

Márcia Maria Ferreira Lima

Estudo experimental da esclerose combinada
subaguda de medula

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção de título de
Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zanini

Botucatu

2015

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese à Faculdade de Medicina de Botucatu, que
há vários anos me recebeu como professora, acreditando na minha
capacidade.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Marco Antônio Zanini, orientador desta tese que com muita segurança, competência e paciência, soube me orientar nesta pesquisa em um campo novo para mim. Meu eterno obrigado.
- Ao Prof. Titular Luís Antônio de Lima Resende, idealizador desta linha de pesquisa, cujos conhecimentos em neurologia e em cultura humana são notórios, meu muito obrigado por permitir participar desta aventura fantástica.
- Ao Dr. Thiago Dias Fernandez Ex-médico assistente do serviço do HC/UNESP de Eletroencefalografia e potenciais evocados, pelo auxílio na realização dos exames práticos.
- Ao Biomédico Marcelo Fernando Zeugner Bertotti, assistente do serviço do HC/UNESP de Eletroencefalografia e potenciais evocados, pelo auxílio na realização dos exames práticos.
- Ao Prof. Livre Docente Jose Eduardo Corrente, do Departamento de Bioestatística do Instituto do IBBA/UNESP, pela análise estatística e sua interpretação.
- Às Prof^a Dra. Niura Aparecida Ribeiro de Moura Padula e Prof^a Substituta Lara Cristina Antunes dos Santos, colegas de disciplina e serviço, pelo apoio prestado na confecção desta tese.
- Aos técnicos da unidade Cirúrgica Experimental: Luiz Carlos Edvalter Bardella e Maria Cecília Salgado Mercadante, pela colaboração inestimável nos procedimentos experimentais.
- Aos funcionários do Departamento de Neurologia, pelo apoio, incentivo e ajuda, minha gratidão.

EPIGRAFE

5. *adquire a sabedoria, adquiere o entendimento e não te esqueças das palavras da minha boca, nem delas te apartes.*
6. *Não desampares a sabedoria, e ela te guardará; ama-a, e ela te protegerá.*
7. *O princípio da sabedoria é: adquiere a sabedoria; sim, com tudo o que possuis, adquiere o entendimento.*
8. *Estima-a, e ela te exaltará; se a abraçares, ela te honrará;*
9. *dará à tua cabeça um diadema de graça e uma coroa de glória te entregará.*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

I – INTRODUÇÃO.....	12
II – OBJETIVO.....	20
III – MÉTODOS.....	22
IV – RESULTADOS.....	34
V – DISCUSSÃO.....	47
VI – CONCLUSÕES.....	52
VII – REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ml = mililitro

kg = kilograma

PESS = potenciais evocados sômato-sensoriais

mSeg = milisegundos

cm = centímetro

mV = milivolts

hz = ciclos por segundo

m/s = metros por segundo

uV = microvolts

V1 = velocidade de condução na medula espinhal baixa

V2 = velocidade de condução na medula espinhal alta

E.E. = estimulador elétrico

G1 = eletrodo ativo

G2 = eletrodo de referência

ENMG = eletroneuromiografia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ponto de estímulo elétrico (seta preta), e captações a distâncias iguais, do potencial caudal (seta branca grande), potencial medular (seta branca pequena) e potencial cortical (seta amarela, zero da fita métrica, na região da proeminência occipital). As divisões de distâncias pelos tempos de propagação irão possibilitar cálculos das velocidades nos segmentos V1 e V2.....	25
Figura 2	Estimulador elétrico, com distância entre catodo e anodo de 0,5 cm (E.E.), eletrodos de superfície (ao centro) e eletrodos monopolares de agulha (sobre a gase), que foram utilizados para obtenções dos potenciais caudais e da medula espinhal...	26
Figura 3	A obtenção de todos os potenciais foi realizada com bolsa de água quente sob a cauda (branca, na figura), para evitar interferência do resfriamento da cauda nos resultados.....	27
Figura 4	Arranjo dos eletrodos para obtenção dos potenciais corticais, com referências não cefálicas (eletrodos G2 na face palmar dos membros anteriores, aderidos com pasta condutora). Canal 1: eletrodo ativo (G1) na proeminência occipital, em relação a G2 (membro direito); Canal 2: eletrodo ativo (G1) na proeminência occipital, em relação a G2 (membro esquerdo). Demais eletrodos (próximos aos olhos) como fios terra.....	28
Figura 5	Início do procedimento cirúrgico. A – Incisão abdominal mediana longitudinal; B – Exposição das vísceras; C – Identificação da transição estômago-duodeno, e ligadura em duas regiões, para que o suco gástrico não caia sobre as vísceras; D e E: secção distal do estômago, com coto proximal do duodeno já ligado.....	29
Figura 6	Procedimentos cirúrgicos. A – Identificação dos principais vasos para ligaduras; B – Exposição do esôfago distal e região da cárdia; C – clampeamento suave do esôfago distal, com proteção de borracha sobre as extremidades da pinça; D: secção distal do esôfago e retirada do estômago.....	30
Figura 7	Procedimentos cirúrgicos. A – Apresentação do esôfago – mais claro - (por trás) à região proximal do duodeno – mais escuro - (pela frente); B – Sutura da parede posterior do esôfago distal no duodeno, delicada, sem penetrar no lúmen duodenal; C – A linha amarela indica o local em que é feita incisão na parede do duodeno, que vai se comunicar com o esôfago. A região do esôfago pinçada (seta branca) será suturada à parede do duodeno (seta preta); D: Término da sutura. Forçando-se suavemente a sonda nasogástrica percebe-se que o lúmen está pérvio (seta branca).....	31

Figura 8	Procedimentos cirúrgicos. A e B – Movimentação da sonda nasogástrica, indicando ampla permeabilidade da região suturada; C – Sutura da parede abdominal; D: Período pós-operatório imediato.....	32
Figura 9	Potencial caudal (2.68 mSeg), potencial espinhal (4.92 mSeg) e potencial cortical (13 mSeg).....	35
Figura 10	Potencial caudal (2.72 mSeg), potencial espinhal (5.12 mSeg) e potencial cortical (12.2 mSeg).....	35
Figura 11	Potencial caudal (2.40 mSeg), potencial espinhal (6.04mSeg)..	37
Figura 12	Potencial caudal (2.81 mSeg), potencial espinhal (6.12 mSeg).	37
Figura 13	Potencial cortical em 13.1 mSeg (início em 12 mSeg, final em 14 mSeg – início e fim indicados por setas).....	38
Figura 14	Potencial cortical em 13.4 mSeg.....	38
Figura 15	Animal 9, do Grupo II. Potencial cortical anormal, com provável início em 14 mSeg, final em 17 mSeg – setas (latência em 15.3 – 15.5 mSeg). A alteração cortical coexiste com potenciais caudais e espinhais normais.....	40
Figura 16	Animal 10, do Grupo II. Potencial cortical anormal, ausente. Não foi possível sua obtenção com 2 séries de 200 promediações cada. A alteração cortical coexiste com potenciais caudais e espinhais normais.....	41
Figura 17	Animal 11, do Grupo II. Potencial cortical anormal, ausente. Não foi possível sua obtenção com 2 séries de 200 promediações cada. A alteração cortical coexiste com potenciais caudais e espinhais normais.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios dos potenciais caudais (Pcaudal), potenciais lombares (Plombar), da subtração entre ambos os tempos (PL – Pcaudal), e divisão da distância (Dist) pelo tempo para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V1. Idem, subtração das latências dos potenciais corticais menos lombares, divisão da distância (Dist) pelo tempo (PC – PL) para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V2.....	36
Tabela 2	Valores médios dos potenciais caudais (Pcaudal), potenciais lombares (Plombar), da subtração entre ambos os tempos (PL – Pcaudal), e divisão da distância (Dist) pelo tempo para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V1. Idem, subtração das latências dos potenciais corticais menos lombares, divisão da distância (Dist) pelo tempo (PC – PL) para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V2.....	39
Tabela 3	Valores médios dos potenciais caudais (Pcaudal), potenciais lombares (Plombar), da subtração entre ambos os tempos (PL – Pcaudal), e divisão da distância (Dist) pelo tempo para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V1. Idem, subtração das latências dos potenciais corticais menos lombares, divisão da distância (Dist) pelo tempo (PC – PL) para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V2. Em azul, valores anormais. n.o. = potenciais não obtidos.....	42

Lima MMF. Estudo experimental da esclerose combinada subaguda de medula. Botucatu 2015. 64p. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

RESUMO

A deficiência de vitamina B12 no ser humano, frequentemente associada a deficiência de fator intrínseco, produzido no estômago, leva a múltiplas alterações neurológicas e hematológicas. A mais conhecida alteração do sistema nervoso central é a desmielinização e degeneração dos fascículos grácil e cuneiforme da medula cervical. Este trabalho teve por objetivo tentar obter um modelo experimental da afecção, através da gastrectomia total em ratos.

Animais foram gastrectomizados, submetidos à suplementação polivitamínica via oral, e 2 a 3 meses depois submetidos a estudos de condução nervosa, com estímulos elétricos na extremidade da cauda, e captação de potenciais elétricos em 3 pontos, com distâncias iguais entre si: próximo ao ânus (potencial caudal), região inferior da coluna (potencial lombar) e região da protuberância cervical (potencial cortical). A velocidade de condução pela região inferior da medula espinhal foi denominada segmento V1, pela região torácica alta e cervical até o córtex, segmento V2. Após obtenções de registros de boa qualidade técnica em 15 gastrectomizados, os segmentos V1 e V2 foram comparados com dados de 20 controles pelo teste “t” de Student para amostras independentes, análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey. Os animais gastrectomizados apresentaram reduções de velocidades estatisticamente significativas para o segmento V2.

Os autores pensam ter conseguido modelo experimental da afecção em ratos, o que abre amplas perspectivas para testes terapêuticos em laboratório, com possibilidades para benefícios futuros ao homem.

PALAVRAS CHAVE: esclerose combinada subaguda da medula, gastrectomia experimental, ratos, vitamina B12

Lima MMF. Experimental model of the subacute combined sclerosis of the spinal cord. Botucatu, 2015. 64p. Thesis (PhD in Surgery) – Botucatu Medical School, UNESP.

SUMMARY

The B12 Vitamin deficiency in man, often associated with deficiency of intrinsic factor produced in the stomach, leading to several neurological and hematological disturbances. The best known alteration of the central nervous system is the demyelination and degeneration of the gracilis and cuneiform fascicles in the cervical spinal cord. This study aimed to try an experimental model of the disease, through total gastrectomy in rats.

Animals were gastrectomized, submitted to oral polivitaminic supplementation, and 2-3 months later underwent nerve conduction studies. Electrical stimulation was done on the tail end, and electrical potentials were obtained at 3 points with equal distances from each other: near the anus (tail potential), lower spinal cord (lumbar potential) and the region of cervical spinal cord (cortical potential). The conduction velocity of the lower region of the spinal cord segment was named V1, the high spinal cord to the cortex was named V2 segment. After good quality records from 15 gastrectomized animals, the V1 and V2 segments were compared with data from 20 controls by the "t" Student test for independent samples, analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test. Gastrectomized animals presented statistically significant reductions in the velocities for the V2 segment.

The authors think they have obtained an experimental model of the disease in rats, which opens up broad prospects for therapeutic tests in the laboratory, with possibilities for future benefits to the man.

KEY WORDS: experimental gastrectomy, rats, subacute combined degeneration of the spinal cord, vitamin B12

Vitamina B12 é coenzima de grande interesse clínico para o homem e diferentes animais (Battersby, 1994).

Após ser liberada dos alimentos por proteólise, a Vitamina B12 liga-se preferencialmente à proteína R (ou haptocorrina), proteína com peso molecular de 150 kd presente na saliva e no suco gástrico. O suco gástrico também possui o Fator Intrínseco, glicoproteína com peso molecular de 45 kd, produzido pelo retículo endoplasmático das células parietais do estômago. Comparando-se a afinidade da Vitamina B12 pela proteína R e pelo Fator Intrínseco, a afinidade pela proteína R é 50 vezes maior em pH 2, e 3 vezes maior, em pH 8. Assim, a proteína R é a proteína ligante preferencial após a liberação da Vitamina B12 dos alimentos (Antony, 2005). O conteúdo gástrico, com o complexo Vitamina B12 – Proteína R, e Fator Intrínseco, descem para a segunda parte do duodeno, onde as proteases pancreáticas degradam a Proteína R, mas não o Fator Intrínseco. Desta forma a Vitamina B12 é transferida para o Fator Intrínseco, em evento fisiológico, que dura cerca de 10 minutos. O Fator Intrínseco contém outro sítio de ligação, para os Receptores das células do íleo, localizados nas microvilosidades das células mucosas do íleo terminal. Estes receptores se acoplam ao complexo Fator Intrínseco-Vitamina B12, em processo cálcio-dependente. Desta forma, a Vitamina B12 ganha a corrente sanguínea, ligada à Transcobalamina-II, através da qual chega aos tecidos-alvo. A dissociação da Transcobalamina-II ocorre dentro dos lisossomos, em pH ácido. A Transcobalamina-II é degradada, e a Vitamina B12 é reduzida e convertida em suas formas ativas de Coenzimas intracelulares: *metilmalonil Coenzima-A mutase*, que atua no ciclo de Krebs para

transformação de metilmalonil Coenzima-A em Succinil Co-A e *metionina sintetase*, que catalisa transferência de radicais metil da metil-cobalamina para homocisteína para formar metionina. Estas duas coenzimas ativas da Vitamina B12 são críticas para a biosíntese de DNA, RNA e outras proteínas, em mecanismos de interação com o folato, e estão envolvidas na patogênese das complicações hematológicas e neurológicas da carência de B12 (Antony, 1991; Battersby, 1994; Antony, 2005).

Deficiência de Vitamina B12 leva a complexo quadro clínico no homem e em diferentes animais. O reconhecimento da associação entre anemia perniciosa e degeneração combinada subaguda de medula espinhal foi feito no final do século XIX, por Lichtheim, Putnam e Dana (citados por Lanska, 2010). A descoberta do Fator Intrínseco e as observações de melhora clínica com o uso de extratos de fígado, na primeira metade do século XX, e a síntese da molécula de cianocobalamina por Hodgkin, em 1955, foram fatos marcantes na história da afecção (Lanska, 2010).

Carência de vitamina B12, no homem, leva a anemia megaloblástica e a síndromes neurológicas, embora com frequência o quadro hematológico ou o quadro neurológico ocorram isoladamente (Zittoun, 2001; Antony, 2005). A esclerose combinada subaguda de medula tem este nome porque os pacientes com carência de B12 desenvolvem quadro de polineuropatia periférica sensitiva associada a evidências clínicas de comprometimento dos feixes longos da medula espinhal, fascículos grácil e cuneiforme (funículo posterior) e, eventualmente, via córtico-espinhal.

O quadro neurológico pode incluir atrofia óptica, ataxia cerebelar, polineuropatia de fibras mielínicas grossas, demência ou psicose (Kumar, 2004; Tripathi et al., 2010). Pode ocorrer comprometimento do funículo lateral da medula, com liberação piramidal (Maamar et al., 2006). Estudos de imagem mostram desmielinização cordonal posterior da medula espinhal cérvico-torácica (Maamar et al., 2006). Dentre 47 pacientes com estudos de imagem por ressonância magnética, aumento de sinal na medula espinhal foi visto em 21, e atrofia de medula espinhal em 6 (Misra et al., 2007). O aumento de sinal em T-2, na região cervical, com o “sinal do V invertido”, é típico da afecção (Mankad et al., 2010). Quadros atípicos e mais raros incluem mielite transversa (Vanconcellos et al., 2002), sinal de Lhermitte (Teive et al., 2009), paralisia de corda vocal (Green et al., 2011), hipotensão ortostática, incontinência urinária ou fecal (Antony, 2005), nível sensitivo, ou mesmo broncoespasmo (Puntambekar et al., 2009).

Recentemente foi descrita tendência a ataques isquêmicos transitórios, possivelmente por hiperhomocisteinemia, em paciente com anemia perniciosa (Bougteba et al., 2009).

Anemia perniciosa é a causa mais comum de carência de Vitamina B12 (Alderuccio et al., 2002). Gastrite crônica autoimune é caracterizada por infiltrados mononucleares na mucosa e submucosa do corpo e fundo gástricos, associados à atrofia de células parietais. É doença mediada por linfócitos T – CD4, com pouca ou nenhuma participação de linfócitos CD8 ou B (Silva et al., 1998; Suri-Payer et al., 2001). Anticorpos anti-células parietais podem estar presentes em endocrinopatias ou mesmo em pequena porcentagem da

população normal, entretanto anticorpos anti-Fator intrínseco são mais específicos, pois raramente estão presentes em outros distúrbios autoimunes ou em pessoas normais (Fairbanks et al., 1983).

Estudos em animais

Estudos experimentais de anemia macrocítica começaram a ser realizados, no rato, a partir de 1950 (Plum, 1950), e em guinea pig, a partir de 1956 (Slungaard et al., 1956a, b). Em 1952, indução de carência de Vitamina C em macacos levou a megaloblastose, pelas interações bioquímicas desta vitamina com folatos e Vitamina B12 (May et al., 1952). O sangue periférico destes animais apresentou leucopenia, moderada trombocitopenia e hipersegmentação de granulócitos (Sundberg et al., 1952), similares aos achados de carência de B12 no homem. Em 1973 foi obtido modelo experimental de degeneração combinada subaguda de medula, em ratos, pela injeção de ácido carboxílico 1-aminociclopentano (Gandy et al., 1973).

Em 1971 foi descrita fêmea do macaco gibão apresentando anemia megaloblástica, com quadro clínico de diarreia e anemia, com achados hematológicos típicos da doença, que reverteram com a reposição de Vitamina B12 (Yoshimitsu et al., 1971).

Modelos experimentais de carência de B12 foram obtidos em morcegos, com emprego do óxido nítrico (Van der Westhuyzen et al., 1982; Metz et al., 1993)

A microflora de ruminantes sintetiza Vitamina B12 na presença de cobalto. Deficiência dietética de cobalto leva a diminuição da Vitamina B12 no

plasma, com inapetência, perda de peso e anemia, eventualmente com alterações degenerativas no sistema nervoso central, músculo cardíaco e músculo esquelético (Maltin et al., 1983). No músculo estriado esquelético de carneiros foram demonstradas alterações mitocondriais pela histoquímica e microscopia eletrônica (Maltin et al., 1983). Foi desenvolvido modelo experimental em ratos com gastrectomia total proporcionando déficit de vitamina B12 - cobalamina (Scalabrino et al., 1990)

Atualmente há numerosos modelos de gastrite autoimune experimental em camundongos, que podem ser divididos em linfopênicos (Ahmed et al., 1981; Sakaguchi et al., 1989), não linfopênicos (Claeys et al., 1997; Scarff et al., 1997; Greenwood et al., 2001), transgênicos (McHugh et al., 2001) ou espontâneos (Alderuccio et al., 1998).

A medula óssea pode reagir a injúrias primárias como neoplasias hematológicas, ou secundariamente, por metástases, distúrbios autoimunes ou infecções crônicas. Encontramos poucas publicações em que foi atribuída importância à distribuição de fibras reticulínicas no estroma (Bauermeister, 1971; Naeim, 1994; Foucar, 1995; Bain et al., 1996).

A esclerose combinada subaguda de medula é síndrome neurológica frequente em nosso meio com a carência de B12 adquiridas de diversos modos (Weir et al., 1999) podendo resultar em quadro de polineuropatia periférica sensitiva associada a evidências clínicas de comprometimento dos feixes longos da medula espinhal, fascículos grácil e cuneiforme (funículo posterior) e, eventualmente, via córtico-espinhal.

Que seja de nosso conhecimento, ainda não foi desenvolvido um modelo experimental da doença incluindo avaliações do funículo posterior da medula por potenciais evocados sômato-sensoriais, nosso objetivo neste trabalho.

Relevância do estudo

Ao longo dos últimos 20 anos, a Proponente deste trabalho examinou vários pacientes humanos com hipótese diagnóstica de esclerose combinada subaguda de medula. Atualmente, a Disciplina de Neurologia Clínica possui modernos equipamentos para obtenções de potenciais evocados, possibilitando a proposição desta pesquisa.

Neste trabalho pretendemos desenvolver modelo experimental em ratos, com estudos de potenciais evocados sômato-sensoriais, que poderão confirmar diagnósticos de esclerose combinada subaguda de medula. A partir desta pesquisa, poderão surgir novas possibilidades de estudos da patogênese da doença, e possibilidades de novas terapêuticas.

II - OBJETIVOS

- Induzir esclerose combinada subaguda de medula espinhal em ratos através da gastrectomia total.
- Após estudos normativos de potenciais evocados sômato-sensoriais em ratos, utilizar o método para diagnóstico da afecção.

Após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram utilizados 35 animais, ratos Wistar adultos jovens, de ambos os sexos, pesando entre 250 e 300 gramas, mantidos vivos em cativeiro, no Biotério Central, com água e ração *ad libitum*.

O procedimento anestésico seguiu a padronização de anestesia geral para ratos em nossos laboratórios, com injeção intramuscular única de uma mistura de Ketamina - 10%, 1 ml / kg de peso + Xilazina - 10 %, 0,4 ml / kg de peso. Durante anestesia, todos os animais foram posicionados em decúbito dorsal, para estudos normativos de condução nervosa motora, e potenciais evocados sômato-sensoriais (PESS). Grupo I, 20 animais, divididos em 2 sub-grupos, IA: normais – 10 ; IB: grupo *sham* – 10. Grupo II, 15 animais submetidos a gastrectomias totais.

Procedimentos eletroneuromiográficos (ENMG) realizados em todos os animais

Condução motora – Eletrodos de superfície na face plantar (G1) e dorsal (G2) do pé, com terra interposto entre catodo do estimulador e G1. Foram aplicados estímulos elétricos supra-máximos de 0,2 mSeg de duração, sobre o nervo ciático, na região distal da perna e proximal da coxa, para obtenção dos potenciais de ação musculares compostos. Foram utilizados bases de tempo de 1 mSeg/cm, sensibilidades de 2 mV/cm e filtros com banda passante de 20 a 3000 Hz. O critério de inclusão para obtenção de potenciais evocados foi velocidade de condução motora do nervo ciático e/ou nervo caudal distal maior ou igual a 40 m/s.

Potenciais evocados

Primeiro procedimento: estímulos elétricos na posição de 2 centímetros proximais ao final da cauda, com captação por eletrodos de superfície ou monopolares, na região proximal da cauda (próximo ao ânus) – canal 1, e com eletrodos de superfície ou monopolares na região da medula espinhal – canal 2.

Segundo procedimento: estímulos elétricos na mesma posição acima descrita, eletrodos captadores no córtex cerebral (canais 1 e 2). Foram utilizados bases de tempo de 2 mSeg/cm, sensibilidades de 20 uV/cm e filtros com banda passante de 20 a 3000 Hz. Foram obtidas promediações até a perfeita identificação dos potenciais, pelo examinador. Os traçados obtidos foram superpostos para marcações de latências.

No final os dados foram tabulados para análises de latências e velocidades para potencial do nervo caudal, potencial medular e potenciais corticais (PESS).

A figura 1 ilustra as técnicas utilizadas para obtenção dos potenciais, inicialmente com marcações de distâncias iguais entre os segmentos a serem estudados:

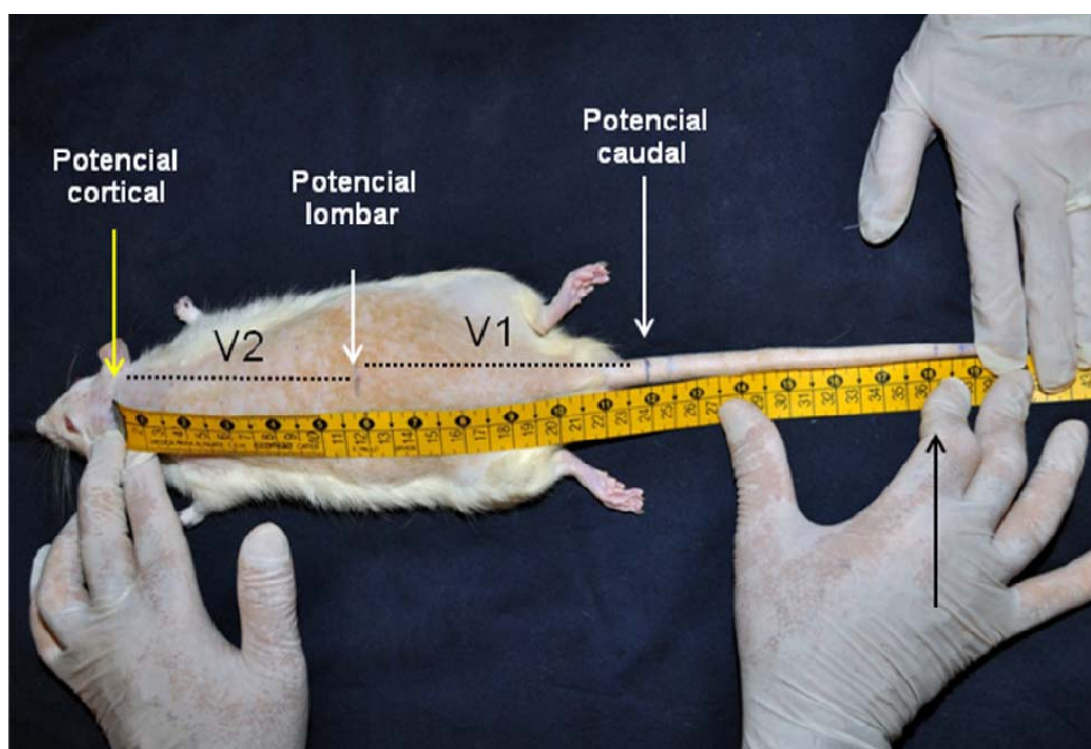


Figura 1 – Ponto de estímulo elétrico (seta preta), e captações a distâncias iguais, do potencial caudal (seta branca grande), potencial medular (seta branca pequena) e potencial cortical (seta amarela, zero da fita métrica, na região da proeminência occipital). As divisões de distâncias pelos tempos de propagação irão possibilitar cálculos das velocidades nos segmentos V1 e V2.

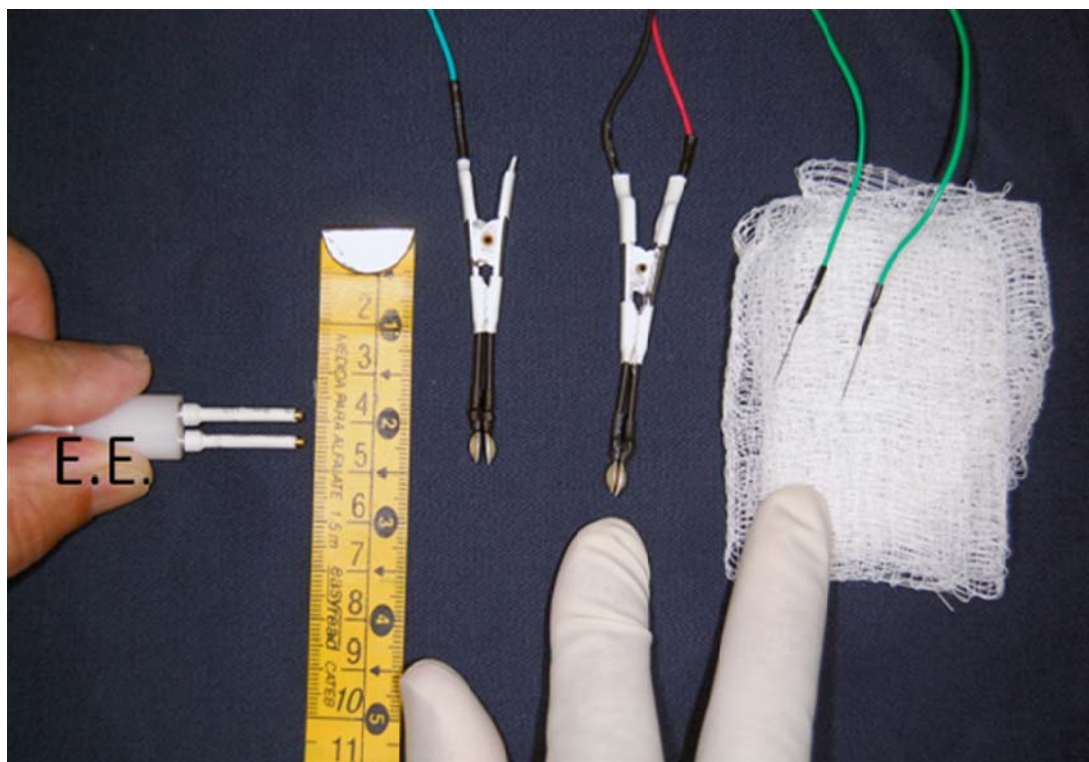


Figura 2 – Estimulador elétrico, com distância entre catodo e anodo de 0,5 cm (E.E.), eletrodos de superfície (ao centro) e eletrodos monopolares de agulha (sobre a gase), que foram utilizados para obtenções dos potenciais caudais e da medula espinhal.

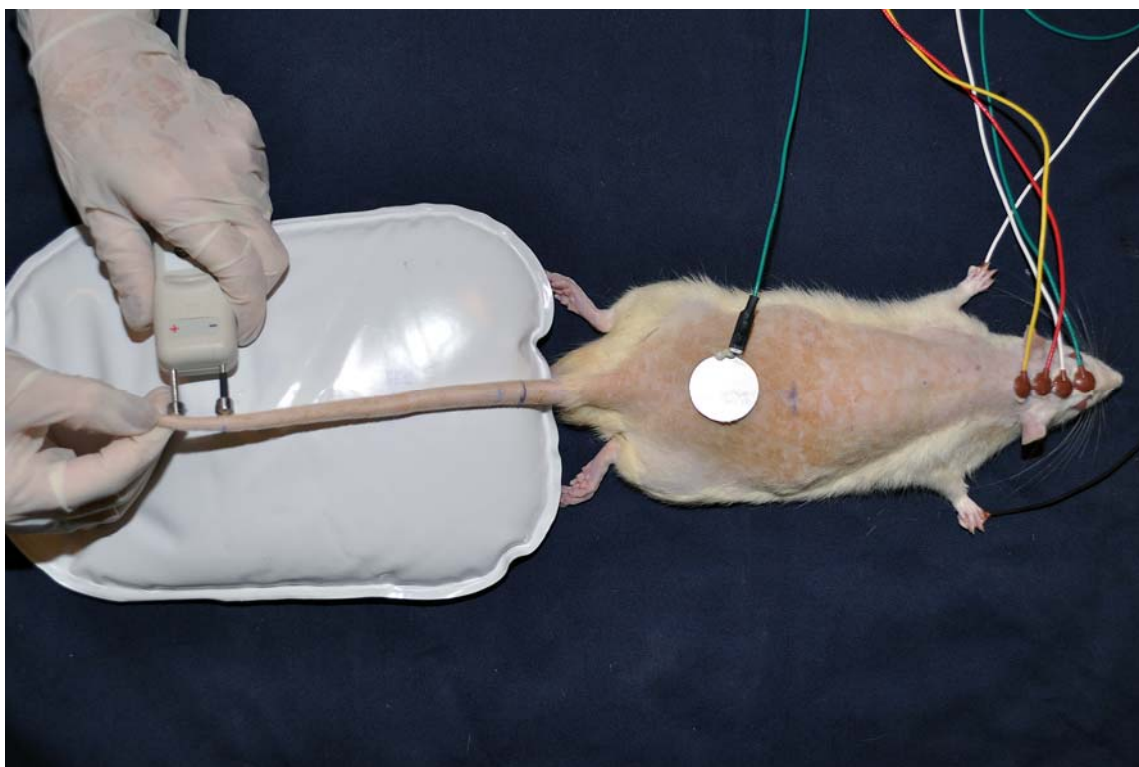


Figura 3 - A obtenção de todos os potenciais foi realizada com bolsa de água quente sob a cauda (branca, na figura), para evitar interferência do resfriamento da cauda nos resultados.

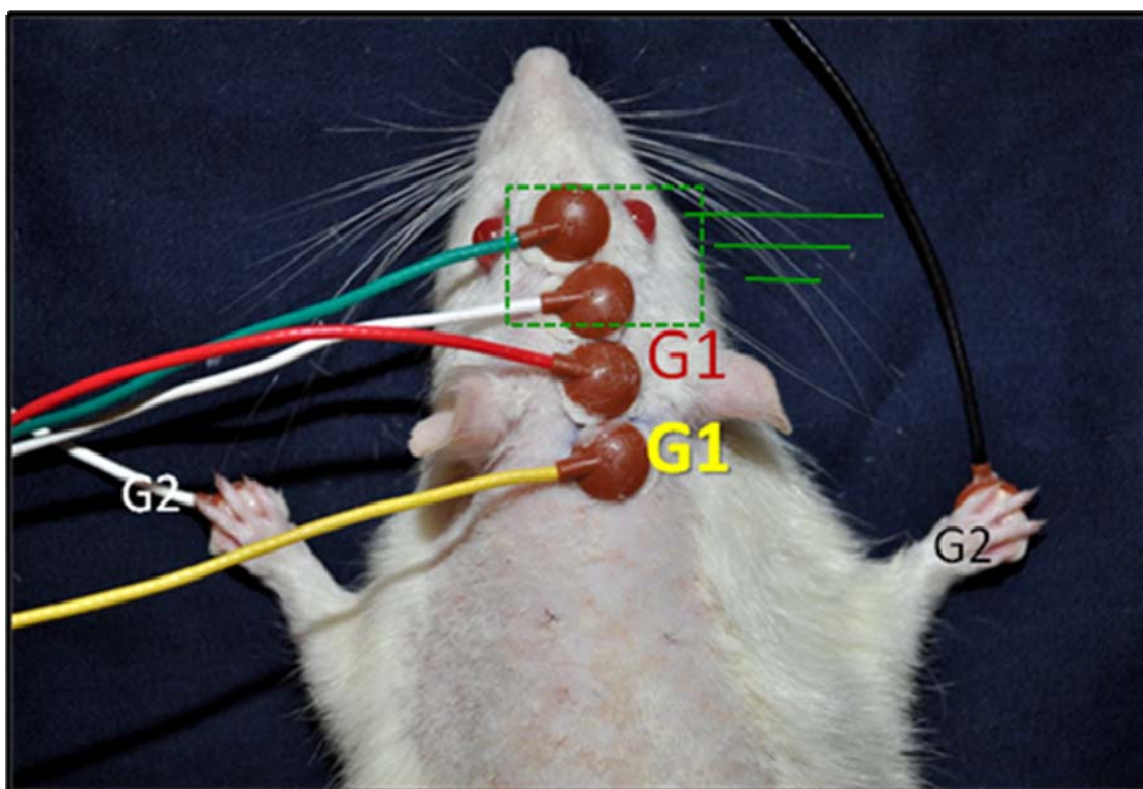


Figura 4 – Arranjo dos eletrodos para obtenção dos potenciais corticais, com referências não cefálicas (eletrodos G2 na face palmar dos membros anteriores, aderidos com pasta condutora). Canal 1: eletrodo ativo (G1) na proeminência occipital, em relação a G2 (membro direito); Canal 2: eletrodo ativo (G1) na proeminência occipital, em relação a G2 (membro esquerdo). Demais eletrodos (próximos aos olhos) como fios terra.

Esses procedimentos ENMG têm por objetivo viabilizar o cálculo da velocidade de propagação dos impulsos nervosos no trajeto anatômico final da cauda, até a medula espinhal lombar (segmento V1) e no trajeto medula espinhal torácica, medula cervical e chegada ao córtex (segmento V2).

Grupo IB – 10 animais, do grupo *sham*. Durante o mesmo procedimento anestésico acima descrito, foi feita incisão mediana no abdômen, longitudinal, de aproximadamente 5 cm, abertura da cavidade abdominal, em seguida sutura (sem gastrectomia).

Grupo II - Durante o mesmo procedimento anestésico já descrito, foi feita incisão mediana no abdômen, longitudinal, de aproximadamente 5 cm, abertura da cavidade abdominal, em seguida os demais procedimentos para a gastrectomia total, descritos a seguir:

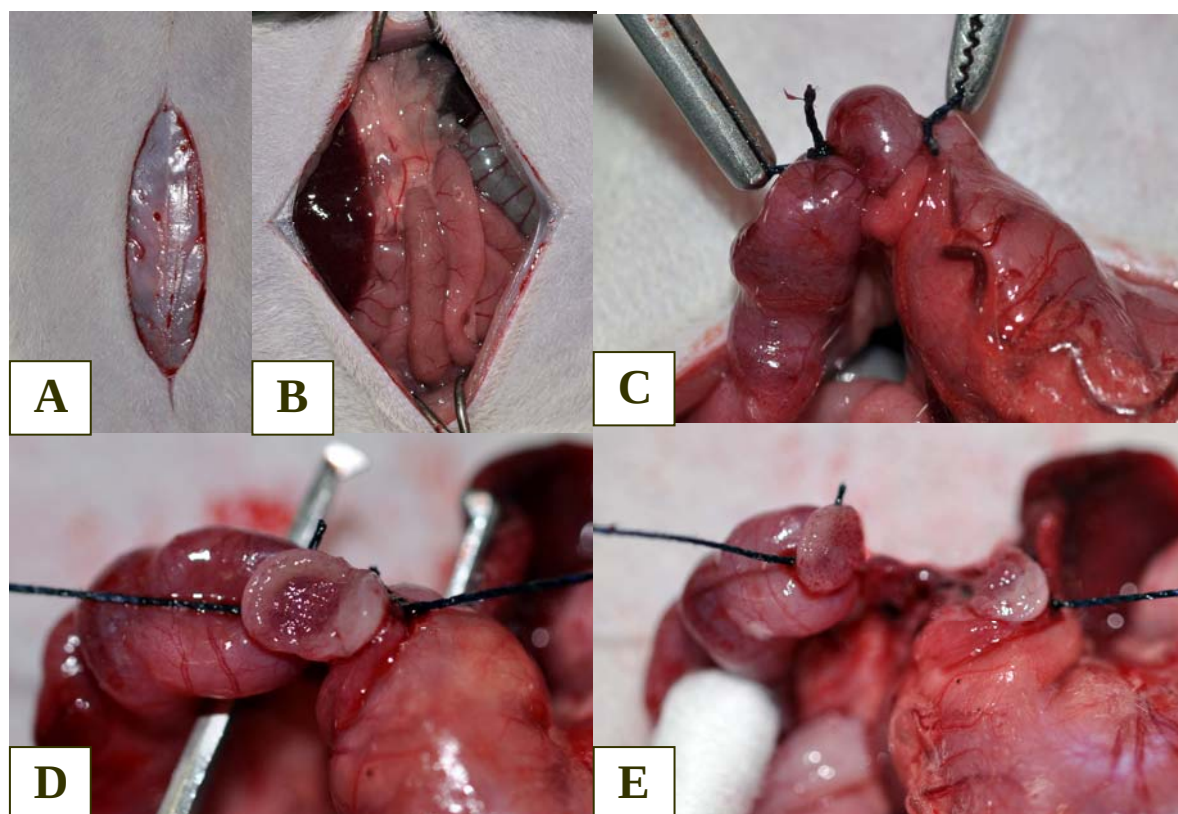


Figura 5 – Início do procedimento cirúrgico. A – Incisão abdominal mediana longitudinal; B – Exposição das vísceras; C – Identificação da transição estômago-duodeno, e ligadura em duas regiões, para que o suco gástrico não caia sobre as vísceras; D e E: secção distal do estômago, com coto proximal do duodeno já ligado.

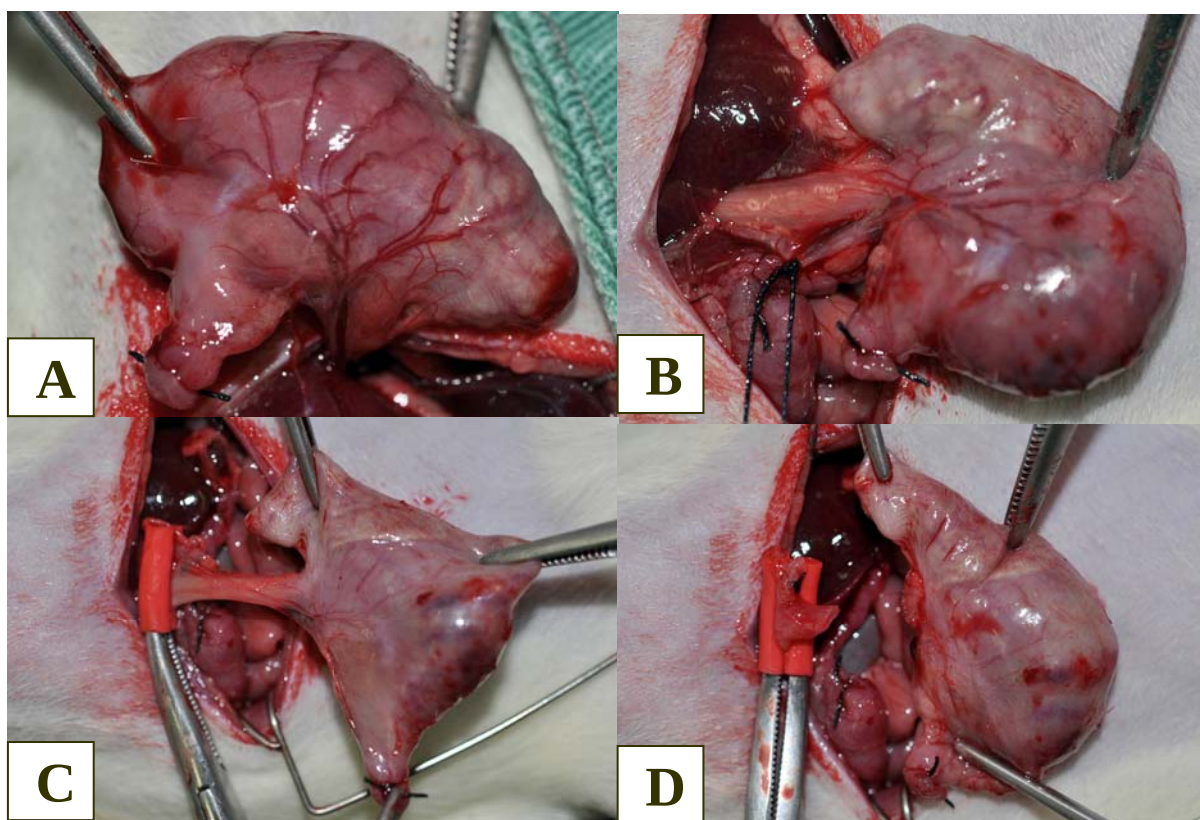


Figura 6 – Procedimentos cirúrgicos. A – Identificação dos principais vasos para ligaduras; B – Exposição do esôfago distal e região da cárdia; C – Clampeamento suave do esôfago distal, com proteção de borracha sobre as extremidades da pinça; D: secção distal do esôfago e retirada do estômago.

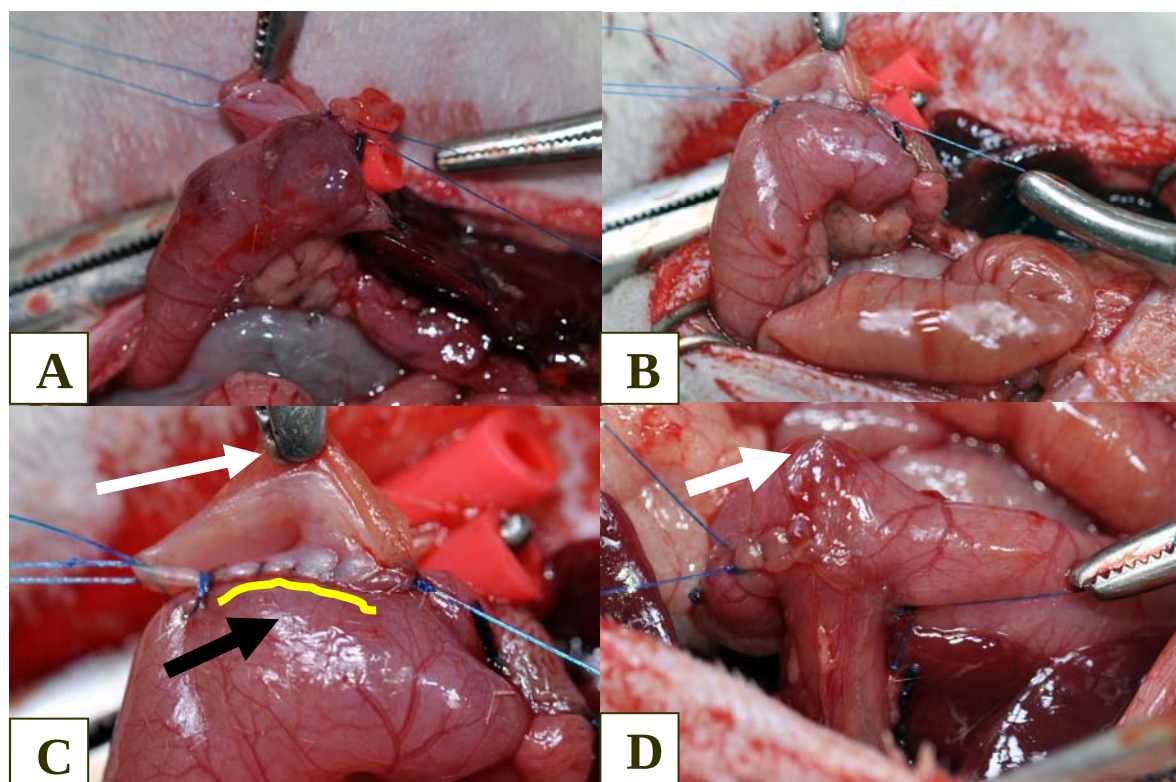


Figura 7 – Procedimentos cirúrgicos. A – Apresentação do esôfago – mais claro - (por trás) à região proximal do duodeno – mais escuro - (pela frente); B – Sutura da parede posterior do esôfago distal no duodeno, delicada, sem penetrar no lúmen duodenal; C – A linha amarela indica o local em que é feita incisão na parede do duodeno, que vai se comunicar com o esôfago. A região do esôfago pinçada (seta branca) será suturada à parede do duodeno (seta preta); D: Término da sutura. Forçando-se suavemente a sonda nasogástrica percebe-se que o lúmen está pérvio (seta branca).

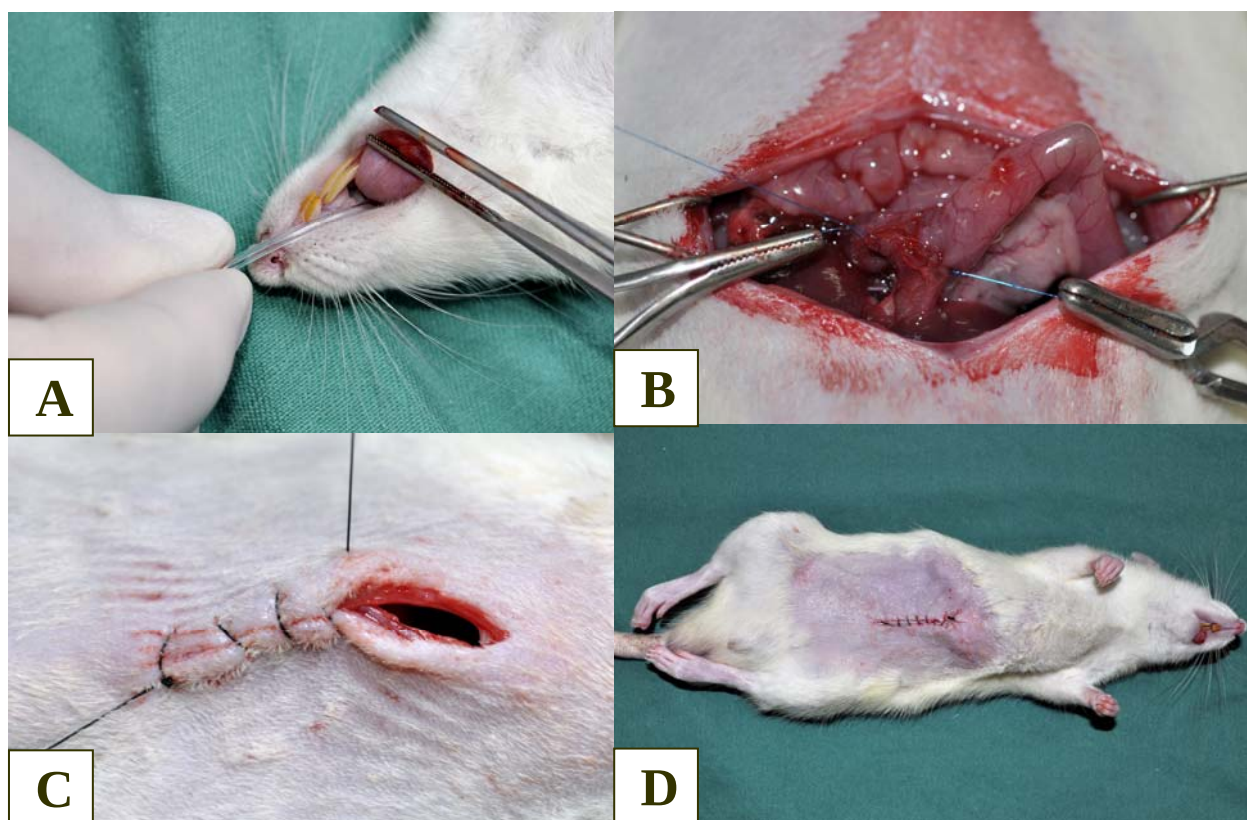


Figura 8 – Procedimentos cirúrgicos. A e B – Movimentação da sonda nasogástrica, indicando ampla permeabilidade da região suturada; C – Sutura da parede abdominal; D: Período pós-operatório imediato.

As técnicas de obtenção dos potenciais foram similares nos três grupos. Todos os exames ENMG foram realizados em equipamento Nihon-Kohden modelo Neuropack II.

Para evitar desnutrição após gastrectomia, foi adicionado complexo vitamínico à ração *ad libitum* dos animais (1 comprimido de Supradyn-Roche, para cada 100 gramas de ração). Objetivando modelo experimental crônico, considerando-se a vida média dos ratos de nosso Laboratório entre 2 a 2 anos e meio, os procedimentos ENMG foram realizados 2 a 3 meses após gastrectomia (2 meses / 24, equivaleriam a 70 meses / 840; ou seja, aproximadamente 6 anos da vida de um adulto normal que viver 70 anos).

O estudo estatístico das velocidades dos segmentos V1 e V2 entre os grupos IA (controles) e IB (grupo *sham*) foi realizado pelo teste “t” de Student para amostras independentes. Numa segunda etapa, a comparação entre os três grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

IV – RESULTADOS

GRUPO I

GRUPO IA. Neste grupo os potenciais do nervo caudal foram facilmente obtidos, como onda bi ou trifásica, com grande eletronegatividade. Os potenciais espinhais foram de menores amplitudes, porém facilmente identificáveis. Os potenciais corticais foram de mais difícil obtenção, aparecendo como onda eletronegativa, registrável na proeminência occipital. As figuras 9 e 10 ilustram exemplos de potenciais normais do Grupo IA:

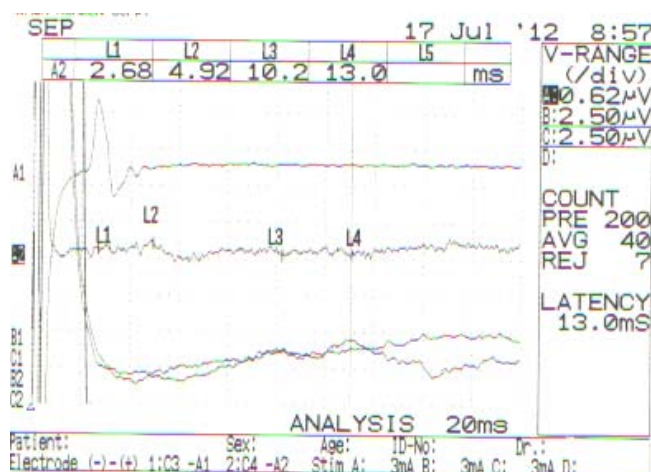


Figura 9 – Potencial caudal (2.68 mSeg), potencial espinhal (4.92 mSeg) e potencial cortical (13 mSeg).

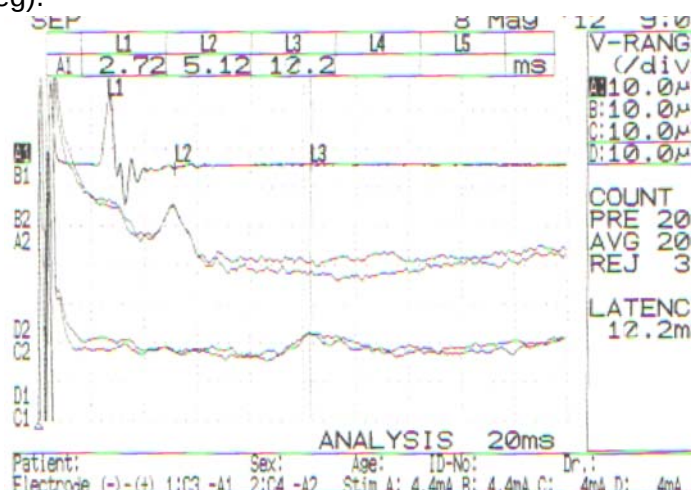


Figura 10 – Potencial caudal (2.72 mSeg), potencial espinhal (5.12 mSeg) e potencial cortical (12.2 mSeg).

A tabela 1 resume os valores de latências dos potenciais caudais, espinhais e corticais, e das velocidades de condução segmentares, dos 10 animais do Grupo IA.

Tabela 1 – Valores médios dos potenciais caudais (Pcaudal), potenciais lombares (Plombar), da subtração entre ambos os tempos (PL – Pcaudal), e divisão da distância (Dist) pelo tempo para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V1. Idem, subtração das latências dos potenciais corticais menos lombares, divisão da distância (Dist) pelo tempo (PC – PL) para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V2

Controles									
(Grupo IA)	Pcaudal	Plombar	PL-PC	Dist	Veloc	Pcortical	PC-PL	Dist	Veloc
1	2,68	4,92	2,24	110	49,1	13	8,08	110	13,6
2	2,96	5,32	2,36	120	50,8	11,7	6,38	120	18,8
3	2,76	5,48	2,72	110	40,4	12,4	6,92	110	15,8
4	2,36	4,68	2,32	100	43,1	13	8,32	100	12
5	2,72	5,12	2,4	110	45,8	12,2	7,1	110	15,4
6	2,88	5,3	2,42	100	41,3	12,1	6,8	100	14,7
7	3,15	5,55	2,4	110	45,8	12	6,45	110	17
8	2,61	5,22	2,61	110	42,1	11,6	6,38	110	17,2
9	2,91	5,35	2,44	100	40,9	12,5	7,15	100	13,9
10	2,7	5,25	2,55	100	39,2	12	6,75	100	14,8
Média	2,773	5,219	2,446	107	43,85	12,25	7,033	107	15,32

GRUPO IB. Devido à grande dificuldade na obtenção dos potenciais espinhais no Grupo IA, no Grupo IB passaram a ser obtidos preferencialmente com eletrodos monopolares (de agulha), que possibilitaram maiores amplitudes. As figuras 11 e 12 ilustram exemplos de potenciais caudais e espinhais do Grupo IB.

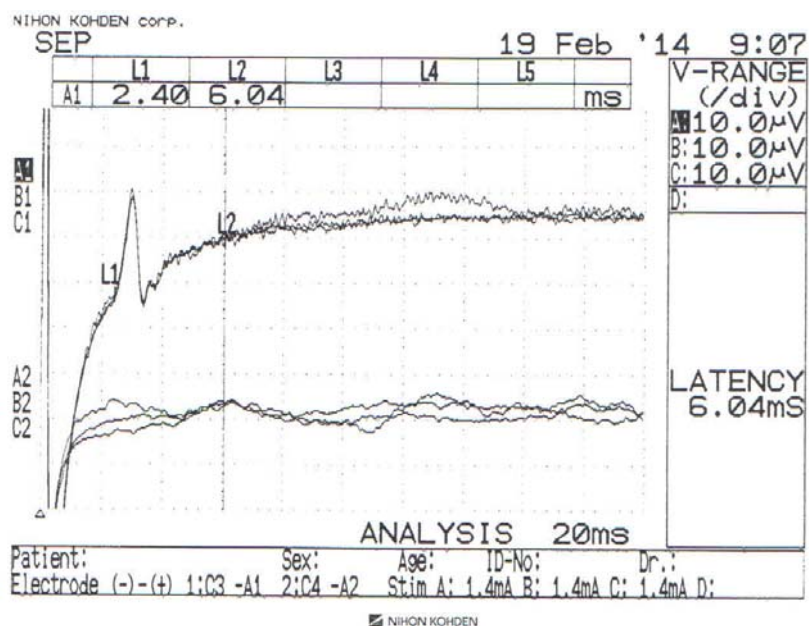


Figura 11 – Potencial caudal (2.40 mSeg), potencial espinhal (6.04mSeg).

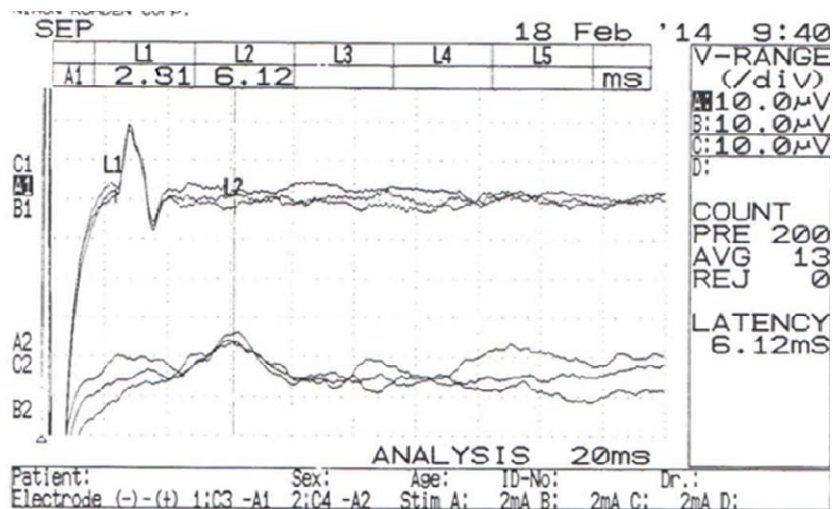


Figura 12 – Potencial caudal (2.81 mSeg), potencial espinhal (6.12 mSeg).

As figuras 13 e 14 ilustram exemplos de potenciais corticais do Grupo IB:

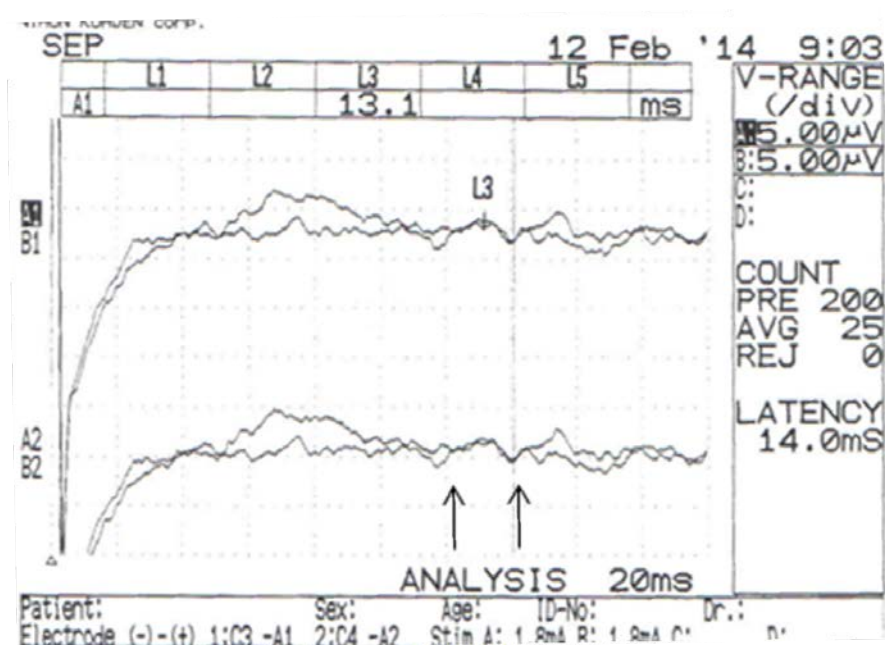


Figura 13 – Potencial cortical em 13.1 mSeg (início em 12 mSeg, final em 14 mSeg – início e fim indicados por setas).

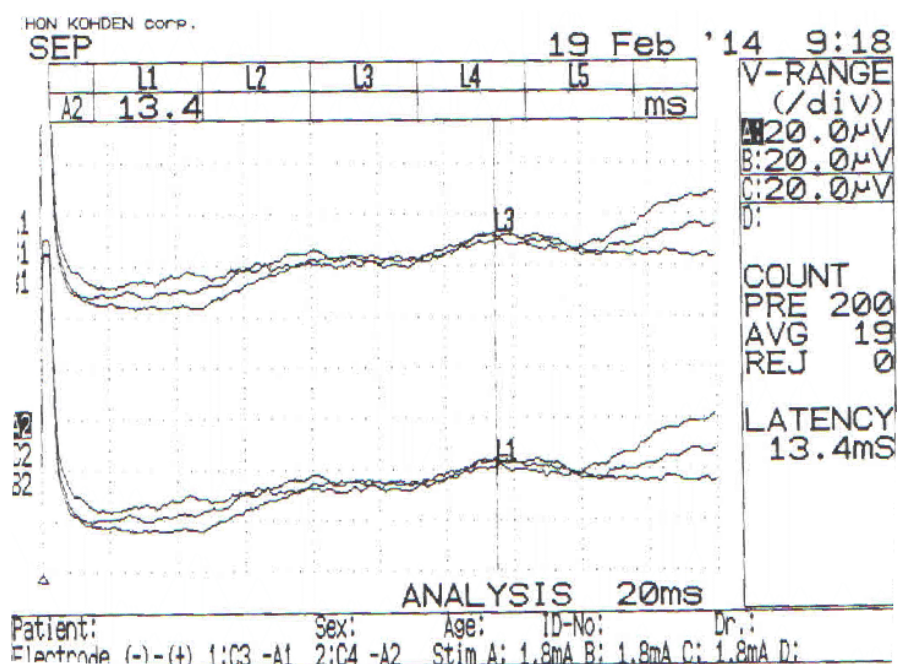


Figura 14 – Potencial cortical em 13.4 mSeg.

A tabela 2 resume os valores de latências dos potenciais caudais, espinhais e corticais, e das velocidades de condução segmentares, dos 10 animais do Grupo IB.

Tabela 2 – Valores médios dos potenciais caudais (Pcaudal), potenciais lombares (Plombar), da subtração entre ambos os tempos (PL – Pcaudal), e divisão da distância (Dist) pelo tempo para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V1. Idem, subtração das latências dos potenciais corticais menos lombares, divisão da distância (Dist) pelo tempo (PC – PL) para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V2

Grupo IB									
(sham)	Pcaudal	Plombar	PL-PC	Dist	Veloc	Pcortical	Pcort-PL	Dist	Veloc
1	3,16	5,08	1,92	110	57,3	13,0	7,9	110,0	13,9
2	3,52	5,84	2,32	120	51,7	13,1	7,3	120,0	16,5
3	2,48	4,59	2,11	120	56,9	12,5	7,9	120,0	15,2
4	2,81	6,12	3,31	120	36,3	13,5	7,4	120,0	16,3
5	2,40	6,04	3,64	120	33,0	13,4	7,4	120,0	16,3
6	2,80	5,90	3,1	110	35,5	13,0	7,1	110,0	15,5
7	2,55	5,50	2,95	120	40,7	13,2	7,7	120,0	15,6
8	2,91	5,70	2,79	120	43,0	13,3	7,6	120,0	15,8
9	2,74	5,80	3,06	120	39,2	13,4	7,6	120,0	15,8
10	2,60	5,90	3,3	120	36,4	13,5	7,6	120,0	15,8
Média	2,80	5,65	2,85	118	43,0	13,2	17,8	118,0	14,2

GRUPO II

A gastrectomia levou a grande mortalidade dos animais nas primeiras 3 a 4 semanas após o procedimento. Membros da equipe e funcionários do Laboratório Experimental calculam que neste grupo morreram mais de 30 animais, de modo que estudos finalizados só foram possíveis em 15.

Os dados dos grupo IA e IB permitiram inferir latências anormais de potenciais corticais, aquelas com valores superiores a 14 milisegundos. A maior anormalidade foi a não obtenção dos potenciais corticais, que ocorreu em 5 animais. Potenciais corticais com latências maiores que 15 milisegundos foram observados em 3 animais. Assim, potenciais corticais anormais incidiram em pelo menos 8 / 15 animais (53.3%).

A seguir, são fornecidos exemplos de alterações dos potenciais corticais:

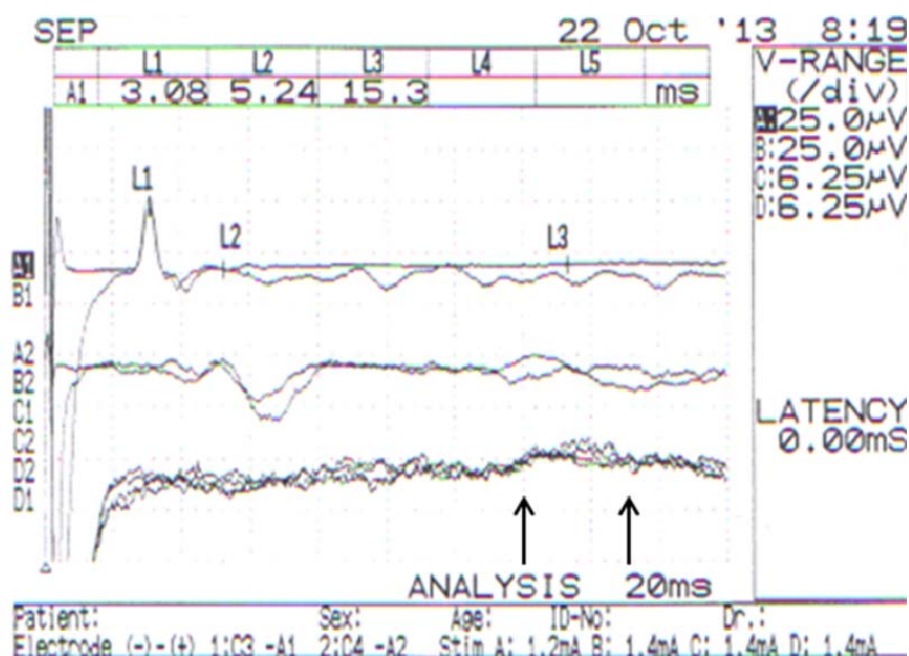


Figura 15 – Animal 9, do Grupo II. Potencial cortical anormal, com provável início em 14 mSeg, final em 17 mSeg – setas (latência em 15.3 – 15.5 mSeg). A alteração cortical coexiste com potenciais caudais e espinhais normais.

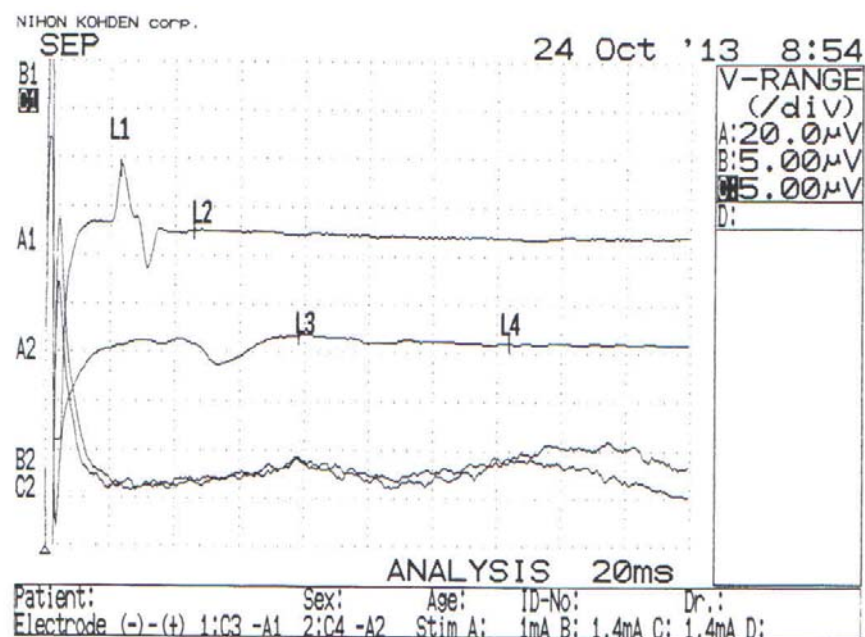


Figura 16 – Animal 10, do Grupo II. Potencial cortical anormal, ausente. Não foi possível sua obtenção com duas séries de 200 promediações cada. A alteração cortical coexiste com potenciais caudais e espinhais normais.

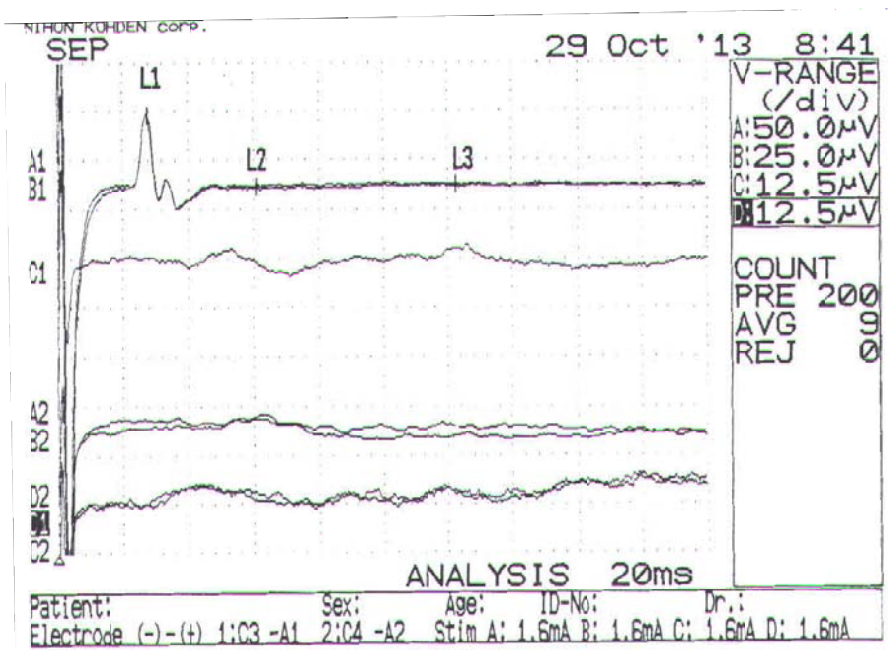


Figura 17 – Animal 11, do Grupo II. Potencial cortical anormal, ausente. Não foi possível sua obtenção com duas séries de 200 promediações cada. A alteração cortical coexiste com potenciais caudais e espinhais normais.

A tabela 3 resume os valores de latências dos potenciais caudais, espinhais e corticais, e das velocidades de condução segmentares, dos 15 animais do Grupo II.

Tabela 3 – Valores médios dos potenciais caudais (Pcaudal), potenciais lombares (Plombar), da subtração entre ambos os tempos (PL – Pcaudal), e divisão da distância (Dist) pelo tempo para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V1. Idem, subtração das latências dos potenciais corticais menos lombares, divisão da distância (Dist) pelo tempo (PC – PL) para obtenção das velocidades (Veloc) no segmento V2. Em azul, valores anormais. n.o. = potenciais não obtidos

Grupo II									
(Gastrectomia)	Pcaudal	Plombar	PL-PC	Dist	Veloc	Pcortical	Pcort-PL	Dist	Veloc
1	2,68	4,92	2,24	110	49,11	13,0	8,08	110	13,61
2	2,96	5,32	2,36	110	46,61	12,6	7,28	110	15,10
3	2,76	5,48	2,72	110	40,44	12,4	6,92	110	15,89
4	2,36	4,68	2,32	110	47,41	14,0	9,32	110	11,80
5	2,84	5,76	2,92	110	37,67	12,7	6,94	110	15,80
6	2,84	5,64	2,80	120	42,86	12,1	6,50	120	18,40
7	3,12	6,24	3,12	120	38,46	12,0	5,76	120	20,83
8	2,60	5,68	3,08	120	38,96	15,4	9,72	120	12,34
9	3,08	5,24	2,16	110	50,93	15,3	10,06	110	10,93
10	2,24	4,40	2,16	100	46,30	n.o	n.o	100	n.o
11	2,40	6,00	3,60	110	30,56	n.o	n.o	110	n.o
12	2,76	6,08	3,32	110	33,13	n.o	n.o	110	n.o
13	2,56	6,36	3,80	110	28,95	15,8	9,44	110	11,65
14	2,88	6,48	3,60	110	30,56	n.o	n.o	110	n.o
15	3,56	5,76	2,20	110	50,00	n.o	n.o	110	n.o
Média	2,78	5,60	2,83	111,33	40,80	13,53	2,47	111,33	14,63

ESTUDO ESTATÍSTICO

PRIMEIRA PARTE

Estudo estatístico pelo teste “t” de Student para comparação entre os segmentos V1 e V2 entre os grupos IA e IB:

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	18	0.28	0.7849
Satterthwaite	Unequal	12.199	0.28	0.7864

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	18	-0.51	0.6179
Satterthwaite	Unequal	11.491	-0.51	0.6213

– Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros V1 e V2 na comparação entre grupos IA e IB ($p = 0,7864$ e $0,6213$, respectivamente).

Os grupos IA e IB foram então somados, para $n = 20$, como controles, para o grupo gastrectomizado (Grupo II). O grupo II tem $n = 10$ porque em 5 animais os potenciais corticais não puderam ser obtidos.

Comparação entre os segmentos V1 do grupo controle com o grupo gastectomizado:

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	33	-1.08	0.2890
Satterthwaite	Unequal	28.481	-1.06	0.2974

– Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o parâmetro V1 na comparação entre grupos controle e gastrectomizado ($p = 0,2890$).

Comparação entre os segmentos V2 do grupo controle com o grupo gastectomizado:

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	28	17.40	<.0001
Satterthwaite	Unequal	9.3112	12.41	<.0001

– Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o parâmetro V2 na comparação entre grupos controle e gastrectomizado (p menor que 0,0001).

SEGUNDA PARTE

Estudo estatístico pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, comparando-se os 3 grupos, IA, IB e II:

Em relação à velocidade V1:

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
grupo	2	62.67142541	31.33571271	0.60	0.5548

Em relação à velocidade V2:

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
grupo	2	6531.644886	3265.822443	146.11	<.0001

– Novamente, ausência de significância estatística para os parâmetros V1 entre os 3 grupos, e valores significativos na comparação do parâmetro V2 entre o grupo gastrectomizado e os demais (p menor que 0,0001).

V – DISCUSSÃO

Os trabalhos iniciais desta pesquisa foram precedidos por estudo piloto apenas da gastrectomia, em 4 animais. Gastrectomias bem sucedidas só foram possíveis pela grande experiência dos funcionários do setor experimental, e grande perícia e ajuda do colega docente da Disciplina de Gastrocirurgia, habituado com o procedimento. Nas duas semanas seguintes às gastrectomias iniciais observou-se emagrecimento por provável desnutrição, e surgiu a idéia de suplementação polivitamínica via oral, que resultou em bons resultados. A suplementação polivitamínica aos gastrectomizados passou a evitar emagrecimento e desnutrição. Entretanto, a mortalidade após gastrectomia em ratos é muito alta. Como não foram feitas necropsias, desconhecemos a causa da mortalidade alta. Além de essencial para síntese de DNA e respiração celular mitocondrial, carência de B12 pode levar a doenças cardio-vasculares (Kozyraki et al., 2013). Alguns de nossos animais aparentemente sofreram morte súbita. Nossa equipe e funcionários do Laboratório Experimental calcularam que foram perdidos mais de 30 animais, por óbitos nos primeiros dias do pós-operatório, ou nas primeiras duas ou três semanas após cirurgia. Os óbitos por infecções, no grupo sham (IB), foram escassos. Assim, para obtenção dos 35 animais do final de estudo calcula-se que foram perdidos cerca de 35 animais (infecções no grupo sham, e múltiplos óbitos no Grupo II).

A metodologia ENMG, que aparentava ser fácil no plano teórico, apresentou-se difícil na prática. Ocorriam variações de latências e amplitudes de potenciais caudais, a medida que passava o tempo de anestesia, e, nos meses de maio a julho os animais apresentavam resfriamento da cauda. Surgiu então a ideia de mantê-los aquecidos com bolsas de água quente, o que

resolveu o problema. Latências passaram a permanecer estáveis com o decorrer do estudo de cada animal. Potenciais caudais foram obtidos facilmente com aquecimento dos animais. Potenciais lombares requereram promediações de 10 a 20 respostas, para ficarem nítidos, enquanto que os potenciais corticais só ficaram nítidos com pelo menos 200 promediações.

Comparando-se latências e velocidades dos segmentos V1 e V2, do grupo controle e grupo *sham*, observaram-se resultados similares e homogêneos. Nos testes estatísticos não ocorreram variações estatisticamente significativas entre os diferentes parâmetros destes dois grupos. Tais resultados eram esperados.

Sobre as reduções estatisticamente significativas das velocidades do segmento V2 dos ratos gastrectomizados, a literatura registra predomínio das alterações desmielinizantes e degenerativas, no homem, na carência de B12, no segmento cervical (Maamar et al., 2006). Foi registrado aumento de sinal na medula espinhal em 21 pacientes, e atrofia de medula espinhal em 6 (Misra et al., 2007). O aumento de sinal em T-2, na região cervical, com o “sinal do V invertido”, é considerado típico da afecção (Mankad et al., 2010), mas as resoluções dos equipamentos de ressonância disponíveis em nosso meio não nos permitiram estudos de imagem nos ratos. Foram descritos quadros atípicos e mais raros, no homem, como mielite transversa (Vanconcellos et al., 2002) e sinal de Lhermitte (Teive et al., 2009). Na esclerose múltipla e deficiência de B12 dos seres humanos o sinal de Lhermitte está relacionado a desmielinizações do funículo posterior da medula, que se mostrou alterado nos

ratos deste trabalho, já que as vias aferentes, dos impulsos elétricos aplicados na cauda, chegam ao córtex por esta via anatômica.

Além dos estudos estatísticos, foram fornecidas descrições de outros tipos de anormalidades. Comparando-se os potenciais corticais normais, das figuras 9 e 13, com o potencial cortical alterado, figura 15, a latência normal está em torno de 13 milissegundos, e a alterada em 15 milissegundos. Esta diferença, de 2 milissegundos, é aparentemente pequena porque estamos acostumados com os membros longos do ser humano. Na perna humana costumamos medir 60 a 70 centímetros no membro inferior, e 30 a 40 centímetros no membro superior, no Laboratório de ENMG. Entretanto, aqueles 2 milissegundos de retardo de latência, no comprimento do corpo do rato, é significativo porque está relacionado a uma distância muito curta (para o total do corpo). Em outras palavras, 2 milissegundos a mais, em relação ao tamanho do rato, seriam equivalentes a grandes retardos de latências, de 6 a 8 milissegundos, para o homem. Outro tipo de anormalidade registrada foi ausência de potenciais corticais, coexistindo com potenciais caudais e lombares presentes. Tais ausências de potenciais corticais não ocorreram por problemas técnicos, porque os potenciais caudais e lombares foram obtidos no mesmo procedimento. Considerando-se 3 animais com potenciais corticais de latências prolongadas, e outros 5 animais em que potenciais corticais não foram obtidos, chega-se ao número de 8 / 15 (total de animais do grupo II). Ou seja, anormalidades da condução central, pela medula espinhal alta, ocorreram em 53,3% dos animais gastrectomizados.

Experimentos recentes com técnicas de biologia molecular em neurônios de medula espinhal de camundongos indicam que a Vitamina B12 está relacionada a transportadores de membranas lisossomais e ao fator de crescimento epidérmico (Mutti et al., 2013). Os mecanismos das lesões da mielina na deficiência de B12 são complexos, mas envolvem aumento do fator de necrose tumoral (TNF-alfa), diminuição do fator de crescimento epidérmico (FCE) e aumento de secreção dos príons normais (Scalabrino et al., 2013).

A importância da Vitamina B12 na medicina moderna é crescente, e motivou recentemente um Simpósio Internacional Sobre Vitamina B12, em Nancy, França, em 2013 (Guéant et al., 2013)

Pensamos que o modelo experimental descrito neste trabalho abre amplas perspectivas de pesquisas terapêuticas, em laboratórios, com possíveis aplicações futuras e possibilidades de eventuais benefícios, para seres humanos.

VI – CONCLUSÕES

- As velocidades de propagação dos impulsos nervosos na medula espinhal baixa foram similares nos animais gastrectomizados em relação aos controles;
- as velocidades de propagação dos impulsos nervosos na medula espinhal alta mostraram-se alentecidas ou ausentes em 53,3 % dos animais gastrectomizados;
- este modelo experimental mostrou alterações compatíveis com o que se conhece em humanos, não está descrito na literatura e abre perspectivas de pesquisas nesta área.

VI – REFERÊNCIAS

Ahmed SA, Penhale WJ. Pathological changes in inbred strains of mice following early thymectomy and irradiation. *Experientia* 1981;37(12):1341-3.

Alderuccio F, Sentry JW, Marshall ACJ, Biondo M, Toh BH. Animal Models of Human Disease: Experimental Autoimmune Gastritis – A Model for Autoimmune Gastritis and Pernicious Anemia. *Clin Immunol.* 2002;102(1):48-58.

Alderuccio F, Toh BH. Spontaneous autoimmune gastritis in C3H/He mice: A new mouse model for gastric autoimmunity. *Am J Pathol.* 1998;153(4):1311-18.

Antony AC. Megaloblastic anemias. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ et al (eds). *Hematology: Basic Principles and Practice.* New York: Churchill Livingstone, 1991. p. 392-422.

Antony AC. Megaloblastic anemias. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P (eds). *Hematology. Basic Principles and Practice.* Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005. p. 519-23.

Bain BJ, Clark DM., Lampert IA. Infection and Reactive Changes. In: *Bone Marrow Pathology.* 2^a ed. London: Blackwell Science, 1996. cap.2, p.51-87.

Bauermeister DE. Quantification of Bone Marrow Reticulin - A Normal Range. *Am J Clin Pathol.* 1971;56:24-31.

Battersby AR. How nature builds the pigments of life: The conquest of vitamin B12. *Science.* 1994;264:1551-7.

Bougteba A, Basir A, Kissani N. Recurrent ischemic stroke revealing Biermer's disease. *Rev Neurol (Paris).* 2009;165(12):1099-102.

Claeys D, Sarage E, Rossier BC, Kraehenbuhl JP. Neonatal injection of native proton pump antigens induces autoimmune gastritis in mice. *Gastroenterology.* 1997;113(4):1136-45.

Fairbanks VF, Lennon VA, Kokmen E, Howar FM. Tests for pernicious anemia: Serum intrinsic factor blocking antibody. *Mayo Clin Proc.* 1983;58:203-4.

Foucar K. Miscellaneous Disorders of Bone Marrow Including Stromal and Bone Abnormalities. In: Bone Marrow Pathology. Chicago: ASCP Press, 1995. Cap.25, p.431-74.

Gandy G, Jacobson W, Sidman R. Inhibition of a transmethylation reaction in the central nervous system – an experimental model for subacute combined degeneration of the cord. J Physiol. 1973;233(1):1-3.

Green R, Kara N, Cocks H. Vitamin B12 deficiency: an unusual cause of vocal fold palsy. J Laryngol Otol. 2011;125(12):1309-11.

Greenwood DLV, SENTRY JW, Toh BH. Characterisation of proton pump antibodies and stomach pathology in gastritis induced by neonatal immunization without adjuvant. Autoimmunity. 2001;34(2):81-94.

Guéant JL, Alpers DH. Vitamin B12, a fascinating micronutrient, which influences human health in the very early and later stages of life. Biochimie. 2013;95:967-9.

Kozyraki R, Cases O. Vitamin B12 absorption: Mammalian physiology and acquired and inherited disorders. Biochimie. 2013;95:1002-7.

Kumar S. Vitamin B12 deficiency presenting with an acute reversible extrapyramidal syndrome. Neurol India. 2004 Dec;52(4):507-9.

Lanska DJ. Chapter 30: historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders: the water-soluble B vitamins. Handb Clin Neurol. 2010;95:445-76.

Maamar M, Tazi-Mezalek Z, Harmouche H, Ammouri W, Zahlane M, Adnaoui M, Aouni M, Mohattane A, Maaouni A. Neurological manifestations of vitamin B12 deficiency: a retrospective study of 26 cases. Rev Med Int. 2006;27(6):442-7.

Maltin CA, Duncan L, Wilson AB. Mitochondrial abnormalities in muscle from vitamin B12-deficient sheep. J Comp Pathol. 1983;93(3):429-35.

Mankad K, Kullmann DM, Davagnanam I. Neurological manifestation of vitamin B12 deficiency. *Am J Med.* 2010; 123(6):61-2.

May CD, Hamilton A, Stewart CT, Figen J. Experimental Megaloblastic Anemia and Scurvy in the Monkey: IV. Vitamin B₁₂ and Folic Acid Compounds in the Diet, Liver, Urine and Feces and Effects of Therapy. *Blood.* 1952;7:978-91.

McHugh RS, Shevach EM, Margulies DH, Natarajan K. A T cell receptor transgenic model of severe, spontaneous organ-specific autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2094-2103.

Metz J. Pathogenesis of cobalamin neuropathy: Deficiency of nervous system S-adenosylmethionine? *Nutr Rev.* 1993;51:12-15.

Misra UK, Kalita J. Comparison of clinical and electrodiagnostic features in B12 deficiency neurological syndromes with and without antiparietal cell antibodies. *Postgrad Med J.* 2007;83(976):124-7.

Mutti E, Lildballe DL, Kristensen L, Birn H, Nexø E. Vitamin B12 dependent changes in mouse spinal Cord expression of vitamin B12 related proteins and the epidermal growth factor system. *Brain Res.* 2013;1503:1-6.

Naeim F. Abnormal Morphology: General Considerations. In: *Pathology of Bone Marrow.* 2^a ed, Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. Cap.3, p.82-115.

Plum CM. Experimental macrocytic anaemia in the rat. *Sang.* 1950;21(5):437-51.

Puntambekar P, Basha MM, Zak IT, Madhavan R. Rare sensory and autonomic disturbances associated with vitamin B12 deficiency. *J Neurol Sci.* 2009 Dec 15;287(1-2):285-7.

Sakaguchi S, Sakaguchi N. Organ-specific autoimmune disease induced in mice by elimination of T cell subsets. V. Neonatal administration of cyclosporin A causes autoimmune disease. *J Immunol.* 1989;142(2):471-80.

Scalabrino G, Monzio-Compagnoni B, Ferioli ME, Lorenzini EC, Chiodini E, Candiani R. Subacute combined degeneration and induction of ornithine decarboxylase in spinal cord of totally gastrectomized rats. *Lab Invest*. 1990;62:297-304.

Scalabrino G, Veber D. Cobalamin and normal prions: A new horizon for cobalamin neurotrophism. *Biochimie*. 2013;95:1041-6.

Scarff KJ, Pettitt JM, Van Driel IR, Gleeson PA, Toh BH. Immunization with gastric H⁺/K⁺ - ATPase induces a reversible autoimmune gastritis. *Immunology*. 1997;92(1):91-8.

Silva HD, Van Driel IR, La Gruta N, Toh BH, Gleeson PA. CD4 T cells, but not CD8 T cells, are required for the development of experimental autoimmune gastritis. *Immunology*. 1998;93(3):405-8.

Slungaard RK et al. Cited in: Megaloblastic anemia in guinea pigs. *Nutr Rev*. 1956b;14(7):220-1.

Slungaard RK, Higgins GM. Experimental megaloblastic anemia in young guinea pigs. *Blood*. 1956a;11(2):123-42.

Sundberg RD, Schaar F, May CD, Winkle MS. Experimental Nutritional Megaloblastic Anemia. *Blood*. 1952;7(12):1143-81.

Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by cd4 (+) cd25(+) T cells. *J Autoimmun*. 2001;16(2):115-23.

Teive HAG, Haratz S, Zavala J, Munhoz RP, Scola RH, Werneck LC. Lhermitte's sign and vitamin B12 deficiency: case report. *São Paulo Med J*. 2009;127(3):171-3.

Tripathi AK, Verma SP, Himanshu D. Acute psychosis: a presentation of cyanocobalamin deficiency megaloblastic anemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2010; 26(3):99-100.

Van der Westhuyzen J, Fernandes-Costa F, Metz J. Cobalamin inactivation by nitrous oxide produces severe neurological impairment in fruit bats: protection by methionine and aggravation by folates. *Life Sci.* 1982;31(18):2001-10.

Vasconcellos LF, Correa RB, Chimelli L, Nascimento F, Fonseca AB, Nagel J, Novis SA, Vincent M. Myelopathy due to vitamin B12 deficiency presenting as transverse myelitis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002;60(1):150-4.

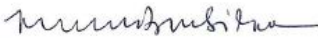
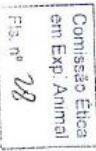
Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B 12 and folate. *British Medical Bulletin.* 1999;55(3):669-82.

Yoshimitsu M, Nigi H. A case of megaloblastic anemia in the gibbon (*Hylobates foolock*). *Jap J vet Res.* 1971;19:81-6.

Zittoun J. Biermer's disease. *Rev Prat.* 2001;51(14):1542-6.

ANEXO 1

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		 Comissão de Ética em Experimentação Animal  Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99
Certificado			
Certificamos que o (Protocolo CEEA 949/2012) "Estudo experimental da esclerose combinada subaguda de medula", a ser conduzido por Márcia Maria Ferreira Lima, orientada pelo Prof. Dr. Luiz Antônio de Lima Resende, com a colaboração de Lucilene Silva Ruiz e Resende, Luiz Eduardo Naresse e Maria Aparecida Custódio Domingues, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.			
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 31/05/2012.			
 Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA		 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA	
			
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br			

ANEXO 2

Solicitação de Mudança de Orientador



Botucatu, 14 de maio de 2013

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Katashi Okoshi
Presidente do Comitê no uso de animais

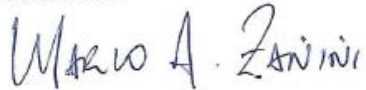
Prezado Sr:

Solicito a mudança de orientador no Projeto "Estudo experimental da esclerose combinada subaguda de medula", anteriormente orientada pelo Prof. Adjunto Luiz Antonio de Lima Resende e agora passará a ser pelo Prof. Dr. Marco Antonio Zanini.

Atenciosamente,


Profa. Marcia Maria Ferreira Lima
Depto. de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria

Ciente, de acordo:


Prof. Dr. Marco Antonio Zanini

ANEXO 3

Autorização para mudança de Orientador



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone: (14) 3880-1608/3880-1609

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 17 de maio de 2013.

Of. 14/13-CEUA

Ilustríssimo Senhor

Prof. Dr. Marco Antônio Zanini

Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria da

Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Prof. Marco,

Com referência ao Projeto (Protocolo CEUA 949/2012) "Estudo experimental da esclerose combinada subaguda de medula", conduzido por Márcia Maria Ferreira Lima, informo que houve alteração de orientação no mesmo, ficando na seguinte conformidade:

Anterior: Prof. Dr. Luiz Antônio de Lima Resende

Atual: Prof. Dr. Marco Antônio Zanini

Atenciosamente,

Prof. Dr. Katashi Okoshi
Presidente da CEUA

ANEXO 4

Protocolo de submissão do artigo para publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira

ScholarOne Manuscripts™

Marco Zanini ♥ Instructions & Forms Help

SciELO Acta Cirúrgica Brasileira

Main Menu / Author Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to	Acta Cirúrgica Brasileira
Manuscript ID	ACB-2015-0191
Title	Experimental model of the subacute combined sclerosis of the spinal cord.
Authors	Lima, Marcia Resende, Luiz Antonio Fernandes, Thlago Hamamoto Filho, Pedro Tadao Zanini, Marco
Date Submitted	20-Sep-2015

Author Dashboard