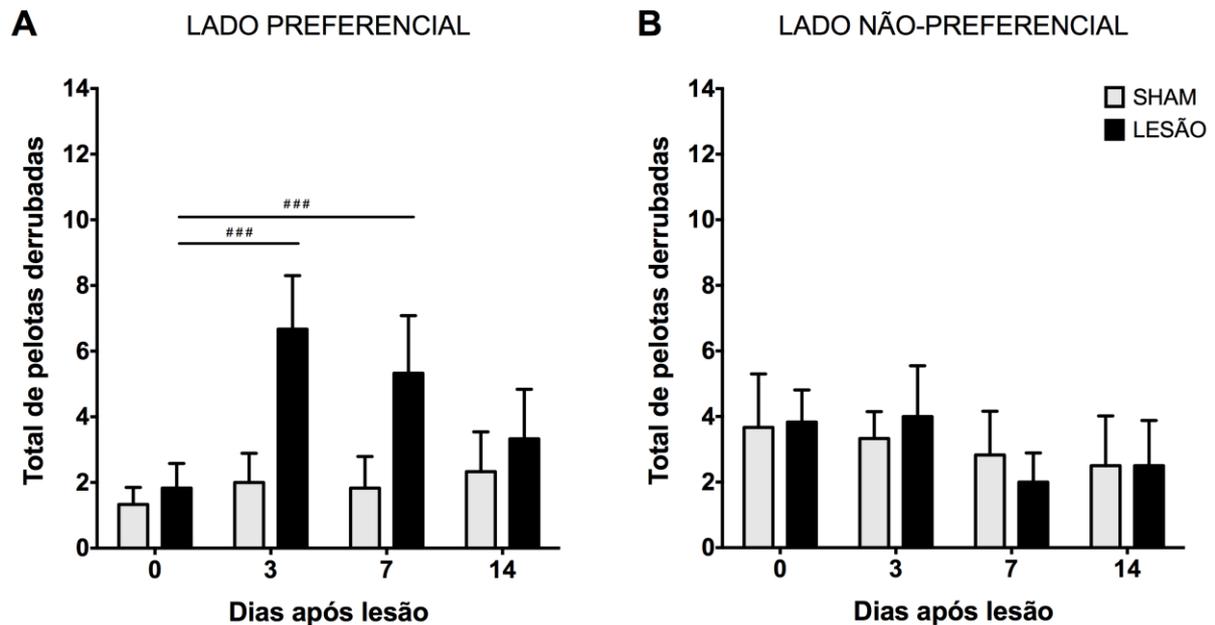


Figura 31: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinal no teste do "Staircase", para o total de pelotas derrubadas. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 1,190$ e $P = 0,3386$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 14,06$ e $P < 0,001$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,8709$ e $P = 0,4726$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 3,846$ e $P = 0,0253$).

Portanto, quando se avaliou o percentual de sucesso no teste do “*Staircase*”, animais do grupo sham mostraram uma diminuição no percentual de sucesso em recuperar pelotas de açúcar com a pata preferencial no terceiro dia após lesão (ver Figura 32 A), enquanto animais do grupo lesão tiveram uma diminuição no percentual de sucesso de recuperação de pelotas de açúcar com a pata preferencial no terceiro, sétimo e décimo quarto dias após lesão (ver Figura 32 A). Do lado não-preferencial não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dias após lesão quando comparados ao registro de base, tanto para o grupo sham, quanto para o grupo lesão (ver Figura 32 B).

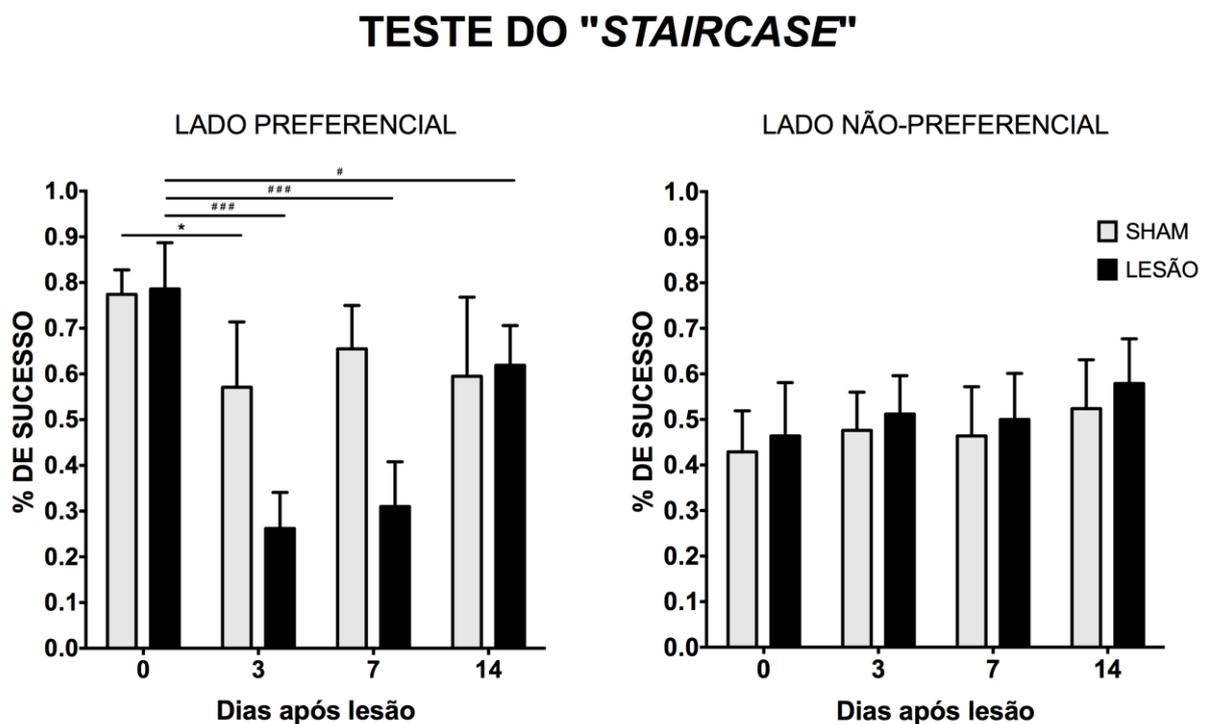


Figura 32: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste do “*Staircase*”, para o percentual de sucesso na tarefa motora de recuperar as pelotas de açúcar. Em A lado preferencial, grupo sham ($F_{(3,20)} = 3,150$ e $P = 0,0476$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 46,15$ e $P < 0,001$). Em B lado não-preferencial grupo sham ($F_{(3,20)} = 0,9090$ e $P = 0,4543$) e grupo lesão ($F_{(3,20)} = 5,390$ e $P = 0,0070$).

4.6 TESTE DE EXTENSÃO DA PATA EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR

Apenas animais do grupo lesão apresentaram uma diminuição no número de respostas para o teste de extensão da pata, do lado preferencial, no décimo quarto dia após lesão (ver Figura 33 A). Do lado não-preferencial não se observou diferença estatisticamente significativa quando comparados ao registro de base, tanto para o grupo sham, quanto para o grupo lesão (ver Figura 33 B).

TESTE DE EXTENSÃO DA PATA

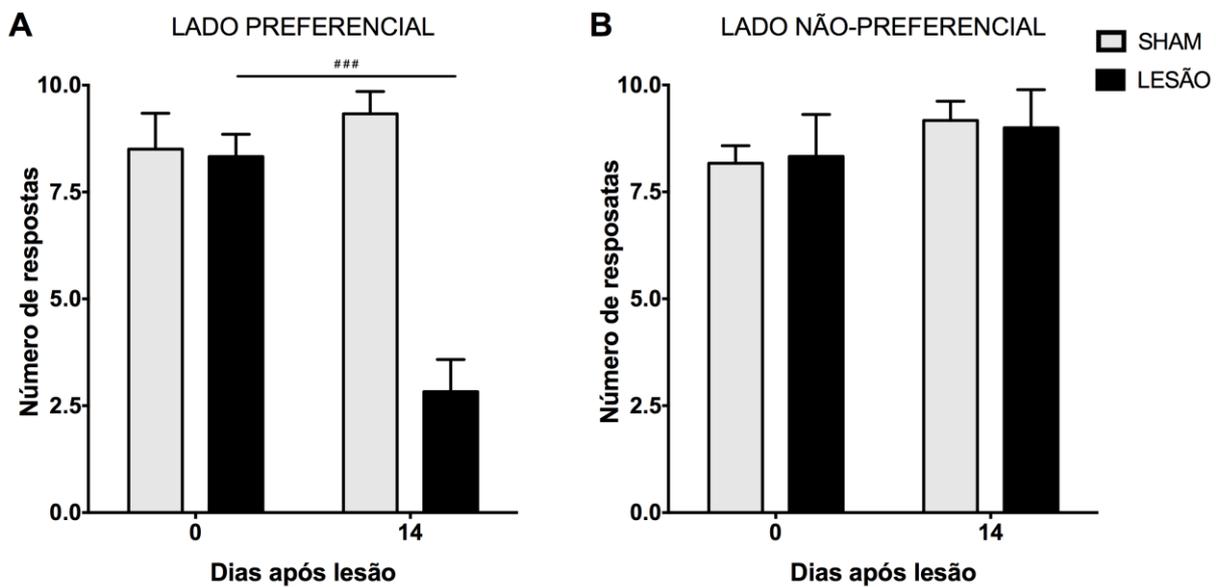


Figura 33: Efeito da lesão unilateral do trato corticoespinhal no teste de extensão da pata comparando os resultados dos grupos controle, sham e lesão para o número de respostas. Em **A**, lado preferencial ($F_{(2,24)} = 168,0$ e $P < 0,0001$) e em **B**, lado não-preferencial ($F_{(2,24)} = 0,2871$ e $P = 0,7530$).

5. DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A medula espinhal é um importante componente morfológico e funcional do SNC, susceptível à lesão quando da diminuição ou interrupção do seu suprimento sanguíneo. Estudos anatômicos mostram que a substância cinzenta apresenta demanda vascular maior do que aquela apresentada pela substância branca em qualquer região da medula espinhal, devido a alta atividade metabólica dos neurônios (DUGGAL e LACH, 2002). No entanto, nas regiões de abaulamento, devido ao aumento no diâmetro transversal (FOUNTAS *et al.*, 1998) da medula espinhal e maior quantidade de tecido nervoso (KO *et al.*, 2004), a substância branca também apresenta demanda vascular aumentada tanto no homem (BOSMIA *et al.*, 2015) como no rato (SCREMIN, 2009). Portanto, qualquer distúrbio vascular nestas regiões tem o potencial de resultar em lesão do tecido nervoso correspondente, provocando déficits sensoriais e/ou motores dos membros superior e/ou inferior. No presente trabalho testou-se a hipótese de que a microinjeção de ET-1 no trato corticoespinhal e a subsequente isquemia transitória focal unilateral da medula espinhal provoca déficit motor na pata anterior ipsilateral.

Para testar a existência e a extensão das lesões sobre as funções sensorial e motora do rato, adaptou-se com sucesso testes comportamentais descritos na literatura científica, capazes de demonstrar os efeitos da LME sobre a atividade motoras da pata anterior em tarefas de apanhar, agarrar (GARCIA-ALIAS *et al.*, 2008; MONTOYA *et al.*, 1991) e manusear objetos (ALLRED *et al.*, 2008b; GARCIA-ALIAS *et al.*, 2009; TENNANT *et al.*, 2010a), bem como, de estender a pata (GARCIA-ALIAS *et al.*, 2009; GARCIA-ALIAS *et al.*, 2008) quando se lhe apresenta um estímulo sensorial no dorso.

5.1.1 Considerações Técnicas

O modelo experimental desenvolvido no presente projeto foi eficiente em provocar lesão unilateral do trato corticoespinal, com repercussão funcional na pata anterior que pode ser avaliada por testes comportamentais validados e estabelecidos na literatura científica. A reperfusão sanguínea observada no local de isquemia, também torna o presente modelo experimental útil para avaliação do estresse oxidativo pós-lesão do tecido nervoso e apresenta reprodutibilidade. Portanto, microinjeções de ET-1 no trato corticoespinal para provocar isquemia focal do TCE é um modelo experimental que poderá ser usado para uma variedade de pesquisas que envolvem lesão da medula espinal e, por exemplo, testes de drogas neuroprotetoras.

No entanto, este modelo experimental apresenta algumas limitações técnicas, tais como a dificuldade de garantir a restrição da área de lesão com a possibilidade de espalhamento da ET-1 para a substância branca suprajacente ao TCE e assim pode causar alteração sensorial. Durante a fase de desenvolvimento da técnica cirúrgica, ficou evidente que se houver algum erro de coordenada estereotáxica, com microinjeção de ET-1 na substância cinzenta do corno dorsal, o animal de experimentação vai a óbito. Neste desenho experimental ainda não foi possível avaliar o curso da evolução temporal da lesão, da resposta citopatológica bem como a consequência do estresse oxidativo devido a reperfusão. Entretanto, estas avaliações já estão sendo abordadas em outros projetos no Laboratório de Neuroplasticidade.

5.2 TESTE DE MANIPULAÇÃO DO MACARRÃO EM ANIMAIS INTACTOS

Pequenos roedores como os ratos aprendem prontamente a agarrar e manusear objetos enquanto comem, tais como as peças de macarrão (IWANIUK e WHISHAW, 2000). Durante o treinamento e registro da atividade motora na avaliação da linha de base, observamos que *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, à semelhança dos animais da linhagem *Long-Evans Hooded*

aprendem facilmente a tarefa motora de manusear peças de macarrão em ambiente controlado, apresentando igual assimetria no uso das patas (“*grasping* e *guide paws*”). No entanto, diferentemente do que foi descrito por ALLRED *et al.*, (2008b) e TENNAT *et al.*, (2010b), ratos da linhagem *Wistar* fazem mais ajustes motores por peça de macarrão com a pata preferencial do que com a pata não-preferencial (ver Figura 14).

Mesmo fazendo mais ajustes motores por peça de macarrão, ratos da linhagem *Wistar* levam praticamente o mesmo tempo (ver Figura 15) que animais da linhagem *Long-Evans Hooded* (ALLRED *et al.*, 2008b; TENNANT *et al.*, 2010a) levam para comer cada peça de macarrão. Portanto, considerando-se que ratos da linhagem *Wistar* fazem mais ajustes motores por peça de macarrão em um tempo semelhante, isso explica por que a taxa de ajustes motores (ver Figura 16) do *Wistar* tende a ser maior que a do *Long-Evans Hooded*.

5.3 TESTE DO “*STAIRCASE*” EM ANIMAIS INTACTOS

Depois de Montoya *et al.*, (1991) ter publicado o teste do “*Staircase*”, outros trabalhos científicos (GARCIA-ALIAS *et al.*, 2009; GARCIA-ALIAS *et al.*, 2008; PAGNUSSAT *et al.*, 2009; SAMSAM *et al.*, 2004) passaram a utilizá-lo como teste de déficit motor em diferentes contextos de lesão. Montoya *et al.*, (1991) utilizou duas pelotas de açúcar em cada poço (um poço por degrau), diferentemente de alguns trabalhos seguintes que passaram a utilizar três pelotas por poço (GARCIA-ALIAS *et al.*, 2009; GARCIA-ALIAS *et al.*, 2008; PAGNUSSAT *et al.*, 2009). Como a preocupação precípua deste trabalho não era a quantidade de ações motoras e sim a qualidade desta, decidiu-se utilizar apenas duas pelotas de açúcar por poço, seguindo o protocolo original do teste.

A semelhança do que se observou no teste de manipulação do macarrão, animais da linhagem *Wistar* facilmente aprendem a recuperar pelotas de açúcar no aparato do teste do “*Staircase*”. Aqui também foi possível observar uma assimetria entre as patas anteriores (preferencial e não-preferencial) com diferença do número de pelotas recuperadas (ver Figura 17). Este resultado parece ser outra particularidade de animais da linhagem *Wistar*, uma vez que no

trabalho original de Montoya *et al.*, (1991) animais da linhagem *Sprague-Dawley* não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando se comparou o resultado individual das patas anteriores.

Embora não exista diferença estatisticamente significativa no número de pelotas recuperadas com a boca (ver Figura 18) ou de pelotas deixadas no aparato de teste (ver Figura 20), há uma tendência a diferença nos resultados do número de pelotas alcançadas (ver Figura 19) e derrubadas (rever Figura 21) no aparato de teste, reforçando a ideia de assimetria no uso dos membros anteriores em ratos da linhagem *Wistar*.

5.4 LESÃO MEDULAR POR ISQUEMIA FOCAL APÓS MICROINJEÇÃO DE ET-1

A microinjeção de ET-1 causou lesão cística amórfica de borda bem delimitada, que sugere rompimento dos axônios do TCE e parte do funículo dorsal. Este mecanismo de lesão é diferente daquele observado em estudos onde foi utilizado esmagamento da medula espinhal por compressão (CHERIYAN *et al.*, 2014; IWANAMI *et al.*, 2005; MARCOL *et al.*, 2012; SCHEFF *et al.*, 2003; STOKES, 1992), onde observou-se uma extensa área de lesão dependente da quantidade de massa arremessada sobre a medula espinhal, com degeneração de um extenso território de tecido nervoso e formação de uma ampla cavidade cística ou de várias cavidades císticas pequenas.

Modelos de lesão por compressão, seja por clipe de aneurisma (FEHLINGS *et al.*, 1989; JOSHI e FEHLINGS, 2002; POON *et al.*, 2007), balão (BOUHY *et al.*, 2006; VANICKY *et al.*, 2001), fórceps (BRADBURY *et al.*, 1999; CAGGIANO *et al.*, 2005; GARCIA-ALIAS *et al.*, 2008; PLEMEL *et al.*, 2008; STREIJGER *et al.*, 2011) ou estrangulamento por fio de sutura (DA COSTA *et al.*, 2008), a semelhança dos modelos por compressão também produzem lesões extensas, mas com uma ampla variedade de desfechos a depender do tipo de dispositivo utilizado, da quantidade de pressão aplicada e do tempo de indução da lesão. Nestes modelos de lesão pode ou não ser observado formação de cavidade cística. Modelos de lesão por fórceps (BRADBURY *et al.*, 1999; GARCIA-ALIAS *et al.*, 2008) ou balão (BOUHY *et al.*, 2006; VANICKY *et al.*, 2001), aplicados apenas a região dorsal da medula espinhal, resultam em destruição completa dos funículos dorsais e

tratos corticoespinhais bilateralmente. Raciocínio semelhante se aplica aos modelos de lesão por tração (CHOO *et al.*, 2009; DABNEY *et al.*, 2004; SEIFERT *et al.*, 2011), deslocamento (KWON *et al.*, 2002; REID *et al.*, 2000) e transecção da medula espinhal (CAGGIANO *et al.*, 2005; CHERIYAN *et al.*, 2014; CHOO *et al.*, 2009; JOSHI e FEHLINGS, 2002; LU *et al.*, 2012; SEIFERT *et al.*, 2011). Em todos esses modelos de lesão observa-se déficit sensorial e motor e dificuldade em se interpretar e diferenciar a eficiência das diferentes intervenções terapêuticas.

5.5 TESTE DE MANUSEIO DO MACARRÃO EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR

O teste de manuseio do macarrão evidenciou de maneira clara e inequívoca (ver Figura 24) que houve um prejuízo às ações motoras de preensão e manuseio com a pata preferencial (ipsilateral à lesão), a partir do terceiro dia após lesão, em animais que sofreram lesão por microinjeção de ET-1. É evidente, neste grupo experimental (grupo lesão), a ocorrência de padrão motor de compensação rápida à lesão (evidente em 3 dias após lesão), onde a pata não-preferencial assume as funções motoras da pata preferencial realizando ajustes motores de Ex/FI e Ab/Ad, ao mesmo tempo em que a pata preferencial (ipsilateral à lesão) passou a fazer ajustes característicos da pata não-preferencial (L/Rc).

O desenvolvimento de um comportamento compensatório é uma estratégia vantajosa que permite a execução de tarefas da vida diária independentemente da lesão, estimulando aquisição de novas habilidades motoras e diminuindo os efeitos deletérios da lesão. As bases neurais desse comportamento motor compensatório ainda precisam ser mais exploradas.

Como já era esperado, houve um acréscimo significativo no tempo (em segundo) necessário para os animais comerem cada peça de macarrão, tanto no grupo sham (3 e 7 dias após lesão), como no grupo lesão (3, 7 e 14 dias após lesão), o que revela que não somente a lesão medular, mas também o procedimento cirúrgico contribuiu para esse acréscimo de tempo (ver Figura 25).

Esse acréscimo de tempo contribuiu de maneira significativa à diminuição da taxa de ajustes motores das patas preferencial e não-preferencial, tanto em animais do grupo sham (3 e 7 dias após lesão) quanto em animais de grupo lesão (3, 7 e 14 dias após lesão) (ver Figura 26 A e B).

5.6 TESTE DO “STAIRCASE” EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR

Os resultados do teste do “*Staircase*” também evidenciam de maneira inequívoca que houve um prejuízo às ações motoras da pata preferencial (ipsilateral à lesão) em animais do grupo lesão, em todos os dias avaliados (ver Figura 27 A), sem prejuízo às ações motoras da pata não-preferencial (ver Figura 27 B). Esses resultados corroboram a ocorrência de lesão do trato corticoespinhal unilateralmente.

Não houve diferença estatística no resultado de recuperação de pelotas com a boca tanto do lado preferencial (ver Figura 28) quanto do lado não-preferencial (ver Figura 28 B), no entanto, como esse resultado é somado ao total de pelotas alcançados com as patas, ele interferiu no resultado do total de pelotas alcançadas do lado preferencial de animais do grupo lesão, onde parece ter ocorrido uma recuperação espontânea da lesão, sem diferença entre o registro de base e o décimo quarto dia após lesão (ver Figura 29 A). Essa característica do teste do “*Staircase*” precisa ser observada com atenção para não se afirmar categoricamente que houve uma recuperação do membro afetado, quando parte do comportamento motor não depende apenas do membro afetado.

Embora haja variabilidade de resultado do total de pelotas deixadas no aparato de teste, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, lados preferencial e não-preferencial e tempos após lesão (ver Figura 30 A e B). Resultado diferente foi observado quando se avaliou o número de pelotas derrubadas. Animais do grupo lesão apresentaram mais dificuldade de apreender as pelotas de açúcar e isso contribuiu para um resultado mais expressivo, com um número maior de pelotas derrubadas pela pata preferencial no terceiro e sétimo dias após lesão (ver Figura 31 A).

O resultado do percentual de sucesso se assemelha ao do número total de pelotas recuperadas com a pata, onde ficou evidente um prejuízo às ações motoras da pata preferencial em

animais do grupo lesão (ver Figura 32), corroborando o fato de existir uma lesão unilateral do trato corticoespinhal.

5.6 TESTE DE EXTENSÃO DA PATA EM ANIMAIS APÓS LESÃO MEDULAR

À semelhança dos outros testes comportamentais utilizados neste projeto de pesquisa, o teste de extensão da pata também foi de fácil implementação e avaliação. Este teste revelou que houve prejuízo à sensibilidade da pata preferencial de animais do grupo lesão, no décimo quarto dia após lesão (ver Figura 33 A). Este resultado, somado ao aspecto histológico da lesão mostra a dificuldade de se garantir que a área de lesão fique restrita ao TCE, mostrando que uma vez microinjetada, a ET-1 pode se espalhar para a substância branca suprajacente ao TCE.

6. CONCLUSÕES

A microinjeção de ET-1 no funículo dorsal de *Rattus novergicus* da linhagem *Wistar* provocou lesão do trato corticoespinal e substância branca suprajacente. Houve alteração histológica com formação de cavidade cística amorfa sobre o trato corticoespinal e parte da substância branca suprajacente, cuja área de lesão foi calculada em $0,421 \text{ mm}^2 (\pm 0,035 \text{ mm}^2, n=3)$.

Na avaliação do teste do macarrão, o *Rattus novergicus* apresentou comportamento motor diferente dos animais da linhagem *Long-Evans Hooded*, fazendo mais ajustes motores para tempo semelhante de manuseio da peça de macarrão.

Na avaliação do teste do “Staircase”, o *Rattus novergicus* apresentou comportamento motor semelhante aquele observado em animais da linhagem *Sprague-Dawley*.

As alterações sensório-motoras induzidas pelo modelo experimental de lesão da medula espinal estudado no presente projeto evidenciaram o comportamento de compensação motora no teste do macarrão, diminuição da habilidade de preensão no teste do “Staircase” e diminuição da sensibilidade somática no teste de extensão da pata.

Este modelo experimental de LME apresenta fácil reprodutibilidade e sensibilidade a diferentes testes comportamentais já existentes (ou desenvolvimento de novos testes comportamentais), podendo ser aplicado em diferentes trabalhos experimentais de entrega de droga para avaliação de terapias regenerativas.

7. REFERÊNCIAS

ALLRED; ADKINS; WOODLEE; HUSBANDS; MALDONADO; KANE; SCHALLERT; JONES. The Vermicelli Handling Test: A simple quantitative measure of dexterous forepaw function in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 170, n.2, p. 229-244, 2008a.

ALLRED; ADKINS; WOODLEE; HUSBANDS; MALDONADO; KANE; SCHALLERT; JONES. The vermicelli handling test: a simple quantitative measure of dexterous forepaw function in rats. **J Neurosci Methods**, v. 170, n.2, p. 229-244, 2008b.

ANDERSON. Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population. **J Neurotrauma**, v. 21, n.10, p. 1371-1383, 2004.

BALLERMANN; MCKENNA; WHISHAW. A grasp-related deficit in tactile discrimination following dorsal column lesion in the rat. **Brain Res Bull**, v. 54, n.2, p. 237-242, 2001.

BAO; LIU. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. **Neuroscience**, v. 115, n.3, p. 839-849, 2002.

BARSON. The vertebral level of termination of the spinal cord during normal and abnormal development. **J Anat**, v. 106, n.Pt 3, p. 489-497, 1970.

BARSON; SANDS. Regional and segmental characteristics of the human adult spinal cord. **J Anat**, v. 123, n.Pt 3, p. 797-803, 1977.

BLANCO; ANDERSON; STEWARD. Recovery of forepaw gripping ability and reorganization of cortical motor control following cervical spinal cord injuries in mice. **Exp Neurol**, v. 203, n.2, p. 333-348, 2007.

BOSMIA; HOGAN; LOUKAS; TUBBS; COHEN-GADOL. Blood supply to the human spinal cord: Part I. Anatomy and hemodynamics. **Clin Anat**, v. 28, n.1, p. 52-64, 2015.

BOUHY; MALGRANGE; MULTON; POIRRIER; SCHOLTES; SCHOENEN; FRANZEN. Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic

rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages. **FASEB J**, v. 20, n.8, p. 1239-1241, 2006.

BRADBURY; KHEMANI; VON; KING; PRIESTLEY; MCMAHON. NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. **Eur J Neurosci**, v. 11, n.11, p. 3873-3883, 1999.

CAGGIANO; ZIMBER; GANGULY; BLIGHT; GRUSKIN. Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. **J Neurotrauma**, v. 22, n.2, p. 226-239, 2005.

CAMPOS; RIBEIRO; LISTIK; PEREIRA; ANDRADE SOBRINHO; RAPOPORT. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 35, n., p. 88-93, 2008.

CENCI; WHISHAW; SCHALLERT. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n.7, p. 574-579, 2002.

CHEN; TANG; VOGEL; DEVIVO. Causes of spinal cord injury. **Topics in spinal cord injury rehabilitation**, v. 19, n.1, p. 1-8, 2013.

CHERIYAN; RYAN; WEINREB; CHERIYAN; PAUL; LAFAGE; KIRSCH; ERRICO. Spinal cord injury models: a review. **Spinal Cord**, v. 52, n.8, p. 588-595, 2014.

CHOO; LIU; LIU; DVORAK; TETZLAFF; OXLAND. Modeling spinal cord contusion, dislocation, and distraction: characterization of vertebral clamps, injury severities, and node of Ranvier deformations. **J Neurosci Methods**, v. 181, n.1, p. 6-17, 2009.

COURTINE; BUNGE; FAWCETT; GROSSMAN; KAAS; LEMON; MAIER; MARTIN; NUDO; RAMON-CUETO; ROUILLER; SCHNELL; WANNIER; SCHWAB; EDGERTON. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? **Nat Med**, v. 13, n.5, p. 561-566, 2007.

CRAVEN. Spinal cord. **Anaesthesia & intensive care medicine**, v. 5, n.5, p. 144-146, 2004.

DA COSTA; CARVALHO; MARTINEZ; DE-ARY-PIRES; PIRES-NETO; DE ARY-PIRES. Strapping the spinal cord: an innovative experimental model of CNS injury in rats. **J Neurosci Methods**, v. 170, n.1, p. 130-139, 2008.

DABNEY; EHRENSHTEYN; AGRESTA; TWISS; STERN; TICE; SALZMAN. A model of experimental spinal cord trauma based on computer-controlled intervertebral distraction: characterization of graded injury. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 29, n.21, p. 2357-2364, 2004.

DARBY. Chapter 3 - General Anatomy of the Spinal Cord em ed^eds Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Ans (Third Edition), vol. City: Mosbyp. Pages 65-972014.

DENIC; JOHNSON; BIEBER; WARRINGTON; RODRIGUEZ; PIRKO. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. **Pathophysiology**, v. 18, n.1, p. 21-29, 2011.

DEVIVO. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. **Spinal Cord**, v. 50, n.5, p. 365-372, 2012.

DUGGAL; LACH. Selective vulnerability of the lumbosacral spinal cord after cardiac arrest and hypotension. **Stroke**, v. 33, n.1, p. 116-121, 2002.

DUNHAM; SIRIPHORN; CHOMPOOPONG; FLOYD. Characterization of a Graded Cervical Hemiconfusion Spinal Cord Injury Model in Adult Male Rats. **J Neurotraum**, v. 27, n.11, p. 2091-2106, 2010.

FEHLINGS; TATOR; LINDEN. The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 74, n.4, p. 241-259, 1989.

FIFORD; BILSTON; WAITE; LU. A vertebral dislocation model of spinal cord injury in rats. **J Neurotrauma**, v. 21, n.4, p. 451-458, 2004.

FORSYTH; ALEXANDER; DAVIS; UNDERDAL. **The Advantages of Early Spine Fusion in the Treatment of Fracture-Dislocation of the Cervical Spine**. ed., 1959, 17-36 p.

FOUNTAS; KAPSALAKI; JACKSON; VOGEL; ROBINSON. Cervical spinal cord--smaller than considered? **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 23, n.14, p. 1513-1516, 1998.

FROST; BARBAY; MUMERT; STOWE; NUDO. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. **Behav Brain Res**, v. 169, n.2, p. 206-211, 2006.

GALVÃO; CRISTANTE; JORGE; DAMASCENO; MARCON; OLIVEIRA; BARROS FILHO. Avaliação funcional e histológica da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 19, n., p. 10-16, 2011.

GARCIA-ALIAS; BARKHUYSEN; BUCKLE; FAWCETT. Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. **Nat Neurosci**, v. 12, n.9, p. 1145-1151, 2009.

GARCIA-ALIAS; LIN; AKRIMI; STORY; BRADBURY; FAWCETT. Therapeutic time window for the application of chondroitinase ABC after spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 210, n.2, p. 331-338, 2008.

GRUNER. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. **J Neurotrauma**, v. 9, n.2, p. 123-126; discussion 126-128, 1992.

HARRISON; O'BRIEN; ADAMS; COWIN; RUITENBERG; SENGUL; WATSON. Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. **NeuroImage**, v. 68, n., p. 22-29, 2013.

HUGHES; ANTHONY; RUDDIN; BOTHAM; RANKINE; SABLONE; BAUMANN; MIR; PERRY. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 62, n.12, p. 1276-1286, 2003.

IVANCO; PELLIS; WHISHAW. Skilled forelimb movements in prey catching and in reaching by rats (*Rattus norvegicus*) and opossums (*Monodelphis domestica*): relations to anatomical differences in motor systems. **Behavioural Brain Research**, v. 79, n.1-2, p. 163-181, 1996.

IWANAMI; YAMANE; KATOH; NAKAMURA; MOMOSHIMA; ISHII; TANIOKA; TAMAOKI; NOMURA; TOYAMA; OKANO. Establishment of graded spinal cord injury model in a nonhuman primate: the common marmoset. **J Neurosci Res**, v. 80, n.2, p. 172-181, 2005.

IWANIUK; WHISHAW. On the origin of skilled forelimb movements. **Trends Neurosci**, v. 23, n.8, p. 372-376, 2000.

JOSHI; FEHLINGS. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. **J Neurotrauma**, v. 19, n.2, p. 175-190, 2002.

KAMEYAMA; HASHIZUME; SOBUE. Morphologic features of the normal human cadaveric spinal cord. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 21, n.11, p. 1285-1290, 1996.

KO; PARK; SHIN; BAEK. Gross quantitative measurements of spinal cord segments in human. **Spinal Cord**, v. 42, n.1, p. 35-40, 2004.

KUNKEL-BAGDEN; DAI; BREGMAN. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. **Exp Neurol**, v. 119, n.2, p. 153-164, 1993.

KWON; OXLAND; TETZLAFF. Animal models used in spinal cord regeneration research. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 27, n.14, p. 1504-1510, 2002.

KWON; HILLYER; TETZLAFF. Translational research in spinal cord injury: a survey of opinion from the SCI community. **J Neurotrauma**, v. 27, n.1, p. 21-33, 2010.

LEE; JONES; MAYRHOFER; BROWN; CLELAND. Origin of macrophages in a kaolin-induced model of rat syringomyelia: a study using radiation bone marrow chimeras. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 30, n.2, p. 194-200, 2005.

LINKER; LEE. Models of autoimmune demyelination in the central nervous system: on the way to translational medicine. **Exp Transl Stroke Med**, v. 1, n., p. 5, 2009.

LIU; XU; PAN; MCADOO. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. **Neuroscience**, v. 93, n.4, p. 1383-1389, 1999.

LIU; ZHANG; TITSWORTH; JIANG; HAN; LU; SHIELDS; XU. A novel role of phospholipase A2 in mediating spinal cord secondary injury. **Ann Neurol**, v. 59, n.4, p. 606-619, 2006.

LU; BLESCH; GRAHAM; WANG; SAMARA; BANOS; HARINGER; HAVTON; WEISHAUP; BENNETT; FOUAD; TUSZYNSKI. Motor Axonal Regeneration after Partial and Complete Spinal Cord Transection. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n.24, p. 8208-8218, 2012.

MAGNUSON; TRINDER; ZHANG; BURKE; MORASSUTTI; SHIELDS. Comparing Deficits Following Excitotoxic and Contusion Injuries in the Thoracic and Lumbar Spinal Cord of the Adult Rat. **Experimental Neurology**, v. 156, n.1, p. 191-204, 1999.

MALINSKA. Volume changes in the human spinal cord during ontogenetic development. **Folia morphologica**, v. 20, n.2, p. 188-191, 1972.

MARCOL; SLUSARCZYK; GZIK; LARYSZ-BRYSZ; BOBROWSKI; GRYNKIEWICZ-BYLINA; ROSICKA; KALITA; WEGLARZ; BARSKI; KOTULSKA; LABUZEK; LEWIN-KOWALIK. Air gun impactor--a novel model of graded white matter spinal cord injury in rodents. **J Reconstr Microsurg**, v. 28, n.8, p. 561-568, 2012.

METZ; MERKLER; DIETZ; SCHWAB; FOUAD. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. **Brain Res**, v. 883, n.2, p. 165-177, 2000.

MONTOYA; CAMPBELL-HOPE; PEMBERTON; DUNNETT. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. **J Neurosci Methods**, v. 36, n.2-3, p. 219-228, 1991.

NOUT; ROSENZWEIG; BROCK; STRAND; MOSEANKO; HAWBECKER; ZDUNOWSKI; NIELSON; ROY; COURTINE; FERGUSON; EDGERTON; BEATTIE; BRESNAHAN; TUSZYNSKI. Animal models of neurologic disorders: a nonhuman primate model of spinal cord injury. **Neurotherapeutics**, v. 9, n.2, p. 380-392, 2012.

NSCISC. 2014. Annual Statistical for the Spinal Cord Injury Model Systems - Complete Public Version. City: University of Alabama at Birmingham: Birmingham, Alabama. Report no.

PAGNUSSAT; MICHAELSEN; ACHAVAL; NETTO. Skilled forelimb reaching in Wistar rats: Evaluation by means of Montoya staircase test. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 177, n.1, p. 115-121, 2009.

PAN; NI; SODHI; AGUANNO; YOUNG; HART. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion. **J Neurosci Res**, v. 68, n.3, p. 315-322, 2002.

PIAO; LEE; JANG; KIM; KIM. A mouse model of photochemically induced spinal cord injury. **J Korean Neurosurg Soc**, v. 46, n.5, p. 479-483, 2009.

PLEMEL; DUNCAN; CHEN; SHANNON; PARK; SPARLING; TETZLAFF. A graded forceps crush spinal cord injury model in mice. **J Neurotrauma**, v. 25, n.4, p. 350-370, 2008.

POON; GUPTA; SHOICHET; TATOR. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 32, n.25, p. 2853-2859, 2007.

REID; POTTER; DELANEY; HSIEH; NICOSIA; HAYES. Ofloxacin for the treatment of urinary tract infections and biofilms in spinal cord injury. **International journal of antimicrobial agents**, v. 13, n.4, p. 305-307, 2000.

SAMSAM; GADRINAB; BUSHNELL. Toxicological evaluation of the staircase test for assessing fine motor movements. **Neurotoxicol Teratol**, v. 26, n.1, p. 113-120, 2004.

SCHEFF; RABCHEVSKY; FUGACCIA; MAIN; LUMPP. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. **J Neurotrauma**, v. 20, n.2, p. 179-193, 2003.

SCREMIN. Chapter 5 - The Spinal Cord Blood Vessels em KAYALIOGLU, C. W. P., ed^eds The Spinal Cord, vol. City: Academic Pressp. Pages 57-632009.

SEIFERT; BELL; ELMER; SUCATO; ROMERO. Characterization of a novel bidirectional distraction spinal cord injury animal model. **J Neurosci Methods**, v. 197, n.1, p. 97-103, 2011.

SHERMAN; NASSAUX; CITRIN. Measurements of the normal cervical spinal cord on MR imaging. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 11, n.2, p. 369-372, 1990.

STOKES. Experimental spinal cord injury: a dynamic and verifiable injury device. **J Neurotrauma**, v. 9, n.2, p. 129-131; discussion 131-124, 1992.

STREIJGER; PLUNET; PLEMEL; LAM; LIU; TETZLAFF. Intermittent fasting in mice does not improve hindlimb motor performance after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 28, n.6, p. 1051-1061, 2011.

TENNANT; ASAY; ALLRED; OZBURN; KLEIM; JONES. The vermicelli and capellini handling tests: simple quantitative measures of dexterous forepaw function in rats and mice. **J Vis Exp**, v. n.41, p. 2010a.

TENNANT; ASAY; ALLRED; OZBURN; KLEIM; JONES. The Vermicelli and Capellini Handling Tests: Simple quantitative measures of dexterous forepaw function in rats and mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2010b. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2076>

VAN DEN BERG; CASTELLOTE; MAHILLO-FERNANDEZ; DE PEDRO-CUESTA. Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. **Neuroepidemiology**, v. 34, n.3, p. 184-192; discussion 192, 2010.

VANICKY; URDZIKOVA; SAGANOVA; CIZKOVA; GALIK. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J Neurotrauma**, v. 18, n.12, p. 1399-1407, 2001.

WATSON; HARVEY. Chapter 11 - Projections from the Brain to the Spinal Cord em KAYALIOGLU, C. W. P., ed^eds *The Spinal Cord*, vol. City: Academic Pressp. Pages 168-1792009.

WATSON; KAYALIOGLU. Chapter 1 - The Organization of the Spinal Cord em KAYALIOGLU, C. W. P., ed^eds *The Spinal Cord*, vol. City: Academic Pressp. Pages 1-72009.

WATSON; PRADO; DIETRICH; GINSBERG; GREEN. Photochemically induced spinal cord injury in the rat. **Brain Res**, v. 367, n.1-2, p. 296-300, 1986.

WHISHAW; COLES. Varieties of paw and digit movement during spontaneous food handling in rats: postures, bimanual coordination, preferences, and the effect of forelimb cortex lesions. **Behav Brain Res**, v. 77, n.1-2, p. 135-148, 1996.

WHISHAW; GORNY; SARNA. Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations. **Behav Brain Res**, v. 93, n.1-2, p. 167-183, 1998a.

WHISHAW; SARNA; PELLIS. Evidence for rodent-common and species-typical limb and digit use in eating, derived from a comparative analysis of ten rodent species. **Behav Brain Res**, v. 96, n.1-2, p. 79-91, 1998b.

WHO. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals em ed^eds Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, vol. City: 2011.

ANEXOS**ANEXO A – PARECER DO CEPAE/UFPA****PARECER BIO079-12**

Projeto: INIBIÇÃO MICROGLIAL E DEGRADAÇÃO DE PROTEOGLICANOS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA A REGENERAÇÃO AXONAL APÓS LESÃO ISQUÊMICA FOCAL DA MEDULA ESPINHAL

Coordenador(a): Prof. Dr. Antonio Pereira Jr

Área Temática: Biologia

Vigência: 10/10/2010 a 12/12/2014

Nº na CEPAE-UFPA: BIO0079-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de outubro de 2010


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA