

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRAUMA RAQUIMEDULAR: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL NEUROREGENERADOR
E NEUROPROTETOR DA FRAÇÃO PROTEICA
EXTRAÍDA DO LÁTEX**

Nátalie Massaro Rosa-Ballaben

Médica Veterinária

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRAUMA RAQUIMEDULAR: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL NEUROREGENERADOR
E NEUROPROTETOR DA FRAÇÃO PROTEICA
EXTRAÍDA DO LÁTEX**

Nátalie Massaro Rosa-Ballaben

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientadora: Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das Exigências para a obtenção do título de Doutora em Cirurgia Veterinária

2018

R788t Rosa-Ballaben, Nátalie Massaro
Trauma raquimedular: avaliação do potencial neuroregenerador e neuroprotetor da fração proteica extraída do látex / Nátalie Massaro Rosa-Ballaben. – – Jaboticabal, 2018
xi, 64 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Paola Castro Moraes

Coorientadora: Luiza da Silva Lopes

Banca examinadora: Artur Gouveia Rocha, Annelise Carla Camplesi dos Santos, Gustavo Garkalns de Souza Oliveira, Andriago Barbosa de Nardi

Bibliografia

1. Neurologia. 2. Medula Espinhal. 3. Regeneração Tecidual. 4. Biomateriais. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-001:599.323



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TRAUMA RAQUIMEDULAR: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROREGENERADOR E NEUROPROTETOR DA FRAÇÃO PROTEICA EXTRAÍDA DO LÁTEX

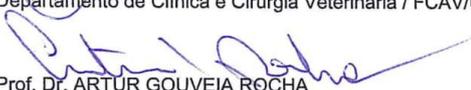
AUTORA: NÁTALIE MASSARO ROSA BALLABEN

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

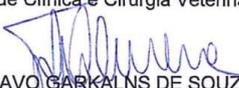
COORIENTADORA: LUIZA DA SILVA LOPES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ARTUR GOUVEIA ROCHA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNICEP - São Carlos - SP


Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. GUSTAVO GARKALNS DE SOUZA OLIVEIRA
Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de maio de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NÁTALIE MASSARO ROSA BALLABEN – Nasceu em 03 de setembro de 1985, na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Filha de Claudia Gomes Massaro Rosa e Antonio Carlos Aporta Rosa. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2010 pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Em 2010 ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional – PAP – em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Jaboticabal, tendo concluído o curso em 2012. Neste mesmo ano, ingressou no curso de mestrado do programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da mesma instituição de ensino sob orientação do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, tendo sido bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em 2015 ingressou no curso de doutorado do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na mesma instituição, tendo sido bolsista do programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico

Ao Rafael, meu marido pela compreensão nos momentos de ausência em prol do projeto, e pelo apoio e amor incondicional.

As minhas pequenas Manu e Duda que ainda na barriga ajudaram não me deixando passar mal e me incentivaram com chutes na barriga durante a execução da tese.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Claudia e à minha irmã Ana Carolina pela confiança, apoio, incentivo e carinho que me dedicaram a vida toda.

Agradecimento Especial

À professora Paola pela amizade, conselhos e inspiração na profissão.

À professora Luiza pela confiança, oportunidade e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar.

Aos animais utilizados nesse experimento.

À toda minha família pelo carinho e confiança.

À minha segunda família, meus sogros, em especial ao Tito pela amizade e ajuda sem poupar esforços.

Às minhas cachorras Hanna e Sofia pelas lambidas e companhia durante a execução da tese.

Aos técnicos de laboratório da USP, em especial Sandrinha, Daniel e Vera, sem eles nada disso seria possível.

Aos parceiros de laboratório Ivair, Tetê e Pâmela pelo auxílio em cada etapa sem pedir nada em troca.

Aos professores membros da banca, por sempre acrescentar com suas experiências

Aos meus amigos por fazer passar por essa etapa de maneira mais fácil e agradável.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida

À todos aquelas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Impacto Social da Lesão Medular	2
2.2 Anatomia	3
2.3 Lesão Medular	6
2.4 Regeneração Medular.....	8
2.5 Opções Terapêuticas na Lesão Medular	9
2.6 Fração Proteica Extraída do Látex Natural	11
2.7 Ácido Hialurônico como Meio de Transporte de Substâncias Terapêuticas	12
3 OBJETIVOS.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Aspectos Éticos.....	14
4.2 Animais e Grupos Experimentais	14
4.3 Critérios de Exclusão	15
4.4 Preparo do Hidrogel	15
4.5 Procedimento Cirúrgico.....	16
4.6 Avaliação Neuroclínica.....	20
4.7 Avaliação do Peso Corporal.....	21
4.8 Avaliação Funcional	21
4.9 Eutanásia e Preparo das Amostras para Análise Histológica	23
4.10 Histologia e Imunoistoquímica	24
4.11 Documentação Fotográfica	25
4.12 Análise Estatística.....	26
5 RESULTADOS	26
5.1 Taxa de Mortalidade	27
5.2 Avaliação Neuroclínica.....	28
5.2.1 Avaliação Clínica	29

5.2.2	Avaliação Neurológica	33
5.3	Avaliação Funcional	38
5.4	Avaliações Histológicas e por Imunoistoquímica	40
5.5	Limitações do Estudo	47
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	55
8	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO 1	64

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 150/2015, sobre o projeto intitulado “*Trauma raquimedular: teste de um novo composto com potencial neuroregenerador*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Luiza da Silva Lopes** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 14 de dezembro de 2015.

We certify that the protocol nº 150/2015, entitled “*Spinal cord injury: test a new compound with neuroregeneration potential*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 12/14/2015.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

TRAUMA RAQUIMEDULAR: TESTE DE UM NOVO COMPOSTO COM POTENCIAL NEURORREGENERADOR

RESUMO - A lesão medular não é um evento incomum na medicina humana e veterinária e resulta em disfunções neurológicas de graus variados. Apesar dos esforços no tratamento, lesões medulares frequentemente causam sequelas permanentes, desde déficit proprioceptivo isolado até paralisia completa de membros. A membrana confeccionada à base de látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* tem sido utilizada com sucesso para regeneração de tecidos, e seu potencial regenerador foi reconhecido como sendo de uma fração proteica conhecida como proteína P1. Este novo biomaterial foi eficaz em vários testes de regeneração em animais de experimentação e humanos, e, ainda que tenha mostrado potencial regenerador em teste de lesão de nervo periférico, a proteína ainda não foi testada em Sistema Nervoso Central. Objetivou-se avaliar o potencial regenerador da fração proteica extraída do látex natural (P1) na hemisseção da medula espinhal em ratos. Foram utilizados 18 ratos machos adultos submetidos à hemisseção medular no segmento medular T13 subdivididos em dois grupos: GHP (tratados com proteína P1 em gel de ácido hialurônico) e GHSP (tratado somente com ácido hialurônico). Foram realizadas análises neuroclínicas, bem como avaliação funcional da marcha em plataforma de acrílico. Após oito semanas os animais foram submetidos à eutanásia e os segmentos medulares envolvidos foram avaliados por histoquímica pela coloração Tricrômico de Masson e Luxol Fast Blue, além de avaliação da reação astrogliar por imunohistoquímica. Não houve diferença significativa entre os dois grupos para as avaliações neuroclínicas, não sendo observado melhora clínica satisfatória para as variáveis analisadas, porém, em relação à análise histológica foi notada diferença importante entre os grupos, evidenciando menor reação cicatricial e degeneração do tecido medular restante, além de presença de hiper celularidade organizada e menor reação astrogliar nos animais tratados com a fração proteica P1. Apesar da não evidência de melhora nos parâmetros neuroclínicos com o uso da proteína P1, houve alterações histológicas notórias e relevantes nos animais em que foi utilizada, além de ser benéfica como indutora de neuroproteção.

Palavras-Chaves: Neurologia, Medula Espinhal, Regeneração Tecidual, Biomateriais

SPINAL CORD INJURY: TEST A NEW COMPOUND WITH NEURO REGENERATION POTENTIAL

ABSTRACT - Spinal cord injury is not an uncommon event in human and veterinary medicine and results in neurological dysfunctions of varying degrees. Despite efforts in treatment, spinal cord injuries often cause permanent sequelae, ranging from isolated proprioceptive deficit to complete limb paralysis. The membrane made from natural latex extracted from the rubber tree *Hevea brasiliensis* has been successfully used for tissue regeneration and its regenerative potential has been recognized as being of a protein fraction known as P1 protein. This new biomaterial has been effective in several regeneration tests in experimental animals and humans, and although it has shown a potential regenerator in a peripheral nerve injury test, the protein has not yet been tested in the Central Nervous System. The objective of this study was to evaluate the regenerative potential of the protein fraction extracted from natural latex (P1) in the hemisection of the spinal cord in rats. Eighteen adult male rats submitted to medullary hemisection in the T13 medullary segment were subdivided into two groups: GHP (treated with protein P1 in hyaluronic acid gel) and GHSP (treated with hyaluronic acid only). Neuroclinical analyzes were performed as well as functional evaluation of gait on acrylic platform. After eight weeks the animals were submitted to euthanasia and the involved spinal segments were evaluated by histochemistry by Masson and Luxol Fast Blue Trichrome staining, as well as evaluation of the astroglial reaction by immunohistochemistry. There was no significant difference between the two groups for the neuroclinical evaluations, and no satisfactory clinical improvement was observed for the analyzed variables; however, in relation to the histological analysis, an important difference between the groups was observed, evidencing a smaller cicatricial reaction and degeneration of the remaining spinal cord tissue, besides the presence of organized hypercellularity and less astroglial reaction in the animals treated with the protein fraction P1. Although there was no evidence of improvement in the neuroclinical parameters with the use of the P1 protein, there were significant and relevant histological changes in the animals in which it was used, besides being beneficial as inducer of neuroprotection.

Keywords: Neurology, Spinal Cord, Tissue Regeneration, Biomaterials

LISTA DE ABREVIATURAS

BBB	Escala Basso, Beattie e Bresnahan
cm	Centímetros
FLEX	Reflexo Flexor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Proteína Glial Fibrilar Ácida)
GHP	Grupo Hemissecção Tratado com Fração Protéica P1 Extraída do Látex
GHSP	Grupo Hemissecção Tratado sem Fração Protéica P1 Extraída do Látex
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NOCI	Nocicepção
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
PH	Potencial Hidrogeniônico
PROP	Propriocepção
RU	Retenção Urinária
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TONO	Tono Muscular
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Imagens fotográficas da sequência do procedimento cirúrgico realizado em ratos para exposição da medula espinhal. A) posicionamento em decúbito esternal em prancha cirúrgica e tricotomia dorsal; B) incisão mediana longitudinal na pele do dorso; C) visualização da fascia muscular após afastamento e divulsão de pele e tecido subcutâneo; D) exposição da vértebra T13 após dissecação dos planos musculares; E) laminectomia da vértebra T13 com auxílio de pinça hemostática; F) exposição da medula espinhal ao nível da vértebra T13, ainda recoberta pela duramáter (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).
.....17
- Figura 2. Imagens fotográficas da sequência do procedimento cirúrgico de hemissecção medular realizado em ratos. A) hemissecção medular direita com auxílio de molde de corte confeccionado em alumínio (seta); B) utilização de cureta de microcirurgia (seta) para garantir que toda região medular internamente ao molde fosse seccionada; C) utilização de aspirador cirúrgico com ponteira adaptada para microcirurgia (seta) para remoção do fragmento medular seccionado; D) realização de ponto com fio de Nylon 3-0 preto na musculatura lateral ao local da hemissecção medular para futura localização do local da lesão; E) aplicação do hidrogel com auxílio de seringa e agulha de insulina; F) sutura da pele ao final do procedimento (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).
.....19
- Figura 3. Imagem fotográfica da plataforma de acrílico (1000 mm de comprimento, 50 mm de largura) utilizada para captura da marcha por método de filmagem (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).
.....22
- Figura 4. Fotomicrografias de secções transversais de medula espinhal de rato sem lesão coradas pela técnica A: tricrômico de Masson; B: luxol fast blue; C: imunomarcção para GFAP, em objetiva de 4x evidenciando o padrão medular normal (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).
.....41

Figura 5. Fotomicrografias das amostras de medula do lado contralateral à lesão medular de dois animais do GHSP (grupo hemissecção sem proteína) em objetiva de 4x. A e C: amostras coradas pela técnica luxol fast blue evidenciando intensa degeneração medular (seta preta) e presença de importante reação cicatricial (seta branca); B e D: amostras coradas pela técnica tricrômico de Masson demonstrando intensa degeneração medular (seta preta), grande quantidade de cistos de diferentes tamanhos (setas vermelhas) distribuídos no tecido medular além de importante reação cicatricial (seta branca) (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).
42

Figura 6. Fotomicrografias das amostras de medula do lado contralateral à lesão medular de dois animais do GHP (grupo hemissecção com proteína) em objetiva de 4 x. A e C: amostras coradas pela técnica luxol fast blue evidenciando degeneração medular leve (seta preta) e presença de discreta reação cicatricial (seta branca); B e D: amostras coradas pela técnica tricrômico de Masson demonstrando degeneração medular leve (seta preta), pequena quantidade de cistos (setas vermelhas) ao longo do tecido medular além de discreta reação cicatricial (seta branca) (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).
43

Figura 7. Fotomicrografias das amostras de medula de um animal do grupo GHP (A e B) e de um animal do grupo GHSP (C e D). A: amostra corada pela técnica luxol fast blue demonstrando formação tecidual ocupando parcialmente o lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de 40 x demonstrando grande quantidade de células com núcleos intensamente corados e organizadas em padrão enrodilhado (círculos) ; B: amostra corada pela técnica tricrômico de Masson demonstrando formação tecidual ocupando parcialmente o lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de 40 x demonstrando grande quantidade de células com núcleos intensamente corados e organizadas em padrão enrodilhado (círculos); C: amostra corada pela técnica luxol fast blue demonstrando formação tecidual ocupando pequena área do lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de 40 x demonstrando menor quantidade de células dispostas de maneira não organizada; D: amostra corada pela técnica tricrômico de Masson demonstrando formação tecidual ocupando pequena área do lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de

40 x demonstrando menor quantidade de células dispostas de maneira não organizada (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

.....44

Figura 8. Fotomicrografias das secções transversais de medula de dois animais do grupo GHP (grupo hemissecção com proteína) imunomarcadas para GFAP. A e C: medula com hemissecção vista em microscópio com objetiva de 4 x destacando formação tecidual ocupando parcialmente o lado operado (seta); B e D: formação tecidual evidenciada pela imagem anterior vista em objetiva de 40 x demonstrando imunomarcção de astrócitos (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

.....45

Figura 9. Fotomicrografias das amostras de medula de um rato do grupo GHSP (A, B e C) e de outro do grupo GHP (D, E e F) imunomarcadas para GFAP. A: Medula com hemissecção vista em microscópio com objetiva de 4 x; B: Substância cinzenta da hemimedula restante vista em microscópio com objetiva de 40 x com presença de intensa marcação de astrócitos (seta branca) e neurônios com graus avançados de degeneração (seta preta); C: Substância branca da hemimedula restante vista em microscópio com objetiva de 40 x com marcação intensa de astrócitos com despovoamento celular e intensa degeneração; D: Medula com hemissecção vista em microscópio com objetiva de 4 x; E: Substância cinzenta da hemimedula restante vista em microscópio com objetiva de 40 x com presença de marcação leve de astrócitos (seta branca) e neurônios com grau leve de degeneração; F: Substância branca da hemimedula restante vista em microscópio com objetiva de 40 x com marcação leve de astrócitos (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

.....46

Figura 10. Imagem fotográfica evidenciando resultado da automutilação em extremidade de membro pélvico esquerdo (seta) em rato submetido à hemissecção medular (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

.....47

Figura 11. Imagem fotográfica da caixa alojamento dos ratos submetidos à hemissecção medular demonstrando o melhoramento ambiental realizado composto pela colocação de tubos de pvc que serviriam como esconderijos (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de ratos que vieram a óbito durante o período experimental de hemissecção medular em ratos e suas causas- Ribeirão Preto-SP, 2018.	27
Tabela 2. Teste GLM para a avaliação neuroclínica dos ratos submetidos a hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) ao longo do tempo experimental – Ribeirão Preto-SP, 2018.	28
Tabela 3. Avaliação do peso corporal em gramas ao longo do tempo dos ratos submetidos a hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	30
Tabela 4. Avaliação do estado clínico geral ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) - Ribeirão Preto-SP, 2018.	31
Tabela 5. Avaliação do grau de hidratação ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) - Ribeirão Preto-SP, 2018.	32
Tabela 6. Avaliação da presença de retenção urinária ao longo do tempo dos ratos submetidos a hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) - Ribeirão Preto-SP, 2018.	33

Tabela 7. Avaliação da propriocepção consciente do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	35
Tabela 8. Avaliação da nocicepção do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	36
Tabela 9. Avaliação do reflexo flexor do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	37
Tabela 10. Avaliação do tono muscular do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	38
Tabela 11. Avaliação funcional baseada na escala proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (BBB) ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	39
Tabela 12. Avaliação funcional baseada na análise da marcha ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemissecção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	40
Tabela 13. Número de animais que apresentaram menor (escore 1) ou maior (escore 2) escore de reação astrocitária pelo estudo imunistoquímico (GFAP) para os ratos com hemissecção medular tratados com proteína P1 em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.	45

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular não é um evento incomum na medicina humana e veterinária e resulta em disfunções neurológicas de graus variados. Estão à disposição diversas opções de tratamento que visam à resolução dos problemas ocasionados pela lesão. Apesar do empenho no tratamento, lesões medulares frequentemente causam sequelas permanentes, com graus variados de déficit proprioceptivo até paralisia de membros.

Diversos esforços têm sido feitos na tentativa de obter tratamento mais efetivo para a lesão da medula espinhal, porém algumas lesões medulares ainda são consideradas intratáveis e incuráveis, e consideráveis avanços ainda são exigidos. Deste modo, a regeneração do tecido nervoso representa desenvolvimento crucial na área de neurologia para aquisição do restabelecimento funcional.

A membrana confeccionada a base de látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* tem sido utilizada com sucesso para regeneração de tecidos, e seu potencial regenerador foi reconhecido como sendo de uma fração proteica conhecida como proteína P1. Este novo biomaterial foi eficaz em vários estudos de regeneração clínicos e em animais, mas a proteína P1 não foi suficientemente testada em tecido nervoso.

Diante dos potenciais benefícios da utilização da proteína P1 extraída do látex na regeneração tecidual e a escassez de estudos relacionados ao seu emprego no tecido nervoso, propõe-se avaliar seu uso como indutora de regeneração após secção medular em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Impacto Social da Lesão Medular

A lesão medular foi definida pelo Banco de Dados Nacional de Lesão Medular em 2013, como toda injúria às estruturas contidas no canal medular, resultando em perda temporária ou permanente das funções motora, sensorial e/ou autonômicas (ARAÚJO, 2013). As consequências dessa lesão incluem redução ou perda total da capacidade motora e sensorial e perturbações do funcionamento intestinal, urinário e sexual, sendo uma das principais causas de incapacidade física em seres humanos (BRAGA-SILVA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014; RAMOS, ALEGRETE, 2015).

Estima-se que dois milhões e meio de pessoas convivam com lesão da medula espinhal e que mais de 130 mil novos casos ocorram por ano no mundo (SILVA, 2013). Mais de 400 mil pacientes com lesões espinhais estão presentes nos EUA, com quase 15 mil novos casos a cada ano (ZHENG et al., 2017) das quais 1.000 são em crianças (BRAGA-SILVA et al., 2007). No Brasil, o último censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), realizado em 2010, relatou cerca de 200.000 paraplégicos (RODRIGUES et al., 2012). Em medicina veterinária de pequenos animais, embora não se conheça a incidência exata dessa afecção, ela é frequentemente encontrada e muitas vezes determina a morte ou eutanásia desses pacientes (SILVA, 2013).

Estudos realizados em 2004 pelo Centro de Estatística Nacional de Lesão Medular Americano (*National Spinal Cord Injury Statistical Center*) mostraram altos gastos federais com esta incidência (CUNHA, 2008), sendo a lesão medular considerada um problema de saúde pública de profundo impacto socioeconômico (FORNER, 2015).

2.2 Anatomia

O sistema nervoso central (SNC) é constituído pela medula espinhal e pelo encéfalo, ambos revestidos pelas meninges. A medula espinhal é de extrema importância, uma vez que é o elo de comunicação entre o encéfalo e o sistema nervoso periférico (SNP), integrando a informação que recebe e produzindo respostas através de mecanismos reflexos (BORLIDO, 2014).

A medula espinhal é a parte mais caudal do SNC, caracterizada por ser uma massa alongada, cilíndrica, de tecido nervoso situada dentro do canal vertebral que se estende desde a medula oblonga do cérebro na base do crânio até a região lombar sem ocupá-la completamente. A medula não tem o mesmo tamanho em toda a extensão; na verdade existe diminuição progressiva do diâmetro na direção craniocaudal, havendo achatamento em sentido dorsoventral. Seu diâmetro diminui gradativamente no sentido caudal até formar o cone medular, terminando a medula espinhal aproximadamente ao nível da sexta vértebra lombar em cães, sétima vértebra lombar em gatos enquanto finaliza na primeira vértebra lombar em humanos. Raízes sensitivas e motoras (respectivamente dorsais e ventrais) unem-se a saída de cada forame intervertebral formando os nervos espinhais do SNP, os feixes dorsal e ventral dos nervos lombares e sacrais percorrem algumas distâncias antes de deixarem a coluna medular, denominando-se cauda equina (CUNHA, 2008; PENHA, 2014).

Em uma secção transversal a medula é visualizada como tendo duas metades simétricas em espelho, direita e esquerda. Em sua face ventral apresenta uma fissura longitudinal denominada mediana ventral e em sua face dorsal um sulco longitudinal dorsal (FERNÁNDEZ, BERNARDINI, 2010). A medula espinhal consiste de uma porção central em forma de borboleta chamada de “h” medular composta por substância cinzenta, e de uma porção periférica composta por substância branca (BORLIDO, 2014). Na região cinzenta da medula, encontram-se os corpos celulares dos neurônios que, de acordo com suas conexões, são classificados em interneurônios, neurônios aferentes e neurônios eferentes. Bilateralmente, a substância cinzenta é constituída pelas colunas dorsal e ventral, conectadas pela substância cinzenta

intermediária central. Cada segmento deste conjunto, em cortes transversais, é denominado de corno (PENHA, 2014). As áreas motoras, localizadas nos cornos ventrais direito e esquerdo da substância cinzenta, possuem neurônios motores, enquanto as áreas sensitivas, localizadas nos cornos dorsais direito e esquerdo, também na substância cinzenta, possuem neurônios sensitivos (CUNHA, 2008). A substância branca consiste de axônios, em sua maioria mielinizados, formando feixes nervosos, mas também possui células gliais, tais como oligodendrócitos, astrócitos e células da microglia (células do sistema imunológico) (BORLIDO, 2014).

Na superfície da medula, distingue-se um par de sulcos dorsolaterais, dos quais emergem fibras nervosas que se unem em grupos e constituem as raízes dorsais (sensitivas) dos nervos espinhais, enquanto que as raízes ventrais (motoras) emergem dos sulcos ventrolaterais. Por todo o comprimento da medula espinhal encontra-se um pequeno canal central, revestido por células ependimárias (FERNÁNDEZ, BERNARDINI, 2010).

Os impulsos entram e saem da medula espinhal através dos pares de nervos espinhais, os quais contêm fibras sensoriais e fibras motoras, envolvidas nas atividades reflexas, nas vias ascendentes e descendentes (que unem os centros espinhais com outras partes do SNC). Estas vias encontram-se na substância branca, sendo que as vias ascendentes transportam potenciais de ação relacionados com as sensações de dor, temperatura, tato, pressão e prurido (informação sensorial), e as vias descendentes transportam potenciais de ação relacionados principalmente com a função motora, influenciando, portanto, a atividade dos neurônios na substância cinzenta na medula espinhal sensibilidade tátil fina sendo responsável pela atividade dos neurônios na substância cinzenta da medula espinhal (BORLIDO, 2014; MARTIN, 2013).

O sistema nervoso (SN) é composto por dois tipos de células, os neurônios e outras células designadas coletivamente por neuróglias. O neurônio é a unidade celular funcional do sistema nervoso. Embora ocorram em formas e tamanhos diferentes, cada um possui quatro regiões especializadas morfologicamente com funções específicas: dendritos, corpo celular, axônio e terminações axônicas. Os dendritos recebem informações provenientes de outros neurônios. O corpo celular contém o núcleo e as organelas celulares

essenciais à sobrevivência e a função dos neurônios, além de também desempenhar funções integrativas importantes. O axônio conduz informações codificadas na forma de potenciais de ação para a terminação axônica. As conexões entre dois neurônios em um circuito neural são estabelecidas pelas terminações axônicas de um e os dendritos e o corpo celular do outro na sinapse (MARTIN, 2013).

As células da neuroglia são mais abundantes que neurônios e, apesar de seu papel de suporte aos neurônios, não transmitem impulsos nervosos. Ao contrário dos neurônios, as células gliais têm também a capacidade para a divisão celular, participam na formação da barreira hemato-encefálica, fagocitam substâncias estranhas, produzem líquido cefalorraquidiano, e formam bainhas de mielina em torno dos axônios, sendo também essenciais no início do desenvolvimento do SNC, guiando os neurônios em desenvolvimento para as suas localizações corretas e, no adulto, são suporte estrutural para as células nervosas (CUNHA, 2008; CENTENARO et al., 2011; BORLIDO, 2014).

Os principais tipos de células gliais estão descritos abaixo:

- **Micróglia:** constituída por um número relativamente pequeno de células envolvidas na inflamação do SNC, sendo, portanto, consideradas como as células que conferem imunidade ao SNC. Proliferam e crescem em tamanho quando há degeneração neuronal, para fagocitar fragmentos celulares.

- **Astrócitos:** células mais abundantes da neuróglia têm funções metabólicas e estruturais importantes. Altamente ramificadas, em forma de estrela, suas terminações estendem-se e revestem a superfície de vasos sanguíneos, neurônios e da pia-máter, contribuindo para a barreira hemato-encefálica. No caso de lesão do SNC, os astrócitos começam a se proliferar e formam uma cicatriz chamada de cicatriz glial.

- **Oligodendrócitos:** células ramificadas que se enovelam em torno dos axônios formando a bainha mielínica dos neurônios do SNC.

- **Células de Schwann:** assim como oligodendrócitos, formam a bainha de mielina porém em torno dos axônios periféricos. Além disso, exercem funções importantes na organização da formação das bainhas de tecido conectivo que envolve os nervos periféricos durante o desenvolvimento e na regeneração do axônio após lesão na maturidade.

-Ependimócitos ou células ependimárias: revestem as cavidades cheias de líquido no SNC (ventrículos cerebrais e o canal medular central), exercem função importante na regulação do fluxo de substâncias químicas provenientes dessas cavidades no encéfalo (BORLIDO, 2014; MARTIN, 2013; FERNÁNDEZ, BERNARDINI, 2010;).

2.3 Lesão Medular

A lesão medular é definida como diminuição ou perda, total ou parcial, da função motora e/ou sensorial e/ou anatômica, devido ao trauma de qualquer dos elementos neuronais dentro do canal vertebral (PENHA, 2014).

Entre as causas de lesão medular encontram-se as de origem traumáticas e as não traumáticas. Diversas são as perturbações não traumáticas que podem lesionar a medula espinhal, entre elas as disfunções vasculares, infecções, neoplasmas espinhais, subluxações vertebrais secundárias à artrite reumatoide ou doença articular degenerativa, além da doença de degeneração do disco intervertebral a qual é a causa mais comum em medicina veterinária de pequenos animais. As causas traumáticas são as mais frequentes de lesão na população humana, e resultam dos danos causados por acidentes de veículos automotores, quedas, ferimentos abertos, como lesões por arma de fogo ou arma branca, e ferimentos fechados, como aqueles secundários à agressão intencional (PENHA et al., 2011; PENHA, 2014).

O comprometimento neurológico resultante da lesão medular pode ser reversível ou irreversível. Não ocorrerá recuperação neurológica se persistir o déficit completo após a fase de choque medular. Denomina-se choque medular a reação decorrente de trauma medular repentino, com a depressão, ou mesmo a interrupção, de praticamente todas as funções medulares, podendo os neurônios afetados gradativamente readquirir sua excitabilidade depois de algumas horas, dias ou semanas do evento inicial (CUNHA, 2008; RODRIGUES et al., 2010).

A patogênese das lesões da medula espinhal pode ser dividida em duas fases. A primeira fase consiste no mecanismo inicial da lesão que ocorre no

momento do trauma por meio de contusão, compressão, estiramento e laceração envolvendo a ruptura e o esmagamento de elementos neurais e vasculares imediatos, em um processo mecânico que independe do controle celular. A segunda surge como cascata de fenômenos, envolvendo vários processos, como inflamação, edema, isquemia, hemorragia, desequilíbrios eletrolíticos, apoptose e peroxidação lipídica induzida por radicais livres. Esses fenômenos levam à expansão da lesão primária e cavitação da medula espinhal, interferindo na regeneração celular e culminando na morte neuronal (CUNHA, 2008; ARAÚJO, 2013; RAMOS; ALEGRETE, 2015). Essa fase secundária da lesão pode persistir por anos, e os processos resultantes dificultam a sobrevivência neuronal, tornando o ambiente inóspito para a regeneração neural e recuperação funcional (MARTINI, 2015).

A lesão traumática da medula espinhal causa danos e degeneração não só de neurônios, mas também de oligodendrócitos, astrócitos e precursores celulares no local da lesão. Qualquer cavidade ou cisto resultante dessas mortes pode interromper os tratos axonais, o que leva a várias anormalidades neurológicas, como paresia e paralisia, muitas vezes com perda permanente da função abaixo do nível da lesão (SILVA, 2013; FÜHRMANN et al., 2015). Outra consequência da lesão medular é a hipertrofia de astrócitos acompanhada do aumento na produção de seus filamentos intermediários, como a proteína glial fibrilar ácida (glial fibrillary acidic protein - GFAP). Esse processo é chamado de astrocitose reativa ou astrogliose, que juntamente com o recrutamento de mais tipos celulares incluindo a microglia, macrófagos e células progenitoras, culminam na formação da cicatriz glial, a qual impede a regeneração do axônio por atuar como barreira física, além de acumular moléculas que inibem o crescimento axonal (ARAÚJO, 2013; MELO, 2014).

A fase intermediária da lesão medular inicia entre a segunda e terceira semanas após o evento traumático, e tem duração aproximada de seis meses em humanos. Durante esse momento, a reação de astrogliose continua até a cicatriz glial se formar por completo. A lesão medular é considerada crônica a partir do sexto mês do trauma inicial, e nesta fase a cicatriz glial e os cistos/cavidades na medula espinhal já estão desenvolvidos e estabelecidos. Os cistos são resultado da perda de tecido neural e representam barreira física que impede a regeneração axonal. Nesse momento a degeneração walleriana

(retração axonal) continua e pode levar anos até que os corpos celulares e os restos de axônios degenerados sejam totalmente removidos do sítio da lesão (FORNER, 2015).

2.4 Regeneração Medular

O SN é muito sensível a lesões e sua capacidade regenerativa é um processo complexo e limitado (BISCOLA, 2016). Por outro lado, o SNP e o SNC não apresentam a mesma capacidade de regeneração após lesão, sendo que os axônios do SNC não se regeneram sensivelmente no seu ambiente nativo, ao contrário do SNP, que contém axônios capazes de se regenerar por longas distâncias, durante o reparo de nervos lesionados (DALLO et al., 2007; BORLIDO, 2014). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o esforço de compreender a capacidade de regeneração do SN e as diferenças entre o SNP e o SNC. Essa diferença pode ser pelo fato dos requisitos para recuperação anatômica e funcional após lesão medular serem mais complexos do que outros danos neurológicos, que geralmente requerem apenas restauração dos níveis de neurotransmissores (BARROS FILHO et al., 2002).

Pensa-se que a limitada recuperação observada na lesão medular no adulto se deve sobretudo à limitação na regeneração do SNC, limitação esta não só intrínseca (do próprio SNC) mas também fortemente potenciada por um ambiente inibitório, perilesional (extrínseco), que se estabelece após a lesão e que inibe a regeneração e plasticidade axonal (LEITE, 2010). O microambiente da medula após uma lesão desfavorece a regeneração axonal por apresentar inúmeros obstáculos, como a secreção de moléculas inibitórias por astrócitos e oligodendrócitos, interrupção no fornecimento de fatores neurotróficos, além da proliferação de astrócitos, microglia e células endoteliais, ou mesmo de fibroblastos em torno da medula. A cicatriz neuroglial assim formada age como barreira físico-química responsável por produzir várias moléculas de matriz extracelular que inibem o brotamento axonal no SNC, podendo levar à morte neuronal (MELO, 2014; TAKEDA et al., 2015; BISCOLA, 2016).

O potencial regenerativo pode ser incrementado se um ambiente favorável ao crescimento axonal for disponibilizado. Esforços para prevenir

sequelas e permitir a regeneração neuronal resultaram no conceito de geração de ambiente adequado para o crescimento axonal no SNC, fornecendo aos neurônios lesionados as condições necessárias para sua sobrevivência e regeneração. Esses procedimentos terapêuticos incluem administração de fatores de crescimento, bloqueio de moléculas inibitórias ao crescimento axonal, inibidores da cicatriz glial, mediadores inflamatórios, além de transplantes celulares (NARAZAKI et al., 2006; CENTENARO, 2012).

2.5 Opções Terapêuticas na Lesão Medular

O tratamento das afecções da medula espinhal continua a ser um desafio e a lesão medular grave ainda é considerada condição irreversível. Apesar de recentes avanços no estudo da fisiopatologia do trauma medular, nenhum dos tratamentos disponíveis são considerados particularmente eficazes, pois ainda não foi estabelecida terapia efetiva que detenha a expansão da lesão secundária e diminua as sequelas permanentes (OLIVEIRA et al., 2014; FORNER, 2015; LETAIF et al., 2015). Vários ensaios clínicos têm fornecido informação acerca da regeneração de neurônios lesionados e proteção contra danos adicionais as células remanescentes (ARAÚJO, 2013).

Nas últimas duas décadas, várias pesquisas foram realizadas na tentativa de obter tratamento mais efetivo para a lesão da medula espinhal. Todas essas pesquisas envolvem basicamente quatro formas de abordagem do paciente com lesão medular: a cirúrgica, a farmacológica, a biológica e a por meios físicos (CRISTANTE, 2007). Paralelamente, muito se tem estudado a respeito de substâncias neurotróficas que estimulariam e orientariam o crescimento dos cotos axonais (HIRAKAWA et al., 2007).

O tratamento atual do lesado medular é baseado em dois mecanismos fisiopatológicos: prevenção da lesão progressiva após o trauma e restauração de neurônios danificados (CUNHA, 2008), sendo atraentes as estratégias terapêuticas que combinam a preservação do tecido nervoso no local da lesão e promovem regeneração do tecido lesionado (FÜHRMANN et al., 2015).

A intervenção clínico-cirúrgica usual se restringe à estabilização da coluna vertebral e restauração de seu alinhamento, descompressão da medula espinhal e uso de fármacos da classe dos glicocorticóides (FORNER, 2015).

As terapias farmacológicas para lesões medulares têm o objetivo de inibir a evolução da lesão secundária ou estimular a regeneração da medula espinhal. A metilprednisolona, frequentemente usada com objetivo de reduzir a resposta inflamatória desenvolvida nas primeiras horas após a lesão, mostrou evidências de benefícios em alguns estudos, porém os achados não foram reproduzidos em outros estudos, sendo o seu uso considerado cada vez mais controverso. Esforços para o desenvolvimento de novas substâncias que possam melhorar o funcionamento neurológico pós-lesões têm se intensificado (LEITE, 2010; RAMOS; ALEGRETE, 2015). Como exemplo podemos citar fármacos como o Tirilizade e o GM-1, ainda sob investigação clínica, mas que já apresentam promissores resultados preliminares (CRISTANTE et al., 2010), além do uso de antiinflamatórios não esteroidais e bloqueadores de canais de sódio e cálcio (OLIVEIRA et al., 2014).

Ao contrário do que se acreditava, está provado que neurônios fora do SNC, em locais específicos dentro do SNC, na medula espinhal imatura e em meios especiais de cultura, podem se regenerar (CRISTANTE, 2007). Várias estratégias experimentais buscam aumentar o crescimento de axônios centrais, tais com o uso de fatores de crescimento, de estimulação ao crescimento intrínseco neuronal, de neutralização de inibidores de crescimento do axônio no SNC lesado, e de matriz de suporte ao crescimento axonal (GAO et al., 2013). Nesse contexto os fatores tróficos tem se mostrado favoráveis no tratamento de várias condições do SNC, em sua maioria fatores neurotróficos derivados do cérebro (BONATTO, 2013).

As células-tronco surgem como possibilidade de terapia particularmente promissora, pois além de se diferenciarem em neurônios e componentes da glia, elas também atuam como ponte de apoio para a regeneração axonal. No entanto, as células-tronco transplantadas para a medula espinhal lesionada geralmente encontram ambiente desfavorável ao seu crescimento e diferenciação devido à existência da cicatriz glial agindo como barreira (SILVA, 2013).

Para esse problema multifatorial que constitui a lesão medular, estudos envolvendo a combinação de terapias parecem mais coerentes em conseguir abranger os diferentes aspectos patológicos e promover a completa reparação da medula lesionada (SILVA, 2013).

2.6 Fração Proteica Extraída do Látex Natural

Desde a antiguidade as plantas têm sido utilizadas nos tratamentos de diversas enfermidades, porém somente no início do século XIX é que os primeiros compostos foram isolados, sustentando o crescimento de uma nova ciência: a farmacognosia (MENDONÇA, 2008).

A seringueira *Hevea brasiliensis* é uma planta originária da região amazônica e caracterizada, principalmente, pela importância econômica dada ao seu produto principal, o látex utilizado na produção da borracha (MENDONÇA, 2008).

Em 1994, o Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo/Brasil desenvolveu um novo material biocompatível à base de látex natural extraído da seringueira (MRUÉ, 1996). A aplicação do látex natural, na forma de biomembrana, mostrou importantes propriedades biológicas, tais como intensa atividade angiogênica, promoção de adesão celular, indução da formação de matriz extracelular e de regeneração tecidual (MRUÉ, 1996; ARNEZ, 2008).

Muitas pesquisas que utilizaram este material como implante têm demonstrado resultados satisfatórios na promoção ou aceleração de regeneração de diferentes tecidos corpóreos, o que motiva a realização de novos trabalhos nesta área (ZIMMERMANN et al., 2007). Próteses de látex foram utilizadas com resultados positivos na indução da reparação de paredes esofágicas de cães (MRUÉ, 1996), na regeneração do endotélio da artéria femoral de cães (FREITAS, 2001; LACHAT et al., 2003), na cicatrização de úlceras dérmicas em orelhas de coelhos (MENDONÇA, 2008; MAURÍCIO, 2006), como substituto parcial de pericárdio em cães (SADER et al., 2000), em reparação de úlceras de córnea de coelho (PINHO et al., 2004) e em

queimaduras induzidas no dorso de porcos (ARMANI; COUTINHO-NETTO, 2001). A membrana derivada do látex foi ainda utilizada para a produção de um tubo que foi implantado entre os cotos de nervos isquiáticos seccionados de ratos. Este primeiro estudo desta membrana biocompatível na regeneração de SN caracterizou evidente aceleração de crescimento e da mielinização axonal (GANGA et al., 2012).

Os resultados de todos estes estudos revelaram que a membrana de látex possui características bioquímicas que a tornam capaz de interferir no processo de reparação tecidual, favorecendo a formação rápida e regular de novo tecido (ZIMMERMANN et al., 2007). Estudos preliminares demonstraram a presença de possíveis fatores de crescimento no látex, que atuavam nos tecidos humanos, permitindo melhor vascularização devido a sua capacidade angiogênica (FRADE et al., 2001). Com estes estudos, um novo campo de pesquisa de aplicações médico/farmacêuticas obtidas do látex natural da seringueira foi criado e despertou o interesse de empresas farmacêuticas como a Pele Nova Biotecnologia S/A, detentora da patente para produção e comercialização do Biocure® (biomembrana utilizada como curativo) (MENDONÇA, 2008).

O potencial regenerador da membrana do látex foi reconhecido como sendo de uma fração proteica extraída do látex, conhecida como proteína P1, a qual também tem sido largamente testada na regeneração de tecidos (DIAS et al., 2014). Em estudo feito com secção de nervo isquiático em ratos, demonstrou-se que tubos de colágeno embebidos com a proteína P1 promoveram melhor regeneração do nervo seccionado, com a presença de maior densidade de fibras nervosas mielinizadas (GANGA et al., 2013).

2.7 Ácido Hialurônico como Meio de Transporte de Substâncias Terapêuticas

Muitas opções terapêuticas envolvem uso de substâncias no local da lesão para promover regeneração medular, porém diversas destas moléculas

são incapazes de ultrapassar a barreira hemato-encefálica. Para isso, estratégias são utilizadas para que moléculas terapêuticas evitem alguns desses obstáculos localmente. Uma técnica utilizada tem sido a injeção local de hidrogel, no qual as moléculas bioativas estão nele dispersas (FÜHRMANN et al., 2015).

As características desejáveis para um hidrogel ser veículo útil para ser utilizado em lesão medular são: possibilidade de ser injetado por agulha fina para inserção minimamente invasiva quando necessário; ser degradável e reabsorvível; causar mínimo edema para evitar compressão medular; ser bioinerte, provocando nenhuma ou mínima resposta tóxica ou imune, além de ser estável o suficiente para garantir uma liberação gradual da substância ativa durante o período desejado (FÜHRMANN et al., 2015). Tem havido crescente interesse no ácido hialurônico como biomaterial e hidrogel devido à suas propriedades físicas e biológicas e à facilidade com a qual pode ser modificado e sintetizado (KHAING et al., 2011). Assim, o hidrogel já tem sido utilizado em muitas aplicações médicas e é frequentemente investigado como potencial biomaterial na engenharia de tecidos (KUSHCHAYEV et al., 2016).

O ácido hialurônico é um polissacarídeo de cadeia longa encontrado naturalmente em todos os tecidos, e age como componente estrutural da matriz extracelular e como mediador de várias funções celulares (FRASER et al., 1997; KHAING et al., 2011; KUSHCHAYEV et al., 2016). Um hidrogel composto principalmente de ácido hialurônico pode ser benéfico por si só para a regeneração tecidual e já foi demonstrado que é seguro e biocompatível em modelo animal experimental de lesão medular. No entanto, usado de forma isolada, não promoveu a alteração na ativação da micróglia após lesão medular, nem em recuperação motora dos animais (FÜHRMANN et al., 2015). Em contrapartida, estudos indicam que o gel de ácido hialurônico aplicado em hemisseção medular de ratos diminui o número de astrócitos reativos e de componentes da cicatriz glial, em um curto espaço de tempo (KUSHCHAYEV et al., 2016).

Como os hidrogéis de ácido hialurônico demonstraram potencial de regeneração e imunomodulação, eles podem ser úteis no tratamento de dano medular, podendo ser utilizados para preencher o espaço resultante da lesão e

como veículo carreador de outras substâncias ativas (KUSHCHAYEV et al., 2016).

3 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar o potencial regenerador e neuroprotetor da fração proteica extraída do látex natural (P1) veiculada em hidrogel de ácido hialurônico na hemisseção da medula espinhal induzida experimentalmente em ratos adultos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O experimento foi realizado em conformidade com as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP) sob número de protocolo 150/2015. Todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e a quantidade de animais usados nesta pesquisa.

4.2 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 44 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com peso aproximado de 295g (+/-40g), clinicamente sadios, sendo que 18

animais foram selecionados para formar os grupos experimentais. Durante os experimentos, os animais ficaram alojados no biotério da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em caixas de polipropileno com tampa gradeada de aço, em grupos de quatro animais por caixa.

O biotério foi mantido em ciclos de claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas das 7 às 19h e desligadas das 19 às 7h) e com controle da temperatura ambiente entre 22 e 25°C. Dieta padrão para roedores e água foram oferecidas à vontade. Antes do início dos experimentos, os animais eram mantidos no biotério por 48 horas para ambientação e adaptação.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. GHP (n=9): Grupo submetido à hemisseção medular ao nível da vértebra T13, tratados com 0,2 mL de gel de ácido hialurônico + 10µg de fração proteica P1 extraída do látex. Esse volume de hidrogel foi suficiente para preencher o espaço de cerca de 2 mm da área de ressecção da hemimedula.
2. GHSP (n=9): Grupo submetido à hemisseção medular ao nível da vértebra T13, tratados apenas com 0,2 mL do gel de ácido hialurônico.

4.3 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão adotados foram: inadaptação à plataforma de avaliação, estado clínico geral muito precário por mais de 48 horas do procedimento cirúrgico, ausência de déficits neurológicos após o procedimento cirúrgico e morte antes do término do período experimental.

4.4 Preparo do Hidrogel

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 0,2% de fração proteica extraída do látex (P1) dissolvida em NaCl a 1,8%. Esta solução foi, então misturada, em partes iguais, ao ácido hialurônico, formando um hidrogel de composição final: 0,9% de solução salina, 0,1% da fração protéica P1 e 1% de ácido hialurônico.

Para a síntese do hidrogel de ácido hialurônico sem proteína P1, foi realizado o mesmo protocolo descrito acima, porém sem o acréscimo da fração

protéica P1 extraída do látex (0,9% de solução salina e 1% de ácido hialurônico).

4.5 Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram desenvolvidos em sala com controle térmico, com temperatura ambiente mantida em 21°C.

A anestesia foi induzida por 5% de isoflurano¹, em caixa plástica; após a indução os animais foram intubados e mantidos em respirador para roedores, e manutenção da anestesia inalatória com isoflurano e auxílio de vaporizador. Antes do início do procedimento cirúrgico, cada animal recebeu uma dose de antimicrobiano cefalotina², por via subcutânea (25 mg/Kg) e, a seguir, foi posicionado em decúbito esternal em prancha cirúrgica; na região do dorso foi feita tricotomia e antissepsia com solução de clorexidina a 2%³. Uma incisão mediana foi feita na pele do dorso de cerca de 2 cm, seguida de dissecção dos planos musculares até a identificação dos processos espinhosos das vértebras T12 a L1. Com auxílio de pinça hemostática Hasteald curva foi realizada a laminectomia da vértebra T13 e remoção do processo articular cranial do lado direito da referida vértebra, dessa forma foi exposta a medula espinhal no nível T13 (Figura 1).

¹ Isoflurano – Instituto BioChimico Ind. Farm. LTDA – Itatiaia, RJ, Brasil.

² Cefalotina sódica – ABL Antibióticos do Brasil LTDA – Cosmópolis, SP, Brasil.

³ Clorexidine 2% - Rioquímica Indústria Farmacêutica- São José do Rio Preto, SP, Brasil.

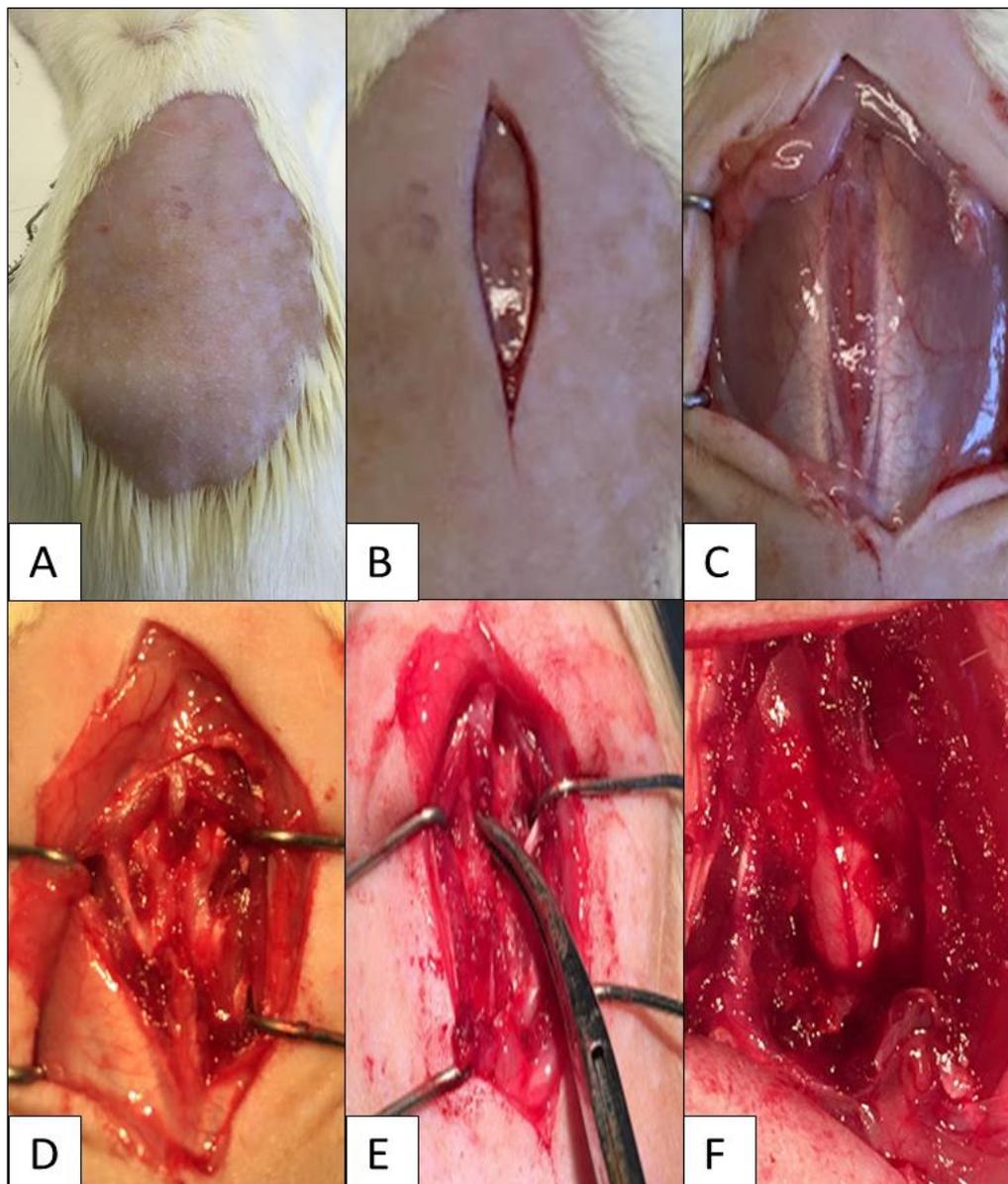


Figura 1. Imagens fotográficas da sequência do procedimento cirúrgico realizado em ratos para exposição da medula espinhal. A) posicionamento em decúbito esternal em prancha cirúrgica e tricotomia dorsal; B) incisão mediana longitudinal na pele do dorso; C) visualização da fascia muscular após afastamento e divulsão de pele e tecido subcutâneo; D) exposição da vértebra T13 após dissecção dos planos musculares; E) laminectomia da vértebra T13 com auxílio de pinça hemostática; F) exposição da medula espinhal ao nível da vértebra T13, ainda recoberta pela duramáter (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

A dura-máter foi aberta com cautela com auxílio de agulha hipodérmica 20 x 5,5 e, na sequência, foi realizada a hemissecção medular do lado direito, de cerca de 2,0 mm de comprimento no eixo longitudinal. O procedimento foi realizado com extremo cuidado para evitar danos aos principais vasos sanguíneos, utilizando-se material e técnica de microcirurgia, sob magnificação por microscópio cirúrgico DF Vasconcelos. Como forma de padronização da lesão, foi utilizado um molde de corte confeccionado em alumínio por integrante do próprio laboratório. Tal equipamento apresentava 3 bordas cortantes, com uma parte central de 2mm e duas extremidades dobradas em 90°, de 1 mm cada, formando um “retângulo aberto”. Este instrumento de corte foi posicionado na hemimedula direita, lateralmente à veia espinhal dorsal e pressionado até atingir o assoalho do canal vertebral de T13. Uma cureta de microcirurgia foi, então, utilizada para garantir que toda a região medular internamente ao molde fosse seccionada e, na sequência, um aspirador cirúrgico com a ponteira adaptada para microcirurgia foi utilizado para remover o fragmento seccionado (Figura 2).

No grupo GHP (proteína), o hidrogel de ácido hialurônico com a fração protéica P1 extraída do látex foi acrescentado com auxílio de seringa de 1 mL e agulha de insulina na área de hemimedula ressecada. Foi utilizado 0,2 mL da solução, o suficiente para preencher o espaço de cerca de 2 mm da área de ressecção da hemimedula. No grupo GHSP (ácido hialurônico) foi acrescentado, da mesma forma e mesmo volume descritos anteriormente, apenas o gel de ácido hialurônico. Foi colocado um ponto utilizando fio de Nylon 3-0⁴ preto na musculatura lateral ao local da hemissecção medular para futura localização do ponto central da lesão causada. Após o procedimento, foi realizada revisão hemostática, seguida do fechamento por planos anatômicos com Nylon 4-0⁴.

⁴ Nylpoint – Point Suture do Brasil Indústria de Fios Cirúrgicos LTDA – Fortaleza, CE, Brasil

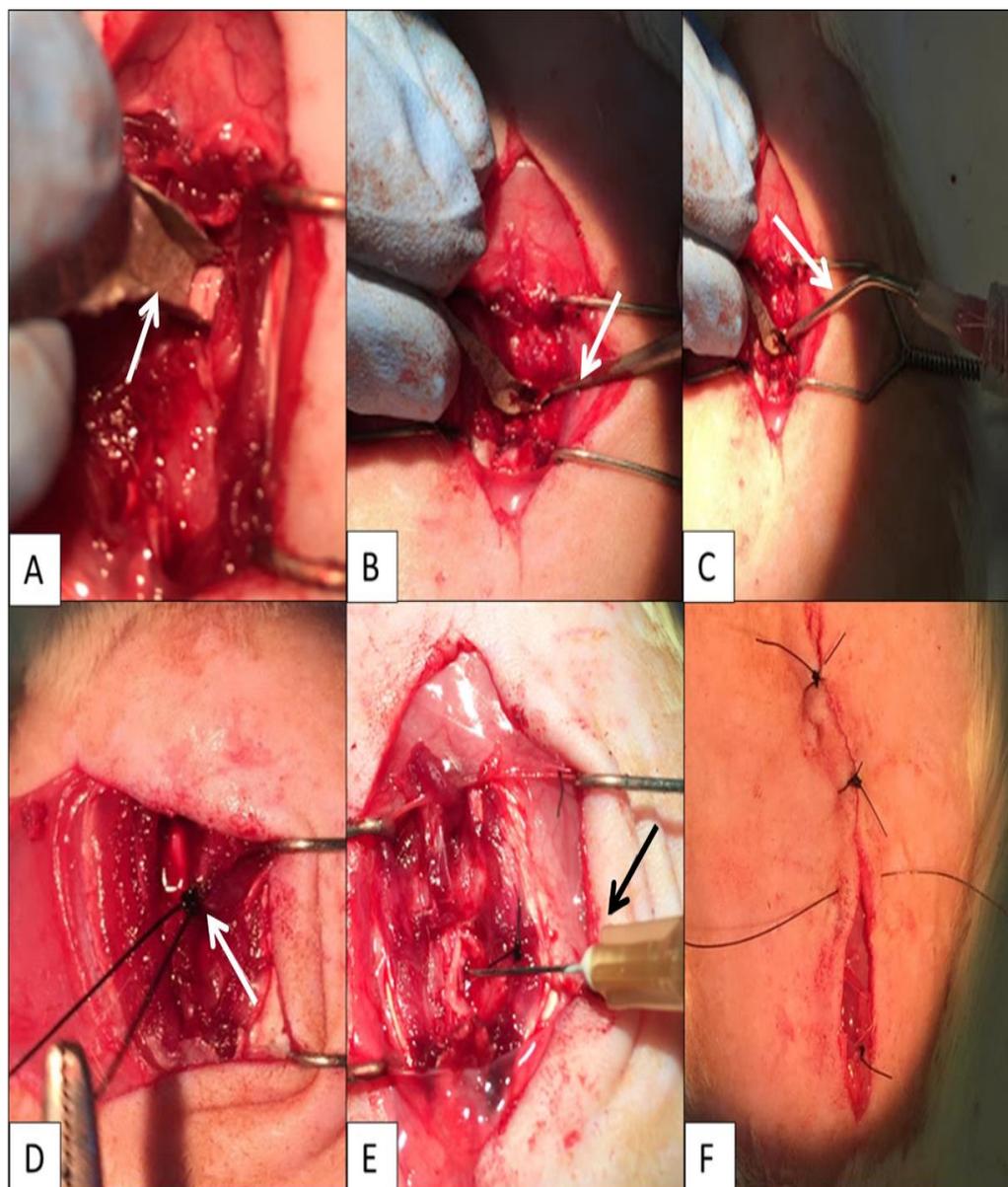


Figura 2. Imagens fotográficas da sequência do procedimento cirúrgico de hemisseção medular realizado em ratos. A) hemisseção medular direita com auxílio de molde de corte confeccionado em alumínio (seta); B) utilização de cureta de microcirurgia (seta) para garantir que toda região medular internamente ao molde fosse seccionada; C) utilização de aspirador cirúrgico com ponteira adaptada para microcirurgia (seta) para remoção do fragmento medular seccionado; D) realização de ponto com fio de Nylon 3-0 preto na musculatura lateral ao local da hemisseção medular para futura localização do local da lesão; E) aplicação do hidrogel com auxílio de seringa e agulha de insulina; F) sutura da pele ao final do procedimento (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

No final do procedimento foi administrado, pela via subcutânea, Cloridrato de Tramadol⁵ (5 mg/Kg) para analgesia e Meloxicam⁶ (1mg/kg) para efeito antiinflamatório. Cada animal foi ainda identificado com furos nas orelhas em um esquema pré-definido de marcação. A seguir, os animais foram mantidos em observação em ambiente aquecido até completa recuperação anestésica e, então, reencaminhados ao biotério da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. No biotério, os animais permaneceram em caixas próprias para roedores com disponibilidade de alimento e água a vontade. Na água de beber foi fornecido paracetamol⁷ (1 comprimido de 500 mg para cada 500 mL de água) nos primeiros 7 dias e, em acréscimo, foi realizada administração de cloridrato de tramadol (5 mg/kg) por via subcutânea, a cada 12 horas, durante 48 horas, para analgesia.

Todos os animais foram observados diariamente do ponto de vista clínico geral até a eutanásia e coleta de amostras, oito semanas após a cirurgia.

4.6 Avaliação Neuroclínica

Os animais foram submetidos à avaliação clínica geral e neurológica imediatamente antes do procedimento cirúrgico, diariamente durante os primeiros 7 dias, e nos dias 35 e 56 de pós-operatório.

Clinicamente os animais foram avaliados quanto ao estado clínico geral (prostração/1, normal/2, excitação/3), retenção urinária (sem retenção urinária/1, com retenção urinária/2), hidratação corpórea (hidratado/1, desidratado/2). Sendo que foram considerados desidratados aqueles com perda maior que 20% do peso corpóreo inicial.

O exame neurológico foi realizado no membro pélvico direito com base nos seguintes critérios:

- Propriocepção consciente: ausente (0), diminuído (1), normal (2)
- Tono muscular: ausente (0), diminuído (1), normal (2), aumentado (3)

⁵ Tramadol - Hipolabor Farm. Ltda – Sabará, MG, Brasil. Tramadol - Hipolabor Farm. Ltda – Sabará, MG, Brasil.

⁶ Maxicam 0,2% - Ouro Fino Saúde Animal LTDA – Cravinhos, SP, Brasil.

⁷ Tylenol - Prati, Donaduzzi & Cia Ltda – Toledo, PR, Brasil.

- Reflexo flexor: ausente (0), diminuído (1), normal (2), aumentado (3)
- Nocicepção: ausente (0), diminuído (1), normal (2), aumentado (3)

A nocicepção foi mensurada pela compressão das falanges com auxílio de uma pinça hemostática de Halsted, e foi considerada ausente quando os animais não reagiram ao estímulo doloroso com vocalização e/ou olhar para o membro, semelhante à avaliação realizada e descrita por Aiello et al. (2015).

4.7 Avaliação do Peso Corporal

Os animais foram pesados em balança de precisão nos mesmos dias em que foram realizadas as avaliações neuroclínicas, a fim de auxiliar a avaliação dos estados de desidratação, má alimentação, interferência do procedimento realizado, estresse sofrido, entre outros.

4.8 Avaliação Funcional

Os ratos foram treinados para caminhar sobre uma plataforma de acrílico (1000 mm de comprimento, 50 mm de largura) (Figura 3), com a presença de uma câmara fechada de 20 x 20 x 20 cm no final da plataforma, a qual servia como abrigo após a caminhada e estímulo atraente para os animais. Este treinamento foi realizado 48 horas antes do procedimento de hemissecção medular e possibilitou a aprendizagem da caminhada sem pausas exploratórias.

Depois da fase de aprendizagem, foi realizada gravação de vídeo da caminhada de cada animal para posterior avaliação. As filmagens foram realizadas antes do procedimento cirúrgico e nos dias 7, 35 e 56 de pós operatório.

A análise funcional da marcha foi efetuada por meio da obtenção das imagens de vídeo utilizando a plataforma, citada anteriormente. Para o registro da marcha foi utilizada uma filmadora Sony DCR-SR68 dotada de um cabo USB conectada diretamente a um computador portátil. Estas imagens foram analisadas por um avaliador sem conhecimento prévio do grupo ao qual cada

animal pertencia. O avaliador analisou a movimentação voluntária dos membros, classificando a deficiência dos animais em monoplegia, paraplegia, monoparesia ou paraparesia.



Figura 3. Imagem fotográfica da plataforma de acrílico (1000 mm de comprimento, 50 mm de largura) utilizada para captura da marcha por método de filmagem (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

Adicionalmente, os vídeos obtidos foram usados para classificação da locomoção de acordo com a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (BASSO et al., 1995). A escala BBB gradua os movimentos das articulações do quadril, joelho e tornozelo, posição do tronco, cauda e patas traseiras. A partir de observações da movimentação do animal, são atribuídos pontos de zero a vinte e um, sendo que o valor zero corresponde à ausência total de movimentos e vinte e um à presença de movimento normal (Anexo 1).

4.9 Eutanásia e Preparo das Amostras para Análise Histológica

Ao final do tempo experimental, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca sob anestesia profunda com injeção intramuscular de quetamina 10%⁸ e xilazina 10%⁹, em sobredose até depressão respiratória. Após posicionamento na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, foi realizada ampla incisão expondo as cavidades torácica e abdominal.

Uma agulha hipodérmica de calibre 25 x 0,8 conectada a uma seringa de 20 ml foi introduzida no ápice do ventrículo esquerdo e uma pequena incisão foi realizada na aurícula direita, sendo realizada perfusão transcardíaca com PBS tamponado e resfriado. A solução foi injetada até a observação do clareamento do líquido de saída e das vísceras, como pulmão e fígado, em volume aproximado de 1 ml/g de peso do animal. Ato contínuo, o local da cirurgia foi acessado e um bloco contendo a região da hemisseção medular, contendo medula espinhal, coluna vertebral e musculatura anexa, juntamente com 1 cm de margens cranial e caudal aos limites cirúrgicos, foi retirado e mergulhado em solução de paraformaldeído 3%, em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3-7,4), mantido nesta solução durante 24 horas à temperatura de 4°C. Após esse tempo, o bloco foi dissecado até restar apenas a medula espinhal e raízes nervosas anexas da região de interesse, a qual foi identificada pela visualização do ponto cirúrgico dado previamente na musculatura. A amostra de medula espinhal obtida foi mantida em solução de paraformaldeído fresca, permanecendo nesta por mais sete dias em geladeira.

Após este período de fixação em paraformaldeído, a extremidade cranial à lesão da medula foi identificada com dois pontos confeccionados com fio de nylon preto, enquanto que a extremidade caudal à lesão foi identificada com apenas um ponto com fio de nylon preto. Após identificação das porções cranial e caudal, a região central da área correspondente à hemisseção medular foi então seccionada com lâmina de bisturi, dividindo-se a medula em duas porções (cranial e caudal a lesão).

⁸ Dopalen - Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínea, SP, Brasil.

⁹ Anasedan - Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínea, SP, Brasil.

4.10 Histologia e Imunoistoquímica

As amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (70% a 100%), diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina. Foram, então, cortadas transversalmente com o auxílio de um micrótomo rotativo, em secções de 5µm de espessura em cortes seriados, estendidas, a seguir, em lâminas histológicas.

Para análise histológica, as lâminas foram mantidas em estufa (60° C) por uma hora para derretimento da parafina. A seguir, os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização com banhos sequenciais de xilol, seguidos de banhos de álcool em concentrações decrescentes e água; posteriormente, foram corados com tricômico de Masson e luxol fast blue. Na coloração feita pelo método tricrômico de Masson, por ser um tricrômico as estruturas são demonstradas em três cores: nucleos em roxo (hematoxilina), citoplasma e tecido nervoso em róseo-avermelhado (fucsina ácida) e fibras colágenas em azul (azul de anilina), sendo utilizada essa coloração para melhor visualização do tecido cicatricial (colágeno) formado. O luxol fast blue cora a mielina com fosfolipídeos em tons de azul a verde, enquanto que os neurônios são corados em tons de rosa a violeta. Essa coloração foi utilizada para identificação da mielina no tecido nervoso, sendo a avaliação realizada através de confronto visual na tonalidade da cor azul: regiões com maior densidade de mielina exibem tonalidade mais escura, enquanto regiões com menor densidade de mielina apresentam tonalidade mais clara. Além das estruturas destacadas pelas colorações específicas na histologia, também foram analisados a citoarquitetura geral, presença de degeneração (leve, moderada ou intensa), presença de vacuolização medular/cistos (leve, moderado ou intensa), além do grau da reação cicatricial (leve, moderada ou intensa).

Foram realizados estudos imunoistoquímicos para GFAP para avaliação da reação astrocitária, através da distribuição e do aspecto morfológico da astrógliia. Após o processo de desparafinização e reidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. Posteriormente, foi feito o bloqueio com soro adequado (de

cabra) a 10% em PBS, por 30 minutos em câmara úmida. Logo após os cortes foram incubados “overnight” à temperatura de 4° C com o anticorpo primário anti-GFAP (1,5:3000) (DAKO Z0334, Dinamarca). Lavado o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho - Santa Cruz Biotechnology SC) diluído 1:300 em BSA. Na sequência, os cortes foram incubados com o conjugado estreptavidina - HRP (BioLegend cat.405210) diluído 1:400 em PBS. A seguir, foram revelados com DAB (3,3'- diaminobenzidina - Sigma) e submetidos à contracoloração com hematoxilina. As lâminas histológicas foram, então, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcool e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com *Permount*®. Observação: para a imunistoquímica, os cortes são estendidos em lâminas histológicas silanizadas (Starfrost) para melhor fixação do tecido na lâmina.

As lâminas imunomarcadas foram analisadas sob microscopia de luz, sendo avaliados os astrócitos marcados com anticorpo anti-GFAP nas substâncias branca e cinzenta, observando-se a intensidade de marcação e a morfologia dos astrócitos por meio de um escore (0=sem marcação; 1=marcação discreta de astrócitos, com prolongamentos delicados; 2=marcação intensa de astrócitos, com prolongamentos grosseiros).

Com a finalidade de verificar a citoarquitetura normal da medula espinhal dos animais estudados e, dessa forma, facilitar a identificação das alterações induzidas pela lesão medular e as possíveis reações de cicatrização, dois animais saudáveis, chamados de animais controle, foram submetidos a sacrifício pelo mesmo método descrito anteriormente e suas medulas espinhais foram retiradas, processadas e preparadas de acordo com o protocolo usado para os grupos experimentais.

4.11 Documentação Fotográfica

Para documentação fotográfica das lâminas histológicas foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E 200 MV com sistema de captura digital de imagens (MOTICAN 10), com software dedicado MOTIC *images plus* 2.0 em

ambiente *Windows*. Foram utilizadas as objetivas de 4, 10 e 40 x para ampliação, avaliação e documentação das estruturas de interesse.

4.12 Análise Estatística

O delineamento estatístico empregado no presente experimento foi inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Foram classificados como efeitos fixos e testados estatisticamente o tratamento GHP e GHSP, as medidas no tempo (momentos 7, 35 e 56 dias de pós-operatório) e as interações entre os efeitos principais. Os dados foram testados quanto a normalidade (Shapiro-Wilk; $p < 5\%$).

As médias foram comparadas de forma paramétrica a partir do teste de Bonferrone ($p < 0,05$) e de forma não paramétrica pelos testes da mediana e de Wilcoxon (efeito do tratamento frente a mediana obtida dentro do tratamento). Todas as análises não paramétricas foram classificadas como significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O método cirúrgico de hemisseção medular empregado foi eficaz na produção de alterações clínico-neurológicas. No dia seguinte após o procedimento cirúrgico os animais já apresentavam os principais sinais clínicos associados: monoplegia, ausência de sensibilidade em membro pélvico afetado, hipotonia e ausência de propriocepção. Alguns animais apresentaram ainda retenção urinária e paraplegia.

Os animais que sobreviveram e chegaram até o final do experimento, não apresentaram complicações cirúrgicas locais tais como deiscência de

sutura, infecção, formação de coleções serosas ou hemorrágicas ou edema tecidual importante.

5.1 Taxa de Mortalidade

Ao todo, 44 animais foram operados para realização de hemissecção medular, porém, apenas 18 animais chegaram vivos ao final do tempo experimental. Os animais que vieram a óbito durante o protocolo experimental foram divididos de acordo com a causa de sua morte, sendo elas: automutilação (em um ou ambos membros pélvicos), retenção urinária (apresentando hematúria mesmo com protocolos de compressão vesical para auxílio no esvaziamento urinário), complicações durante a anestesia, sacrifício por ausência de déficits neurológicos nos primeiros sete dias de pós operatório, sacrifício por sofrimento (animais apresentando grave debilidade do estado clínico geral) ou morte sem causa identificada. A Tabela 1 mostra a quantidade de animais que vieram a óbito e suas causas.

Tabela 1. Quantidade de ratos que vieram a óbito durante o período experimental de hemissecção medular em ratos e suas causas- Ribeirão Preto-SP, 2018.

	Automutilação	Retenção Urinária	Complicação durante anestesia	Ausência de déficit neurológico	Sacrifício por sofrimento	Indefinido
Número de Animais	4	5	5	7	4	1

No total, 59,09% dos animais vieram a óbito durante o período experimental. Destes, 19,23% morreram por complicações durante o protocolo anestésico e 26,92% foram sacrificados por não apresentarem déficits neurológicos nos primeiros sete dias após lesão medular. Animais que vieram a óbito manifestando sinais clínicos de retenção urinária (hematúria e bexiga

urinária repleta) totalizaram 19,23% dos óbitos e ocorreram nos primeiros sete dias após lesão medular, assim como os animais que tiveram que ser descartados do estudo por apresentarem sinais clínicos de dor e sofrimento (letargia, baixo peso corporal, estado clínico geral debilitado) que totalizaram 15,38% também ocorreram nos primeiros sete dias após lesão medular. Automutilação foi a causa de óbito de 15,38% dos animais, ocorrendo o óbito em sua maioria nos primeiros sete dias após lesão causada, porém, é importante destacar que um animal pertencente ao grupo GHSP foi encontrado morto por automutilação após 21 dias da lesão medular.

5.2 Avaliação Neuroclínica

Foi realizado a análise estatística pelo teste semi-paramétrico proc GLM de Bonferrone para as variáveis peso, retenção urinária (RU), propriocepção (Prop), nocicepção (Noci), reflexo flexor (Flex), tono muscular (Tono) e escala de avaliação funcional BBB.

Com a realização do teste GLM foi verificado se houve diferença significativa a 5% de confiabilidade para as variáveis ao longo dos momentos, essas observações estão resumidas na Tabela 2

Tabela 2. Teste GLM para a avaliação neuroclínica dos ratos submetidos a hemiseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) ao longo do tempo experimental – Ribeirão Preto-SP, 2018.

Variável	GHSP			GHP			CV	P valor Bonferrone		
	M7	M35	M56	M7	M35	M56		Grupo	momento	interação
PESO	293.7 ^B	387.7 ^A	425.7 ^A	306.8 ^C	397.5 ^B	448.6 ^A	10.34	0.1567	<.0001	0.8718
RU	1.33 ^A	1.00 ^B	1.00 ^B	1.22 ^A	1.00 ^A	1.00 ^A	24.91	0.6194	0.0039	0.7798
PROP	-0.00 ^A	-0.00 ^A	0.11 ^A	0.00 ^A	0.00 ^A	-0.00 ^A	722.85	0.3425	0.4092	0.4092
NOCI	0.88 ^A	1.00 ^A	1.00 ^A	0.55 ^B	1.37 ^{AB}	1.62 ^A	79.91	0.3488	0.1034	0.2293
FLEX	1.00 ^A	1.77 ^A	1.66 ^A	0.55 ^B	1.75 ^A	1.75 ^A	52.27	0.5280	0.0002	0.5358
TONO	0.55 ^B	2.22 ^A	2.44 ^A	0.33 ^B	2.125 ^A	2.50 ^A	43.95	0.6688	<.0001	0.8561
BBB	0.88 ^A	1.11 ^A	1.11 ^A	0.33 ^A	0.55 ^A	0.55 ^A	194.90	0.1742	0.8738	1.0000

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas em cada grupo não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

RU: retenção urinária; PROP: propriocepção; NOCI: Nocicepção; FLEX: reflexo flexor; TONO: tono muscular; BBB: escala de avaliação funcional BBB

Outro teste não paramétrico aplicado foi o teste de Kruskal Wallis com resultados semelhantes. Os resultados de p das diferentes variáveis analisadas foram: peso ($p=0,70$), estado geral ($p=1,0$), retenção urinária ($p=0,88$), nocicepção ($p=0,27$), reflexo flexor ($p=0,50$), tônus muscular ($p=0,68$) e escala de locomoção BBB ($p=0,76$).

5.2.1 Avaliação Clínica

Todos os animais apresentaram bom estado geral e bom estado de hidratação ao longo de todo o período experimental independente do tratamento realizado.

Não foi observada diferença estatística no ganho de peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais. Por outro lado, os animais desses dois grupos apresentaram ganho de peso significativo ao longo do tempo ($p<0,05$). Da mesma forma, não houve diferença estatística para os dados referentes à retenção urinária entre os grupos GHP e GHSP. Quando considerado o controle urinário ao longo do tempo, os animais independente do grupo apresentaram retenção urinária inicial que desaparecia ao longo do período experimental.

As avaliações clínicas ao longo do período experimental (7, 35 e 56 dias de pós-operatório) estão apresentadas em tabelas, tendo sido avaliados peso (Tabela 3), estado clínico geral (Tabela 4), hidratação corpórea (Tabela 5) e retenção urinária (Tabela 6). Para facilitar a compreensão dos dados, nessas tabelas os animais não seguem a sequência numérica, mas o agrupamento em GHSP e GHP. Animais de um mesmo grupo não aparecem em sequência numérica porque eram nomeados por números e só então sorteados para tomar parte em um dos dois grupos experimentais.

Tabela 3. Avaliação do peso corporal em gramas ao longo do tempo dos ratos submetidos a hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	308	420	474
	NM13	298	398	408
	NM17	294	396	398
	NM29	290	338	392
	NM31	314	414	456
	NM37	286	434	472
	NM38	290	416	496
	NM39	260	380	414
	NM41	256	294	322
GHP	NM8	335	412	496
	NM10	322	392	476
	NM12	304	338	426
	NM14	294	408	396
	NM18	290	420	462
	NM20	298	424	430
	NM30	300	376	434
	NM32	330	450	526
	NM40	250	358	392

Tabela 4. Avaliação do estado clínico geral ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) - Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM 5	2	2	2
	NM 13	2	2	2
	NM 17	2	2	2
	NM 29	2	2	2
	NM 31	2	2	2
	NM 37	2	2	2
	NM 38	2	2	2
	NM 39	2	2	2
	NM 41	2	2	2
GHP	NM 8	2	2	2
	NM 10	2	2	2
	NM 12	2	2	2
	NM 14	2	2	2
	NM 18	2	2	2
	NM 20	2	2	2
	NM 30	2	2	2
	NM 32	2	2	2
	NM 40	2	2	2

1: prostração, 2: normal, 3: excitação

Tabela 5. Avaliação do grau de hidratação ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) - Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	1	1	1
	NM13	1	1	1
	NM17	1	1	1
	NM29	1	1	1
	NM31	1	1	1
	NM37	1	1	1
	NM38	1	1	1
	NM39	1	1	1
	NM41	1	1	1
	GHP	NM8	1	1
NM10		1	1	1
NM12		1	1	1
NM14		1	1	1
NM18		1	1	1
NM20		1	1	1
NM30		1	1	1
NM32		1	1	1
NM40		1	1	1

1: hidratado, 2: desidratado

Tabela 6. Avaliação da presença de retenção urinária ao longo do tempo dos ratos submetidos a hemiseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) - Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	1	1	1
	NM13	2	1	1
	NM17	1	1	1
	NM29	1	1	1
	NM31	2	1	1
	NM37	2	1	1
	NM38	1	1	1
	NM39	1	1	1
	NM41	2	1	1
GHP	NM8	1	1	1
	NM10	1	1	1
	NM12	1	1	1
	NM14	1	1	1
	NM18	1	1	1
	NM20	1	1	1
	NM30	1	1	1
	NM32	2	1	1
	NM40	2	1	1

1: sem retenção urinária, 2: com retenção urinária

5.2.2 Avaliação Neurológica

A variável propriocepção não apresentou diferença estatística para os diferentes tratamentos, com os animais de ambos os grupos experimentais apresentando ausência de propriocepção durante todo o período experimental. Animais de ambos os grupos experimentais apresentaram pequena melhora nos escores de nocicepção porém sem diferença estatística entre os grupos.

A avaliação do reflexo flexor do membro pélvico ipsilateral à lesão medular não foi diferente entre os grupos experimentais. Por outro lado, houve diferença quando considerada a avaliação desse reflexo ao longo do tempo. Animais de ambos os grupos apresentaram reflexo flexor diminuído ou ausente após a cirurgia, que evoluiu para a normalidade em diferentes momentos do experimento. O momento de recuperação do reflexo flexor independia do grupo experimental. O mesmo foi visto com relação ao tono muscular do membro pélvico ipsilateral ao lado operado. O tono muscular diminuiu logo após a cirurgia e era normalizado ou aumentava ao longo do tempo, inclusive com presença de contratura muscular em alguns casos, independente do grupo experimental considerado.

A avaliação neurológica ao longo do período experimental (7, 35 e 56 dias de pós-operatório) está apresentada em tabelas, tendo sido avaliados propriocepção consciente (Tabela 7), tono muscular (Tabela 8), reflexo flexor (Tabela 9) e nocicepção consciente (Tabela 10). Para facilitar a compreensão dos dados, nessas tabelas os animais não seguem a sequência numérica, mas o agrupamento em GHSP e GHP. Animais de um mesmo grupo não aparecem em sequência numérica porque eram nomeados por números e só então sorteados para tomar parte em um dos dois grupos experimentais.

Tabela 7. Avaliação da propriocepção consciente do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	0	0	0
	NM13	0	0	0
	NM17	0	0	0
	NM29	0	0	0
	NM31	0	0	0
	NM37	0	0	0
	NM38	0	0	0
	NM39	0	0	0
	NM41	0	0	0
	GHP	NM8	0	0
NM10		0	0	0
NM12		0	0	0
NM14		0	*	*
NM18		0	0	0
NM20		0	0	0
NM30		0	0	0
NM32		0	0	0
NM40		0	0	0

0: ausente, 1: diminuído, 2: normal, * ausência de dados

Tabela 8. Avaliação da nocicepção do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	0	0	0
	NM13	0	0	0
	NM17	0	2	2
	NM29	2	2	1
	NM31	0	0	0
	NM37	2	2	2
	NM38	2	2	2
	NM39	0	1	1
	NM41	0	0	1
	GHP	NM8	0	1
NM10		0	2	2
NM12		0	2	2
NM14		0	*	*
NM18		0	2	2
NM20		0	0	1
NM30		1	2	2
NM32		0	0	1
NM40		1	2	2

0: ausente, 1: diminuído, 2: normal, 3: aumentado, * ausência de dados

Tabela 9. Avaliação do reflexo flexor do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	0	1	2
	NM13	0	1	1
	NM17	0	2	2
	NM29	0	2	1
	NM31	0	1	0
	NM37	2	2	2
	NM38	3	2	2
	NM39	1	2	2
	NM41	2	3	3
	GHP	NM8	0	2
NM10		0	2	2
NM12		0	2	2
NM14		0	*	*
NM18		0	2	2
NM20		0	1	1
NM30		0	2	2
NM32		0	1	1
NM40		1	2	2

0: ausente, 1: diminuído, 2: normal, 3: aumentado, * ausência de dados

Tabela 10. Avaliação do tono muscular do membro ipsilateral à lesão ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	0	2	2
	NM13	0	1	2
	NM17	0	2	2
	NM29	0	3	3
	NM31	0	2	1
	NM37	0	3	3
	NM38	3	3	3
	NM39	2	3	3
	NM41	1	1	3
	GHP	NM8	0	3
NM10		0	2	3
NM12		0	2	3
NM14		0	1	2
NM18		0	3	3
NM20		0	1	1
NM30		0	2	3
NM32		0	1	1
NM40		1	3	3

0: ausente, 1: diminuição, 2: normal, 3: aumentado

5.3 Avaliação Funcional

O resultado obtido no teste de avaliação funcional com a utilização da escala BBB nos permite avaliar a evolução funcional de cada grupo com o passar dos dias, a partir de um escore, e esta apresentado na Tabela 11.

Foi observado que apenas quatro animais (22,22%) apresentaram aumento de suas notas na escala BBB e esse aumento foi apenas de 1 ponto

entre a primeira e segunda avaliação. Desses quatro animais, dois eram do grupo GHP e dois do grupo GHSP. A escala utilizada possui pontuações que variam de 0 a 21, no entanto, os animais desse estudo obtiveram 6 como pontuação máxima.

Apesar da locomoção pela escala BBB apresentar escores reduzidos não houve diferença entre os grupos experimentais, também não sendo observado melhora nesse quesito ao longo do período experimental.

Tabela 11. Avaliação funcional baseada na escala proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (BBB) ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	2	2	2
	NM13	1	2	2
	NM17	0	0	0
	NM29	0	0	0
	NM31	0	0	0
	NM37	0	0	0
	NM38	5	6	6
	NM39	0	0	0
	NM41	0	0	0
GHP	NM8	1	2	2
	NM10	0	0	0
	NM12	0	0	0
	NM14	2	2	2
	NM18	0	0	0
	NM20	0	1	1
	NM30	0	0	0
	NM32	0	0	0
	NM40	0	0	0

A avaliação funcional também envolveu a caracterização dos animais com relação ao déficit motor apresentado durante a avaliação da marcha após sete, 35 e 56 dias da lesão medular. Assim, os animais foram classificados como apresentando monoparesia/monoplegia (diminuição/ausência da função motora no membro pélvico ipsilateral à lesão) ou paraparesia/paraplegia

(diminuição/ausência da função motora em ambos os membros pélvicos), como mostrado na Tabela 12.

Foi observado que a maioria dos animais apresentou alteração apenas no membro ipsilateral à lesão, porém três animais (16,66%) apresentaram déficit em ambos os membros pélvicos. Adicionalmente, foi verificado que três animais (16,66%), pertencentes ao grupo GHP, apresentaram melhora na classificação da marcha, sendo que desses, dois evoluíram de paraplegia para monoplegia e um evoluiu de monoplegia para monoparesia. Os animais do grupo GHSP não apresentaram melhora na classificação da marcha.

Tabela 12. Avaliação funcional baseada na análise da marcha ao longo do tempo dos ratos submetidos à hemisseção medular tratados com a fração protéica P1 extraída do látex em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ANIMAL	M7	M35	M56
GHSP	NM5	monoparesia	monoparesia	monoparesia
	NM13	monoparesia	monoparesia	monoparesia
	NM17	paraplegia	paraplegia	paraplegia
	NM29	monoplegia	monoplegia	monoplegia
	NM31	monoplegia	monoplegia	monoplegia
	NM37	monoplegia	monoplegia	monoplegia
	NM38	monoparesia	monoparesia	monoparesia
	NM39	monoplegia	monoplegia	monoplegia
	NM41	monoplegia	monoplegia	monoplegia
GHP	NM8	monoparesia	monoparesia	monoparesia
	NM10	monoplegia	monoplegia	monoplegia
	NM12	paraplegia	monoplegia	monoplegia
	NM14	monoparesia	monoparesia	monoparesia
	NM18	paraplegia	monoplegia	monoplegia
	NM20	monoplegia	monoparesia	monoparesia
	NM30	monoplegia	monoplegia	monoplegia
	NM32	monoplegia	monoplegia	monoplegia
	NM40	monoplegia	monoplegia	monoplegia

5.4 Avaliações Histológicas e por Imunoistoquímica

A Figura 4 mostra a medula espinhal de animal controle, em corte transversal em região correspondente àquela dos animais submetidos ao

procedimento de hemisseção, nas diferentes colorações histológicas utilizadas no estudo. Nela pode ser vista a substância cinzenta que ocupa o centro da medula espinhal, com sua região central e seus cornos ventrais e dorsais. Na região central da substância cinzenta observa-se o canal central da medula espinhal e seu revestimento endimário. A substância branca, por sua vez, está distribuída ao redor da substância cinzenta nos chamados funículos medulares.

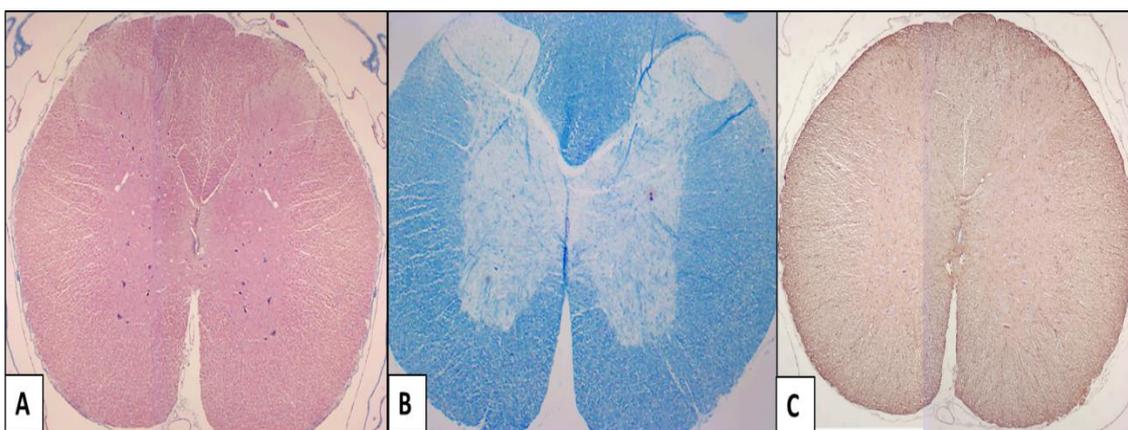


Figura 4. Fotomicrografias de secções transversais de medula espinhal de rato sem lesão coradas pela técnica A: Tricrômico de Masson; B: luxol fast blue; C: imunomarcação para GFAP, em objetiva de 4x evidenciando o padrão medular normal (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

A avaliação histológica pelas colorações por tricromio de Masson e luxol fast blue foi usada para identificar e caracterizar a presença de degeneração e vacuolização, além da reação cicatricial após a lesão medular (Figuras 5 e 6). A degeneração medular foi notória em ambos os grupos experimentais (GHP e GHSP), principalmente envolvendo a região do funículo dorsal contralateral à lesão. No entanto essa degeneração foi intensa em apenas 33% dos animais do grupo GHP contra 77% do grupo GHSP. A presença de vacúolos/cistos ao longo do tecido medular também esteve presente em ambos os grupos experimentais, porém de menor tamanho e intensidade discreta em 66% dos animais do grupo GHP enquanto apenas 22% dos animais do grupo GHSP apresentaram vacuolização discreta. A reação cicatricial nos cortes avaliados também foi observação importante, entretanto apresentaram reação cicatricial

intensa apenas 33% dos animais do grupo GHP, ao passo que 77% dos animais do grupo GHSP apresentaram reação cicatricial intensa.

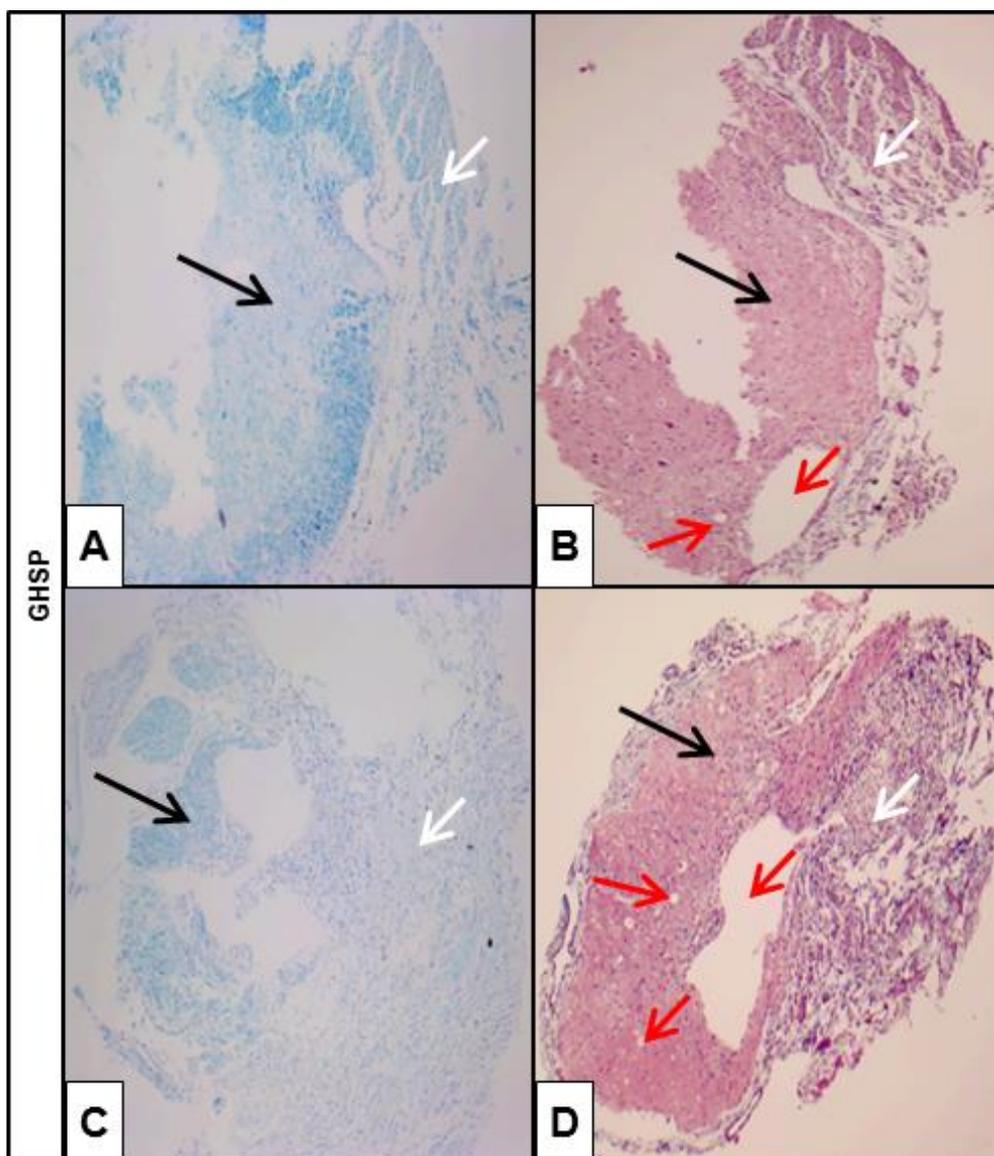


Figura 5. Fotomicrografias das amostras de medula do lado contralateral à lesão medular de dois animais do GHSP (grupo hemisseção sem proteína) em objetiva de 4x. A e C: amostras coradas pela técnica luxol fast blue evidenciando intensa degeneração medular (seta preta) e presença de importante reação cicatricial (seta branca); B e D: amostras coradas pela técnica tricrômico de Masson demonstrando intensa degeneração medular (seta preta), grande quantidade de cistos de diferentes tamanhos (setas vermelhas) distribuídos no tecido medular além de importante reação cicatricial (seta branca) (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

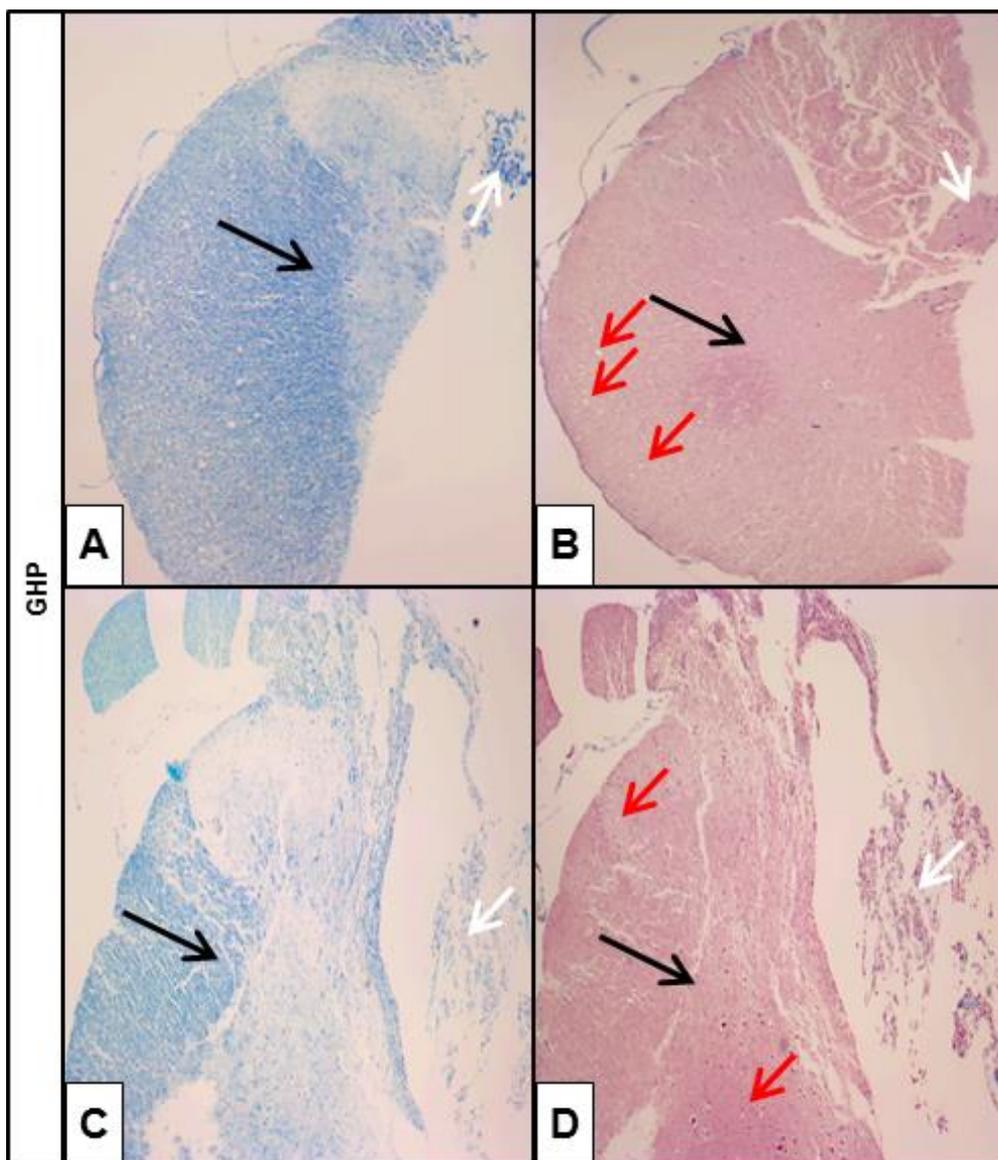


Figura 6. Fotomicrografias das amostras de medula do lado contralateral à lesão medular de dois animais do GHP (grupo hemisseção com proteína) em objetiva de 4 x. A e C: amostras coradas pela técnica luxol fast blue evidenciando degeneração medular leve (seta preta) e presença de discreta reação cicatricial (seta branca); B e D: amostras coradas pela técnica tricrômico de Masson demonstrando degeneração medular leve (seta preta), pequena quantidade de cistos (setas vermelhas) ao longo do tecido medular além de discreta reação cicatricial (seta branca) (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

Observação importante nos animais do grupo GHP pelas colorações luxol fast blue e tricrômico de Masson foi a presença de formação tecidual ocupando parcialmente o lado operado, com grande quantidade de células com núcleo intensamente corados e organizadas em padrão enrodilhado (Figura 7). Esse achado esteve presente em seis animais do grupo GHP contra um animal

do grupo GHSP. Além disso, foi observado nesses seis animais a imunomarcção para GFAP na formação tecidual (Figura 8), esse fato foi observado em um animal do grupo GHSP.

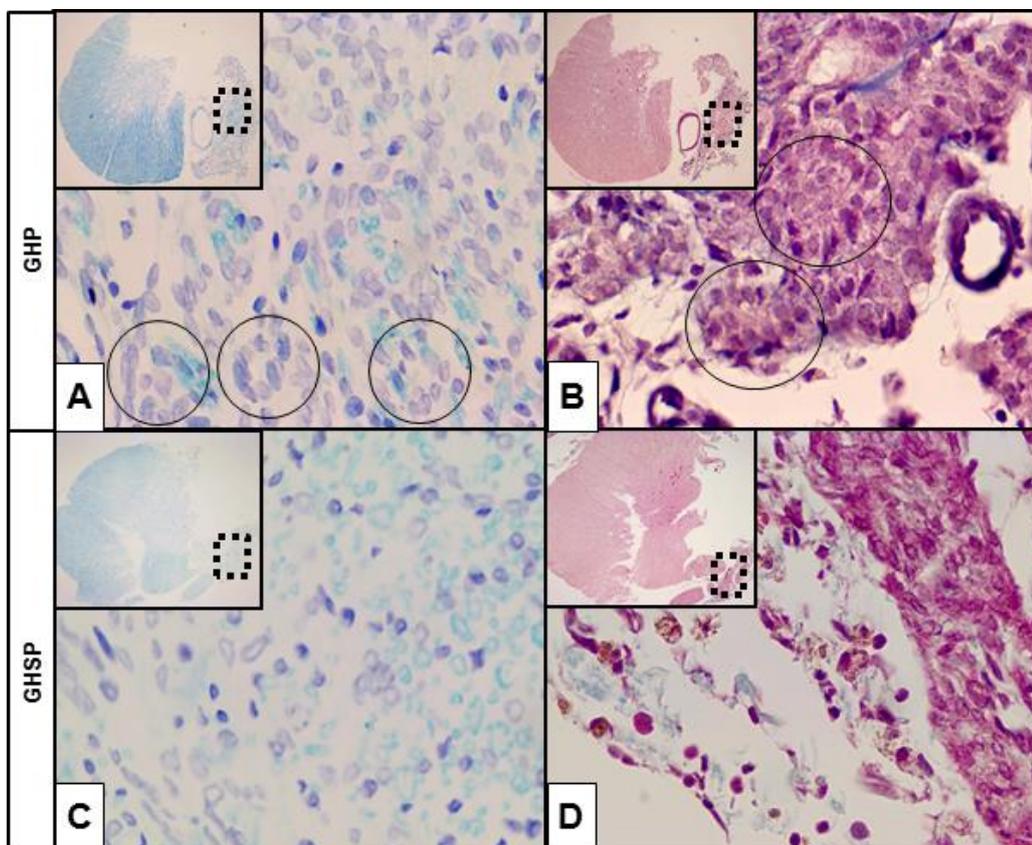


Figura 7. Fotomicrografias das amostras de medula de um animal do grupo GHP (A e B) e de um animal do grupo GHSP (C e D). A: amostra corada pela técnica luxol fast blue demonstrando formação tecidual ocupando parcialmente o lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de 40 x demonstrando grande quantidade de células com núcleos intensamente corados e organizadas em padrão enrodilhado (círculos) ; B: amostra corada pela técnica tricrômico de Masson demonstrando formação tecidual ocupando parcialmente o lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de 40 x demonstrando grande quantidade de células com núcleos intensamente corados e organizadas em padrão enrodilhado (círculos); C: amostra corada pela técnica luxol fast blue demonstrando formação tecidual ocupando pequena área do lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de 40 x demonstrando menor quantidade de células dispostas de maneira não organizada; D: amostra corada pela técnica tricrômico de Masson demonstrando formação tecidual ocupando pequena área do lado operado (quadrado pontilhado) em objetiva de 4 x e ampliação em objetiva de 40 x demonstrando menor quantidade de células dispostas de maneira não organizada (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

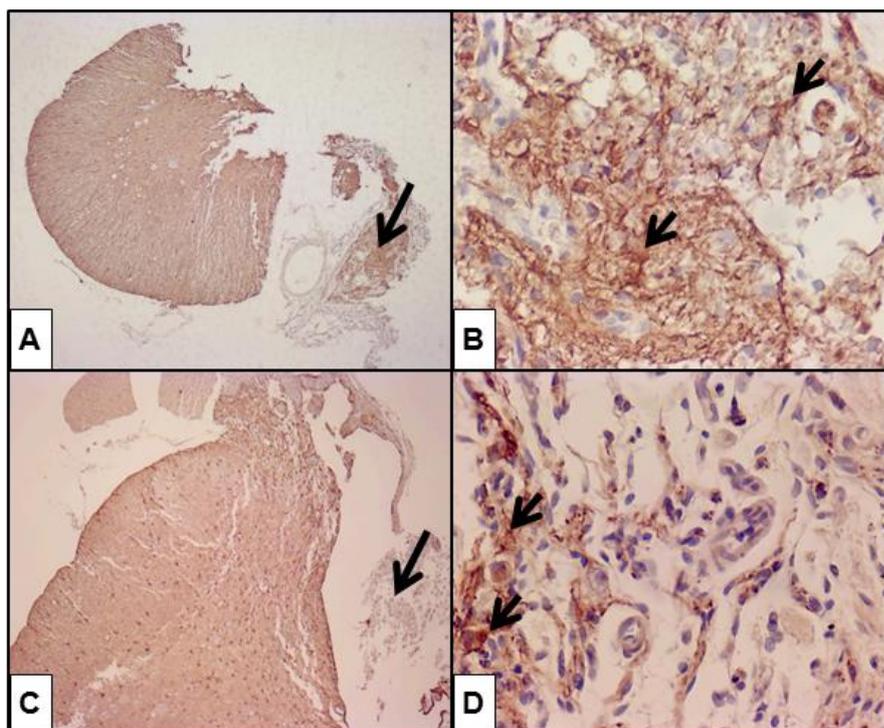


Figura 8. Fotomicrografias das amostras de medula de dois animais do grupo GHP (grupo hemisseção com proteína) imunomarcadas para GFAP. A e C: medula com hemisseção vista em microscópio com objetiva de 4 x destacando formação tecidual ocupando parcialmente o lado operado (seta); B e D: formação tecidual evidenciada pela imagem anterior vista em objetiva de 40 x demonstrando imunomarcagem de astrócitos (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

Foi observado que os animais do grupo GHP apresentaram menor reação astrocitária pelo estudo imunoistoquímico para GFAP, contabilizando um percentual de 66,66% dos animais desse grupo apresentando escore 1 de reação GFAP contra 0% dos animais do grupo GHSP com escore 1 de GFAP (100% dos animais do grupo GHSP apresentaram escore 2 de marcação), como demonstra a Tabela 13. A Figura 9 mostra os achados encontrados no estudo imunoistoquímico para GFAP dos dois grupos experimentais.

Tabela 13. Número de animais que apresentaram menor (escore 1) ou maior (escore 2) escore de reação astrocitária pelo estudo imunoistoquímico (GFAP) para os animais com hemisseção medular tratados com proteína P1 em gel de ácido hialurônico (GHP) e com gel de ácido hialurônico (GHSP) – Ribeirão Preto-SP, 2018.

GRUPO	ESCORE GFAP	
	1	2
GHSP	0	9
GHP	6	3

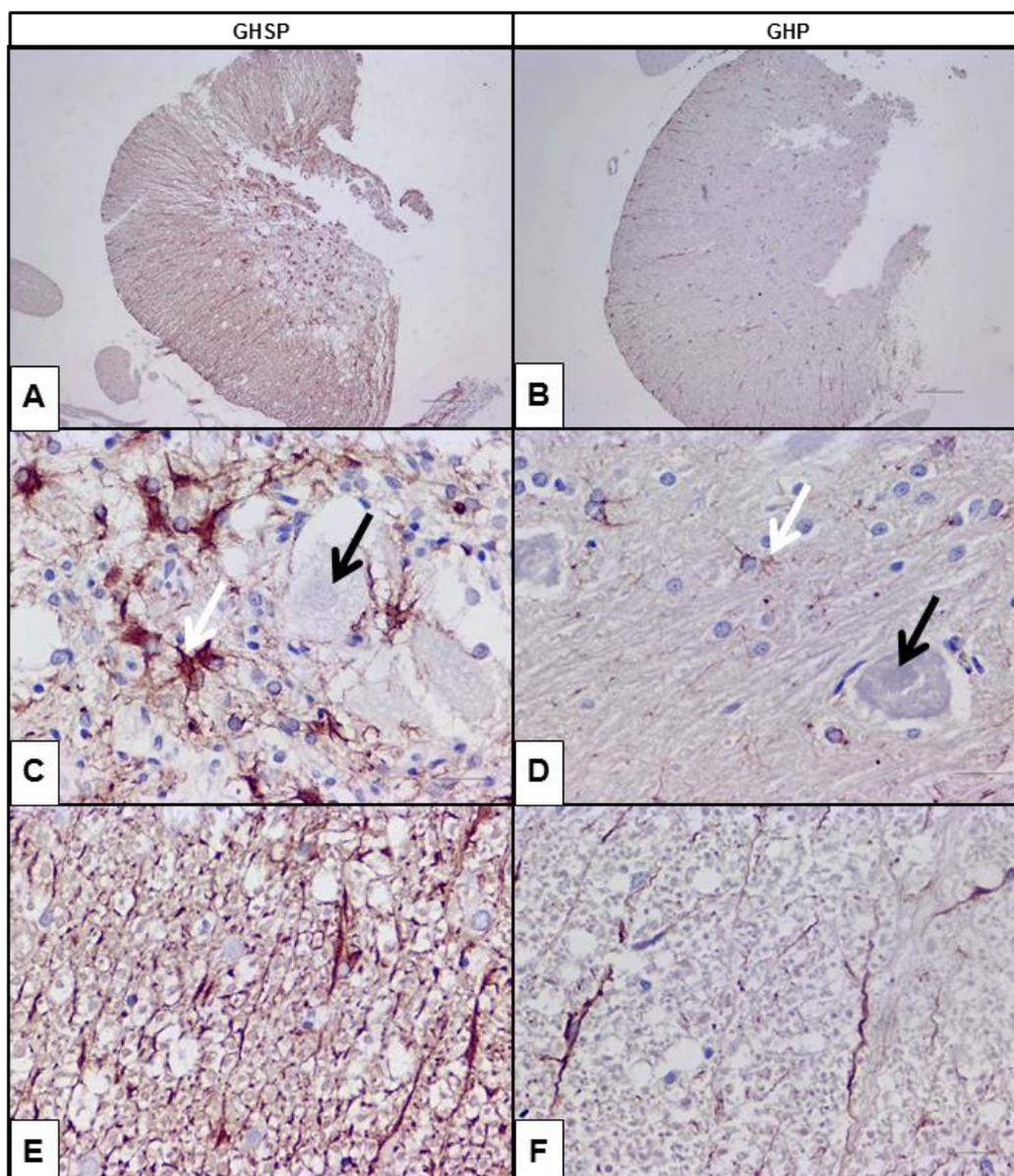


Figura 9. Fotomicrografias das amostras de medula de um rato do grupo GHSP (A, B e C) e de outro do grupo GHP (D, E e F) imunomarcadas para GFAP. A: Medula com hemisseção vista em microscópio com objetiva de 4 x; B: Substância cinzenta da hemimedula restante vista em microscópio com objetiva de 40 x com presença de intensa marcação de astrócitos (seta branca) e neurônios com graus avançados de degeneração (seta preta); C: Substância branca da hemimedula restante vista em microscópio com objetiva de 40 x com marcação intensa de astrócitos com despovoamento celular e intensa degeneração; D: Medula com hemisseção vista em microscópio com objetiva de 4 x; E: Substância cinzenta da hemimedula restante vista em microscópio com objetiva de 40 x com presença de marcação leve de astrócitos (seta branca) e neurônios com grau leve de degeneração; F: Substância branca da hemimedula restante vista em

microscópio com objetiva de 40 x com marcação leve de astrócitos (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

5.5 Limitações do Estudo

Inicialmente foi observado que os animais apresentavam grande tendência à automutilação (Figura 10), inclusive sendo encontrados 4 ratos mortos automutilados dentro da caixa. Após ocorrência de automutilação foi intensificado o protocolo analgésico, porém não houve redução no número de animais automutilados. Alternativamente enriquecimento ambiental foi realizado com inclusão, na caixa alojamento, de esconderijos de tubos de PVC (Figura 11).



Figura 10. Imagem fotográfica evidenciando resultado da automutilação em extremidade de membro pélvico esquerdo (seta) em rato submetido à hemisseccção medular (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).



Figura 11. Imagem fotográfica da caixa alojamento dos ratos submetidos à hemissecção medular demonstrando o melhoramento ambiental realizado composto pela colocação de tubos de pvc que serviriam como esconderijos (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância).

Outra complicação observada nos animais pertencentes a ambos os grupos experimentais foi a presença de hiperextensão das articulações do membro pélvico ipsilateral à lesão medular, associado à contratura muscular.

6 DISCUSSÃO

Foram utilizados ratos Wistar no protocolo experimental do presente estudo devido à facilidade em sua manutenção e manejo. O rato, de diferentes linhagens, é um animal comumente utilizado em estudos de avaliações de lesões do SNC devido a similaridade entre suas respostas histológicas frente às lesões do SNC (CENTENARO, 2012). Porém, é importante lembrar que, em muitos aspectos os animais diferem assim como são diferentes as lesões

ocorridas naturalmente daquelas provocadas experimentalmente (RODRIGUES et al., 2010).

Ainda não existe um modelo universalmente aceito de lesão experimental da medula espinhal, devido à grande diversidade de parâmetros que podem ser analisados e as técnicas terapêuticas testadas (CRISTANTE et al., 2010). O modelo que utiliza o impacto pela queda de um peso (impactor) como forma de produzir lesão medular é o mais utilizado pelos pesquisadores e o que mais se aproxima do que comumente ocorre com o ser humano na situação real durante o trauma (RODRIGUES et al., 2010). Sabe-se que os traumas fechados na medula espinhal são mais comuns do que traumas abertos com perda de substância. No entanto, o modelo com o uso de impactor não permite a comparação da resposta de regeneração de um trato em particular com o lado contralateral preservado, como é visto em modelos de hemissecção medular (MARTINI, 2015), além de não excluir a ocorrência de possível recuperação pela plasticidade de fibras intactas (CENTENARO, 2012), fato esse que justifica a escolha pela hemissecção medular como modelo de lesão utilizado nesse estudo.

As lesões experimentais na medula espinhal dos animais deste projeto foram realizadas no segmento medular T13 devido à facilidade de localização anatômica da vértebra torácica correspondente (T13) durante a cirurgia. A presença da insecção da última costela na referida vértebra facilitou a padronização, pois a ausência de localização precisa poderia levar a resultados incertos (Braga-Silva et al. (2007), além de ser um dos locais mais comuns de lesão medular na medicina veterinária (PENHA et al., 2011; ARAUJO et al., 2017).

Além da escolha do local de lesão medular como descrito anteriormente, a utilização de um molde para corte confeccionado em alumínio e o posicionamento desse molde sempre lateralmente à veia espinhal posterior, aliado à utilização de técnica e equipamentos de microcirurgia com auxílio de microscópio cirúrgico, permitiu a realização de lesões medulares padronizadas. Dessa forma, minimizamos as falhas de padronização da lesão o que evitou a ocorrência de erros encontrados por Cristante et al. (2010). Adicionalmente, após realizada hemissecção medular, foi realizada a sucção do tecido medular seccionado para removê-lo e, dessa forma, garantir a falha medular. Mesma

técnica citada por Centenaro (2012) o qual descreve que modelos de transecção envolvem a abertura da dura-máter e secção de parte ou de toda a extensão da medula espinhal, podendo ou não ser associados à sucção do tecido medular em casos onde porções da medula espinhal precisam ser removidas.

Como veículo para administração da fração protéica P1 foi utilizado o biogel de ácido hialurônico. Esse biogel já mostrou ser seguro e biocompatível através de teste *in vivo*, no qual a medula espinhal não lesada permaneceu inalterada após a aplicação do gel, não ocorrendo resposta axonal, imune ou glial na medula desses animais (FÜHRMANN et al., 2015).

A ocorrência de alteração comportamental nos animais pode ser evitada com o uso de analgesia preemptiva e pós-operatória, além de cuidados com assepsia que facilite a boa cicatrização da ferida cirúrgica como preconizado por Silva (2013). O protocolo analgésico escolhido inicialmente baseou-se no estudo de Falavigna et al. (2013), pelo qual os ratos receberam injeção subcutânea de tramadol a cada 12 horas nas primeiras 48 horas após a cirurgia. Após ocorrência de alguns casos de automutilação nos ratos do nosso experimento, suspeitamos da presença de dor e acrescentamos o paracetamol à água de beber na tentativa de potencializar o efeito analgésico. Como não houve melhora na casuística de automutilação a segunda suspeita foi que estivesse ocorrendo estresse pelo processo experimental. Foi então realizado melhoramento ambiental nas gaiolas de contenção, melhoramento esse composto por tubos de pvc que serviriam como esconderijos, o que minimizou o número de automutilados.

Apesar de ter sido realizada hemissecção medular, três animais (16,66%) apresentaram sinais de déficits neurológicos em ambos os membros pélvicos. Isso pode ter sido causado como consequência do choque medular, reação que ocorre na medula na fase aguda do trauma, e que resulta em depressão e até abolição de praticamente todas as funções medulares. Após alguns dias ou semanas do choque medular, os neurônios medulares podem gradativamente readquirir sua excitabilidade o que poderia justificar que esses animais após 35 dias apresentaram déficit neurológico apenas ipsilateral a lesão (CUNHA, 2008).

Os resultados foram analisados por parâmetros funcionais, que incluiu a avaliação neuroclínica e a escala de locomoção BBB, e parâmetros histológicos. Ambos são parâmetros de avaliação diretos da regeneração da medula espinhal (NARAZAKI et al., 2006). De acordo com a American Spinal Injury Association, a avaliação neurológica deve incluir escores motores e pontuações sensoriais (BONATTO, 2013), o que foi realizado no presente trabalho como método para avaliação neuroclínica. Porém, há autores que afirmam que métodos que utilizam escalas qualitativas ou semiquantitativas tem baixa reprodutibilidade e falta de precisão e sensibilidade, especialmente para pequenas respostas ou diferenças (BARROS FILHO; MOLINA, 2008; SILVA, 2013). Isso pode justificar o fato da não observação de diferenças significativas entre os dois grupos experimentais no que se refere a avaliação neuroclínica, pois essas diferenças podem ter sido apenas sutis e assim não detectadas pelos testes empregados.

Era esperado que a resposta à nocicepção no membro ipsilateral a lesão medular fosse prejudicada ou mesmo inexistente. Entretanto, observamos respostas bastante variáveis nesse quesito, nos animais dos dois grupos experimentais. Mesmo animais com extensas alterações medulares, observadas no exame histológico, e ausência de melhora motora, mantinham ou recuperavam a resposta à nocicepção. Isso pode ser explicado pelo fato de ainda estarem presentes diversos substratos anatômicos para a transmissão de informação nociceptiva gerada em áreas caudais ao sítio da lesão para centros supraespinhais. Além disso, há ainda vias proprioespinais curtas que transmitem a informação nociceptiva a partir de um lado ao outro da medula, bem como neurônios da lâmina I da medula que se projetam ipsi- e bilateralmente para regiões do tronco encefálico que controlam os estados comportamentais relacionados à dor (MARTINI, 2015).

Outra avaliação neuroclínica realizada a ser destacada é a escala BBB, o mais frequente método usado de avaliação funcional da capacidade locomotora em ratos, após lesão medular, devido à facilidade e praticidade na sua aplicação. Porém, essa escala apresenta reprodutibilidade reduzida na avaliação de ratos com lesões moderadamente graves pois apresentam resultados na função locomotora ocorrendo na faixa de pontuação mais baixa da escala (BARROS FILHO; MOLINA, 2008). Isso também foi observado em

nosso estudo, no qual foi realizada lesão medular moderadamente grave, sendo seis a máxima pontuação atingida pelos ratos em um total de 21 pontos possíveis na escala, o que pode justificar a não ocorrência de diferença estatística significativa entre os dois grupos experimentais.

Baseado nos resultados histológicos obtidos, esperávamos resultados melhores no desempenho locomotor e na evolução neuroclínica. Da mesma forma, Silva (2013) não encontrou resultados positivos na recuperação locomotora dos animais tratados com terapia celular em seu experimento e atribuiu essa ausência de resposta benéfica a um dos seguintes fatores: gravidade da lesão medular, método e período de avaliação, ou mesmo protocolo terapêutico não adequado para promover melhora na deambulação. O mesmo pode ter influenciado os nossos resultados, ou seja, nossa lesão foi bastante grave por retirar a metade completa de um hemi segmento da medula, nossos métodos empregados para avaliação podem não ter sido sensíveis o suficiente e o período de avaliação de 56 dias pode não ter sido suficiente para mostrar a recuperação. Além disso, a presença de espasticidade no membro, aliada à contratura muscular exacerbada pela ausência de protocolo de reabilitação, foi outro fator que pode ter prejudicado a recuperação da locomoção, visto que o membro rígido em hiperextensão impossibilita a movimentação necessária para deambulação. A espasticidade também é observada em 80% dos pacientes com lesões medulares e ocorre por um aumento do reflexo tônico de estiramento (tônus muscular), dependente da velocidade e exacerbção das respostas reflexas (CENTENARO, 2012).

No que se refere à avaliação histológica, foram realizados cortes seriados craniais e caudais à partir do local identificado como epicentro da lesão. A localização exata do epicentro da lesão foi facilitada pela aplicação de ponto feito com fio de nylon, na musculatura adjacente, imediatamente após a hemissecção medular. O uso de ponto cirúrgico para identificar a localização da lesão não foi encontrado em outros estudos, pelo contrario, o epicentro da lesão era identificado por meio do acompanhamento da progressão da gravidade das alterações histológicas (SILVA, 2013), o que torna o processo mais demorado. Observação frequente na análise histológica foi a visualização de cistos distribuídos ao longo do tecido medular remanescente, na hemimedula contralateral à lesão, sendo mais evidentes em tamanho e número

nos animais do grupo GHSP. Como os cistos são espaços vazios formados pela morte celular, particularmente de neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e precursores celulares que resultam em interrupção dos tratos axonais, levando a anormalidades neurológicas (SILVA, 2013; MELO, 2014), a presença de menor número de cistos e, quando presentes, de menor tamanho, nos animais do grupo GHP, sugerem menor morte celular nos animais pertencentes a esse grupo, o que indica que a fração protéica P1 pode ter auxiliado na proteção celular frente à lesão medular.

Foi realizado estudo imunoistoquímico para GFAP com a finalidade de avaliar morfológicamente os astrócitos, os quais podem adquirir características hipertróficas acompanhadas por aumento na produção de filamentos intermediários tais como a proteína GFAP, em um processo conhecido como astrocitose reativa ou astrogliose (FÜHRMANN et al., 2015), que culmina na formação da cicatriz glial a qual impede a regeneração do axônio por atuar como barreira física (ARAUJO, 2013). Assim, é possível inferir que a menor marcação para GFAP nos animais do grupo GHP indica menor formação da cicatriz glial que atrapalharia a regeneração axonal, visto que a natureza molecular da cicatriz glial, incluindo a produção de fatores inibitórios pelos astrócitos, é a principal causa de falha na regeneração axonal (MARTINI, 2015). Portanto, o uso da fração protéica P1 extraída do látex induziu a menor formação de cicatriz glial, fato esse que poderia favorecer a regeneração axonal.

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de terapias que forneçam aos neurônios lesionados as condições necessárias para sua sobrevivência e regeneração. Esses procedimentos terapêuticos incluem administração de fatores de crescimento, bloqueio de moléculas inibitórias ao crescimento axonal e inibidores da cicatriz glial (CENTENARO, 2012). Pensando dessa forma, Silva (2013) propôs que a redução ou supressão da cicatriz glial pode ser uma estratégia terapêutica capaz de promover regeneração axonal e, aliado a isso, pesquisadores tem se concentrado em inibir a síntese de GFAP com a intenção de atrasar a formação de cicatrizes resultantes de lesão no SNC (ENG et al., 2000). No presente estudo, o uso da proteína P1 induziu menor astrogliose observada pela menor marcação de

GFAP, culminando em menor formação de cicatriz glial, o que poderia fornecer as condições necessárias para regeneração medular.

O tecido cicatricial resultante da lesão traumática no sistema nervoso central é formado pela reação glial, como descrito anteriormente e por reação fibrosa perivascular e ao redor do tecido nervoso, a qual é formada por uma malha de colágeno e fibroblastos densos (TAKEDA et al., 2015). Com a coloração histológica feita pelo método tricrômico de Masson, as fibras colágenas são coradas em azul permitindo melhor visualização do tecido cicatricial fibroso formado e, com isso, observou-se que o grupo GHSP apresentou maior formação de tecido cicatricial fibroso. Sabe-se que a cicatriz é responsável por produzir várias moléculas de matriz extracelular que inibem o brotamento axonal no SNC (TAKEDA et al., 2015), e, portanto, é possível supor que os animais do grupo GHSP teriam maior dificuldade para regeneração axonal.

Foi evidente no grupo em que foi utilizada a fração protéica P1 a presença de formação tecidual do lado operado. Essa formação de tecido apresentava células organizadas em um padrão enrodilhado, visualmente semelhante ao canal endimário central, porém distribuídas ao longo de toda a neoformação tecidual. Esse achado foi observado em seis ratos desse grupo (GHP), e em um rato do grupo GHSP. É conhecido que as células endimogliais que proliferam do canal central após uma lesão medular migram para o local da lesão para construir o tecido cicatricial, e os processos dessas células formam uma ponte como matriz de suporte para regenerar axônios (TAKEDA et al., 2015). Isso nos leva a supor que a presença dessa celularidade encontrada principalmente nos animais tratados com proteína P1 favoreceria a regeneração axonal.

Apesar dos animais não terem apresentado recuperação motora suficiente para deambulação, observou-se que o uso da fração protéica P1 favoreceu a formação de menor reação glial notada pela imunomarcação para GFAP, e menor degeneração do tecido medular remanescente, além de favorecer a formação tecidual com células em padrão organizado. Aliado à informação de que a fase intermediária da lesão medular tem duração aproximada de seis meses (FORNER, 2015), esses achados nos sugerem que

um maior tempo experimental poderia trazer resultados mais efetivos quanto à locomoção.

Não foram realizados protocolos de reabilitação física nos animais do presente estudo, o que também poderia ser acrescentado futuramente em novos estudos envolvendo a proteína P1 na lesão medular. A melhora na capacidade locomotora tem se mostrado como um resultado do treinamento, não necessariamente através da melhora da atividade muscular voluntária, mas devido ao padrão de atividade gerada pela marcha em esteira, fornecendo o apropriado retorno proprioceptivo e um bom aporte aferente. A estimulação de aferências pode influenciar a ativação de circuitos neuronais localizados na medula espinhal e conseqüentemente influenciar sua função (VAN DE CROMMERT et al., 1998). Por outro lado, cuidados deverão ser tomados quanto à avaliação da locomoção e conclusões a respeito de regeneração após uso do treinamento em esteira, pois foi demonstrado, em estudo com roedores, que mesmo na ausência de regeneração axonal em toda a extensão da lesão o treino com esteira por si só melhorou a função coordenada em ratos com lesão medular completa (NICOLA, 2013).

Apesar da não evidência de melhora nos parâmetros neuroclínicos com o uso da proteína P1, houve alterações histológicas notórias e relevantes nos animais em que foi utilizada, sendo pertinente a realização de novos estudos utilizando a fração protéica P1 extraída do látex, porém com maior tempo experimental e adaptações no protocolo acrescentando-se fisioterapia e testes mais precisos para avaliação neuroclínica.

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, conclui-se que:

1. Os animais não apresentaram nenhuma complicação que pudesse ser atribuída à utilização da fração proteica P1.

2. A fração proteica P1 extraída do látex não foi suficiente para melhorar neurocl clinicamente os animais e regenerar o tecido medular, no entanto permitiu formação de menor reação glial, menor degeneração do tecido medular remanescente, além de favorecer a formação tecidual com células em padrão organizado.
3. A fração proteica extraída do látex melhorou o ambiente perilesional podendo ser considerada como apresentando atividade neuroprotetora.
4. Tempos de observação superiores a 56 dias são necessários para melhor avaliação do potencial regenerativo da proteína P1.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, L. M.; BATISTA, L. V.; PEREIRA, G. C. L.; FONSECA, L. A.; KERPPERS, I. I.; OLIVEIRA, C. S. Efeito do laser de baixa intensidade no trauma agudo medular – estudo piloto. **ConScientiae Saúde**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 11-16, 2011.

AIELLO, G.; MAZZANTI, A.; BECKMANN, D. V.; SANTOS, R. P.; ANDRADES, A. O.; PALMA, H. E.; ANDRADE, C. M.; SOARES, A. V. Prednisona e meloxicam no tratamento de ratos submetidos ao trauma agudo da medula espinhal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 1, p. 124-130, 2015.

ARAÚJO, M. R. **Avaliação Histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos Wistar tratados com células-tronco mesenquimais**. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

ARAÚJO, B. M.; FERNANDES, T. H. T.; BARAÚNA JUNIOR, D.; BONELLI, M. A.; AMORIM, M. M. A.; TUDURY, E. A. Estudo clínico e epidemiológico em cães com fraturas e luxações vertebrais toracolombares. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 8, p. 866-870, 2017.

ARIAS, M. V. B.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 115-134, 2007.

ARMANI, A.; COUTINHO-NETTO, J. Aceleração do reparo tissular em modelo experimental de úlcera dérmica induzida por biomembrana de látex natural

extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2001, Ribeirão Preto. **Anais...Ribeirão Preto**, 2001.

ARNEZ, M. F. M. **Osteointegração de implantes em defeitos circunferenciais utilizando proteínas angiogênicas purificadas do látex, osso autógeno e regeneração óssea guiada. Estudo comparativo em mandíbulas de cães.** 2008. 113. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BARROS FILHO, T. E. P.; OLIVEIRA, R. P.; TSANACLIS, A. M.; BARROS, E. M. K. P.; CRISTANTE, A. F.; PALMA, R. M.; SANTOS, C. V.; MARCON, R. M. An experimental model for the transplantation of fetal central nervous system cells to the injured spinal cord in rats. **Clinics**, São Paulo, v. 57, n. 6, p. 257-264, 2002.

BARROS FILHO, T. E. P.; MOLINA, A. E. I. S. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in wistar rats. **Clinics**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 103-108, 2008.

BASSO, D. M, BEATTIE, M. S, BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of Neurotrauma**, New Rochelle, v. 12, p. 1-21, 1995.

BISCOLA, N. P. **Efeitos neuroprotetor e regenerativo do selante de fibrina derivado da peçonha de serpente combinado com células tronco mononucleares após reparo do nervoisquiático de ratos neonatos.** 2016. 43 f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

BONATTO, F. A. **Múltipla aplicação de células mononucleares da medula óssea melhora a locomoção de ratos com lesão medular independente de expressão de citocinas inflamatórias.** 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em neurociências), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BORLIDO, Â. F. G. **Engenharia de Tecidos para regeneração do tecido nervoso: retrospectiva e perspectivas futuras.** 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.; ROMAN, J. A.; MACHADO, D. C.; COSTA, J. C.; FAÚNDEZ, M.; ORSI, V. V.; BRAGA, R. Modelo experimental de lesão raquimedular em ratos com dispositivo para acesso de agentes terapêuticos locais. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 155-157, 2007.

CENTENARO, L. A.; JAEGER, M. C.; ILHA, J.; SOUZA, M. A.; KALIL-GASPAR, P. I.; CUNHA, N. B.; MARCUZZO, S.; ACHOVAL, M. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats:

effects on functional recovery and axonal regeneration. **Brain Research**, San Diego, v. 1426, p. 54-72, 2011.

CENTENARO, L. A. **Transplante de lâmina própria olfatória e respiratória após lesão medular em ratos: implicações sobre a recuperação locomotora, hiperreflexia e regeneração axonal**. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CHAVES, R. O.; POLIDORO, D. N.; FERANTI, J. P. S.; FABRETTI, A. K.; COPAT, B.; GOMES, L. A.; MAZZANTI, A. Avaliação clínica de cães com doença do disco intervertebral (Hansen tipo I) submetidos à descompressão cirúrgica: 110 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 8, p. 835-839, 2017.

CRISTANTE, A. F. **Emprego das células progenitoras no tratamento de lesão medular crônica em humanos: análise do potencial evocado somato-sensitivo em 39 pacientes**. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CRISTANTE, A. F.; DAMASCENO, M. L.; MARCON, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; BARROS FILHO, T. E. P. Viability of fetal central Nervous System Cells in the treatment of spinal cord injury in rats. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 284-290, 2010.

CUNHA, R. C. **Efeitos funcionais da terapia autóloga de células-tronco derivadas da medula óssea (CD45 e CD34) no trauma raquimedular agudo nos murinos: sedentários e treinados físicos**. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Educação Física), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DALLO, J. G. M.; REICHERT, B. V.; VALLADÃO JÚNIOR, J. B. R.; SILVA, C.; LUCA, B. A.; LEVY, B. F. A.; CHADI, G. Differential astroglial responses in the spinal cord of rats submitted to a sciatic nerve double crush treated with local injection of cultured Schwann cell suspension or lesioned spinal cord extract. Implications on cell therapy for nerve repair. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 22, n. 6, p. 485-494, 2007.

DIAS, F. J.; ISSA, J. P. M.; COUTINHO-NETTO, J.; FAZAN, V. P. S.; SOUSA, L. G.; IYOMASA, M. M.; PAPA, P. C.; WATANABE, I. Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (*Hevea brasiliensis*) administration following. **Journal of the Neurological Sciences**, London, v. 349, p. 129-137, 2014.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acid protein: GFAP-Thirty-one years (1969-2000). **Neurochemical Research**, New York, v. 25, n. 9/10, p. 1439-1451, 2000.

ESCALHÃO, C. C. M. **Comparação das escalas de avaliação funcional de cães com lesões medulares compressivas provocadas por hérnias de**

disco. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Clínicas), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

FALAVIGNA, A.; CECHETTI, F.; FINGER, G.; RUSCHEL, L. G.; MARCON, G.; SILVA, P. G. Experimental model of spinal cord injury (SCI) in rats: management guidelines. **Coluna/Columna**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 70-72, 2013.

FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. Neuroanatomia. In: _____. Neurologia em cães e gatos. (Ed). **Neurologia em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2010. p. 1-31.

FORNER, S. Dor neuropática após lesão medular traumática: o papel dos receptores endotelinérgicos ETa e ETb. 2015. 127 f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

FRADE, M. A. C.; VALVERDE, R. V.; VIOLANTE, M. R.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. T. Chronic phlebopatic cutaneous skin ulcer: a therapeutic proposal. **Internacional Journal of Dermatology**, Rochester, v. 40, p. 238-240, 2001.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**, New Jersey, v. 242, p. 27-33, 1997.

FREITAS, M. **Uso de próteses do composto de látex natural em arterioplastias femorais. Estudo experimental em cães**. 2001. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

FÜHRMANN, T.; OBERMEYER, J.; TATOR, C. H.; SCHOICHET, M. S. Click-crosslinked injectable hyaluronic acid hydrogel is safe and biocompatible in the intrathecal space for ultimate use in regenerative strategies of the injured spinal cord. **Methods**, New York, v. 84, p. 60-69, 2015.

GANGA, M. V.; COUTINHO-NETTO, J.; COLLI, B. O.; MARQUES JUNIOR, W.; CATALÃO, C. H.; SANTANA, R. T. Sciatic nerve regeneration in rats by a nerve conduit engineering with a membrane derived from natural latex. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, p. 885-891, 2012.

GANGA, M. V.; FAZAN, V. P. S.; COUTINHO-NETTO, J.; CATALÃO, C. H. R.; BERNARDINO, C. A.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; LOPES, L.S. Employment of a collagen conduit soaked in an angiogenic fraction derived from natural latex in the regeneration of sciatic nerve of rats. **Procedia Engineering**, v. 59, p. 206-210, 2013.

GAO, M.; LU, P.; BEDNARK, B.; LYNAM, D.; CONNER, J. M.; SAKAMOTO, J.; TUSZYNSKI, M. H. Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection. **Biomaterials**, v. 34, p. 1529-1536, 2013.

GUZEN, F. P.; GUZEN, P. F. B.; LEMES, M. B.; LAURINDO, R. D. Tratamento farmacológico e regeneração do sistema nervoso central em situações traumáticas. **Revista Neurociências**, v. 17, n. 2, p. 128-132, 2009.

HARRIS, N. G.; VERLEY, D. R.; GUTMAN, B. A.; THOMPSON, P. M.; YEH, H. J.; BROWN, J. A. Disconnection and hyper-connectivity underlie reorganization after TBI: A rodent functional connectomic analysis. **Experimental Neurology**, v. 277, p. 124-138, 2016.

HIRAKAWA, C. K.; GRECCO, M. A. S.; SANTOS, J. B. G.; LEITE, V. M.; FALOPPA, F. Estudo comparativo da ação do fator de crescimento de fibroblastos e fragmentos de nervo na regeneração de nervo tibial em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 114-117, 2007.

HITA, R. M. **Análise funcional e histológica da ação da neurotropina-4 sobre a lesão medular em ratos**. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KHAING, Z. Z.; MILMAN, B. D.; VANSCOY, J. E.; SEIDLITS, S. K.; GRILL, R. J.; SCHMIDT, C. E. High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury. **Journal of Neural Engineering**, v. 8, n. 4, p. 1-12, 2011.

KOENIG, B.; PAPE, D.; CHAO, O.; BAUER, J.; GRIMPE, B. Long term study of deoxyribozyme administration to XT-1 Mrna promotes corticospinal tract regeneration and improves behavioral outcome after spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 276, p. 51-58, 2016.

KUSHCHAYEV, S. V.; GIERS, M. B.; ENG, D. H.; MARTIROSYAN, N. L.; ESCHBACHER, J. M.; MORTAZAVI, M. M.; THEODORE, N.; PANITCH, A.; PREUL, M. C. Hyaluronic acid scaffold has a neuroprotective effect in hemisection spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery: Spine**, Virginia, v. 25, p. 114-124, 2016.

LACHAT, J. J.; GRISOTTO, P. C.; THOMAZINI, J. A.; COUTINHO-NETTO, J.; PICCINATO, C. E. Successful of segmental femoral artery substitution with prothesis manufactured from the natural látex of *Hevea brasiliensis*. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v.12, p. 505-506, 2003.

LEITE, M. P. **Regeneração e plasticidade axonal na lesão medular - abordagens terapêuticas**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina), Universidade do Porto, Porto, 2010.

LETAIF, O. B. et al. Effects of estrogen on functional and neurological recovery after spinal cord injury: an experimental study with rats. **Clinics**, São Paulo, v. 70, n. 10, p. 700-705, 2015.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia: texto e atlas**. 4 ed. Porto Alegre: AMGH, 2013.

MARTINI, A. C. **Lipoxina A4 na dor neuropática após a lesão medular: modulação da neuroinflamação e ativação microglial**. 2015. 143 f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MAURÍCIO, V.B. **Aceleração do reparo tissular induzido por uma fração angiogênica purificada do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2006, 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MELO, F. R. **Avaliação do potencial neural de células-tronco mesenquimais dermais humanas: estudo in vitro e in vivo em modelo de lesão medular traumática em ratos**. 2014. 97 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MENDONÇA, R. J. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

MENDONÇA, R. J. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis***. 2008. 47 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex. Estudo experimental em cães**. 1996. 86 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

NARAZAKI, D. K.; BARROS FILHO, T. E. P.; OLIVEIRA, C. R. G. C. M.; CRISTANTE, A. F.; IUTAKA, A. S.; MARCON, R. M.; OLIVEIRA, R. P. Spinal cord regeneration: the action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. **Clinics**, São Paulo, v. 61, n. 5, p. 453-460, 2006.

NICOLA, F. D. C. **Associação de treino locomotor em esteira e células-tronco no tratamento da lesão medular experimental**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

OLIVEIRA, K. M.; LAVOR, M. S. L.; FUKUSHIMA, F. B.; CALDEIRA, F. C.; MELO, E. G. Perspectivas da aplicação das conotoxinas bloqueadoras de canais paracálcio dependentes de voltagem no trauma medular. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 501-509, 2014.

PENHA, E. M.; CARDOSO, G. M.; CARNEIRO, R. L.; MARTINS FILHO, E. F.; GOMES JUNIOR, D. C.; MORAES, V. J.; AGUIAR, W. R.; SOARES, M. B. P. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **Pubvet**, Londrina, v. 5, n. 26, p. 1169, 2011.

PENHA, E. M. **Aplicação de células-tronco mesenquimais no tratamento de lesões raquimedulares naturalmente adquiridas em cães e em gatos domésticos**. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa), Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2014.

PINHO, E.C.C.M.; SOUSA, S.J.F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J.J.; COUTINHO-NETTO, J. Experimental use of latex biomembrane in conjunctival reconstruction. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, p. 27-32, 2004.

RAMOS, R. C. D. V.; ALEGRETE, N. The role of pharmacotherapy in modifying the neurological status of patients with spinal and spinal cord injuries. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 617-624, 2015.

RODRIGUES, N. R.; LETAIF, O. B.; CRISTANTE, A. F.; MARCON, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; BARROS FILHO, T. E. P. Padronização da lesão de medula espinal em ratos wistar. **Acta Ortopedica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 182-186, 2010.

RODRIGUES, L. P.; IGLESIAS, D.; NICOLA, F. C.; STEFFENS, D.; VALENTIM, L.; WITCZAK, A.; ZANATTA, G.; ACHAVAL, M.; PRANKE, P.; NETTO, C. A. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 1, p. 49-57, 2012.

SADER, S.L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI-NETO, J.; MAZZETTO, S.A.; ALVES-JR, P.; VANNI, J.C.; SADER, A.A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 15, n. 4, p. 338-344, 2000.

SILVA, C. M. O. **Condroitinase ABC e células tronco mesenquimais no tratamento de *Rattus norvegicus* submetidos a trauma agudo da medula espinhal**. 2013. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

TAKEDA, A.; ATOBE, Y.; KADOTA, T.; GORIS, R. C.; FUNAKOSHI, K. Axonal regeneration through the fibrous scar in lesioned goldfish spinal cord. **Neuroscience**, v. 284, p. 134-152, 2015.

VILLANOVA, J. A.; DITTRICH-LOCATELLI, R.; FRACARON, L.; REBELATTO, C. L. K.; CAPRIGLION, L. G. A.; BROFMAN, P. R. S.; MIARA, L. C.; NASCIMENTO, C. A. F. Padronização e avaliação histológica de um modelo experimental de lesão medular. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1066-1072, 2014.

ZHENG, Z.; DU, X.; ZHANG, K.; WANG, X.; CHEN, Y.; KUANG, N.; FAN, T.; SUN, B. Olfactory ensheathing cell transplantation inhibits P2X4 receptor overexpression in spinal cord injury rats with neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 651, p. 171-176, 2017.

ZIMMERMANN, M.; RAISER, A. G.; BARBOSA, A. L. T.; NOVOSAD, D.; STEFFEN, R. P. B.; LUKARSEWSK, R.; SILVA, M. S.; LINDIGER, R.; PASTORE, F. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1719-1723, 2007.

ANEXO 1

Escala de avaliação funcional Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (BASSO et al., 1995)

- 0 Nenhum movimento observável do membro posterior.
- 1 Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
- 2 Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
- 3 Movimento extenso de duas articulações.
- 4 Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
- 5 Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
- 6 Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
- 7 Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
- 8 Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso.
- 9 Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar
- 10 Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
- 11 Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
- 12 Passo plantar com suporte de piso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
- 13 Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.
- 14 Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no

instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.

15 Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial

16 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.

17 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.

18 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.

19 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.

20 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda

consistentemente elevada e instabilidade do tronco.

21 Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.