

MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR E PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MOTORA EM RATOS WISTAR

SPINAL CORD INJURY EXPERIMENTAL MODEL AND MOTION EVALUATION PROTOCOL IN WISTAR RATS

GUSTAVO BISPO DOS SANTOS, ALEXANDRE FOGAÇA CRISTANTE, RAPHAEL MARTUS MARCON, FABIANO INÁCIO DE SOUZA, TARCÍSIO ELOY PESSOA DE BARROS FILHO, MARCELO LOQUETTE DAMASCENO

RESUMO

Objetivos: Determinar modelo de contusão medular padronizado e método de avaliação motora em ratos com quadro de paraplegia. **Métodos:** Utilizados 20 ratos Wistar divididos em quatro grupos, diferenciado o nível de gravidade da lesão raquimedular; realizadas lesões intermediárias padronizadas, através do sistema "MASCIS IMPACTOR" (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study): grupo 1 - 12,5 mm (lesão leve); grupo 2 - 25 mm (lesão moderada); grupo 3 - 50 mm (lesão grave); grupo 4 - animais que não sofreram lesão (grupo controle). Após 48 horas foi avaliada função motora, segundo escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan. **Resultados:** Utilizando o modelo, notamos que as contusões leves (12,5mm de altura) foram efetivas, e os animais apresentaram infecção urinária na fase aguda uma semana após a contusão. As contusões intermediárias (25 mm de altura) foram efetivas, os animais apresentaram infecção urinária até duas semanas após a contusão. As contusões graves (50mm de altura) foram efetivas, os animais apresentaram infecção urinária durante três a quatro semanas e autofagia. **Conclusão:** O modelo de lesão medular utilizando o sistema MASCIS IMPACTOR e a avaliação funcional proposta por Basso, Beattie e Bresnahan é reproduzível, podendo ser utilizada, propiciando troca de informações entre os diferentes pesquisadores.

Descritores: Traumatismo da medula espinal. Paraplegia. Contusões.

Citação: Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(2):87-91. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

ABSTRACT

Objectives: To determine a standardized spinal cord contusion model and a method for motor assessment in rats with paraplegia. **Methods:** This study used 20 Wistar rats divided into 4 groups according to level of severity of spinal cord injury; standardized intermediate lesions were made through system MASCIS IMPACTOR (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study): group 1, 12.5mm (mild injury); group 2, 25mm (moderate injury); group 3, 50mm (severe injury); in the group 4 the animals suffered no injury (control group). Motor function was assessed after 48 hours, using the scale proposed by Basso, Beattie and Bresnahan. **Results:** Using the model, we observed that the mild contusions (12.5mm height) were effective, and the animals presented acute urinary tract infection one week after the injury. Moderate contusions (25mm height) were effective, and the animals presented urinary infection until 2 weeks after injury. The severe contusions (50mm height) were effective, and the animals presented urinary infection for 3 to 4 weeks and autophagy. **Conclusion:** The model of spinal cord injury using the system MASCIS IMPACTOR and the functional assessment proposed by Basso, Beattie and Bresnahan is reproducible and can be used, enabling information exchange among different researchers.

Keywords: Spinal cord injuries. Paraplegia. Contusions.

Citation: Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Spinal cord injury experimental model and motion evaluation protocol in Wistar rats. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(2):87-91. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Os modelos experimentais tem sido utilizado visando acumular experiências e por conseguinte melhorar e aprimorar os conhecimentos sobre fisiopatologia da lesão medular.¹⁻³ Esses conhecimentos aplicados a tratamentos clínicos e cirúrgicos

são utilizados para reduzir a morbidade e mortalidade em pacientes com traumatismo raquimedular.⁴

É importante que haja uma avaliação padronizada aplicada nos estudos experimentais para determinar os efeitos de cada intervenção terapêutica que se deseja estudar. Alguns critérios

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

LIM 41 – Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético do Departamento de Ortopedia e Traumatologia

Trabalho realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia – HC/FMUSP

Correspondência: Alexandre Fogaça Cristante : Rua Ovídio Pires de Campos, 333 – 3º. Andar CEP: 05403-010 – Cerqueira César – São Paulo.

E-mail: aacristante@uol.com.br/loquette@uol.com.br

Artigo recebido 14/04/10, aprovado em 26/04/10.

Acta Ortop Bras. 2011;19(2):87-91.

de avaliação tem sido apresentados na literatura, e a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan BBB é a que foi utilizada neste estudo.^{1,2,4}

Definida como uma escala de 21 pontos que observa a recuperação locomotora no membro posterior após lesão na medula espinhal torácica em ratos, essa escala representa uma detalhada e organizada categorização da recuperação dos movimentos no membro inferior a partir da lesão na medula espinhal. Cada índice representa um único e sequencial estágio da recuperação comportamental.⁵

Esse estudo tem como objetivo avaliar, através da escala BBB a gravidade das lesões em diferentes níveis de altura realizadas utilizando-se modelo padronizado de lesão medular experimental "Mascis Impactor".⁴

Foram utilizados 20 ratos da linhagem *Wistar*, machos, adultos jovens, com idade média de 20 semanas, peso em torno de 350g, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, divididos em quatro grupos de cinco animais.

As divisões dos grupos foram realizadas da seguinte forma:

Grupo controle: realizada somente via de acesso e laminectomia ao nível de T 9

Grupo 2: 12,5 mm representando lesão leve

Grupo 3: 15 mm representando lesão moderada

Grupo 4: 50 mm representado lesão grave.

Os procedimentos e o acondicionamento dos animais foram realizados no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da USP.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital, na concentração de 45mg/kg, pela via intraperitoneal no terço inferior do abdômen. Em seguida, os animais foram submetidos à tricotomia dorsal, antisepsia com clorexidine, e incisão longitudinal na topografia de T7 a T12 (Figura 1), dissecação por planos e exposição dos componentes posteriores da coluna dorso-lombar. (Figura 2) As lâminas de T9 e T10 foram ressecadas, no sentido caudo-cranial. (Figura 3)



Figura 1. Planejamento de incisão.



Figura 2. Exposição região dorso-lombar.



Figura 3. Exposição medular em T9.

CONTUSÃO MEDULAR

As lesões foram produzidas obedecendo ao protocolo internacional *MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study)*. Modelo que realiza contusões raquimedulares em diferentes níveis, o que determina o grau de gravidade. (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8)

Os níveis de lesão variam de 6 mm de altura o que é considerada uma lesão leve, até 70 mm de altura, que simula lesão gravíssima. Foram realizadas lesões intermediárias de 12,5 mm representando lesão leve, 25 mm lesão moderada e 50 mm de altura representando lesão grave. Após procedimento de lesão, foram observados parâmetros de padronização tais como aspectos clínicos do sítio de lesão e gráficos. (Figuras 9 e 10)

O sítio de lesão foi irrigado com soro fisiológico à temperatura ambiente, seguindo-se à inspeção, cauterização, miorrafia e sutura da pele. (Figuras 11 e 12) Foi administrado subcutaneamente 25mg/kg de cefalotina.⁴

Os animais foram mantidos em gaiolas (60x40cm) em número de 3 ou 4, sendo fornecido ração e água *ad libitum*. As massagens para esvaziamento vesical foram efetuadas diariamente, assim como avaliação de possíveis complicações, como infecção urinária.

Após 48 horas foram realizadas avaliações motoras seguindo protocolo de avaliação motora, proposta por Basso, Beattie e Bresnahan "BBB", que corresponde a uma escala de 21 pontos,

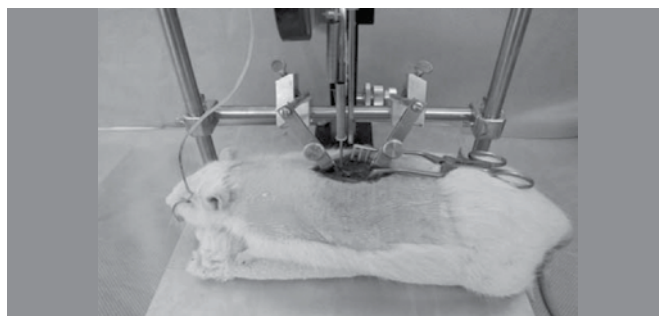


Figura 4. Animal posicionado.



Figura 5. Contato inicial posição neutra.

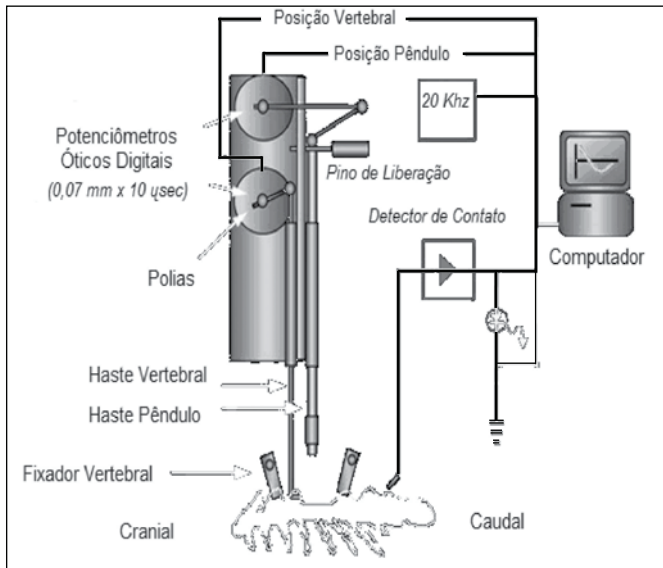


Figura 6. Representação esquemática do modelo utilizado.

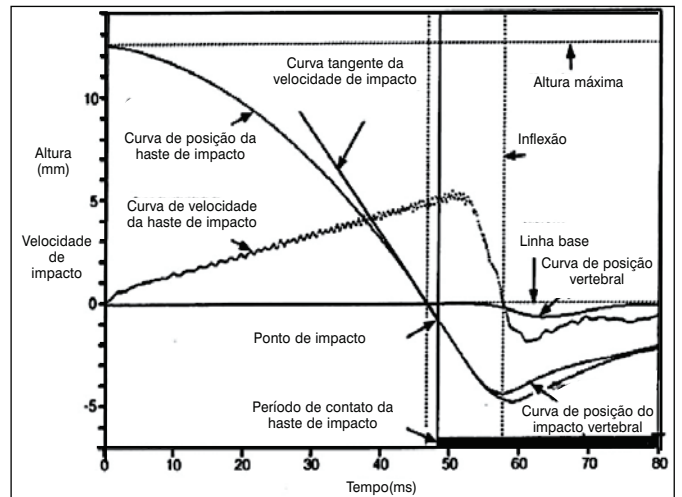


Figura 10. Parâmetros gráficos.



Figura 7. Posicionamento 12,5 mm.

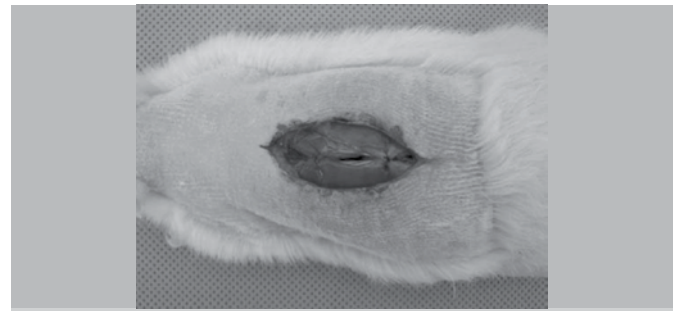


Figura 11. Miorrafia.



Figura 8. Posicionamento 25 mm.



Figura 12. Sutura cutânea.



Figura 9. Aspecto pós contusão.

de acordo com a motricidade dos membros pélvicos e cauda do animal, em local padronizado com dimensões de 90 cm de diâmetro e 7 cm de altura sem presença de ruídos. (Quadros 1 e 2).

RESULTADOS

Os dados obtidos mostram diferenças estatísticas entre os grupos e também que as contusões são efetivas e realizadas de forma padronizada, pois não foram notadas diferenças estatísticas em um mesmo grupo, de acordo com o Quadro 3 e Figura 13.

DISCUSSÃO

Vários modelos experimentais tem sido descritos na literatura para estudo da lesão medular padronizada em animais.¹⁻⁶ Optamos em nosso protocolo o modelo "MASCIS IMPACTOR", que utiliza

Quadro 1. Pontuação do protocolo BBB.

Pontuação	Características	Comentário
0	Não se observam movimentos de membro posteriores (MP)	
1	Movimentos suaves de 1 ou 2 articulações de membro posterior	Suave – Menor que 50% da capacidade articular
2	Movimento extenso de 1 articulação e possível movimento suave de outra articulação no membro posterior	Extenso – Maior ou igual a 50% capacidade articular
3	Movimento Extenso de 2 articulações do MP	Dois articulações = quadril e joelho, geralmente
4	Movimentos suaves de todas as 3 articulações	Três articulações = quadril, joelho e tornozelo
5	Movimentos suaves de 2 articulações, extenso da 3ª articulação do MP	
6	Movimentos extensos de 2 articulações e movimento delicado da 3ª articulação do MP	3ª articulação = tornozelo
7	Movimentos extensos das 3 articulações	
8	Movimentos suaves, sem suportar o peso do corpo ou a pata apoiada sem suportar o peso do corpo	Extensão rítmica de 3 articulações do membro posterior, o tronco se encontra de lado
9	Apoio plantar com suporte do peso do corpo imóvel ou ocasional, frequente ou consistente suporte do peso do corpo com apoio dorsal	Suporte do peso = contração do músculo. Extensão do membro posterior durante o apoio plantar da pata ou elevação da bacia imóvel
10	Passo sustentando o peso do corpo ocasionalmente, sem haver coordenação entre os membros anterior e posterior	Ocasionalmente > 5º e menor ou igual que 50%. Passos – contato plantar com suporte do peso, o membro posterior avança para restabelecer contato plantar. Coordenação – movimentos simultâneos entre o membro posterior e o membro anterior, alternando entre os lados.
11	De freqüente a consistentes passadas com suporte do peso sem coordenação entre os membros posteriores e anteriores	Freqüência – 51 a 94% do tempo Consistente – 95 a 100% do tempo
12	De freqüentes a consistentes passadas com suporte do peso do corpo e coordenação ocasional entre os membros anteriores e membros posteriores	60 a 50% de locomoção coordenada
13	De freqüente a consistentes passadas com suporte do peso e freqüente coordenação entre o membro posterior e o membro anterior	51 a 95% de locomoção coordenada
14	Consiste coordenação da passada com apoio plantar e posição predominante da pata e de rotação no contato inicial e na elevação, freqüente passadas plantares, consistente coordenação entre o membro anterior e ocasionalmente com apoio dorsal	Rotação => rotação interna e externa da pata traseira quando esta apoiada e erguida
16	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação	Freqüente liberdade do 1º dedo => Há mais da metade das passadas sem ouvir os sons das arranhaduras
17	Consiste coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na sua elevação	
18	Coordenação consistente na passada com apoio plantar e consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação	Consiste arranhadura de quatro dedos por um período de 4 minutos
19	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, consistente liberação do 1º dedo. Posição paralela da pata no contato inicial e na elevação e o rabo está para baixo na maior parte do tempo	Rabo para baixo => rabo toca o chão durante as passadas
20	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação, o rabo consistentemente para cima e instabilidade de tronco.	Rabo elevado => não toca o chão. Instabilidade do tronco => lateralização do tronco quando se vira rapidamente (perda de equilíbrio)
21	Consistentemente coordenada na caminhada, consistente movimento do 1º dedo. Posição da pata paralela no apoio e na elevação. O rabo para cima Estabilidade consistente do tronco	Consistente estabilidade do tronco, sem cambalear ou cair, o movimento da bacia e do rabo coordenado com a locomoção

a queda de peso de altura padronizada provocando contusão da medula espinhal em ratos, após a qual os mesmos são avaliados na sua função locomotora.^{1,2,7} Utilizamos neste estudo experimental, ratos da linhagem Wistar pelo baixo custo e na facilidade na sua obtenção.

Os métodos de avaliação funcional ainda não são totalmente padronizados existindo várias descrições na literatura.^{3,8,9} Dentro da avaliação padronizada de lesão medular, para propor-

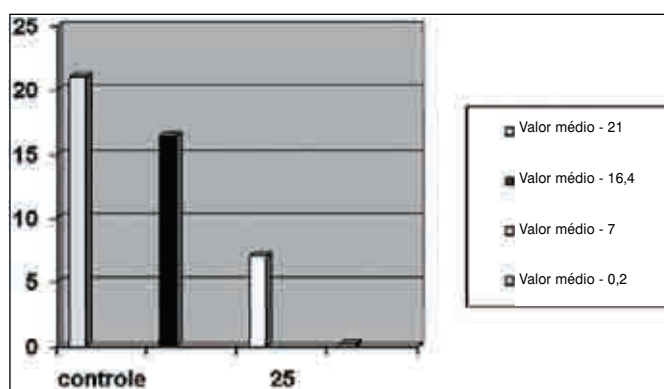
cionar intercâmbio seguro de dados entre os diferentes grupos de pesquisa, vem sendo analisadas entre outras, as alterações anatômicas, bioquímicas e de diagnóstico por imagem.¹⁰⁻¹¹ Em nosso estudo optamos pelo modelo de avaliação funcional descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), que utiliza uma escala de avaliação locomotora padronizada. Optamos, pela metodologia adotada no Multicenter animal spinal Cord injury (MASCIS) que utiliza a escala BBB após lesão da medula espinhal à níveis

Quadro 2. Protocolo BBB (subcomponentes)

CATEGORIA	TIPO	CARACTERÍSTICA
Movimento do membro posterior	Quadril (D/E)	O – sem movimento S – movimento limitado E – movimento extenso
	Joelho (D/E)	O – sem movimento S – movimento limitado E – movimento extenso
	Tornozelo (D/E)	O – sem movimento S – movimento limitado E – movimento extenso
Posição do Tronco	Lado	=> Deitado sobre um dos lados
	Centrado	=> Posição centrada (normal)
	Apoio	=> Usa o rabo para suportar o corpo
Abdome	Apoiado	=> Abdome apoiado no chão
	Paralelo	=> Abdome paralelo ao chão (normal)
	Alto	=> Abdome e bacia elevados
Posição da Pata	Movimentos suaves (D/E)	=> Apoio da pata sem sustentar o peso => Apoio da pata suportando o peso
Caminhando	Peso (D/E)	O – nunca O – Ocasionalmente (menor ou igual a 50% do tempo) F – frequentemente (51 a 94% do tempo) C – consistente (95 a 100% do tempo)
	Coordenação	O – nunca O – Ocasionalmente (menor ou igual a 50% do tempo) F – frequentemente (51 a 94% do tempo) C – consistente (95 a 100% do tempo)
	Mobilidade do 1º dedo	O – nunca O – Ocasionalmente (menor ou igual a 50% do tempo) F – frequentemente (51 a 94% do tempo) C – consistente (95 a 100% do tempo)
Posição Predominante da pata	Contato inicial (D/E)	I – rotação interna E – rotação externa P – paralelo (normal)
Posição Predominante da pata	Contato inicial (D/E)	I – rotação interna E – rotação externa P – paralelo (normal)
	Elevação da pata	I – rotação interna E – rotação externa P – paralelo (normal)
Instabilidade do corpo	Sim/Não	Sim – Cambaleando, desequilíbrio
Rabo	Elevado/ Abaixado	Elevado – o rabo se encontra acima do chão
		Abaixado – o rabo toca o chão

Quadro 3. Pontuação avaliada de acordo com modelo proposta por “BBB”.

Grupo	Animal	1	2	3	4	5	Total
	Controle		21	21	21	21	21
12,5 mm		17	16	17	17	15	82
25 mm		8	8	7	7	5	35
50 mm		0	0	0	0	1	1

**Figura 13.** Valor médio do índice BBB em cada um dos grupos estudados.

de altura padronizada (12,5, 25, 50 mm).

Os resultados apresentados pelos grupos apresentaram diferenças na avaliação funcional da lesão em cada altura padronizada, o que confirma a objetividade e confiabilidade dos dados da escala BBB. É importante enfatizar que esse método de avaliação apresenta confiabilidade nos exames realizados por diferentes observadores como demonstrado por Basso *et al.*²

CONCLUSÃO

Conclui-se que o modelo de lesão medular utilizando o sistema MASCIS IMPATOR e o modelo de avaliação funcional proposto por Basso, Beattie e Bresnahan “BBB” é reprodutível e pode ser utilizada por observadores com treinamento prévio na avaliação de animais com lesão medular, propiciando troca de informações entre os diferentes pesquisadores que utilizam a mesma escala.

REFERÊNCIAS

- Cristante AF, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR *et al.* Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2009;47:458-63.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field test in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12:1-21.
- Tarlov IM. *Spinal cord compression, mechanism of paralysis and treatment*. Springfield, IL: Charles C Thomas; 1957.
- Rodrigues NR. *Padronização da lesão experimental em ratos Wistar [tese]*. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de São Paulo; 1999.
- Haguigui SS, Espejo SS, Sepejo MAP, Rodriguez F, Clapper A. Radiofrequency as a lesioning model in spinal cord injury. *Spine*. 1996;34:214-9.
- Fernandes E, Pallini R, Marchese R, Tulomonti G. Experimental studies on spinal cord injuries in the last fifteen years. *Neurol Res*. 1991;13:138-59.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA *et al.* MASCIS evaluation of open field locomotor scores: Effects of experience and teamwork on reliability. *J Neurotrauma*; 1996;13:343-59.
- Faconer JC, Naroyama PA, Bhattachojee M, Liv SJ. Characterization of a experimental spinal cord injury model using waveform and morphonetic analysis. *Spine*. 1996;21:104-12.
- Black P, Markowitz RS, Cooper V, Mechanic A, Kushner H, Damjanov I *et al.* Models of spinal cord injury: Part 1. Static load technique. *Neurosurgery*. 1986;19:752-62.
- Vialle LRG, Fischer J, Marcon JC, Vialle E, Luizzi R, Torres LSB. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop*. 1999;34:85-9.
- Girardi FP, Khan SN, Cammisia FP Jr, Blanck TJ. Advantages and strategies for spinal cord regeneration. *Orthopedic Clin North Am*. 2000;31:465-71.