

PADRONIZAÇÃO DA LESÃO DE MEDULA ESPINAL EM RATOS WISTAR

STANDARDIZATION OF SPINAL CORD INJURY IN WISTAR RATS

NILSON RODNEI RODRIGUES¹, OLAVO BIRAGHI LETAIF², ALEXANDRE FOGAÇA CRISTANTE²,
RAPHAEL MARTUS MARCON², REGINALDO PERILO OLIVEIRA², TARCÍSIO ELOY PESSOA DE BARROS FILHO²

RESUMO

Objetivo: Padronizar um modelo experimental de lesão de medula espinal em ratos Wistar, utilizaram-se um equipamento computadorizado para impacto por queda de peso e os parâmetros determinados pelo Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study – MASCIS. Métodos: Avaliaram-se 30 ratos, com idade variando entre 20 e 25 semanas de vida. O peso variou de 200 a 300 g, para as fêmeas, e de 232 a 430 g para os machos. Realizaram-se impactos com pesos de 10 g de 12,5; 25 e 50 mm de altura, controlando-se a velocidade de impacto e o coeficiente de compressão. O impacto ocorreu sobre a superfície da medula espinal na altura da décima vértebra torácica, após laminectomia. Monitoraram-se os sinais vitais e realizaram-se gasometrias previamente e posteriormente à lesão da medula. O volume de lesão foi avaliado pela análise quantitativa dos íons de sódio e potássio. Resultados: Verificaram-se correlações estatisticamente significantes entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. O volume de lesão provocado por queda de 50 mm de altura foi superior aos de 12,5 e 25 mm, que não diferiram entre si. Conclusão: O modelo demonstrou-se eficaz e capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos Wistar.

Descritores: Modelo experimental. Lesão medular. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Objective: To standardize an experimental model of spinal cord injury in Wistar rats, computerized weight fall impact equipment were used and the parameters were used determined by the multicenter animal spinal cord injury study – MASCIS. Methods: Thirty rats were used, with age varying between 20 and 25 weeks, and weight ranging from 200 to 300g for females, and from 232 to 430g for males. The impacts were done with weights of 10g starting from 12.5, 25 and 50 mm of height, and the impact speed and compression coefficient were obtained. The impact occurred on the surface of the spinal cord at the level of the tenth thoracic vertebra after laminectomy. Vital signs were monitored and gas analysis was made before and after the spinal cord injury. The lesion volume was evaluated by the quantitative analysis of sodium and potassium ions. Results: Statistically significant correlations were verified among the lesion volume and the mechanical parameters. The lesion volume caused by the fall from 50mm height was superior to that of the 12.5 and 25mm, which didn't differ from each other. Conclusion: The model demonstrated itself to be effective and capable of generating standard spinal cord injuries on Wistar rats.

Keywords: Experimental model. Spinal cord injury. Rats, Wistar.

Citação: Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2010; 18(4):182-6. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>

Citation: Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Standardization of spinal cord injury in Wistar rats. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010; 18(4):182-6. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>

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

1 – Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
2 – Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Trabalho realizado no Departamento de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP e Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético - LIM-41.
Endereço para Correspondência: Olavo Biraghi Letaif. Rua: Rua Ministro Godói, 468 ap 119 - Perdizes, São Paulo, Brasil - CEP: 05015-000 - E-mail: oletai@yahoo.com.br

Trabalho recebido em 17/08/09, aprovado em 20/09/09

INTRODUÇÃO

O efeito potencialmente devastador da lesão medular na qualidade de vida da vítima traz preocupação para os médicos que cuidam deste tipo de paciente. As alterações fisiopatológicas causadas pela lesão da medula espinal afetam múltiplos sistemas, sendo a extensão das alterações relacionada com a gravidade do dano neurológico.

A lesão neurológica pode ser completa ou incompleta; lesões incompletas são aquelas nas quais a função neurológica é preservada em mais do que dois níveis abaixo do nível da lesão. A presença de sensibilidade sacral, função motora distal e potencial evocado sensitivo motor indicam lesão incompleta.

Segundo Holdsworth¹ as lesões completas são aquelas em que não há função neurológica distal à lesão e podem ser reversíveis ou irreversíveis. Não ocorrerá recuperação neurológica se persistir o déficit completo após o choque medular. Uma lesão completa implica na total interrupção da comunicação nervosa, ainda que não haja transecção física da medula espinal.

A lesão do tecido nervoso ocorre por mecanismos primário e secundário. A lesão primária deve-se ao trauma direto ou indireto no nível da lesão; os mecanismos podem ser por flexão, extensão, tração, compressão, inclinação lateral ou laceração por objeto penetrante como, por exemplo, projétil de arma de fogo.²

Após a lesão primária ocorre o desencadeamento do mecanismo secundário, que é a liberação de mediadores endógenos que levam à progressão da lesão neuronal por alterações fisiológicas e metabólicas no local da lesão.^{2,3}

Somente mediante investigações de laboratório bem planejadas foi possível acumular experiência necessária para melhorar nossos conhecimentos da fisiopatologia da lesão medular. Estes conhecimentos, combinados com as técnicas cirúrgicas para estabilização da coluna vertebral e os cuidados clínicos em unidades especializadas, têm possibilitado reduzir a morbidade e a mortalidade em pacientes com traumatismo raquimedular. Apesar destes avanços a lesão medular continua sendo um problema complexo e grave, dado que a nossa capacidade de prevenir a perda ou a recuperação da função neuronal depois do traumatismo da medula espinal permanece limitada. Os métodos atuais para avaliação das alterações fisiopatológicas da lesão da medula espinal em humanos são limitados e as causas das lesões são multifatoriais⁴, portanto há a necessidade do uso de modelos experimentais em animais.

Devemos considerar que os modelos em animais diferem em muitos aspectos das lesões ocorridas em humanos, tanto no mecanismo, quanto topograficamente, anatomicamente e quanto à energia do trauma, mas mesmo assim são fontes ricas e importantes de informações.

Considerando estas variáveis, não é surpreendente que se desenvolvam um grande número de modelos experimentais de lesão medular⁴. Durante os últimos 90 anos, vários modelos experimentais de lesão aguda da medula espinal em animais foram desenvolvidos tentando estudar e encontrar um método efetivo para tratar a lesão aguda da medula espinal no ser humano.⁵⁻¹³

Com relação ao mecanismo de produção de lesão da medula espinal observamos que o modelo que utiliza a queda de peso é o mais aceito pelos pesquisadores e o que mais se aproxima do que ocorre com o ser humano na situação real durante o trauma.

Assim sendo, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de padronizar a lesão de medula espinal através do New York University (NYU) Spinal Cord Contusion - IMPACTOR em ratos Wistar, pelos parâmetros biomecânicos do impacto e estimando o volume de lesão ao nível da medula espinal lesionada.

MATERIAL E MÉTODOS

MODELO DE LESÃO MEDULAR

Foram analisadas as lesões produzidas em 30 ratos Wistar, sendo 24 machos e 6 fêmeas, com idade variando de 20 a 25 semanas e o peso de 200 a 300g para as fêmeas e 232 a 430g para os machos. Foram provocadas lesões através de ensaios de impacto por queda de peso computadorizados alternados de 12,5, 25,0 e 50,0 mm de altura (10 ratos para cada tipo de lesão). Os ratos foram anestesiados com pentobarbital intraperitoneal.

Previamente à contusão, a medula foi exposta através da realização de uma laminectomia (realizado com o auxílio de microscópio cirúrgico). (Figura 1)

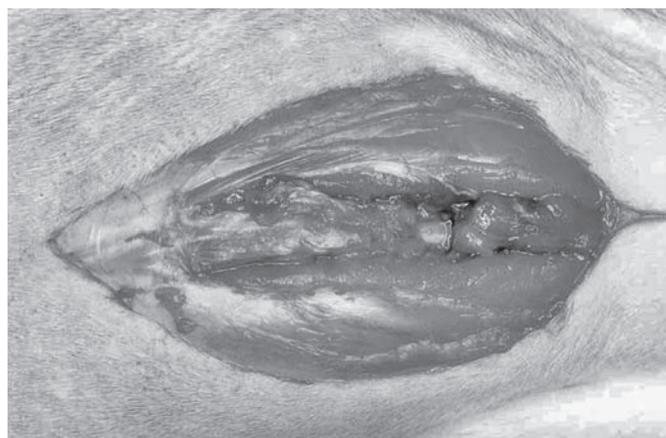


Figura 1 – Laminectomia ao nível de T9-T10 com exposição do saco dural.

O teste de impacto por queda de peso consistiu em liberar-se uma haste de impacto com 10 g de alturas pré-determinadas de 12,5, 25 e 50 mm (entre a cabeça da haste de impacto e a superfície da medula espinal) em queda livre através do tubo guia. (Figuras 2 e 3)



Figura 2 – Equipamento computadorizado para impacto por queda de peso - Impactor.

Determinaram-se os volumes de lesão pela análise quantitativa de sódio (Na) e potássio (K).¹⁴ Procurou-se correlacionar os volumes de lesão com os parâmetros mecânicos do ensaio de impacto que os geraram e obter uma equação de regressão capaz de estimá-los com precisão. A obtenção de uma correlação estatisticamente significativa assegura que o modelo experimental proposto seja reproduzível.

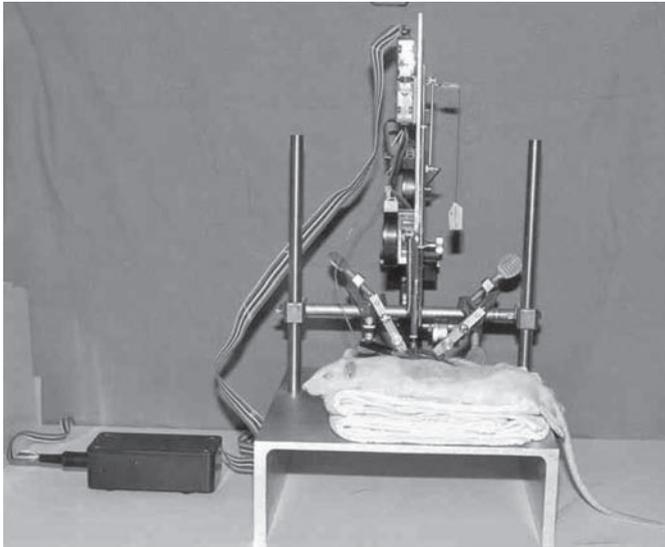


Figura 3 – Posicionamento do rato no Impactor no momento do trauma.

A produção das lesões, a eutanásia dos animais após 48 horas do procedimento e a coleta das amostras ocorreram no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) e no Laboratório de Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP). A análise iônica e a comparação dos dados obtidos através do IMPACTOR ocorreram no Centro de Neurociências da Rutgers - Universidade Estadual de Nova Jersey, New Brunswick, E.U.A.

Para análise estatística foi utilizado o teste de Qui-quadrado na comparação entre três grupos de parâmetros nominais e para os parâmetros ordinais utilizou-se a Análise de Variância. Nos casos em que ocorreram diferenças significativas entre os grupos, estas foram discriminadas pelo teste das mínimas diferenças significantes, protegido de Fisher.

Também foram realizados testes de correlação entre parâmetros ordinais. Nos casos em que o Coeficiente de Correlação (r^2) foi significativo calculou-se a respectiva equação de regressão linear.

Adotou-se o nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$).

Os resultados estatisticamente significantes foram assinalados por asteriscos.

RESULTADOS

Imediatamente após a lesão, observamos hemorragia subdural no local do impacto, que foi evidente em todos os animais e parecia mais intensa e extensa quanto maior era a altura da queda da massa.

Não se observou hipotensão durante o ensaio e lesão da dura-máter após o impacto.

Não houve significância estatística: na distribuição de frequência do sexo, descritiva da idade (semanas), do peso (g), do pH, da pressão parcial de pO_2 (mmHg), do pCO_2 (mmHg), da saturação de O_2 (%) e da pressão sanguínea média (mmHg) dos ratos previamente a contusão segundo a altura da queda da haste de impacto utilizada por grupo. Comparação pela análise de variância ($A = 0,05$).

Foi encontrada significância estatística na análise descritiva: do volume de lesão plasmático por litro ($p = 0,0001$) (Tabela 1), do volume de lesão intracelular por litro ($p = 0,0001$) (Tabela 2) e volume de lesão tecidual por litro ($p = 0,0012$) (Tabela 3) segundo a altura da queda da haste de impacto utilizada em cada grupo. Foi realizada comparação pela análise de variância ($A = 0,05$) e feita discriminação das diferenças pelo teste das mínimas diferenças significantes protegido de Fisher.

Tabela 1 – Volume de lesão plasmático por litro.

	VLp / l		
	12,5	25,0	50,0
M	36,250	38,764	46,269
DP	3,504	2,805	5,045
EPM	1,108	0,887	1,595
N	10	10	10
Análise de variância	F= 17,441		p= 0,0001*

Discriminação por Fisher's Protected LSD: 12,5 \neq 50,0 e 25 \neq 50

Tabela 2 – Volume de lesão intracelular por litro.

	VLi / l		
	12,5	25,0	50,0
M	37,024	39,296	46,180
DP	3,498	3,059	4,956
EPM	1,106	0,967	1,567
N	10	10	10
Análise de variância	F= 14,817		p= 0,0001*

Discriminação por Fisher's Protected LSD: 12,5 \neq 50,0 e 25 \neq 50

Tabela 3 – Volume de lesão tecidual por litro.

	VLk / l		
	12,5	25,0	50,0
M	40,203	45,243	52,219
DP	4,644	5,185	8,342
EPM	1,469	1,640	2,638
N	10	10	10
Análise de variância	F= 8,818		p= 0,0012*

Discriminação por Fisher's Protected LSD: 12,5 \neq 50,0 e 25 \neq 50

Também foi encontrada significância estatística na análise descritiva: da velocidade de impacto Imp-V (m/s) ($p = 0,0001$) (Tabela 4), da deformação máxima (mm) ($p = 0,0001$) (Tabela 5) e da taxa média de compressão (m/s) ($p = 0,0001$) (Tabela 6) segundo a altura da queda da haste de impacto, sendo realizada comparação pela análise de variância ($A = 0,05$).

A Tabela 7 demonstra o coeficiente de correlação e equações de regressão linear do volume de lesão (VL) em função do coeficiente de compressão (Cr).

Tabela 4 – Velocidade de impacto Imp-V (m/s).

	Imp-V (m/s)		
	12,5	25,0	50,0
M	0,496	0,699	1,000
DP	0,013	0,004	0,013
EPM	0,004	0,001	0,004
N	10	10	10
Análise de variância	F= 5358,1		p= 0,0001*

Tabela 5 – Deformação máxima (mm).

	Cd (mm)		
	12,5	25,0	50,0
M	1,455	1,881	2,458
DP	0,286	0,340	0,217
EPM	0,090	0,107	0,069
N	10	10	10
Análise de variância	F= 31,146		p= 0,001

Tabela 6 – Taxa média de compressão (m/s).

	Cr (m/s)		
	12,5	25,0	50,0
M	0,362	0,501	0,733
DP	0,056	0,049	0,059
EPM	0,018	0,015	0,019
N	10	10	10
Análise de variância	F= 116,8		p= 0,0001

Tabela 7 – Coeficiente de correlação e equações de regressão linear do volume de lesão (VL) em função do coeficiente de compressão (Cr).

Parâmetros		Coeficiente de Correlação R	Equação de Regressão
Dependente (Y)	Independente (X)	(r ² crítico = 0,49)	Y= A+BX
VLp / l	Cr	0,469	-
Vli / l	Cr	0,504*	Y= 27,2 + 24,8
VLt / l	Cr	0,376	-

Onde p= plasmático
i= intracelular
t= tecidual

DISCUSSÃO

A lesão traumática da medula espinal talvez seja uma das mais, senão a mais incapacitante lesão que o ser humano pode sofrer e tem despertado grande interesse no conhecimento das alterações histopatológicas, bioquímicas e funcionais.

O desenvolvimento de uma abordagem racional no tratamento da lesão aguda da medula espinal em humano requer um modelo

experimental através de um mecanismo traumático quantificável, que produza lesões padronizadas e reprodutíveis. Os maiores obstáculos nestes estudos têm sido a variedade de parâmetros a serem controlados em modelos animais e a falta de um método de aceitação universal para produzir a lesão.¹⁵

Desde que o método de Allen⁵ foi introduzido, tornou-se o modelo mais utilizado no estudo da lesão traumática da medula espinal. O modelo de Allen⁵ é também conhecido como modelo da queda de peso, pois consiste da queda livre de uma massa conhecida de uma altura preestabelecida sobre a medula espinal exposta cirurgicamente.

Este modelo, com alguns aperfeiçoamentos, foi utilizado por vários autores¹⁶⁻²¹ e é o que mais se assemelha com a lesão traumática no ser humano.

A nossa escolha pelo New York University (NYU) Spinal Cord Contusion system – IMPACTOR, deveu-se ao fato do Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LE-TRAN) participar do Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS), o que possibilita a realização de estudos experimentais comparáveis.

Ratos são uma boa alternativa, segundo a literatura, em razão das características patológicas da sua medula espinal, e estudos utilizando a técnica do impacto, afirmam que o rato é uma espécie válida para o estudo experimental da lesão medular.²²⁻²⁴

A nossa escolha pelo rato Wistar deve-se a sua disponibilidade em nosso meio e ao baixo custo, de manutenção. Não encontramos trabalhos que utilizem ratos Wistar em estudo experimental pela queda de peso com o IMPACTOR.

Neste estudo os ratos distribuídos entre os grupos que utilizam diferentes alturas de haste de impacto apresentaram características semelhantes quanto ao sexo, idade, peso, pH, pO₂, pCO₂, saturação de O₂ e pressão sanguínea previamente à contusão, condição necessária para torná-los comparáveis.

No nosso estudo realizamos uma laminectomia torácica o suficiente para permitir a penetração da cabeça do impactor, com uma área de segurança de 2 mm, sempre preservando os processos articulares e pedículos.

Para produzir diferentes graus de trauma são utilizados diferentes pesos mantendo a mesma altura da queda; ou um mesmo peso cai de diferentes alturas, ou menos comumente, uma combinação das duas variáveis é utilizada.

O volume de lesão plasmático foi o que apresentou correlação com os fatores biomecânicos e observou-se diferença entre aqueles obtidos a 50 mm de altura dos demais, porém não se observou diferença do volume de lesão provocada entre 12,5 e 25 mm de altura. (Tabela 1)

Em nosso estudo não observamos o fenômeno de múltiplos impactos, pois o IMPACTOR possui uma regulagem que evita este segundo impacto.

Em nosso modelo experimental não utilizamos o protetor de medula, pois a queda da haste do impactor cai diretamente sobre a dura-máter espinal exposta, eliminando assim os fatores que poderiam alterar os resultados biomecânicos pela utilização do protetor de medula.

Nós realizamos uma laminectomia limitada; o suficiente para permitir que a cabeça da haste entre em contato com a dura-máter espinal e estabilizamos a coluna vertebral com grampos através dos processos espinhosos, cranial e caudal à laminectomia.

A técnica queda de peso apresenta várias desvantagens ou críticas como:

- 1 – A quantificação g.m não é uma verdadeira representação da energia aplicada à medula espinal; uma massa de 40 gramas caindo da altura de 10 centímetros transfere mais de 100 vezes de energia a medula espinal, que uma massa de 5 gramas caindo da altura de 80 centímetros, ainda que ambas são lesões de 400 g.m.^{7,18}
- 2 – A medula é comprimida na sua face dorsal, diferente das compressões anteriores ou circunferências que se observam nas lesões em seres humanos.²⁵
- 3 – Ainda que alguns autores tem relatado que a técnica da queda de peso apresenta resultados variáveis.^{8,10}

Aos parâmetros biomecânicos do impacto observamos que há diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, no coeficiente de compressão (Cr), na deformação máxima da medula espinal (Cd) e na velocidade máxima de impacto (Imp_V).

A possibilidade de contar com um modelo padronizado em nosso laboratório permite inúmeras perspectivas de pesquisa como: a utilização de fatores neurotróficos, bloqueio de fatores inibidores do crescimento, transplante de nervos periféricos, eletroestimulação, drogas neuroregeneradoras e desenvolvimento de técnicas experimentais para tratamento da lesão medular, inclusive de sua fase crônica.

CONCLUSÕES

Foi possível a padronização da lesão medular experimental em ratos Wistar de acordo com os parâmetros determinados pelo Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study - Mascis.

O modelo experimental consegue estimar o volume de lesão espinal resultante em função dos parâmetros mecânicos medidos durante o impacto.

Não se comprovou diferença significativa entre os volumes de lesão provocados por quedas de massa (10 g) de 12,5 e 25 mm de altura. O volume de lesão provocado por queda de massa a 50 mm de altura foi significativamente maior que os gerados a 12,5 e 25 mm de altura.

REFERÊNCIAS

1. Holdsworth F. Fractures, dislocations and fracture-dislocations of the spine: a review paper. *J Bone Joint Surg Am.* 1970;52:1534-51.
2. Rhoney DH, Luer MS, Hughes M, Hatt J. New pharmacologic approaches to acute spinal cord injury. *Pharmacotherapy.* 1996;16:382-92.
3. Young W. Recovery mechanisms in spinal cord injury: implications for regenerative therapy. In: Seil F, editor. *Frontiers of clinical Neuroscience: neural regeneration and transplantation.* New York: Alan R Liss; 1987. p.156-9.
4. Arizala AM, Marcillo AM. Modelos experimentales de la lesión medular. *Médula Espinal.* 1995;1:15-20.
5. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column a preliminary report. *JAMA.* 1911;57:878-80.
6. Albin MS, White RJ, Locke GS, Massopust LC Jr, Kretschme HE. Localized spinal cord hypothermia: anesthetic effects and application to spinal cord injury. *Anesth Analg.* 1967;46:8-16.
7. Dohrmann GJ, Panjabi MM. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg Neurol.* 1976;6: 263-7.
8. Koozekanani SH, Vise WM, Hashemi RM, McGhee RB. Possible mechanisms for observed pathophysiological variability in experimental spinal cord injury by the method of Allen. *J Neurosurg.* 1976;44:429-34.
9. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies: I. experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1953;70:813-9.
10. Khan M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can J Neurol Sci.* 1983;10:161-5.
11. Delamarter RB, Bohlman HH, Dodge LD, Biro C. Experimental lumbar spinal stenosis: analysis of the cortical evoked potential, microvasculature, and histopathology. *J Bone Joint Surg Am.* 1990; 72:110-20.
12. Eidelberg E, Staten J, Watkins JC, McGraw D, McFadden C. A model of spinal cord injury. *Surg Neurol.* 1976;6:35-8.
13. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in rat. *Surg Neurol.* 1978;10:39-43.
14. Constantine S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994; 80:97-111.
15. De La Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine.* 1981;6:315-35.
16. Assenmacher DR, Ducker TB. Experimental traumatic paraplegia: the vascular and pathological changes seen in reversible and irreversible spinal cord lesions. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53:671-80.
17. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma.* 1992;9:197-217.
18. Dohrmann GJ, Panjabi MM, Banks D. Biomechanics of experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg.* 1978;48:993-1001.
19. Ford RW. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J Neurosurg.* 1983;59:268-75.
20. Gerber AM, Corrie S. Effect of impounder contact area on experimental spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1979;51:539-42.
21. Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Talamonti G. Experimental studies on spinal cord injuries in the last fifteen years. *Neurol Res.* 1991;13:138-59.
22. Black P, Markowitz MA, Cooper V, Mechanic A, Kushner H, Damjanov I et al. Models of spinal cord injury: part I - Static load technique. *Neurosurgery.* 1986;19:752-62.
23. Balentine JB. Pathology of experimental spinal cord trauma: I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest.* 1978;39:236-53.
24. de la Torre JC, Boggan JE. Neurophysiological recording in rat spinal cord trauma. *Exp Neurol.* 1980;70:356-70.
25. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 1996;76:319-70.