

# Efeito da metilprednisolona na lesão medular em ratos: análise funcional e histológica

*Effect of methylprednisolone in medullar injury in rats: a functional and histological analysis*

MARCOS ANTÔNIO TEBET<sup>1</sup>, TARCÍSIO ELOY PESSOA BARROS FILHO<sup>2</sup>, ITIBAGI ROCHA MACHADO<sup>3</sup>,  
MÁRCIO OLIVEIRA PENNA DE CARVALHO<sup>4</sup>, FÁBIO RICHIERI HANANIA<sup>5</sup>, KUANG DAC<sup>6</sup>

## RESUMO

Os efeitos farmacológicos da metilprednisolona têm sido investigados no tratamento da lesão medular. Foi realizado estudo experimental com doze ratos wistar submetidos à lesão contusa da medula espinhal pelo sistema NYU. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo MP, que recebeu metilprednisolona após a lesão contusa e o grupo controle, que recebeu soro fisiológico a 0,9%. Foi realizada análise da recuperação funcional locomotora utilizando-se o teste de BBB no 2º, 7º e 14º dias após a contusão. No décimo quarto dia, os ratos foram sacrificados e analisados os achados histológicos da medula lesada. Observou-se que os ratos do grupo MP apresentaram melhora na recuperação da função locomotora em comparação com o grupo controle e que os achados histológicos da medula lesada não puderam ser correlacionados com a recuperação da função locomotora.

**Descritores:** Metilprednisolona; Medula espinhal; Ratos; Traumatismos da medula espinhal; Atividade motora.

## INTRODUÇÃO

A lesão medular é um problema devastador que acomete principalmente jovens do sexo masculino em idade produtiva. Acomete 20 a 40 pessoas por milhão de habitantes a cada ano e acarreta impacto econômico anual de mais de quatro milhões de dólares nos Estados Unidos da América, onde a principal causa é acidentes por veículos motorizados<sup>(9,24,25)</sup>.

## SUMMARY

The pharmacological effects of the methylprednisolone in the treatment of the spinal cord lesion, have been researched. An experimental study was performed with twelve wistar rats subjected to a contusion lesion of the spinal cord, by the NYU system. The rats were divided in two groups; the MP group which received the methylprednisolone after the contusion lesion and the control group, which received a 0,9% physiological serum. An analysis of the recuperation of the functional movement of the rats was accomplished on the 2nd, 7th and 14th day after the contusion, utilizing the BBB test. On the fourteenth day the rats were sacrificed and the histological findings of the spinal cord lesion were analyzed. It was noted that the rats from the MP group exhibited an improvement in the recuperation of their functional movement compared to that of the control group, and the histological findings of the spinal cord lesion couldn't be correlated with the recuperation of their functional movement.

**Key words:** Methylprednisolone; Spinal cord; Rats; Traumatism of spinal cord; Motor activity.

## INTRODUCTION

Medullar injury is a devastating problem affecting mainly young males in the productive age. It will affect 20 to 40 people per million each year and generate an annual economic impact of over four million American dollars in the USA, where it is mostly caused by motor vehicle accidents<sup>(9,24,25)</sup>.

Trabalho realizado no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

- 1- Professor Adjunto da Faculdade de Medicina de Jundiaí
- 2- Professor Associado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia - FMUSP  
Diretor Científico do IOT - HC/FMUSP
- 3- Professor Adjunto da Faculdade de Medicina de Jundiaí
- 4- Membro Titular da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
- 5- Acadêmico do 5º ano - FMUSP
- 6- Acadêmico do 5º ano - FMUSP

Endereço para correspondência: Rua Euclides da Cunha, 180 CEP 13200-390 Jundiaí - SP - E-mail: matebet@uol.com.br

Trabalho recebido em 21/02/2003. Aprovado em 20/03/2003

Work performed at Laboratory of Rachimedular Traumatism and Peripheral Nerves of Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

- 1- Adjunct Professor, Faculty of Medicine of Jundiaí, SP, Brazil
- 2- Associate Professor, Department of Orthopedics and Traumatology, FMUSP - Scientific Director of IOT - HC/FMUSP
- 3- Adjunct Professor, Faculty of Medicine of Jundiaí, SP, Brazil
- 4- Permanent Member of the Brazilian Society for Orthopedics and Traumatology
- 5- 5th year student, FMUSP
- 6- 5th year student, FMUSP

Address: Rua Euclides da Cunha, 180 - CEP 13200-390 Jundiaí - SP  
E-mail: matebet@uol.com.br

Estudos têm demonstrado que a lesão medular é causada em duas fases distintas: primária ou mecânica e secundária ou isquêmica<sup>(22,24)</sup>. A alteração biológica básica da lesão secundária ou isquêmica é a peroxidação lipídica que desencadeia uma cascata de reações e promove a diminuição do fluxo medular, isquemia e necrose tecidual<sup>(2,13,15,22)</sup>.

Na tentativa de prevenir a isquemia medular pós-traumática secundária e melhorar o potencial de recuperação funcional nos lesados medulares, drogas moduladoras das respostas endógenas estão sendo progressivamente estudadas e aos poucos introduzidas<sup>(9,15)</sup>.

A metilprednisolona, em altas doses, tem sido utilizada nos estudos experimentais realizados em ratos e gatos, com melhora na perfusão microvascular, no metabolismo medular e em medidas histomorfométricas<sup>(1,8)</sup>. Postula-se que seus mecanismos de ação sejam: a inibição da peroxidação lipídica, diminuição da degeneração do axônio, a prevenção de isquemia e a reversão do acúmulo de cálcio intracelular<sup>(1,6,8,14,25)</sup>.

Estudos controlados e multicêntricos, como o National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS) I, II e III, realizados a partir de 1979, defendem o uso da metilprednisolona dentro das primeiras oito horas após lesão medular traumática na prática clínica<sup>(9)</sup>. Porém, apesar de mais de 85% dos estudos experimentais demonstrarem algum efeito benéfico com esteróides, os mecanismos de ação da metilprednisolona na medula lesada ainda não são totalmente compreendidos<sup>(9)</sup>.

A escala locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) foi desenvolvida em 1995 para permitir a avaliação do padrão da recuperação locomotora em estudos experimentais em ratos submetidos a lesão medular pelo sistema New York University (NYU)<sup>(4)</sup>.

Os objetivos deste estudo são avaliar a recuperação da função locomotora de ratos com lesão medular produzida pelo sistema NYU medicados com metilprednisolona e correlacioná-la aos achados do estudo histológico da medula lesada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 12 ratos wistar, adultos jovens, machos, com média de peso de 327g (mínimo de 302g, máximo de 346g e DP=13,5). Os animais foram mantidos no Laboratório de Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em câmaras climatizadas à temperatura de 25° C, em gaiolas individuais, com ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentação ad libitum.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo MP (n=6) recebeu 30mg/Kg de metilprednisolona por via intraperitoneal, cinco minutos e três horas após a contusão medular; e o grupo controle (n=6), que recebeu placebo com aplicação de um mililitro de soro fisiológico a 0,9%.

Para o procedimento anestésico utilizou-se pentobarbital intraperitoneal, na dose de 65mg/Kg. Foi realizada incisão na pele na linha média dorsal de aproximadamente cinco centímetros. A musculatura paravertebral foi afastada dos processos espinho-

*Studies have shown that medullary injury occurs in two distinct phases: the primary (or mechanical) phase and the secondary (or ischemic) phase<sup>(22,24)</sup>. The basic biological change of secondary, or ischemic, injury is the lipid peroxidation that triggers a cascade of reactions and promotes the reduction of medullary flow, ischemia and tissular necrosis<sup>(2,13,15,22)</sup>.*

*In an effort to prevent secondary post-traumatic medullary ischemia and improve the potential for functional recovery of medullary injuries, drugs able to modulate endogenous responses are being progressively investigated and gradually introduced<sup>(9,15)</sup>.*

*High doses of methylprednisolone have been used in trials performed in rats and cats, with improvements in microvascular perfusion, medullary metabolism and histomorphometric measurements<sup>(1,8)</sup>. It is suggested that its mechanisms of action consist of lipid peroxidation inhibition, reduction of axon degeneration, prevention of ischemia and reversal of intracellular calcium accumulation<sup>(1,6,8,14,25)</sup>.*

*Multicenter, controlled studies such as the National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS) I, II and III, started in 1979, advocate the use of methylprednisolone within the first eight hours after the traumatic medullary injury in the clinical practice<sup>(9)</sup>. Although over 85% of the trials showed some beneficial effect with steroids, the mechanisms of action of methylprednisolone in the injured medulla are not yet totally understood<sup>(9)</sup>.*

*The BBB locomotor scale was developed in 1995 by Basso, Beattie and Bresnahan to evaluate the pattern of locomotor recovery in trials performed in rats submitted to medullary injury by the NYU system<sup>(4)</sup>.*

*The purpose of this study is to evaluate the locomotor function recovery in rats with medullary injury produced by the NYU system and treated with methylprednisolone, and correlate it with the findings from the histological study on injured medulla.*

## MATERIAL AND METHODS

*Twelve young adult male Wistar rats were studied whose average weight was 327 g (minimum 302 g, maximum 346 g, SD = 13.5). The animals were kept in the Laboratory of Microsurgery, IOT-FMUSP, inside individual cages in acclimatized chambers at a temperature of 25°C, with a 12-hour light/dark cycle and ad libitum feeding.*

*The animals were randomized into two groups: the MP group (n=6) received 30 mg/kg methylprednisolone intraperitoneally five minutes and then three hours following medullary contusion, and the control group (n=6) received placebo as one application of 1 ml 0.9% saline solution.*

*For the anesthetic procedure a 65-mg/kg dose of pentobarbital was administered intraperitoneally. One skin incision of about 5 cm in length was made in the dorsal median line. The paravertebral musculature was separated from the spinal processes to allow the exposure of spinal cord vertebrae T8 to T12; then, with the aid of a proper punching device, laminectomies of the distal half of vertebrae T9 and T10 were*

para exposição de T8 a T12 da coluna espinal e realizou-se, com a utilização de sacabocado adequado, as laminectomias da metade distal de T9 e de T10, sem provocar lesão do saco dural, permitindo espaço suficiente para acomodar a cabeça do impactor.

A lesão medular foi realizada pelo sistema New York University (NYU), desenvolvido por Gruner<sup>(12)</sup>, em 1992 (Figura 1). Realizou-se a lesão contusa equivalente à queda de um peso de 10g a uma altura de 25mm.

Realizada a lesão medular, o rato foi transferido para uma câmara com temperatura controlada, a temperatura retal foi aferida no décimo quinto minuto seguinte e a bexiga esvaziada por compressão manual após 6 horas, 24 horas e diariamente, até a eutanásia.

A avaliação locomotora foi realizada no 2º, 7º e 14º dias após contusão medular, utilizando-se a escala de (BBB), publicada em 1995. Baseados nesta escala foram observados os movimentos das articulações dos quadris, joelhos e tornozelos, além da posição do tronco, rabo e patas traseiras. A partir destas observações foram atribuídos pontos de zero a 21, sendo zero a ausência total de movimentos e 21 a presença de movimentos normais. Foram treinados quatro médicos, como observadores, que compuseram o grupo de estudo para avaliação dos animais pela escala de BBB<sup>(4)</sup>.

Os animais foram sacrificados no 14º dia após a lesão, aplicando-se 140mg/Kg de pentobarbital intraperitoneal, conforme as regras e regulamentações da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP.

O segmento de T1 à L5, contendo todo o estójo ósseo e os músculos paravertebrais, foi removido, e laminectomias de T5 à L5 foram realizadas para remoção da medula. A região medular com evidências macroscópicas de contusão foi denominada "área B", sendo a extremidade cefálica a "área A" e a caudal a "área C", dentro de 1cm a partir do epicentro da contusão, 5mm acima e 5mm abaixo. O conjunto foi armazenado em frascos contendo formol a 10%.

O segmento medular foi submetido a cortes histológicos no plano axial com intervalo de dois milímetros. O material foi processado e desidratado em bateria de álcoois, desidratado em xilol e incluso em parafina. Após a realização dos cortes histológicos de 5m em micrótomo, 5mm acima e cinco abaixo da lesão, o material foi fixado em lâminas de vidro e corado pela técnica de hematoxilina-eosina.

As alterações histológicas foram avaliadas quanto a presença de edema, congestão, infiltrado celular, cavidades e necrose. Um escore de 0 a 3 foi atribuído para cada achado dos cortes medulares estudados.



**Figura 1 - Sistema New York University (NYU).  
Figure 1 - The NYU system.**

performed without causing any injury to the dural sac, allowing space enough to accommodate the impactor head.

The medullar injury was performed according to the NYU system developed by Gruner<sup>(12)</sup> in 1992 (Figure 1). A contuse injury equivalent to the fall of a 10-g weight from a 25-mm height was produced.

After the production of medullar injury, the rat was transferred to a temperature-controlled chamber; the rat's rectal temperature was taken after 15 minutes and

its bladder emptied by hand compression after 6 hours, 24 hours and then once daily, until the killing.

The locomotor function was evaluated 2, 7 and 14 days after the medullar contusion, with the aid of the BBB scale. Based on this scale, we observed the movements of the hip, knee and ankle articulations, as well as the positions of the trunk, tail and hind legs. To quantify these observations a score ranging from zero to 21 was used where zero corresponded to complete absence of movements and 21 to the presence of normal movements. Four physicians were trained as observers and formed the study group in charge of the evaluation of the animals with the BBB scale<sup>(4)</sup>.

Fourteen days after the injury the animals were killed by one dosis of 140 mg/kg pentobarbital administered intraperitoneally in accordance with the rules and regulations of the Ethics Committee for Analysis of Research Projects, HC - FMUSP.

The T1 - L5 segment containing the whole osseous enchainement and the paravertebral muscles was removed and laminectomies (vertebrae T5 - L5) were performed in order to remove the medulla. The medullar region with macroscopic evidence of contusion was named "Zone B", while the cephalic end was named "Zone A" and the caudal area, "Zone C", measured within 1 cm from the epicenter of the contusion, 5 mm above and 5 mm below it. The whole set was stored in jars with 10% formol solution.

The medullar segment was submitted to histological cuts in the axial plan with 2-mm intervals. The material was processed and dehydrated using a series of alcohols, and then dehydrated in xylol and embedded in paraffin. After the 5 µ histological cuts were made with the aid of a microtome caliper 5 mm above and 5 mm below the injury, the material was fixed in glass staining dishes and stained with the hematoxylin-eosin technique.

The histological alterations were evaluated for the presence of edema, congestion, cell infiltrate, cavitations and necrosis. The findings regarding the medullar cuts investigated were scored from 0 to 3.

## Análise estatística

Na análise descritiva, as variáveis quantitativas (peso, escores do 2º, 7º e 14º dias após lesão medular) foram avaliadas com a observação dos valores mínimos e máximos e com o cálculo de médias, desvios-padrões e medianas; as variáveis qualitativas (edema, congestão, necrose, infiltração celular e cavitação de cada região), com o cálculo de frequências absolutas e percentuais.

Para a análise comparativa, utilizou-se o teste exato de Fisher para avaliação da homogeneidade das proporções dos grupos em relação às variáveis qualitativas. O teste não-paramétrico de Anova comparou os dois grupos nas variáveis mensuradas para amostras independentes e o teste não-paramétrico de Friedman comparou os momentos no mesmo grupo nas variáveis mensuradas para amostras dependentes. Todos os testes foram realizados admitindo-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Análise funcional motora de BBB

A Tabela 1 mostra o resultado da avaliação funcional segundo a escala locomotora de BBB dos grupos no 2º, 7º e 14º dias após a lesão medular e o gráfico 1 mostra a evolução dos valores médios da avaliação funcional. As médias dos valores obtidas nos três momentos são representadas na Tabela 2.

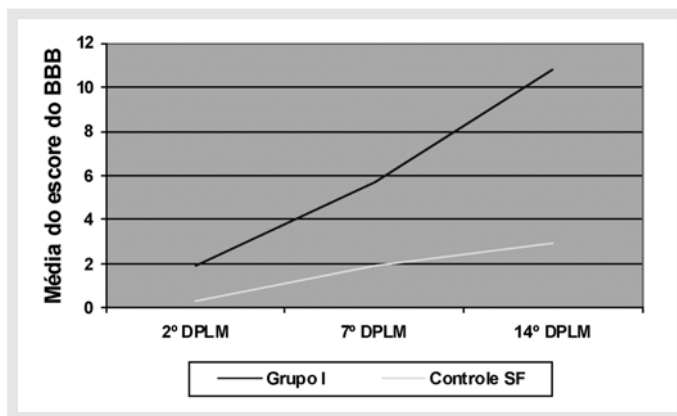
Foi realizado estudo estatístico dos resultados comparativos do BBB em cada momento. Os grupos apresentaram alterações significantes nos momentos avaliados ( $p < 0,01$ ). Através das comparações dois a dois, os resultados da avaliação do 2º dia após lesão medular diferem significativamente do 14º dia em ambos os grupos ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística comparando os grupo no sétimo dia após lesão medular com os demais momentos (Tabela 2 e Gráfico 1).

	RATO	2º DPLM	7º DPLM	14º DPLM
Grupo I	1	0	7	10
	2	3	7	12
	3	6	8	13
	4	3	1	5
	5	0	7	12
	6	0	6	13
	1	1	2	2
	2	0	1	4

Fonte: Laboratório de Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP  
DPLM = dia de pós-lesão medular.

**Tabela 1 - Resultados da avaliação funcional dos ratos no 2º, 7º e 14º dias após lesão medular.**

**Table 1 - Results of the functional evaluation in rats on Days 2, 7 and 14 following medullar injury.**



**Gráfico 1 - Evolução dos valores médios da avaliação funcional no 2º, 7º e 14º dias após lesão medular.**

**Graph 1 - Evolution of the mean values of the functional evaluation on Days 2, 7 and 14 following medullar injury.**

Grupos	2º DPLM	7º DPLM	14º DPLM	Média DPLM
Grupo I	2,0	6,0	10,8	6,3
Controle SF	0,3	2,2	3,0	1,8
Média por DPLM	1,1	4,1	6,9	

Fonte: Laboratório de Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP  
DPLM = dia de pós-lesão medular.

**Tabela 2 - Média do BBB no 2º, 7º e 14º dias após lesão medular por grupo.**

**Table 2 - BBB average per group on Days 2, 7 and 14 following medullar injury.**

## Statistical analysis

In the descriptive analysis the quantitative variables (weight, scores on Days 2, 7 and 14 following the medullar injury) were evaluated through the observation of minimum and maximum values and the calculation of the mean values, standard deviations and average values. Qualitative variables such as edema, congestion, necrosis, cell infiltration and cavitation were also evaluated for each region, and the calculation of both absolute and percentage frequencies was performed.

For the comparative analysis the Fisher's exact test was used to evaluate the homogeneity of the proportions of the groups as regards the qualitative variables. The ANOVA non-parametric analysis compared both groups as regards the variables that were measured for independent samples while the non-parametric Friedman test compared the time points in the same group for the variables measured for dependent samples. All tests were performed based on a 5% significance level ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

### Motor functional analysis according to the BBB scale

Table 1 shows the result of the functional evaluation according to the BBB locomotor scale of the groups on Days 2, 7 and 14 following the medullar injury, and Graph 1 shows the evolution of the average values of the functional evaluation. The average values found at those three time points are represented in Table 2.

A statistical study of the comparative results obtained with the BBB scale was performed at each time point. The groups showed significant alterations at the time points evaluated ( $p < 0.01$ ). By paired comparison, on Day 2 following the medullar injury, the results of the evaluation were significantly different from the results found on Day 14, in both groups ( $p < 0.05$ ). There were no statistical differences on Day 7 after the medullar injury as compared to the other time points (Table 2 and Graph 1).

Foi observado que o grupo MP apresentou uma média significativamente mais elevada ( $p < 0,05$ ) que o grupo controle no terceiro momento (14º dia após lesão medular).

### Análise histológica

A análise histológica avaliou as variáveis quanto a presença de edema, congestão, necrose, infiltrado celular e cavitação no centro da lesão (região B), acima (região A) e abaixo (região C). Para cada variável foi atribuído um escore de 0 a 3 (Tabelas 3, 4 e 5).

A necrose e o edema foram os únicos achados encontrados em todos os ratos de todos os grupos na zona de lesão (zona B). Porém, a necrose esteve presente em 11 (91,6%) ratos e o edema em 10 (83,3%) na zona abaixo da lesão (zona C). Na zona acima da lesão (zona A) a presença destes foi encontrada em 7 (58,3%) e em 9 (75,0%), respectivamente.

Outro achado significativo foi a relação da necrose na zona de lesão (zona B), onde sua presença foi significativamente maior que nas outras zonas ( $p < 0,05$ ).

A zona B apresentou escore histológico significativamente maior ao ser comparado com as demais zonas ( $p < 0,05$ ). Entretanto, ao comparar o grupo controle com o grupo MP em cada zona, esta diferença não foi observada ( $p > 0,05$ ) (Gráfico 2).

As fotomicrografias da medula são apresentadas nas Figuras 1 e 2, mostrando os achados histológicos de cavitação, edema, con-

Grupo	Rato	Edema	Congestão	Cavidade	Necrose	Infiltração
Grupo I	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	2	0	1	2	0
	4	1	1	2	1	2
	5	1	1	0	0	0
	6	1	1	1	1	1
Controle	1	0	2	0	0	0
	2	1	1	0	1	0
	3	1	1	0	0	0
	4	2	1	0	1	0
	5	2	2	0	3	0
	6	1	1	0	1	0

Fonte: Laboratório de Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP

**Tabela 3 -** Escore dos achados histológicos de cada rato segundo edema, hemorragia, cavidade, necrose e infiltração encontrados na zona A.

**Table 3 -** Score of histological findings for each rat as regards edema, hemorrhage, cavitation, necrosis and infiltration obtained in zone A.

Grupo	Rato	Edema	Congestão	Cavidade	Necrose	Infiltração
Grupo I	1	2	0	2	1	0
	2	1	1	2	1	2
	3	2	0	2	2	3
	4	1	1	2	2	2
	5	3	3	3	2	2
	6	2	1	2	1	2
Controle	1	1	1	2	2	0
	2	1	1	2	3	2
	3	1	1	1	2	2
	4	2	1	1	2	1
	5	3	2	0	2	2
	6	2	1	1	2	1

Fonte: Laboratório de Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP

**Tabela 4 -** Escore dos achados histológicos de cada rato segundo edema, hemorragia, cavidade, necrose e infiltração encontrados na zona B.

**Table 4 -** Score of histological findings for each rat according to edema, hemorrhage, cavitation, necrosis and infiltration obtained in zone B.

Grupo	Rato	Edema	Congestão	Cavidade	Necrose	Infiltração
Grupo I	1	2	0	2	0	0
	2	1	0	1	1	3
	3	2	0	1	2	0
	4	0	1	1	1	0
	5	0	0	1	1	3
	6	1	0	1	1	1
Controle	1	1	1	2	2	3
	2	1	0	1	1	2
	3	1	0	0	1	2
	4	1	0	0	1	0
	5	1	1	0	1	0
	6	1	0	1	1	1

Fonte: Laboratório de Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP

**Tabela 5 -** Escore dos achados histológicos de cada rato segundo edema, hemorragia, cavidade, necrose e infiltração encontrados na zona C.

**Table 5 -** Score of histological findings for each rat according to edema, hemorrhage, cavitation, necrosis and infiltration obtained in zone C.

It was seen that the MP group presented a significantly higher mean value ( $p < 0.05$ ) than the control group at the third time point (Day 14 after the medullar injury).

### Histological analysis

A histological analysis evaluated the variables for the presence of edema, congestion, necrosis, cell infiltrate and cavitation at the center of the injury (zone B), above the injury (zone A) and below the injury (zone C). Each variable was scored from 0 to 3 (see Tables 3, 4 and 5).

Necrosis and edema were the only findings seen in all rats of all groups in the injury zone (Zone B). However, necrosis was present in 11 (91.6%) rats and edema was present in 10 (83.3%) rats in the zone below the injury (zone C). In the zone above the injury (zone A) necrosis and edema were found in 7 (58.3%) and 9 (75.0%) rats, respectively.

Another significant finding was the necrosis ratio in the injury zone (Zone B), with a presence that was significantly higher as compared with the other zones ( $p < 0.05$ ).

Zone B had a significantly higher histological score as compared with the other zones ( $p < 0.05$ ). However, when the control group was compared with the MP group in each zone, this difference was not observed ( $p > 0.05$ ) (Graph 2).

Photomicrographs of the medulla are presented in Figures 1 and 2 that show the histological findings regarding cavitation, edema, con-

gestão, necrose e infiltração celular dos cortes medulares corados com hematoxilina-eosina.

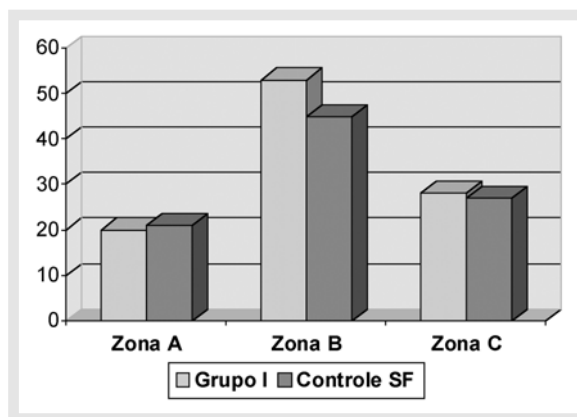
## DISCUSSÃO

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para simular a lesão medular e reproduzi-la de forma homogênea, e assim, analisar a resposta da função locomotora em animais que sofreram lesão medular<sup>(1,5,8,13,14,17,25)</sup>.

Testes locomotores qualitativos devem ser fáceis de usar, sensíveis e capazes de detectar rapidamente qualquer mudança de comportamento<sup>(4,10)</sup>. O teste desenvolvido por Tarlov e Klinger, em 1954, foi o primeiro a se aproximar deste ideal e posteriormente modificado por outros autores<sup>(4,10,19)</sup>, até que, em 1995, Basso et al.<sup>(4)</sup> desenvolveram o teste denominado BBB.

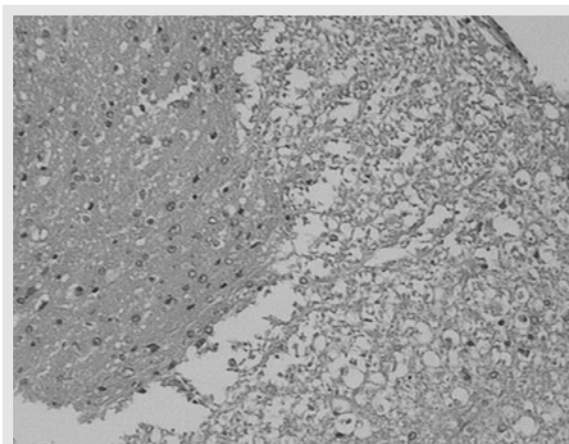
O teste locomotor de BBB é um sistema de 21 pontos baseado em achados comportamentais definidos como movimentação dos membros inferiores, posição do tronco, posição do abdome, acomodação das patas, marcha, coordenação, capacidade de limpar as patas, posição predominante das patas traseiras, instabilidade do tronco e posição do rabo, os quais seguem a recuperação, desde a paralisia completa (escore 0) à locomoção normal (escore 21), avaliados em campo aberto por um período de quatro minutos.

O teste de BBB foi desenvolvido para ser mais específico, confiável e abrangente que os precedentes<sup>(4)</sup>, o que pode levar a grande variação na interpretação, tanto inter como intra-observador<sup>(23)</sup>. Porém, observamos que, com treinamento dos observadores, o teste pôde ser aplicado de forma sensível e adequada, como também observado por Basso et al.<sup>(3,4)</sup>.



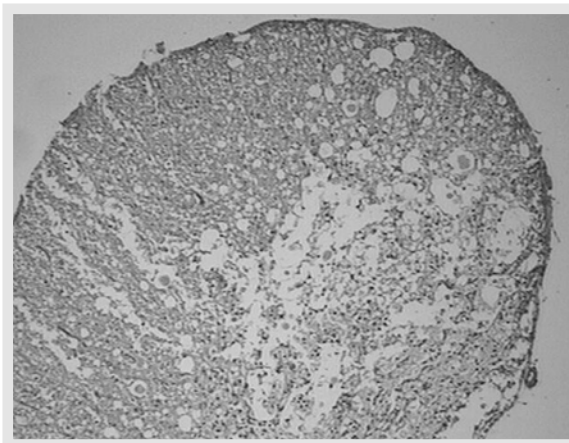
**Gráfico 2 - Resultado do escore histológico obtido nas zonas A, B e C.**

**Graph 2 - Results of the histological scores obtained in zones A, B and C.**



**Figura 2 - Fotomicrografia da lesão medula na zona B (HE x 100).**

**Figure 2 - Photomicrography of medullary injury in zone B (HE x 100).**



**Figura 3 - Fotomicrografia da medula lesada na zona B (HE x 40).**

**Figure 3 - Photomicrography of injured medulla in Zone B (HE x 40).**

gestion, necrosis and cell infiltration of the hematoxylin-eosin-stained medullar cuts.

## DISCUSSION

Several experimental models were developed to simulate medullary injury and reproduce it in homogeneous form, in order to analyze the locomotor function response in animals submitted to medullary injury<sup>(1,5,8,13,14,17,25)</sup>.

Qualitative locomotor tests should be easy to use, sensible and able to quickly detect any behavioral changes<sup>(4,10)</sup>. The Tarlov and Klinger test developed in 1954 was the first to approach this ideal; later, other authors<sup>(4,10,19)</sup> modified this test until 1995, when the so-called BBB test was developed by Basso et al.<sup>(4)</sup>.

The BBB locomotor test is a 21-point system based on behavioral findings defined as movements of the hind legs, position of the trunk, position of the abdomen, accommodation of legs, march, coordination, ability to clean the paws, predominant position on the hind legs, instability of the trunk and position of the tail that follow recovery, from complete paralysis (score 0) to normal locomotion (score 21), evaluated in open field for a 4-minute period.

The BBB test was designed to be more specific, trustworthy and comprehensive than the previous tests<sup>(4)</sup> that might lead to a large variation in the interpretation both by inter-observers and intra-observers<sup>(23)</sup>. However, we noticed that once the observed were trained, the test could be applied in a sensitive, proper form, as noticed also by Basso et al.<sup>(3,4)</sup>.

Recent studies indicate that contuse injuries in the spinal cord may be minimized by

Estudos recentes indicam que as lesões contusas da medula espinhal podem ser minimizadas por terapêuticas farmacológicas, desde que administradas em curto espaço de tempo após o trauma<sup>(11)</sup>. Apesar dos mecanismos de ação não serem bem entendidos, nem universalmente aceitos, corticosteróides, como a metilprednisolona, têm sido amplamente utilizados no tratamento da lesão medular experimental<sup>(13,25)</sup>. A metilprednisolona foi considerada como tratamento padrão após lesão medular aguda em humanos por alguns autores<sup>(20)</sup>, porém, isto não é um consenso geral<sup>(16)</sup>.

A metilprednisolona foi primeiramente utilizada em pacientes com lesão medular aguda na década de sessenta, por demonstrar efeito benéfico no tratamento de outros distúrbios neurológicos, como tumores do sistema nervoso central<sup>(9)</sup>.

Desde então, vários estudos experimentais foram realizados com o objetivo de demonstrar os efeitos benéficos da metilprednisolona no traumatismo medular agudo<sup>(9,13,15,25)</sup>, porém o NAS-CIS II, terminado em 1990, foi o primeiro estudo randomizado, duplo-cego placebo controlado, a demonstrar inequivocamente que a metilprednisolona pode modificar benéficamente o curso dos eventos após lesão medular aguda<sup>(9,15)</sup>.

No presente estudo, observamos que o grupo de ratos que recebeu metilprednisolona apresentou uma melhora na escala locomotora significativamente maior (média de 6,1) que o grupo controle (média de 1,7), concordando com os resultados encontrados por Constantini e Young<sup>(6)</sup>. Acreditamos que esta melhora funcional seja devido aos efeitos benéficos da metilprednisolona na fase isquêmica da lesão medular.

A presença de áreas necróticas principalmente na região dorsal da medula e na zona B (zona da lesão), demonstra que a necrose é em decorrência não só da lesão mecânica inicial, mas, principalmente, da lesão isquêmica secundária, como também citado por Balentine<sup>(2)</sup>.

Não observamos a presença de zonas hemorrágicas nos segmentos medulares avaliados, o que discorda com o publicado por Constantini e Young<sup>(6)</sup>. Porém, estes autores realizaram estudo histológico 24 horas após a lesão medular e, segundo Balentine<sup>(2)</sup>, a hemorragia é um achado inicial e predomina nos três primeiros dias, sendo posteriormente substituída por áreas de cavitação (Figuras 2 e 3). Em nosso estudo, realizamos a avaliação histológica após 14 dias, quando a área hemorrágica já havia sido substituída.

Interpretamos as cavitações circundadas por células não neuronais e a presença de infiltrado celular (neutrófilos) como reação inflamatória local. Periféricamente a estas áreas de cavitação, observamos a presença de tecido neuronal viável, comprovando a ocorrência de lesão medular incompleta.

Ao analisarmos as evoluções dos resultados funcionais locomotores e os achados histológicos, observamos que não pudemos correlacioná-los, ou seja, a recuperação funcional não foi inversamente proporcional aos indícios de necrose tecidual, diferentemente do estudo realizado por Basso et al.<sup>(3)</sup>, mas concordantes com as observações de Means et al.<sup>(18)</sup>.

Basso et al.<sup>(3)</sup>, em 1996, realizaram análise histomorfométrica e coloração específica para tecido nervoso para analisar e quantificar o tecido nervoso remanescente e assim compara-

*pharmacological therapies, provided they are administered shortly after the trauma<sup>(11)</sup>. Although their mechanisms of action are not well understood nor universally accepted, corticosteroids such as methylprednisolone have been widely employed in the treatment of experimental medullary injury<sup>(13,25)</sup>. Methylprednisolone was considered a standard therapy following acute medullary injury in humans by some authors<sup>(20)</sup>, although there is no general consensus<sup>(16)</sup>.*

*Methylprednisolone was used initially, in the decade of 1960, in patients with acute medullary injury due, to its beneficial effect in the treatment of other neurological disorders such as CNS tumors<sup>(9)</sup>.*

*From then on several trials were performed with the purpose of showing the beneficial effects of methylprednisolone in acute medullary traumatism<sup>(9,13,15,25)</sup>. However, the NAS-CIS II study, completed in 1990, was the first randomized, double-blind, placebo-controlled study to show unmistakably that methylprednisolone may change beneficially the course of events following acute medullary injury<sup>(9,15)</sup>.*

*In the present study we observed that the group of rats receiving methylprednisolone showed an improvement in the locomotor scale that was significantly higher (average: 6.1) as compared with the control group (average: 1.7), which agrees with the results found by Constantini and Young<sup>(6)</sup>. We believe that this functional improvement is due to the beneficial effects of methylprednisolone during the ischemic phase of medullary injury.*

*The presence of necrotic areas mainly in the medullary dorsal zone and in zone B (injury zone) shows that necrosis is a result not only of the initial mechanical injury, but also and mainly of the secondary ischemic injury, as quoted also Balentine<sup>(2)</sup>.*

*We did not observe the presence of hemorrhagic zones in the medullary segments evaluated, in disagreement with the findings of Constantini and Young<sup>(6)</sup>. However, these authors performed a histological study 24 hours after the medullary injury and, according to Balentine<sup>(2)</sup>, hemorrhage is one of the initial findings, predominating during the first three days and being replaced later by cavitation areas (Figures 2 and 3). In our study the histological evaluation was performed on Day 14, when the hemorrhagic area had already been replaced.*

*We interpreted the cavitations surrounded by non-neuronal cells and the presence of cell infiltrate (neutrophils) as local inflammatory response. Peripherally to these cavitation areas, we observed the presence of feasible neuronal tissue, which proves the occurrence of incomplete medullary injury.*

*As we analyzed the evolution of the locomotor functional results and histological findings, we realized that we could not correlate them, meaning that the functional recovery was not inversely proportional to the evidence of tissular necrosis, in disagreement with the studies by Basso et al.<sup>(3)</sup>, but in agreement with the observations of Means et al.<sup>(18)</sup>.*

*In 1996 Basso et al.<sup>(3)</sup> performed an histomorphometric analysis and staining specific for nervous tissues, in order to analyze and quantify the remaining nervous tissue and make a comparison with the functional findings. Differently from*

los aos achados funcionais. Diferentemente deste, o qual utilizamos a coloração de hematoxilina-eosina com o objetivo de quantificar os achados inflamatórios indiretos representantes da lesão medular secundária e da necrose.

## CONCLUSÕES

- 1) A metilprednisolona apresentou efeito benéfico na recuperação funcional dos ratos com lesão medular.
- 2) Os achados histológicos não puderam ser correlacionados com os resultados da função locomotora.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson DK, Means ED, Waters TR. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg* 56:106-113, 1982.
2. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest* 39:236-253, 1978.
3. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU Weight-Drop device versus transection. *Exp Neurol* 139:244-256, 1996.
4. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1-21, 1995.
5. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma* 9:197-217, 1992.
6. Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg* 79:500-507, 1993.
7. Burney RE, Maio RF, Maynard F, Karunas R. Incidence, characteristics and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. *Arch Surg* 128:596-599, 1993.
8. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg* 80:97-111, 1994.
9. Ducker TB, Zeidman SM. Spinal cord injury: role of steroid therapy. *Spine* 19:2281-2287, 1994.
10. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: Behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol* 88:123-134, 1985.
11. Gebrin AS, Cristante AF, Marcon RM, Da-Silva CF, Barros Filho TEP. Intervenções farmacológicas no trauma raquimedular: uma nova visão terapêutica. *Acta Ortop Bras* 5:123-133, 1997.
12. Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury

*these authors, we used hematoxylin-eosin staining with the purpose of quantifying the indirect inflammatory findings that represented the secondary medullar injury and necrosis.*

## CONCLUSIONS

- 1) *Methylprednisolone had a beneficial effect in the functional recovery of rats with medullar injury.*
- 2) *The histological findings could not be correlated with the results of the locomotor function.*

- in the rat. *J Neurotrauma* 9:123-126, 1992.
13. Hall ED, Braughler JM. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity. *J Neurosurg* 57:247-253, 1982.
14. Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg* 61:124-130, 1984.
15. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 76:13-22, 1992.
16. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg* 93:1-7, 2000.
17. Kuhn PL, Wrathall JR. A mouse model of graded contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma* 15:125-140, 1998.
18. Means ED, Anderson DK, Waters TR, Kal L. Effect of methylprednisolone in compression trauma the feline spinal cord. *J Neurosurg* 55:200-208, 1981.
19. Noble LJ, Wrathall JR. Correlative analyses of lesion development and functional status after graded spinal cord contusive injuries in the rat. *Exp Neurol* 103:34-40, 1989.
20. Rabchevsky AG, Fugaccia I, Sullivan PG, Blades DA, Scheff SW. Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *J Neurosci Res* 68:7-18, 2002.
21. Tarlov IM. Spinal cord compression studies III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. *Arch Neurol Psych* 71:588-597, 1954.
22. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75: 15-26, 1991.
23. Vialle E, Vialle LRG, Rasera E, Cechinel C, Leolnel I, Seyboth C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental. *Rev Bras Ortop* 37:83-88, 2002.
24. Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Torres LFB. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 34:85-89, 1999.
25. Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg* 57:667-673, 1982.