

LUIZ ROBERTO GOMES VIALLE

**INSTALAÇÃO DE UM SISTEMA DE ESTUDO DE LESÕES MEDULARES
EXPERIMENTAIS EM ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor.

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

CURITIBA

2001

LUIZ ROBERTO GOMES VIALLE

**INSTALAÇÃO DE UM SISTEMA DE ESTUDO DE LESÕES MEDULARES
EXPERIMENTAIS EM ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor.

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

CURITIBA

2001

A rã morreu instantaneamente quando a medula foi cortada; e antes disto ela viveu sem cabeça, sem coração ou bexiga ou intestinos ou pele; e aqui, portanto, parecem estar os fundamentos do movimento e da vida.

Leonardo da Vinci

(1452 - 1519)

Àqueles que me comoveram com o seu sofrimento, me estimularam com a sua angústia, e que com a sua fé e esperança me despertaram para esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, orientador desta tese, pelo estímulo, e em especial, pela amizade que me permitiu partilhar durante estes anos de mestrado e doutorado.

A Wise Young, MD, PhD, Diretor do W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, da Rutgers, The State University of New Jersey, por permitir a extensão de seus estudos ao nosso meio, pela cortesia com que tem recebido a mim e aos meus colaboradores no seu laboratório, e em especial por ter vindo inaugurar pessoalmente as nossas instalações para pesquisa.

Ao Dr. Emiliano Neves Vialle pela colaboração no levantamento bibliográfico e nas atividades de laboratório, em especial pela dedicação e empenho nos estudos histológicos.

Ao Dr. Júlio Cesar Marcon, médico do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital Universitário Cajuru, pela paciência e empenho nas etapas deste projeto que envolveram atividades de laboratório e computação.

Ao Dr. Sergei Fischer, médico do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital Universitário Cajuru, pela inestimável colaboração nas práticas cirúrgicas.

Ao Dr. Richard Luzzi, pela disposição incomum para as atividades de laboratório e pela implantação das condições técnicas para o desenvolvimento de pesquisas em pequenos animais.

Ao Dr. Carlos Mikio Ono, engenheiro eletrônico e analista de sistemas, pela valiosa ajuda para decifrar os segredos da informática.

Ao Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres, Professor Titular de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Paraná, pelo valioso apoio e pela orientação no preparo das lâminas e fotografias.

À Dra. Maria Fernanda Soares, médica residente do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo empenho na interpretação dos dados histológicos.

Ao Dr. Rodolpho Paciornik, membro do Colégio Internacional de Cirurgiões e da Sociedade Brasileira de Escritores Médicos, pela revisão do texto em português e inglês.

À Diretoria do Hospital Universitário Cajuru, nas pessoas do Dr. Luiz Sallim Emed, Diretor Superintendente, e Sr. Lourival Schweidler, Diretor Administrativo, pela confiança antecipada que depositaram nas possibilidades desta linha de pesquisa, e pelo apoio permanente para a instalação do nosso Laboratório de Estudos de Lesões Medulares e Trauma Experimental.

À Direção e aos funcionários do Instituto de Pesquisas Médicas da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, pelo uso de suas instalações e pela contínua atenção com que nos receberam durante a realização dos experimentos.

À minha família, pela compreensão pelas horas roubadas.

SUMÁRIO

	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
	RESUMO.....	xi
	ABSTRACT.....	xii
1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	OBJETIVOS.....	7
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	O SISTEMA IMPACTOR NYU.....	15
3.1.1	DESCRIÇÃO DO SISTEMA.....	15
3.1.2	DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DO SOFTWARE.....	19
3.1.3	DESCRIÇÃO DO TESTE INICIAL SIMULADO.....	23
3.2	O MANUSEIO DO ANIMAL.....	27
3.3	A CONTUSÃO MEDULAR.....	29
3.4	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS.....	34
3.4.1	Método para avaliação do funcionamento do aparelho impactor.....	35
3.4.2	Método para avaliação da lesão motora.....	35

3.4.3	Método para avaliação da uniformidade da lesão produzida na medula.....	35
3.4.4	Método para avaliação através da microscopia óptica.....	37
4	RESULTADOS	42
4.1	O APARELHO IMPACTOR.....	42
4.2	O <i>SOFTWARE</i>	42
4.3	A PARALISIA DO ANIMAL.....	44
4.4	A LESÃO MEDULAR.....	44
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXOS	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	LESÕES DE NEURÔNIOS 24 HORAS APÓS O TRAUMA.....	5
FIGURA 2	LESÕES DE NEURÔNIOS 48 HORAS APÓS O TRAUMA.....	5
FIGURA 3	O APARELHO IMPACTOR.....	15
FIGURA 4	O APARELHO IMPACTOR E O MOMENTO DA IMPACÇÃO..	16
FIGURA 5	DETALHE DOS BOTÕES DE AJUSTE DA BARRA IMPACTORA.....	17
FIGURA 6	DETALHE DOS POTENCIÔMETROS ÓPTICOS.....	17
FIGURA 7	GRÁFICO QUE REPRESENTA AS CURVAS PRODUZIDAS PELO IMPACTO.....	21
FIGURA 8	AMPLIAÇÃO DO GRÁFICO, A PARTIR DO PONTO DE IMPACTO.....	22
FIGURA 9	ASPECTO DA MEDULA PÓS-LAMINECTOMIA.....	30
FIGURA 10	DETALHES DA POSIÇÃO DO ANIMAL DURANTE A IMPACÇÃO.....	31
FIGURA 11	DETALHES DA CALIBRAÇÃO DO APARELHO.....	33
FIGURA 12	ASPECTO DA MEDULA APÓS A CONTUSÃO.....	36
FIGURA 13	MODELO DA DIVISÃO DA ÁREA PARA ESTUDO HISTOLÓGICO DA MEDULA.....	37
FIGURA 14	DETALHE DA FORMA DE ANOTAÇÕES REGISTRADAS NO PROTOCOLO.....	39
FIGURA 15	MODELO DO PROTOCOLO PARA REGISTRO DAS OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	40
FIGURA 16	EXEMPLO DO GRÁFICO E DOS PARÂMETROS DE IMPACÇÃO OBTIDOS EM CADA EXPERIMENTO.....	44

FIGURA 17	GRÁFICO QUE MOSTRA A OCORRÊNCIA DE HIPOXIA NEURONAL.....	46
FIGURA 18	GRÁFICO QUE REGISTRA O DANO À SUBSTÂNCIA BRANCA.....	47
FIGURA 19	GRÁFICO QUE REGISTRA O NÚMERO DE ZONAS COMPROMETIDAS POR PERDA NEURONAL.....	48
FIGURA 20	GRÁFICO QUE REGISTRA A PERDA NEURONAL NA ZONA CENTRAL DA LESÃO.....	48
FIGURA 21	ASPECTO DA SUBSTÂNCIA BRANCA NORMAL CORADA COM HEMATOXILINA-EOSINA.....	50
FIGURA 22	ASPECTO DA SUBSTÂNCIA BRANCA NORMAL CORADA COM LUXOL <i>FAST BLUE</i>	50
FIGURA 23	SUBSTÂNCIA BRANCA COM LESÃO PÓS-TRAUMA, EM HEMATOXILINA EOSINA.....	51
FIGURA 24	SUBSTÂNCIA BRANCA COM LESÃO PÓS-TRAUMA, EM LUXOL <i>FAST BLUE</i>	51
FIGURA 25	SUBSTÂNCIA CINZENTA NORMAL, HEMATOXILINA-EOSINA.....	52
FIGURA 26	SUBSTÂNCIA CINZENTA NORMAL, LUXOL <i>FAST BLUE</i>	52
FIGURA 27	SUBSTÂNCIA CINZENTA PÓS-TRAUMA, HEMATOXILINA-EOSINA.....	53
FIGURA 28	SUBSTÂNCIA CINZENTA PÓS-TRAUMA, LUXOL <i>FAST BLUE</i>	53
FIGURA 29	NEURÔNIO NORMAL, HEMATOXILINA-EOSINA.....	54
FIGURA 30	NEURÔNIO NORMAL, LUXOL <i>FAST BLUE</i>	54
FIGURA 31	NEURÔNIO HIPÓXICO, HEMATOXILINA-EOSINA.....	55
FIGURA 32	NEURÔNIO HIPÓXICO, LUXOL <i>FAST BLUE</i>	55

RESUMO

A lesão medular traumática (LMT) sempre representou um desafio para a ciência. As dificuldades encontradas no tratamento das vítimas desta afecção são de tamanha importância, que algumas universidades criaram laboratórios para se dedicar exclusivamente a pesquisas sobre este tema. Um dos problemas mais críticos para estudos sobre a fisiopatologia da lesão e as possibilidades de regeneração da medula, reside na impossibilidade de reproduzir um número adequado de lesões uniformes em pacientes. A opção por pequenos animais para trabalhos experimentais superou em parte estes obstáculos, dadas as semelhanças com as lesões em seres humanos, além de permitir a criação de modelos para experimentos seriados. Os objetivos deste trabalho foram a instalação, em nosso meio, de um sistema de produção de lesão medular experimental em animal de pequeno porte, e a padronização do dano medular. Para isto, foi utilizado um sistema de contusão medular aberta, pós laminectomia, com um aparelho impactor desenvolvido na Universidade de Nova York, acoplado a um *software* que registra em computador os dados obtidos em cada impacção. Foram realizados experimentos em 300 ratos da raça Whistar para alcançar o uso adequado deste sistema. A avaliação do uso do aparelho e do *software* foi feita através do estudo dos gráficos produzidos após 30 experimentos consecutivos. A avaliação da paralisia produzida foi feita segundo escores da Universidade de Ohio, Estados Unidos, para determinar se a contusão medular era efetiva para produzir uma lesão completa. A avaliação da padronização da lesão medular foi realizada através de estudos histológicos em 20 animais submetidos seqüencialmente a impacção, analisando a área contundida quanto ao dano à substância branca, hipoxia, hemorragia e perda neuronal. Como resultados, conseguiu-se o perfeito funcionamento do aparelho impactor e do seu *software*, animais com paralisia total pós-impacção e alterações histológicas reproduzidas de forma idêntica na medula. Foi possível concluir que o modelo de produção de lesão medular traumática utilizado pôde ser instalado e que com a sua aplicação se obteve um dano medular padronizado.

ABSTRACT

Traumatic spinal injury has always constituted a challenge to science. The difficulties encountered in treating victims are of such great importance that has lead some of the universities to establish exclusive laboratories for research in this field. One of the most critical problems in the study of the pathophysiology of spinal cord injury and its regeneration possibilities resides in the lack of an adequate number of uniform lesions in patients. The choice of small animals for research has partially overcome these obstacles given the close relationship with the lesions in humans and has allowed for the establishment of a model for serial experiments. This task aimed at the establishment, in our community, of a method for producing experimental spinal cord injury in small animals, as well as the standardization of this lesion. A method of direct contusion of the cord was applied post-laminectomy, with the use of an impactor device developed by the New York University linked to a software which registers on the computer the data obtained from each lesion. Experiments were carried out on 300 Whistar rats in order to obtain the appropriate use of the system. Assessment of the use of this device and the software was made by analyzing the data produced after 30 consecutive experiments. Evaluation of the paralysis produced was carried out through the score method of the Ohio University with the purpose of determining if the spinal contusion was effective in producing a complete lesion. Standardization of the spinal lesion was evaluated through histological studies on 20 injured specimens; evaluation included: injury to the white matter, hypoxia, hemorrhage and neuronal loss. The results confirmed the perfect functioning of the impactor device and its software, total paralysis in the animals after impaction and histological alterations reproduced in the cord in the same manner. It was possible to conclude therefore that this method for producing traumatic spinal cord lesion can be utilized in our community and that through this method standardized cord injury can be attained.

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular traumática (LMT) é uma das mais devastadoras entre as lesões que podem afetar o ser humano. Seu registro remonta à própria história da medicina.

As anotações cirúrgicas mais antigas de que se tem notícia são os papiros de Edwin Smith, por ele descobertos em Tebas em 1862. Um egiptologista, Professor Breasted, efetuou a sua tradução em 1930, atribuindo a sua escrita por volta de 1700 a.C, mas como sendo cópia de um manuscrito original escrito talvez entre 3000 e 2500 a.C. Nestes papiros, um Tratado de Cirurgia, os antigos médicos egípcios classificaram as doenças em 3 categorias:

- 1- Uma doença que vou tratar (casos favoráveis).
- 2- Uma doença que eu vou enfrentar (casos difíceis).
- 3- Uma doença a não ser tratada (casos sem esperança).

As lesões medulares estavam enquadradas na 3ª categoria. Os papiros de Edwin Smith relacionam seis casos de lesão vertebral e reconhecem a paralisia provocada por estas graves lesões, com recomendações para o seu tratamento (com aplicações de carne e mel).

Esta indiferença milenar estendeu-se até a nossa época. Contudo, embora de forma lenta, este século foi marcado por maior enfrentamento da LMT, primeiro para tentar compreendê-la melhor e depois para combater suas seqüelas. Na seqüência de estudos e experimentos, surgiram as oportunidades para descobertas que estão mudando o enfoque até então dado a esta doença.

Conseqüência direta do trauma, a LMT atinge principalmente a faixa etária mais exposta a acidentes, que em geral é também a mais produtiva. Cerca de 60% dos casos de LMT ocorrem em pessoas entre 16 e 30 anos de idade, mas a média está aumentando com o aumento da longevidade do ser humano, chegando aos 33 anos nesta última década.

Devido às peculiaridades econômicas brasileiras, é difícil obter dados estatísticos precisos a respeito da LMT, sendo as estimativas baseadas nas informações provenientes dos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, existe desde 1937 o National Spinal Cord Injury Database, que registra informações oriundas de 21 centros federais de atendimento a pacientes com lesão medular.

Através de seus dados, estima-se que a incidência anual de LMT está entre 30 a 40 casos novos por milhão de habitantes. Para uma população em torno de 170.000.000 de habitantes, poderíamos imaginar cerca de 6.000 casos anuais no Brasil.

A prevalência é estimada em torno de 700 casos por milhão de habitantes, o que daria uma população de 100.000 pessoas convivendo com este problema no nosso país.

Os homens representam 82% dos lesados, fruto da sua exposição aos fatores de risco, tais como dirigir em excesso de velocidade, ou dirigir alcoolizado ou vítima de agressões. No mundo todo a causa principal de LMT é o acidente de trânsito; dos casos relatados nos Estados Unidos, 38% têm esta etiologia. A segunda causa que mais contribui para provocar LMT é a violência, sob várias formas, incluindo ferimento por projétil de arma de fogo. Esta forma de agressão, em especial, tem aumentado assustadoramente a sua participação nas estatísticas dos últimos anos.

Em Curitiba, dados obtidos pelo Grupo Integrado de Apoio ao Paraplégico - GIAPA - do Hospital Universitário Cajuru, mostram que em 240 casos onde foi possível determinar a causa de LMT, 42% foram vítimas de acidente de trânsito e 27% de violências que incluem variadas formas de agressão.

O custo econômico e social, para o atendimento deste volume de pessoas é assombroso, pois soma o atendimento médico-hospitalar de urgência, ao período de reabilitação.

Devido às conhecidas complicações clínicas que ocorrem no lesado medular - pneumonia, infecção urinária, escara, íleo paralítico, trombose venosa profunda, entre os mais comuns - o atendimento deve ser multidisciplinar desde o seu início, e exige prazo de internamento mais prolongado.

A reabilitação, que tem seu início ainda no período hospitalar, engloba a reinclusão social do lesado medular e a sua readaptação profissional, trabalho este que reúne psicólogos, terapeutas ocupacionais, fisioterapeutas, além de equipamentos específicos e cada vez mais sofisticados. Em 1992, o National Spinal Cord Injury Statistical Center, da Universidade do Alabama, estimou em 198.000 dólares o custo no primeiro ano de tratamento e 24.000 dólares o custo nos anos subseqüentes. Estas estatísticas e estes custos desencadearam esforços

específicos nesta área, que resultaram na fundação de diversas associações, com destaque para 3 delas:

- ASIA - American Spinal Injury Association.
- PVA - Paralyzed Veterans of America
- IMSOP - International Medical Society of Paraplegia

Estas sociedades, com a participação de várias especialidades médicas envolvidas, associação de pacientes e familiares, provocaram mudanças radicais no enfoque da LMT. Com isto, o transporte do lesado medular, o diagnóstico apurado e precoce, as técnicas de tratamento e a prevenção das complicações, foram amplamente debatidos ao longo dos últimos anos, criando padronização internacional na forma de conduzir estes casos. Como consequência desta linguagem comum, foram criados centros especializados que conseguem dar melhor atenção global aos enfermos; estes passaram a sobreviver em maior número e ter expectativa de vida quase normal para a sua faixa etária. A principal causa de morte, insuficiência renal por infecções múltiplas, passou a ser controlada com os avanços da urologia moderna.

Este progresso alcançado e a presença atuante de várias associações, pressionaram a comunidade, especialmente governos, a atender as exigências específicas deste grupo de pessoas através de medidas de impacto social, como transporte especial, rampas, estacionamentos, etc.

Esta exposição sucinta procura ajudar a compreender a preocupação da sociedade com um grupo que aumenta progressivamente com as novas vítimas e com a longevidade, bem como mostra a capacidade deste grupo de se organizar, exigir e obter conquistas.

A área da saúde não ficou imune às pressões recebidas. Estabelecidos os critérios principais em torno da atenção ao paciente e dos conhecimentos da fisiopatologia da lesão, surgiu a necessidade de investigação profunda sobre as possibilidades de cura, tentando a reversão do quadro de paralisia. Estimuladas pelo espírito científico, várias linhas de pesquisa começaram a ser perseguidas. Na medida em que alguns progressos foram sendo obtidos, maior foi o número de cientistas interessados em aprofundar suas experiências. As conclusões animadoras destas investigações criaram expectativas positivas em todos os envolvidos. Tida

como um fato irreversível até então, hoje não podemos pensar no futuro da LMT sem a visão de descobertas que levarão à sua cura.

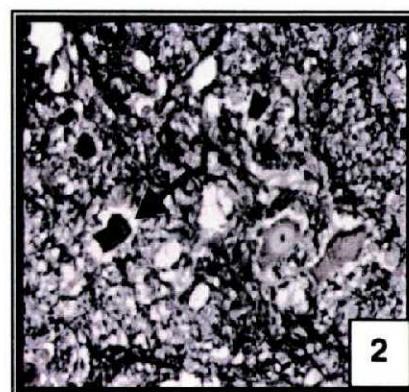
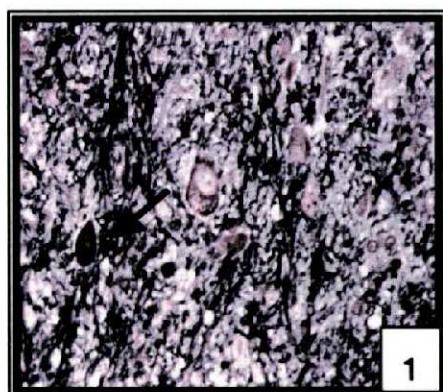
É universal a aceitação de dois tipos de lesão que produzem o dano neurológico:

- o primeiro, produzido pelo trauma em si, com morte celular e liberação de eletrólitos, metabólitos e enzimas; este é um processo mecânico, que independe do controle celular.

- o segundo, surge como uma cascata de fenômenos, envolvendo edema, inflamação, isquemia, reperfusão, fatores de crescimento, metabolismo do cálcio e peroxidase lipídica.

A Figura 1 é um exemplo deste fenômeno, e mostra a medula após 24 horas de um trauma provocado no nosso laboratório, pelo sistema impactor que esta tese descreve. A Figura 2 mostra a evolução do dano medular em outro espécime, submetido à mesma impacção, 48 horas após o trauma; nota-se claramente a progressão da lesão, agora com vacuolização, pelos fenômenos descritos acima.

FIGURAS 1 e 2: A FIGURA 1 MOSTRA LESÕES DOS NEURÔNIOS APÓS 24 HORAS DO TRAUMA;
A FIGURA 2, OBTIDA DE OUTRO ANIMAL, MOSTRA A PROGRESSÃO DESTAS LESÕES APÓS 48 HORAS, COM DEGENERAÇÃO NEURONAL E VACUOLIZAÇÃO (SETAS) DEPOIS DE CESSADO O TRAUMATISMO (*LUXOL FAST BLUE*)



Esta forma particular de morte celular, apoptose, tem sido alvo de esforços científicos no sentido de obter o seu controle. Estes esforços estão sendo aplicados em duas áreas distintas: a bioengenharia e a biomedicina.

A bioengenharia se preocupa em restabelecer os impulsos interrompidos no nível lesado com estímulos elétricos ao músculo. Aparelhos cada vez menores

estão conseguindo produzir movimentos distais e até estimular a marcha, embora de forma muito mecânica.

A área biomédica se preocupa em dar solução ao local lesado, através de enxertos, transplante celular, transposição de nervos, enfim tenta regenerar a área afetada. A busca do tratamento eficaz nesta área se faz atualmente através de dois caminhos:

- prevenção da lesão progressiva pós-trauma.
- restauração de neurônios lesados.

Há progressos nas duas frentes. Recentes estudos multicêntricos mostraram o efeito neuroprotetor da metilprednisolona quando utilizada nas primeiras 8 horas do trauma, provando que o dano medular é progressivo e pode ser interrompido com tratamento adequado. No campo da regeneração, com a aplicação de técnicas em biologia molecular, proteínas que atuam como fator de crescimento neuronal foram isoladas e aplicadas com sucesso em ratos.

Baseados nos avanços obtidos com os mais recentes relatos científicos, pode-se afirmar que a postura pessimista do mundo médico em torno da LMT, já pode ser modificada pela certeza de uma próxima descoberta que vai alterar de forma radical a evolução desta enfermidade. Mas esta visão científica de possibilidades a curto ou médio prazo demonstra que isto só acontecerá com pesquisas mais intensas. A maior parte das pesquisas que apresentaram resultados aplicáveis ao ser humano, desenvolveu-se em pequenos animais, e os principais estudos envolvidos com elas analisam os fenômenos decorrentes da produção, nestes animais, de uma lesão traumática padronizada. Desta maneira, os tratamentos propostos são testados, supostamente, sobre portadores de lesões idênticas, o que torna mais confiável o resultado obtido. Como todos os laboratórios envolvidos admitem que o melhor animal para estas experiências é o rato e que a única forma de comparar resultados é a partir de lesões padronizadas e em grande volume de espécimes, é possível acreditar que o projeto a que esta tese se refere tem justificada aplicação e oportunidade.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos desta tese são:

- 1- a instalação de um sistema de produção de lesões medulares em animais de pequeno porte, com o estabelecimento de modelo da fase aguda do trauma medular.
- 2- a padronização do dano medular obtido por impacção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Cabe a Alfred Reginald ALLEN, o mérito do primeiro impactor utilizado. O que surpreende é que isto ocorreu em 1911. Com a impacção da medula de cães, Allen procurou determinar o peso máximo que a medula suportaria até ser produzida uma lesão, e a partir daí, como a ação cirúrgica sobre a medula poderia reverter o quadro. Consistia de um peso derrubado sobre a medula exposta a partir de uma distância fixa. A velocidade do peso era constante, pela ação da gravidade, mas a deformidade da medula e os parâmetros do impacto não eram analisados.

Outros modelos e variações desta técnica surgiram ao longo dos anos, mas nenhum sobreviveu às análises mais críticas. Isto porque o fundamento das experiências com lesão medular é estudar a reparação ou regeneração a partir de danos exatamente iguais na medula.

DUCKER e colaboradores, em 1971, numa época em que o impactor desenhado por Allen renasceu, testaram-no em macacos. Pesos cilíndricos de 10, 15, 20, e 25 gramas, eram derrubados de uma altura de 20 cms, caindo sobre a área laminectomizada e imediatamente removidos. As análises microscópicas após o sacrifício dos animais procuravam relacionar o trauma e o prazo até o exame com a progressão da área de necrose. Demonstraram assim, que danos secundários ao trauma inicial podiam ocorrer. Estes danos secundários eram provocados por reações pós-traumáticas como edema, hemorragia e necrose, entre outros.

HUNG e colaboradores, em 1975, utilizando variante do impactor procuraram estudar a resposta biomecânica ao trauma, utilizando câmera fotográfica de alta velocidade. A deformação sofrida era registrada no momento do impacto e a onda produzida sobre o líquido era medida. O peso era derrubado através de um tubo de náilon, caindo sobre apoio colocado na área laminectomizada, que transmitia o impacto à medula. Os animais utilizados eram gatos, numa série de 12 exemplares. O objetivo desta pesquisa era investigar as forças mecânicas envolvidas na impacção, mas concluíram chamando a atenção para a necessária procura da exatidão na interpretação dos fenômenos.

KOOZEKANANI e colaboradores, em 1976, interessados na standardização através do método de Allen, comparam dados obtidos com

fotografias, com aqueles obtidos por simulação em computador, da dinâmica do mecanismo. O impacto era causado por peso largado dentro de um tubo, também sobre um apoio colocado sobre a duramáter de cães, método então usual em vários laboratórios. Concluem que embora de aparência simples, o método de Allen, com mínimas variações na técnica, pode produzir graus variáveis de compressão da medula mas também adverte para a necessidade imperativa de padronização deste modelo.

Nesse mesmo ano, 1976, EIDELBERG e colaboradores tentam substituir o método de Allen por compressão progressiva por meio de pesos colocados diretamente na medula de cobaias, estas pesando em torno de 1kg. Para escolha de animais menores, entre outros motivos, mencionavam custo e facilidades para manuseá-los. Os pesos eram mantidos na posição de compressão por um tempo determinado, o que evidentemente é um importante fator para lesões não idênticas. Muitas das lesões provocadas foram incompletas, mas mostraram que mesmo grandes áreas lesadas podem ter alguma função motora ou sensitiva, desde que existam pequenas áreas preservadas.

Embora por toda essa década de 70 a maior parte dos investigadores utilizasse variantes do impactor de Allen, todos concordavam que havia

Algumas tentativas de conseguir resultados mais uniformes continuaram a diferenças no grau de lesão conseguido, com imprecisões nos resultados. ser feitas. RIVLIN e TATOR, em 1978, propõem o uso de um clipe para aneurisma modificado que produzia força de compressão de 180 gramas. Este trabalho enfatiza novamente a dificuldade quanto a custos ou manuseio de animais maiores e justifica a escolha de ratos por serem mais baratos e de fácil obtenção. Após remoção do clipe conseguem observar que o alívio precoce da compressão seria importante fator para a recuperação parcial. Comparam este método com o de Allen e com a insuflação por balonete em macacos, que o mesmo autor vinha testando desde 1973. O balonete inflável era impraticável no pequeno espaço extradural do rato, agora o animal de escolha para as experiências. Quanto ao método de Allen, consideram que a sua falha mais séria era a variabilidade do grau de trauma imposto à medula.

WRATHALL e colaboradores, em 1985, estabelecem critérios para a obtenção de lesões gradativas e reprodutíveis no rato, utilizando modificação no

impactor. Esta modificação incluía a introdução de sensores para detectar os fenômenos físicos decorrentes do impacto. Os ratos foram submetidos a análises pré- e pós-contusão, com estudos histológicos, que confirmaram a possibilidade de produzir lesões similares para condições definidas de altura e peso da cabeça impactora.

GALE e colaboradores, também em 1985, utilizando ratos e a mesma técnica de impacção, avaliam a recuperação funcional e a relacionam ao volume da lesão; concluem que os protocolos de avaliação são altamente sensíveis e consistentes para diferentes grupos de animais com lesões similares provenientes de várias sessões.

NOBLE e WRATHALL, no mesmo ano, apresentam os resultados de análises morfométricas realizadas em medulas de ratos, lesados por impacção com o aparelho descrito anteriormente. Um peso de 10 gramas foi derrubado sobre a medula laminectomizada de alturas variáveis. Após quatro semanas da lesão, os ratos foram sacrificados e mensurados o volume da lesão, sua extensão e as dimensões dos tecidos no epicentro - área de lesão, área de substância cinzenta e área de substância branca. Estas medidas foram relacionadas com o peso e a altura de onde ele foi lançado; os resultados, submetidos a apurada análise estatística, mostraram que havia correlação entre eles - peso e altura - e os parâmetros morfológicos encontrados. Concluem que a medida da área de substância branca no epicentro da lesão é de simples execução e útil para quantificar esta lesão.

Estas três últimas publicações estabelecem com suas conclusões as bases para o uso do rato com modelo de animal para o estudo do efeito farmacológico de drogas aplicadas após a lesão por impacção.

BLACK e colaboradores, em 1986, estudando a impacção por queda de peso em ratos, reafirmam a sua validade como método de estudo da lesão medular. Estabelecem critérios para análise histológica da medula lesada, dividindo-a em áreas ou compartimentos que seriam preferenciais e sistematicamente examinados. Demonstram a correlação entre a queda do peso, a paralisia e o volume de necrose produzido. Estas mesmas divisões em compartimentos foram utilizadas na avaliação histológica feita nesta tese.

NOBLE e WRATHALL, em 1987, publicam nota divulgando alternativas para tornar o impactor mais barato, disponibilizando o seu uso por múltiplos centros

de pesquisa. Estas modificações simplificando o aparelho não tiram a sua característica, apenas alteram sua base de apoio e os mecanismos de fixação da coluna que vai receber o impacto.

BRESNAHAM e colaboradores, em 1987, desenvolveram um aparelho impactor com registro simultâneo de dados como deformação da coluna pós-impacto, deformação da medula, velocidade de queda do peso, altura; enfim variáveis que procurou relacionar ao tipo de lesão provocada. O aparelho partiu do princípio de Allen. Foram usados ratos, mas o peso era apoiado e pressionado segundo registros computadorizados, por tempo determinado. O objetivo era provar a possibilidade de produção de lesões graduais ou incompletas, que permitissem outros tipos de estudo.

Esta e outras publicações do final da década de 80, já eram unânimes em definir o rato como o animal ideal para este tipo de pesquisa. Quanto ao sistema de produção da lesão medular, a maioria aplicava algumas modificações ao impactor de Allen.

Wise YOUNG, um dos principais pesquisadores nesta área e conselheiro deste projeto que tentamos desenvolver, em trabalho realizado com KWO, em 1989, para o estudo da concentração de cálcio e potássio na medula lesada, reafirma a opinião geral de que o uso de impactores derivados da idéia original de Allen, ligados a sensores e sistemas computadorizados, permite provocar lesões medulares no rato de forma reprodutível e exata.

Na década de 90, com a necessidade de intensificar as pesquisas em decorrência das descobertas já efetuadas, em especial multiplicando o número de animais utilizados, a escolha do rato e de um sistema de produção de lesão por impacto monitorizado foi natural. Com esta quase padronização, porque existem diferenças pequenas entre os sensores colocados no aparelho, admitiu-se que as lesões provocadas nos diversos centros de estudo eram realmente semelhantes. A partir daí, os trabalhos publicados passam a enfatizar os aspectos decorrentes da aplicação de drogas à medula lesada e alguns dos resultados autorizam a sua aplicação em seres humanos. Foi a partir destes modelos, impactor e ratos, que BRACKEN e colaboradores em 1990, publicaram a mais importante conquista no campo da ação de drogas sobre a medula lesada, com a introdução do uso de

doses maciças de metilprednisolona nas primeiras oito horas do trauma raquimedular.

Em 1994, CONSTANTINI e YOUNG estudam o efeito de metilprednisolona e gangliosídeos combinados, e comprovam que quando administrados conjuntamente tem seus efeitos anulados. Esta importante conclusão foi alcançada utilizando ratos e o aparelho impactor desenvolvido na Universidade de Nova York, e conhecido pela sigla NYU.

Ainda dentro desta linha, FALCONER e colaboradores, em 1994, testam o uso de ressonância magnética para detectar alterações secundárias na medula de ratos após contusão por impacção, e em 1996, experimentam modificações com o uso de eletromagnetos e *laser* para analisar os parâmetros biomecânicos provocados pelo impacto em relação às alterações histológicas encontradas.

Os estudos atuais, publicados ou em execução, continuam na sua maioria absoluta a utilizar ratos e impactores, mas já não estão entrando em detalhes sobre o aparelho.

Pesquisas recentes, como o estudo do efeito protetor no tecido nervoso da proteína citoplasmática Bcl-2, publicado por LOU em 1998, descrevem na sua metodologia a "produção de lesão com o uso do sistema impactor de Allen".

KUHN e WRATHALL, também em 1998, reestudando o rato como modelo para contusão medular, concluem que "a técnica de queda do peso em ratos produz um modelo confiável e reprodutível sendo as diferenças entre diversos grupos experimentais facilmente detectáveis, funcional e histologicamente". Citando especificamente a aplicação destas pesquisas aos seres humanos, enfatizam que este modelo em ratos representa a oportunidade de investigar como a resposta celular ao trauma afeta os mecanismos de reparação e o resultado funcional.

Não foi intenção do autor fazer revisão da literatura sobre as pesquisas relacionadas à lesão medular, mesmo porque não é objetivo desta tese. Mas o desenvolvimento dos impactores não mereceu publicação específica em textos científicos, talvez por ser produto de ensaios dos departamentos de engenharia ou física das diversas universidades, e acaba sendo mencionado apenas em manuais de circulação interna. Por este motivo torna-se difícil revisar a literatura a respeito da evolução do impactor sem mencionar pesquisas sobre lesão medular.

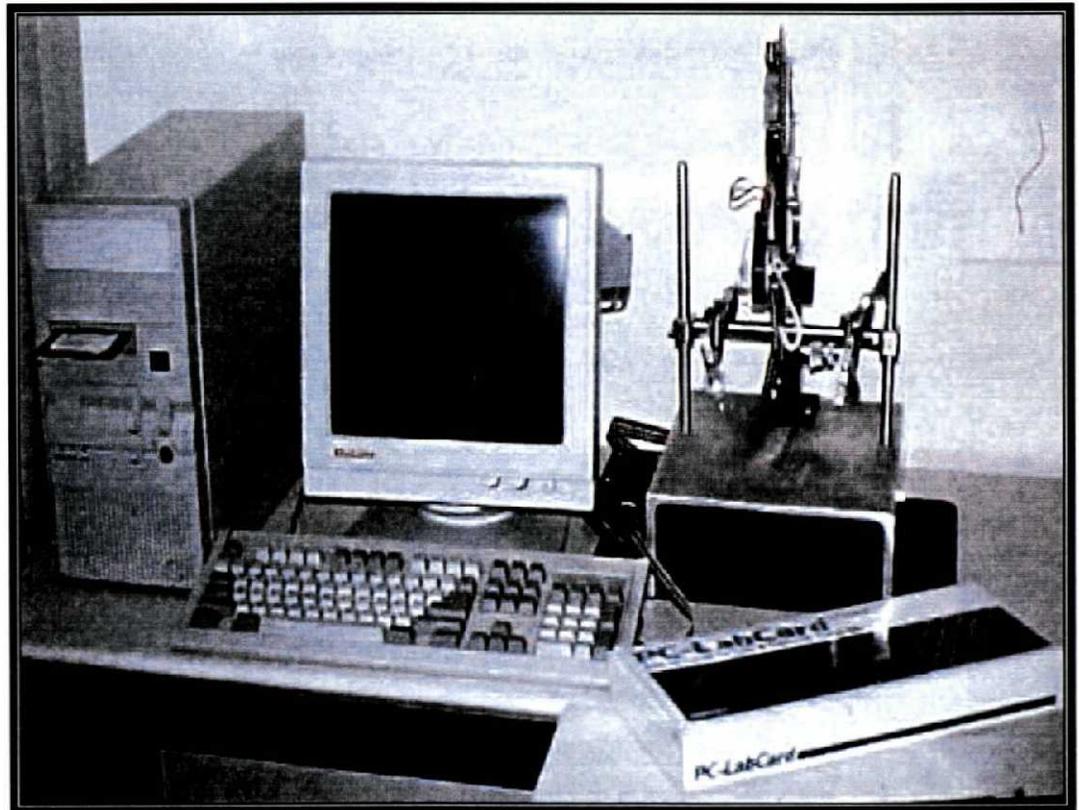
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 O SISTEMA IMPACTOR NYU

3.1.1 Descrição do sistema

Para produzir contusão e registrar os dados, o sistema é composto pelas seguintes partes, mostradas na Figura 3.

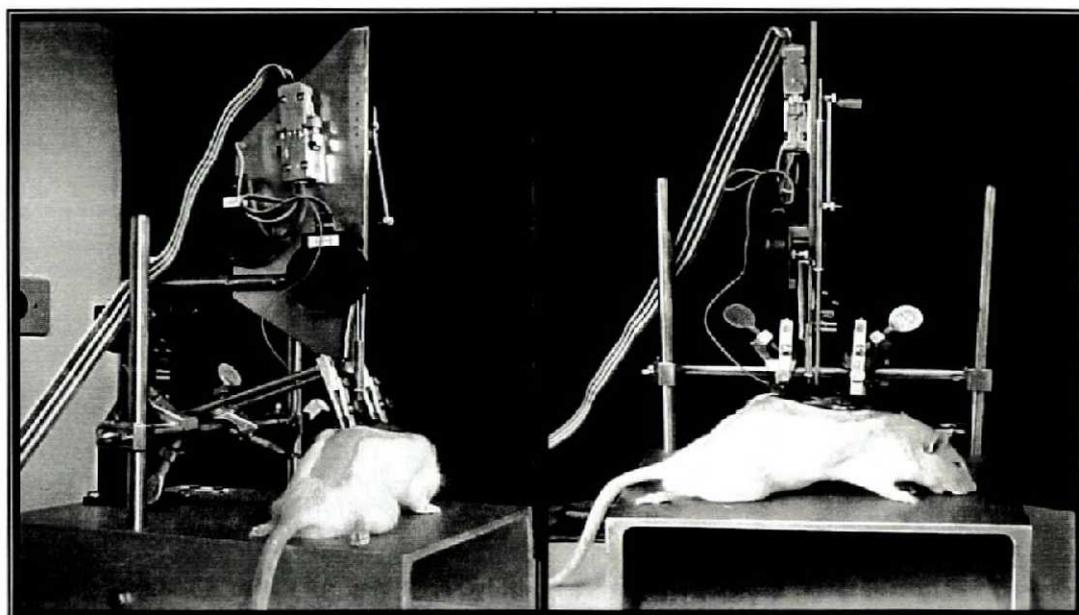
FIGURA 3 - O COMPUTADOR E O APARELHO IMPACTOR TRABALHAM ACOPLADOS



- Um computador: IBM/PC compatível com pelo menos 640Kb RAM e processador de 12 MHz.
- Programa impactor: *software* especialmente desenvolvido para registrar, calcular ou mostrar os dados adquiridos.
- Placa de interface: IBM com uma saída paralela e circuitos de temporização.

- Caixa azul: uma caixa azul de plástico que conecta o impactor ao computador. Ela contém o circuito detector de contato que sente o momento de contato entre o peso do impactor e a medula. Também contém um diodo emissor de luz (LED) e de um sinal sonoro indicando o contato.
- Monitor: EGA ou VGA em cores
- Impressora, para impressão da tela

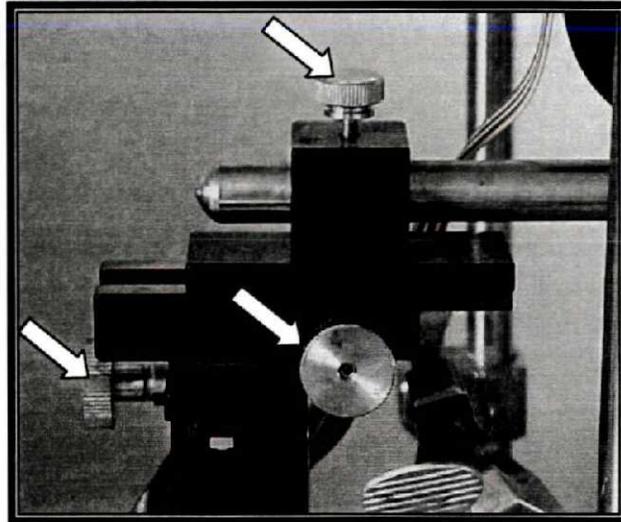
FIGURA 4 - VISÃO GERAL DO APARELHO NO MOMENTO DA IMPACÇÃO



Aparelho impactor: o aparelho de queda do peso, isto é, uma estrutura metálica de sustentação com uma base de onde saem duas hastes verticais e uma transversal, formando a letra "H", onde se apoiam dois cliques de pressão, tipo pinça de Allis, que prendem o rato por suas apófises espinhosas. A Figura 4 mostra estes detalhes.

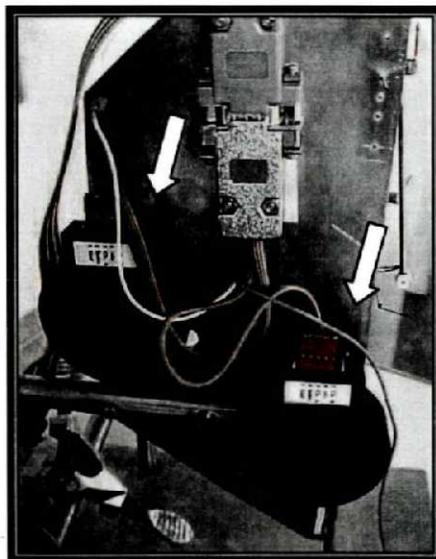
- Barra vertical: que sustenta todo o conjunto de impacção e registro de dados; através de botões tipo microscópio (Figura 5) permite ajustes laterais e de altura, para localizar a cabeça impactora exatamente sobre a medula a ser contundida, no espaço laminectomizado.

FIGURA 5 - BOTÕES PARA AJUSTE DA BARRA IMPACTORA SOBRE A MEDULA (SETAS)



- Potenciômetros: dois, de tipo óptico, com registro digital, que transferem para o computador, através de fórmulas matemáticas, os dados obtidos em cada impacção. A Figura 6 mostra estes dois potenciômetros instalados no impactor.

FIGURA 6 - DETALHE DOS POTENCIÔMETROS ÓPTICOS (SETAS) QUE TRANSFEREM PARA O COMPUTADOR OS DADOS DA IMPACÇÃO



- Haste impactora: a haste e o peso ligado a ela, que caem sobre a medula.
- Cabeça impactora: a ponta do peso que entra em contato com a medula, com 2,5 mm de diâmetro e pode ser substituída por tamanhos maiores.
- Conexões: hastes conectoras de aço inoxidável entre os potenciômetros ópticos e a haste impactora. Estas hastes e conexões transformam os movimentos verticais da haste em movimentos rotacionais nos potenciômetros. O computador utiliza fórmula matemática para traduzir as leituras dos potenciômetros em deslocamentos lineares da haste impactora.
- Garra jacaré: esta pequena garra, presa ao animal, na musculatura paravertebral, conecta o animal a um sistema elétrico de aterramento. O contacto com o animal é essencial para o detector de contato medular funcionar apropriadamente.
- Pinos de segurança e liberação: estes dois pinos estão ligados a um fio.
- O pino de segurança é colocado na posição zero do Impactor. Esta é a linha de base na posição "zero" da cabeça impactora. O pino de liberação é colocado na altura desejada da queda.
- Detector de movimento vertebral: um potenciômetro ligado a uma haste vertical conectada com um fio de tungstênio. Um fio em forma de U invertido é colocado no processo lateral da vértebra adjacente ao local do impacto, para monitorar o movimento vertebral, medindo o seu deslocamento com o impacto.
- Placa paralela: uma placa de computador que é instalada em um computador IBM PC compatível e recebe as respostas da caixa azul. É projetada especificamente para o impactor e não deve ser usada para outros propósitos.
- Conector de nove pinos: este conector vai do Impactor para a caixa azul.
- Conector de 37 pinos: este conecta a caixa azul na placa paralela.

- Conector arredondado: este conecta a placa paralela na caixa azul.
- DOS ou MS DOS: Sistema operacional de disco ou Microsoft DOS.
- Arquivo Padrão: arquivo específico (IMPDEFULT.TXT) contendo ajustes padrões ou personalizados para o impactor, bem como os valores de calibração para uma unidade particular de impactor.

3.1.2 Descrição das funções do *Software*

O programa impactor usa funções em comandos de letras simples. Cada menu de comandos é ativado por simples toque na tecla, em geral na 1ª letra do comando. Os comandos são indicados por um caractere em negrito. Estes caracteres são destacados em telas coloridas.

Quando o programa inicia, o logotipo de abertura do impactor aparece. Pressionando <SPACEBAR> segue-se imediatamente ao MENU PRINCIPAL (Tabela 1). O MENU PRINCIPAL mostra o "Nome do arquivo atual" no topo. Este é o nome do último arquivo lido ou adquirido. Pressionando <ENTER> deste ou de qualquer outro menu, retorna-se ao menu anterior, e uma breve descrição de cada função. A ordem de descrição é diferente da ordem do menu para tornar as explicações mais didáticas.

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DO *SOFTWARE*

<p>MAIN MENU</p> <p>Current file name = IMPTEST</p> <p>Acquire</p> <p>Check operation/Calibrate</p> <p>Impact analysis</p> <p>Graph impact curves</p> <p>List raw data to display</p> <p>Disk I/O functions: save / load binary data</p> <p>Write calculated impact values to text file (IMPTTEST.TXT)</p> <p>Save parameters labels to text file (LABELS.TXT)</p> <p>Text output of raw impact curves to disk</p> <p>New acquisition parameters</p> <p>HELP!</p> <p>Quit program</p>

A interpretação dos ícones da Tabela 1 é descrita a seguir:

Verificar o funcionamento / Calibração (**Check Operation / Calibrate**): verifica o funcionamento ou reajusta a relação entre as hastes do impactor e o movimento dos potenciômetros. O último é necessário somente se a ligação entre as hastes for modificada.

Aquisição (**Acquire**): inicia o modo para aquisição de dados do impactor e para salvar os dados.

Gráfico de curvas do impacto (**Graph impact curves**): mostra os dados do impacto graficamente e permite a correção de alguns parâmetros. Estas curvas são:

- Curva de impacto (I): representa a altura da cabeça impactora.

- Curva de deslocamento da coluna vertebral (V): representa o desvio ósseo medido pelo fio detector de movimento vertebral.

- Curva da Superfície Medular (CS): representa o desvio da superfície medular; é derivada das curvas I e V, pela subtração de V de I a partir do ponto de impacto.

Estas curvas estão representadas nas Figuras 7 e 8. Na Figura 7 as linhas que representam estes dados são:

- na cor vermelha: a posição da haste impactora durante a sua queda, partindo de 25 mm; a linha preta tangente é a representação da velocidade

- na cor preta, partindo de zero, a linha ondulada mostra a velocidade da queda, crescente até o ponto de impacto e a linha pontilhada representa a linha de base

- em azul, a linha vertical contínua identifica o ponto de impacto

- em vermelho, a linha vertical representa a haste impactora

- em verde, a curva V, representa o deslocamento da vértebra após o impacto

- em azul, a curva CS, representa a deformidade sofrida pela medula

A partir do ponto de impacto, o gráfico pode ser ampliado para destacar melhor as curvas V e CS.

FIGURA 7 - GRÁFICO QUE REPRESENTA AS CURVAS PRODUZIDAS PELO IMPACTO; A CURVA I, EM VERMELHO, MOSTRA A ALTURA DA HASTE IMPACTORA EM QUEDA. A CURVA V, EM VERDE, REPRESENTA O DESLOCAMENTO DA VÉRTEBRA E A CURVA CS, EM AZUL, REPRESENTA A DEFORMIDADE SOFRIDA PELA MEDULA. ESTÃO REGISTRADAS A ALTURA E A VELOCIDADE DA HASTE EM QUEDA DESDE O PONTO DE PARTIDA. A LINHA DE BASE SAI DO ZERO. O GRÁFICO PODE SER AMPLIADO A PARTIR DO PONTO DE IMPACTO (ver fig. 8)

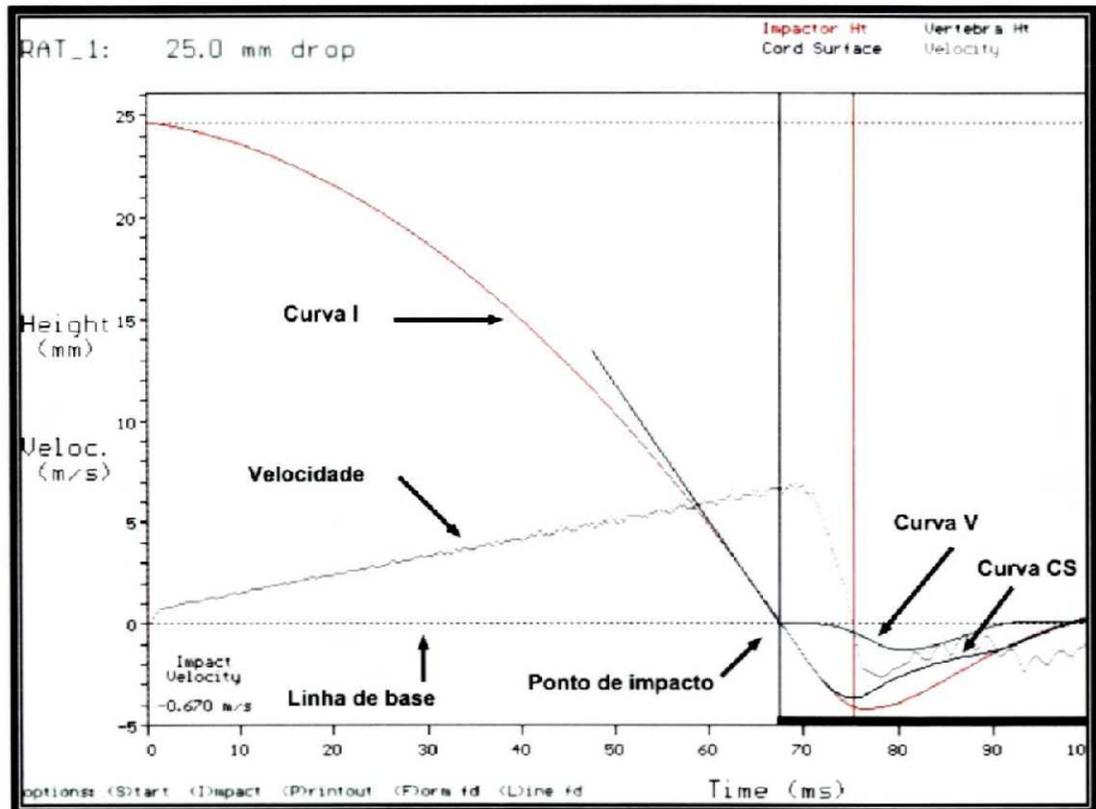
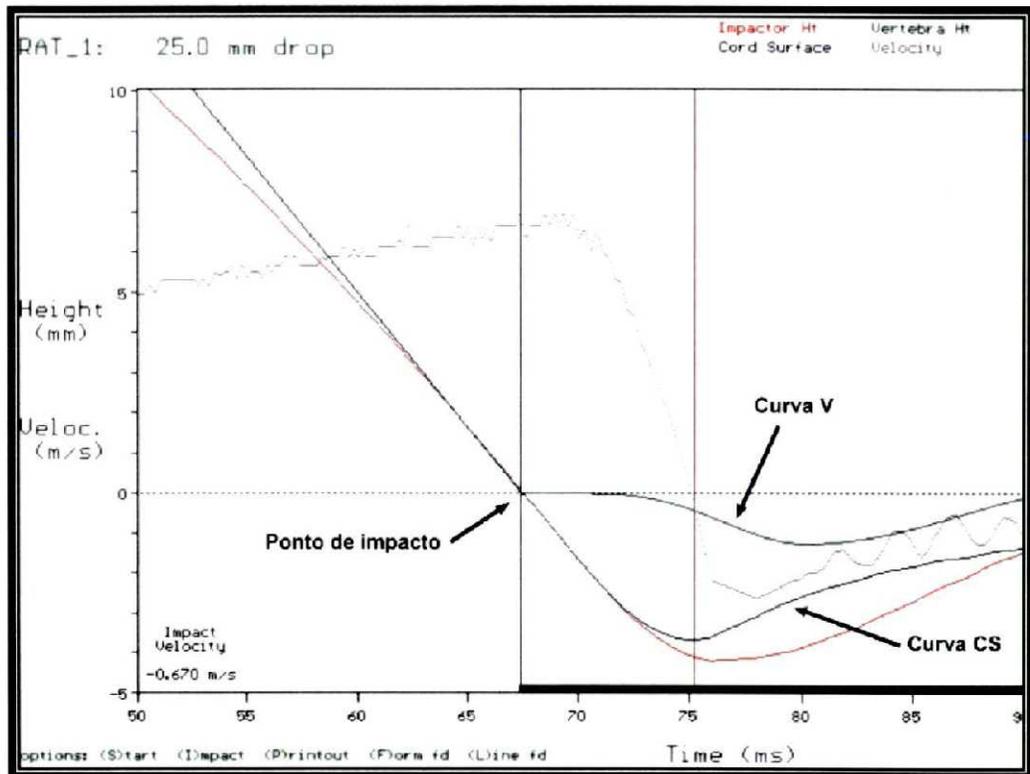


FIGURA 8 - GRÁFICO AMPLIADO QUE DESTACA, A PARTIR DO PONTO DE IMPACTO, AS CURVAS V E CS



Análise do impacto (*Impact Analysis*) : converte os dados brutos obtidos pelos potenciômetros e/ou contatos, em desvios, compressão, velocidade, e outros valores.

Listar os dados brutos na tela (*List raw data to display*) : mostra graficamente o estado dos potenciômetros, contato, e canais de temporização durante os 200 ms. seguintes à queda.

Funções de E/S de disco (*Disk I/O functions*) : contêm opções para visualizar diretórios do disco, localizar arquivos, alterar caminhos e nomes dos arquivos, carregar e salvar arquivos.

Registro dos valores do impacto calculados (*Write calculated impact values*) : salva os parâmetros calculados das curvas da queda para o disco, assim como altura da queda, latência do impacto, valor do impacto, compressão medular, e outros. O arquivo contém formato ASCII tabulado e pode ser lido em planilhas.

Salvar os valores de parâmetros para um arquivo texto (*Save parameter labels to text file*) : registra os valores de cada parâmetro do impacto calculado para o disco, em um arquivo de formato ASCII para ser lido em uma planilha.

Saída em texto das curvas do impacto (*Text output of raw impact curves*): permite salvar os dados do impacto para o disco como texto, ou arquivos de dados ASCII, para transferência para outros programas (isto é, planilhas ou aplicações de análise gráfica) as quais possam ler e manipular arquivos texto. Os valores registrados são a posição do Impactor em milímetros e a velocidade do impacto em milímetros por segundo.

Novos parâmetros de aquisição (*New acquisition parameters*) : permite mudar certos parâmetros do impacto de modo a sobrepor valores carregados no arquivo padrão lidos de um arquivo de dados.

Sair (*Quit*): sai do programa. Deve-se digitar <Q> novamente para confirmar se realmente quer sair, mesmo que sejam perdidos os dados que não foram salvados na memória.

3.1.3 Descrição do teste inicial simulado

Os dados obtidos pelo impactor são mostrados pelo computador através de uma taxa ; esta é dada por um parâmetro que precisa ser ajustado. Normalmente, o período de amostragem é entre 10 microssegundos/amostragem. Para ajustar a taxa de amostragem procede-se como segue :

- a. Do MENU PRINCIPAL, seleciona-se *Novos Parâmetros de Aquisição* (New Acquisition Parameters). O menu é mostrado .
- b. Seleciona-se *Parâmetros de Aquisição* da taxa de amostragem (Acquisition Sampling Rate Parameter).
- c. Digitando "A" novamente o computador irá automaticamente determinar a taxa de amostragem apropriada. O menu irá então ser mostrado novamente com o novo parâmetro de taxa de amostragem e períodos. Voltar ao MENU PRINCIPAL.

Digita-se <C> para acessar *Verificar funcionamento / rotina de calibração* (Check operation/ calibrate routine) Esta rotina mostra contagens ou transições dos

potenciômetros (contagens dos potenciômetros) quando a haste vertebral e a haste do impactor são movidas. Ao mover as duas hastes para cima e para baixo, nota-se que a contagem aumenta quando as hastes são erguidas e diminui quando as hastes são abaixadas. Normalmente, se as hastes são erguidas suavemente e então abaixadas ao mesmo ponto, a contagem do potenciômetro deverá retornar ao número inicial (em geral 0 ou próximo dele). Encostando a garra jacaré na haste impactora, deve-se ouvir um som provindo da caixa azul e o LED deverá acender. Na tela, "Contato do Impactor" deverá mudar de "OFF" para "ON". Pressionando <ENTER> volta-se ao MENU PRINCIPAL. Se parecer haver algum problema com o funcionamento até este ponto, verifica-se a conexão entre o impactor, a caixa azul, e o computador, para ter certeza de que está correta. Da mesma maneira, verifica-se as conexões dos potenciômetros.

O aparelho está pronto para adquirir uma simulação de dados. Eleva-se a haste impactora e se insere o pino de segurança na posição de "0" (zero mm). Isto ajusta a linha de base ou posição de referência na qual as alturas do impacto são calculadas. Coloca-se um material absorvente (esponja, papel toalha, etc.) abaixo da cabeça impactora. A superfície deve estar cerca de 8 cm da plataforma, para que quando a cabeça impactora estiver na posição 0 mm, ela esteja em contato com a esponja. Molha-se a esponja com solução salina e a garra jacaré (sistema de aterramento) é presa na esponja. O contacto entre a haste impactora e a garra jacaré permite que uma pequena corrente ($110 \mu A$) passe da haste para o sistema terra. Esta corrente é amplificada para ativar o LED e o sinal sonoro na caixa azul.

Agora, abaixa-se a haste impactora até a esponja usando o botão de ajuste grosseiro até que o LED e o alarme se ativem e imediatamente a haste é levantada até o alarme desligar. Se existir um excesso de fluido ao redor da ponta da haste, pode-se levantar a haste até desencostá-la da esponja e o alarme irá permanecer ligado. Por esta razão , sempre se ajusta a posição de contato abaixando a haste impactora, pois a superfície de tensão do líquido pode dar resultados com base em falsa posição da linha de base. A haste então é abaixada novamente, suavemente, usando o botão de ajuste fino, até o alarme tocar de novo. Neste ponto, a haste impactora deve ser levantada manualmente, de preferência usando a extremidade curta da haste de ligação, que sai da haste do potenciômetro, e ajusta-se o segundo pino (mais curto) na posição de 25mm.

Do MENU PRINCIPAL digita-se <A> para *Aquisição* (Acquire). Digitando <F> muda-se o nome do arquivo para "TEST". Digita-se <H> até que a *Altura* (Height) se ajuste em 25 mm. Digita-se <R> para ativar a *Rotina de detecção de liberação* (Release Detection Routine). Ouve-se uma seqüência de sons indicando que o programa está pronto para monitorar a queda e aparece na tela uma mensagem para iniciar. Puxando o pino de liberação, se a queda for bem sucedida, 2 sons irão tocar: um produzido pela caixa azul indicando o contato físico e outro produzido pelo computador, sinalizando o fim da aquisição dos dados. O programa irá então perguntar se os dados deverão ser salvos no arquivo pré-determinado. Pressiona-se <ENTER> para fazê-lo. O programa então começará a analisar os novos dados.

O primeiro passo da análise serve para o computador determinar a taxa de amostragem. O período de amostragem (μ s./amostragem) é inicialmente calculado e mostrado na Tabela 2.

TABELA 2 - CÁLCULO DA TAXA DE AMOSTRAGEM

TIMING CALCULATIONS / File TEST	
Number of samples	20000
Clock period	0.100 msec
# transitions to 10msec	200
	4
Star time sample	961
End time sample	4.785
Samples/clock cycle	95.7000
Samples /msec	208 msec
Max sample period	10.449
μ sec/sample	

Se a taxa de amostragem estiver dentro da faixa apropriada (9,5 a 10,5 μ s/amostragem), a tabela irá desaparecer automaticamente após dois segundos . Se a taxa de amostragem não estiver nesta faixa, a seguinte mensagem de alerta é gerada:

"Alerta:erro de temporização - deveria ser cerca de 10 μ s/amostragem ..."

("Warning: timing error - should be about 10 μ sec/sample ..")

Neste caso, deve-se retornar mais tarde ao menu Novos Parâmetros de Aquisição e ajustar a taxa de amostragem para fazer os valores μ s /amostragem estarem na faixa entre 9.5 - 10.5 μ s. A análise pode ainda proceder com uma taxa de amostragem fora desta faixa; entretanto, o período total de amostragem irá depender da taxa utilizada.

A Tabela 3, parâmetros de cálculo, irá aparecer em seguida, após digitar ENTER. Um exemplo desta tabela é mostrado a seguir.

TABELA 3 - PARÂMETROS DE CÁLCULO IMPTEST PARAMETER CALCULATIONS

Impactor v7.0

Impact Height and Velocity Calculations:

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (m/sec)
Expected	25.221	-0.700	71.392
Actual	25.432	-0.700	76.576
Error	-0.211	0.000	5.184
Error (%)	0.8	0.0	7.261

Se alguma variável (altura, velocidade, momento do impacto, ou curva do impacto) mostrar erros significativos, soará um alerta sonoro, e uma das seguintes mensagens de erro irá aparecer:

Mensagem de erro	Condição de Erro
"Alerta: erro na ALTURA"	0.5mm
"Alerta: erro na VELOCIDADE"	5%
"Alerta: erro no MOMENTO INICIAL"	5ms
"Alerta: possível erro na curva mínima CS"	8ms > impacto

Se esta etapa é completada com sucesso, o aparelho está calibrado para iniciar a contusão no animal.

O impactor possui um manual que explica com maiores detalhes as funções do software e a calibração do aparelho, mas seguindo-se atentamente o que se descreveu aqui, nenhuma ajuda adicional é necessária.

3.2 O MANUSEIO DO ANIMAL

Os procedimentos adotados em relação ao animal seguem os propostos pelo MASCIS, *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*, que engloba várias universidades americanas, incluídos em protocolo especial. Resume os procedimentos experimentais e recomendações de cuidados com os animais. Além disto são respeitados os princípios éticos da experimentação animal e as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal .

Os experimentos foram realizados em ratos com idade entre 75 a 80 dias, da raça Whistar, com peso de 300 a 400g para machos e de 200 a 300g para fêmeas. Machos e fêmeas foram estudados alternadamente. Os ratos foram obtidos uma semana antes do experimento, para que pudessem ser aclimatados ao ambiente do laboratório. Foram utilizados 300 ratos neste período da pesquisa, até que todos os testes, gráficos e parâmetros do *software* estivessem corretos; após isto ser conseguido, 30 animais foram consecutivamente submetidos a impacção, e suas avaliações clínica e histológica, e os gráficos correspondentes à sua impacção analisados para a avaliação do método.

Para a lesão medular, os animais foram anestesiados com pentobarbital intraperitoneal (35-55mg/Kg para fêmeas e 55-75 mg/Kg para machos). A medula foi exposta por uma laminectomia no nível T9-T10, e contundida com o impactor NYU cerca de 1 hora após a indução anestésica ou após 1 hora de uma dose adicional de pentobarbital.

Após a lesão, os ratos foram colocados em uma gaiola com temperatura controlada por 48 horas. A bexiga paralisada foi esvaziada por pressão manual a cada 8 horas. Os ratos foram sacrificados em 48 horas para a realização dos estudos histológicos, com uma superdose de pentobarbital aplicada intraperitonealmente, sendo os animais decapitados e exsanguinados. A coluna vertebral de C5 a L5 foi removida e congelada. As medições primárias dos resultados incluíam análises histológicas em 48 horas, e escores OSU (*Ohio State University*, escores de avaliação clínica) em 48 horas. Os dados das lesões avaliavam os parâmetros de contusão (dados pelo impactor).

Os escores OSU expressam o Índice Locomotor de Basso, Beattie e Bresnahan do Laboratório de Neurociências da Universidade Estadual de Ohio,

Estados Unidos. (OSU – *Ohio State University*). Este índice é determinado por avaliação de dois observadores após 4 minutos de inspeção do rato. São anotados 10 comportamentos envolvendo tronco, cauda, e membros posteriores. São eles:

- 1 – Movimento dos membros posteriores: quadril, joelho e tornozelo;
- 2 – Posição do tronco: lateral, média, propulsão com a cauda;
- 3 – Abdome: achatado, paralelo ou elevado do plano;
- 4 – Posição das patas: raspa o solo, apóia, não apóia;
- 5 – Apoio das patas: apoio dorsal ou plantar;
- 6 – Coordenação: membros anteriores e posteriores;
- 7 – Dedos: incidência de impulsões;
- 8 – Posição predominante das patas: rotação e despegue da marcha;
- 9 – Instabilidade do tronco: Sim/Não;
- 10 – Cauda: movimentos para cima e para baixo.

Ele relaciona ainda estas observações aos movimentos habituais do rato normal e analisa a recuperação do rato crônico, e na experimentação aguda avalia a paralisia total.

Este planejamento foi seguido para todos os ratos do estudo. Na tabela abaixo está o protocolo que ilustra o tempo de curso dos procedimentos durante as primeiras 48 horas.

TABELA 4 - PROTOCOLO PARA SEQUÊNCIA DE PROCEDIMENTOS NA CONTUSÃO MEDULAR

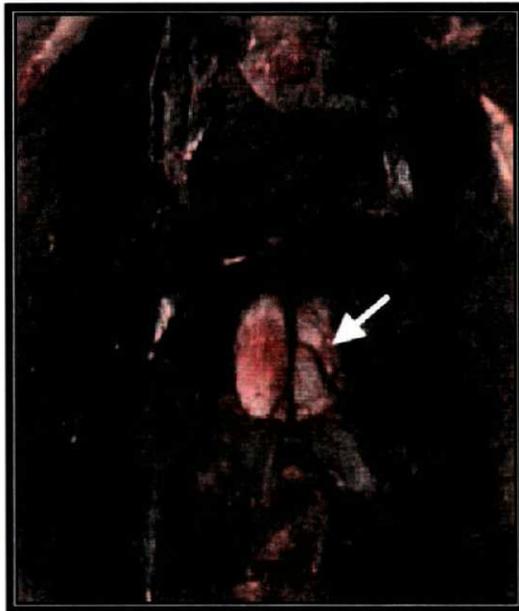
Pré-lesão	
-18 hrs	Pesar os ratos no dia anterior à cirurgia. Iniciar jejum na manhã antes da cirurgia.
- 60 min	Pesar o rato para obter o peso corporal pré-lesão. Anestesia com pentobarbital intraperitoneal (35-55mg/Kg para as fêmeas, 55-75mg/Kg para os machos) baseado neste peso. Se a dose não anestesiou o animal, não prosseguir (usar outro rato para o estudo). Tricotomia do local da cirurgia. Usar Povidine® para descontaminar todos os locais cirúrgicos. Manter condições assépticas para todos os procedimentos.
-20 min	Fazer a laminectomia com o rato em uma mesa aquecida
- 5 min	Ajustar o rato no impactor
0 hrs	Fazer a contusão medular de acordo com o protocolo.
Pós-Lesão	
+ 5 min	Transferir o rato do Impactor para a mesa aquecida
+10 min	Suturar os músculos e pele
+ 15 min	Registrar a temperatura retal.
+ 30 min	Transferir o animal para a gaiola
+24 hrs	Esvaziar a bexiga
+ 48 hrs	Decapitar e exsanguinar o rato, retirar a coluna de C5 a L5 e guardar em solução de formol a 10%.

3.3 A CONTUSÃO MEDULAR

A laminectomia foi feita por uma incisão dorsal na pele, expondo a coluna da oitava vértebra torácica (T8) à décima segunda vértebra torácica(T12); afastando os músculos paravertebrais foram expostas as vértebras T9 a T11, usando-se coagulação bipolar se necessário para controlar o sangramento.

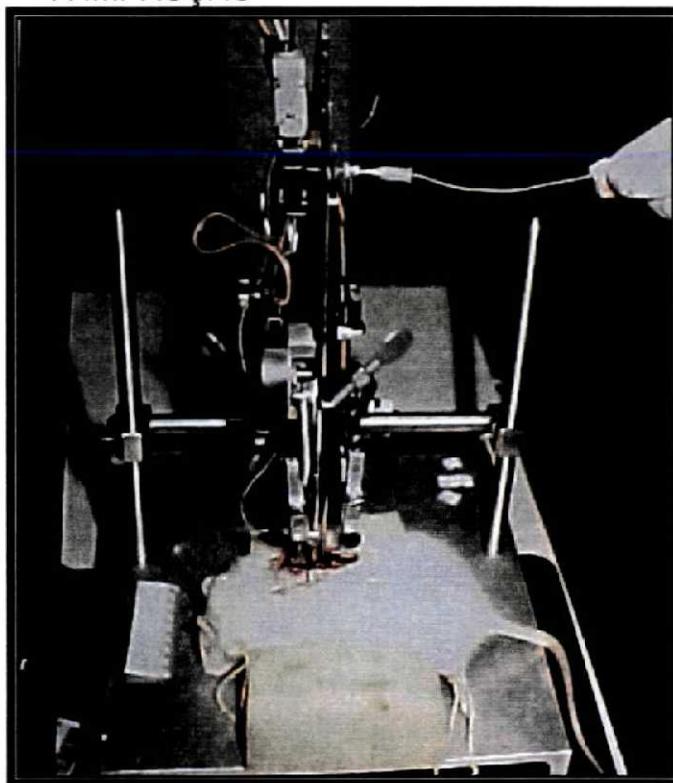
As apófises espinhosas de T10 e T9 foram ressecadas com um pequeno instrumento (saca-bocados). Partindo da porção inferior da lâmina de T10 em direção cranial, foi removida esta lâmina e a metade distal de T9, criando a abertura para passar o impactor, com pelo menos 0,2 mm de folga. Este procedimento era feito com o uso de microscópio ou lupa com aumento de 4.5 vezes; devido às pequenas dimensões do campo cirúrgico, o aumento é necessário para evitar lesões à duramáter. A Figura 9 mostra a medula após a laminectomia.

FIGURA 9 - ASPECTO DA MEDULA (SETA) PÓS-LAMINECTOMIA EM T10



O rato já laminectomizado estava pronto para ser colocado no aparelho. A cabeça impactora foi limpa com álcool a 95% e secada com ar. Utilizando os clamps da haste transversal da estrutura em "H" fixava-se T8 pela sua apófise espinhosa e então T11 também. Uma esponja era colocada como suporte sob o peito do rato para ajudar a apoiá-lo, como mostra a Figura 10.

FIGURA 10 - DETALHES DO APOIO DO RATO SOBRE UMA ESPONJA DURANTE A IMPACÇÃO



Verificava-se se o impactor estava alinhado verticalmente na mesa de exames. A linha de base do impactor era primeiramente ajustada, a haste levantada até a posição apropriada, o computador preparado para a aquisição de dados, e o peso liberado.

Para iniciar os valores de aquisição, digitava-se <A> a partir do menu principal para adquirir (*Acquire*) nova queda. Certificava-se de que o nome do arquivo estivesse correto. Usava-se nomes com 2 ou 3 dígitos no final para uma série de animais. Podia-se facilmente mudar os nomes subsequente usando as funções Aumentar/Diminuir (*Increment/Decrement*). Digitava-se <H> até que a altura estivesse ajustada no valor desejado.

A laminectomia e exposição cirúrgica da medula eram feitas fora do aparelho. Colocava-se o pino de segurança na posição zero e levantava-se o impactor a um nível mais alto. Posicionava-se o animal no aparelho usando os 2 grampos para segurar as vértebras acima e abaixo do local da laminectomia. O animal devia estar suspenso com o tórax encostando levemente na esponja para prevenir o deslizamento do corpo para frente. Estando certo de que a cabeça

impactora estivesse bem acima da medula, abaixava-se manualmente a haste impactora até a posição do pino de segurança. Centralizava-se a cabeça impactora sobre a medula usando os botões horizontais e laterais dos manipuladores. Com a cabeça na posição zero, abaixava-se suavemente o impactor usando o botão micromanipulador da altura até que a cabeça impactora estivesse a alguns milímetros acima da medula. Verificava-se a largura da laminectomia para confirmar que havia suficiente espaço para a cabeça impactora. O espaço livre devia ser diretamente observado sob o microscópio. Se necessário alargava-se a laminectomia.

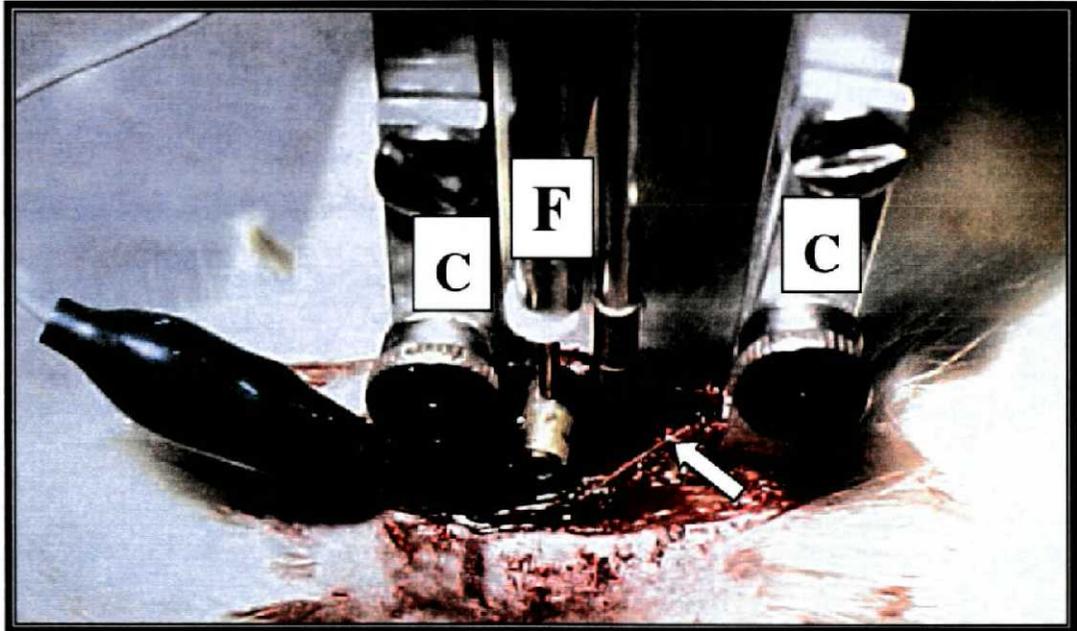
Com a cabeça impactora 1 a 2 milímetros acima da medula, o fio de referência vertebral era encostado no processo lateral vertebral. O fio, neste momento, podia parecer estar em má posição até que a cabeça impactora estivesse próxima da medula. Se necessário o fio era entortado com um porta-agulha até tocar no processo lateral vertebral quando a cabeça impactora estivesse centrada sobre a medula.

O ajuste mais apurado da linha de base do impactor era obtido pelos seguintes passos:

- Preparo da superfície de contato: o circuito detector de contato necessita de algum meio de condução; a superfície medular deveria estar umedecida, mas não coberta, por uma solução salina.

- A cabeça impactora era abaixada lentamente até que tocasse na medula e soasse o alarme, como demonstrado na Figura 11.

FIGURA 11- CABEÇA DA HASTE IMPACTORA (SETA) ENCOSTANDO NA MEDULA PARA CALIBRAR O APARELHO; EM VERDE, A GARRA QUE ESTABELECE O CIRCUITO. (C) IDENTIFICA OS CLAMPS QUE SE PRENDEM ÀS APÓFISES ESPINHOSAS E (F) É O FIO DE REFERÊNCIA VERTEBRAL



- Levantava-se a cabeça impactora até que o alarme silenciasse. Não mais do que um movimento de milímetros era necessário, dependendo do total de fluidos e da superfície de tensão na superfície da medula. Se fosse substancialmente mais do que alguns milímetros, a superfície estaria muito molhada ou algum outro problema se apresentaria.
- Novamente abaixava-se a cabeça usando o controle de manipulação fina, parando quando o alarme tocava, determinando assim a posição correta da linha de base. O impactor deveria estar repousando levemente na medula. O alarme podia parar de tocar intermitentemente devido ao movimento da medula pela respiração do animal.
- Levantava-se a haste impactora e colocava-se o pino de liberação na posição desejada. O pino de segurança permanecia na posição. O pino de segurança prevenia que a cabeça impactora atingisse a medula (ou produzisse uma lesão significativa) se as hastes deslizassem antes do pino de liberação estar na posição.

- Removia-se o pino de segurança após o pino de liberação estar seguramente na posição, cuidando para que não enroscasse no fio que conecta os dois pinos e acidentalmente puxasse o pino de liberação.
- Preparava-se o computador digitando-se <R> para ativar a rotina de liberação. Ouvia-se três tons agudos que indicavam estar o programa "armado", ou pronto para monitorar a queda.
- Puxava-se o pino de liberação e dois sons em separado tocavam se a queda obtinha sucesso, um produzido pelo alarme indicando contato físico e outro produzido pelo computador sinalizando o fim da aquisição dos dados.
- Imediatamente e manualmente levantava-se a haste e se inseriam os pinos de segurança e liberação. Este passo assegurava que o impactor não ficasse apoiado na medula. Abrindo os grampos vertebrais, removia-se o animal para a mesa aquecida.
- Finalmente os dados eram salvos, com o programa perguntando se deveriam ser registrados no arquivo pré-determinado. Pressionava-se <ENTER> para salvar neste arquivo, ou qualquer outro caractere para mudar o nome do arquivo e salvar manualmente. Os dados da queda eram então analisados automaticamente, as variáveis do impacto sendo mostradas, e os dados transformados em gráficos.

3.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Para atender aos objetivos propostos nesta tese, isto é, demonstrar a possibilidade de estabelecer um modelo da fase aguda do trauma medular através do aparelho impactor e a padronização do dano medular, foram realizados trinta procedimentos consecutivos.

Os dados obtidos nestes experimentos foram examinados separadamente, buscando a comprovação dos objetivos propostos. Os trinta experimentos foram analisados com relação ao funcionamento do impactor e à lesão motora do animal; vinte foram enviados à análise histológica para estudo das alterações produzidas na medula.

3.4.1 Método para avaliação do funcionamento do aparelho impactor

Foram estudados e comparados os gráficos após cada impacção, visando comparar os dados obtidos, com os limites pré-estabelecidos pelo seu *software*. Foram analisados os valores correspondentes ao tempo e velocidade da haste impactora, desde a sua ativação até o contato com a medula. É importante lembrar que o aparelho é regulado para confirmar de imediato a correta execução do experimento, através de indicações automáticas do erro cometido. Os experimentos que acusaram um erro fora da margem aceita pelo *software*, foram abandonados. Só foram considerados para a análise histológica os experimentos que se mantiveram dentro dos parâmetros aceitáveis. O computador registrou estes parâmetros, com gráficos que foram impressos e anexados ao protocolo de cada animal.

3.4.2 Método para avaliação da lesão motora

Após a contusão medular, os 30 animais foram submetidos à análise da paralisia produzida, através do exame físico pelo escore OSU, já descrito. Este exame físico foi realizado após 48 horas, pois esta é uma padronização internacional para o estudo da fase aguda da lesão medular; permite que se tenha certeza que a paralisia foi obtida e não houve recuperação motora dentro deste prazo. Os dados deste exame foram incluídos no protocolo do animal.

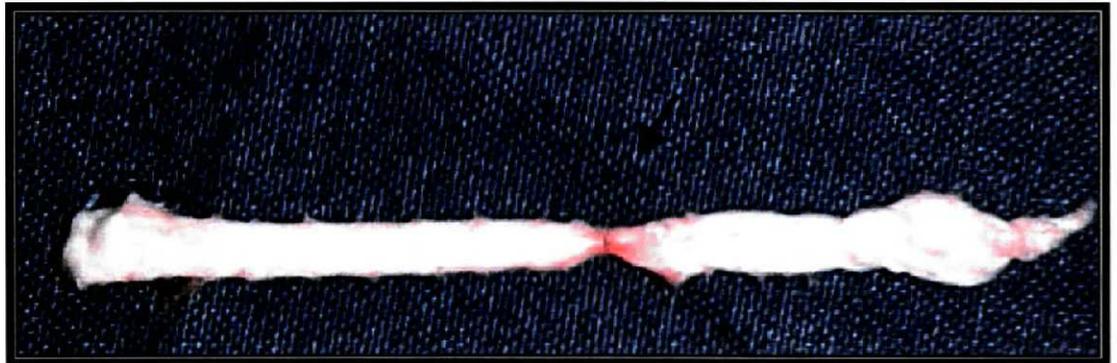
3.4.3 Método para avaliação da uniformidade da lesão produzida na medula

Foram feitos estudos histológicos avaliando a presença de hemorragia, hipoxia neuronal, morte neuronal e dano à substância branca, em cortes seriados que incluíam o centro da lesão. Os cortes histológicos foram revisados por examinadores independentes, que não sabiam o tempo de evolução em que o animal havia sido sacrificado ou quais eram os animais controle.

Após a remoção do tecido medular do canal vertebral manualmente, com o uso de uma pequena pinça sacabocado, realizou-se a inspeção macroscópica do tecido medular. Observou-se exatamente no local que recebeu a impacção, um

tecido necrótico, cujo centro foi determinado como área da lesão. A Figura 12 demonstra este aspecto. A partir desta área, uma secção de 4 cm (2 cm em sentido cranial e 2 cm em sentido caudal) foi separada para estudo histológico. A extremidade cranial foi reparada com fio cirúrgico para possibilitar a sua correta identificação durante o manuseio

FIGURA 12 - MEDULA REMOVIDA DA COLUNA VERTEBRAL, ONDE A ÁREA CONTUNDIDA APARECE COMO UMA DEPRESSÃO APÓS 48 HORAS DO TRAUMA (SETA); A PARTIR DO SEU CENTRO FORAM REALIZADOS CORTES 2 CM EM SENTIDO CRANIAL E 2 CM EM SENTIDO CAUDAL



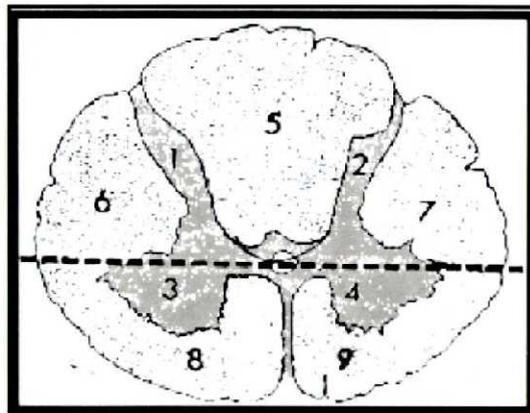
As secções obtidas a 2 cm cranial e caudal ao local do trauma foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, submetidas a processador automático de tecidos e incluídas em parafina. Para cada espécime, determinou-se uma área compreendida entre 0,5 cm cranial e 0,5 cm caudal ao ponto central da impacção, portanto, uma área de 1 cm . Dessa amostra foram obtidos cortes histológicos seriados de 5 micra de espessura, realizados a intervalos de 500 micra, num total de 10 cortes. Os 1,5cm proximais e distais restantes foram seccionados a intervalos de 0,5 cm, resultando em três cortes de 5 micra de espessura para cada área proximal e distal à zona contundida, ou seja, 6 cortes. Os cortes resultantes, em número de 16 por animal, foram sucessivamente dispostos e orientados no sentido crânio-caudal, permitindo a avaliação de toda a magnitude e amplitude da lesão na área contundida.

3.4.4 Método para avaliação através da microscopia óptica

Após a devida identificação, os cortes foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) e luxol *fast blue* (LFB) para mielina, combinado com cresil-violeta para neurônios.

De cada um dos 16 cortes histológicos foram produzidas 2 lâminas, sendo 16 coradas por HE e 16 coradas por LFB para cada espécime; foram 32 lâminas para os 24 animais (20 do estudo e 4 controles) perfazendo 768 lâminas para análise. Em cada uma das lâminas, a medula foi subdividida em nove áreas ou compartimentos padrão, cinco delas correspondentes às colunas de substância branca (anteriores direita e esquerda; póstero-laterais direita e esquerda e posterior) e quatro aos cornos de substância cinzenta (anteriores direito e esquerdo e posteriores direito e esquerdo), conforme demonstrado na figura 13.

FIGURA 13 - DIVISÃO DA ÁREA DE CORTE EM 9 COMPARTIMENTOS, DE 1 A 4 NA SUBSTÂNCIA CINZENTA E DE 5 A 9 NA SUBSTÂNCIA BRANCA



Em cada uma das nove áreas ou compartimentos padrão correspondentes a cada corte, foram avaliados os quatro critérios de lesão raquimedular estabelecidos por Black (1986):

1º - degeneração de substância branca: caracterizada por um espectro variado de lesões, iniciando-se com edema e cistificação da substância branca, passando por desmielinização e, finalmente, por infiltração macrofágica, necrose cística e deformação medular, lesões estas melhor avaliáveis ao LFB;

2º - hemorragia: traduzida por insudação de hemácias na substância branca e/ou cinzenta;

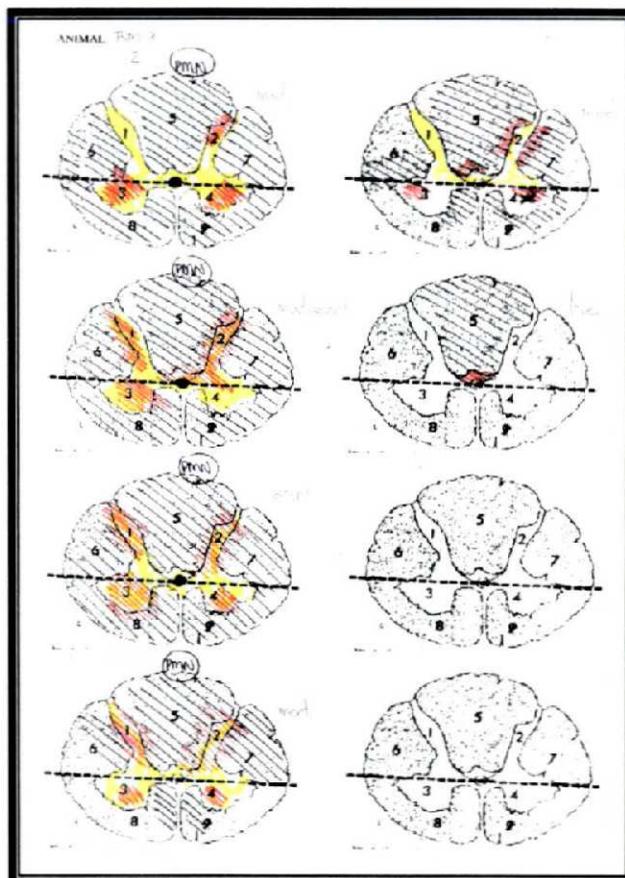
3º - perda neuronal: caracterizada como acelularidade, isto é, ausência de neurônios com pericário e núcleos bem individualizáveis à microscopia óptica, vacuolização grosseira e infiltrado inflamatório na substância cinzenta;

4º -injúria hipóxica neuronal: demonstrável pela picnose e retração nuclear e intensa eosinofilia do pericário.

Foram anotadas 13.824 observações em HE (24 animais x 16 lâminas x 9 áreas x 4 critérios) e 1.920 em LFB (24 animais x 16 lâminas x 9 áreas x 1 critério), pois o LFB foi utilizado apenas para avaliar o dano à substância branca.

Desta forma, foram feitas no total 15.744 observações (HE mais LFB), as quais foram reproduzidas e localizadas graficamente em protocolo próprio, conforme corte histológico e área ou compartimento padrão, e tabuladas em planilha eletrônica Microsoft Excel 97. As Figuras 14 e 15 mostram o modelo adotado para registrar as observações após a análise de cada corte.

FIGURA 15 - MODELO DO PROTOCOLO DE REGISTRO DAS OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS. CADA FOLHA LEVA O NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL EXAMINADO, ONDE ESTÃO REPRESENTADOS OS CORTES HISTOLÓGICOS



Os cortes foram analisados por dois observadores patologistas em microscópio Olympus CBA 213, seguindo a orientação proximal-distal previamente estabelecida. A documentação fotográfica microscópica foi realizada através de microscópio óptico Olympus CH30.

Na preparação desta tese foram seguidas as seguintes normas:

Normas para Referências Bibliográficas (NBR 6023/00) da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2000).

Nomina Anatômica Veterinária, 1983, e

Obedeceu-se aos princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999).

4 RESULTADOS

Para procurar confirmar se os objetivos propostos haviam sido alcançados, os resultados que foram analisados reportam-se especificamente:

- ao emprego do aparelho impactor e do seu *software*
- ao efeito produzido no animal com respeito à função motora
- ao estudo histológico da medula lesada.

Após o domínio do sistema foram realizados experimentos consecutivos, e os dados obtidos foram analisados considerando separadamente :

- 4.1 O aparelho impactor
- 4.2 O *software*
- 4.3 A paralisia produzida no animal
- 4.4 A lesão produzida na medula

4.1 O APARELHO IMPACTOR

A única forma de verificar o correto funcionamento do impactor foi através da análise da interpretação dos gráficos obtidos após cada um dos trinta experimentos. Todos estes gráficos foram confirmados pelo *software* como dentro das especificações para as quais o aparelho foi regulado, e estão demonstrados no anexo 1. Como os gráficos são expressão dos parâmetros de impacção fornecidos pelo *software*, foram analisados junto com o item 4.2.

4.2 O SOFTWARE

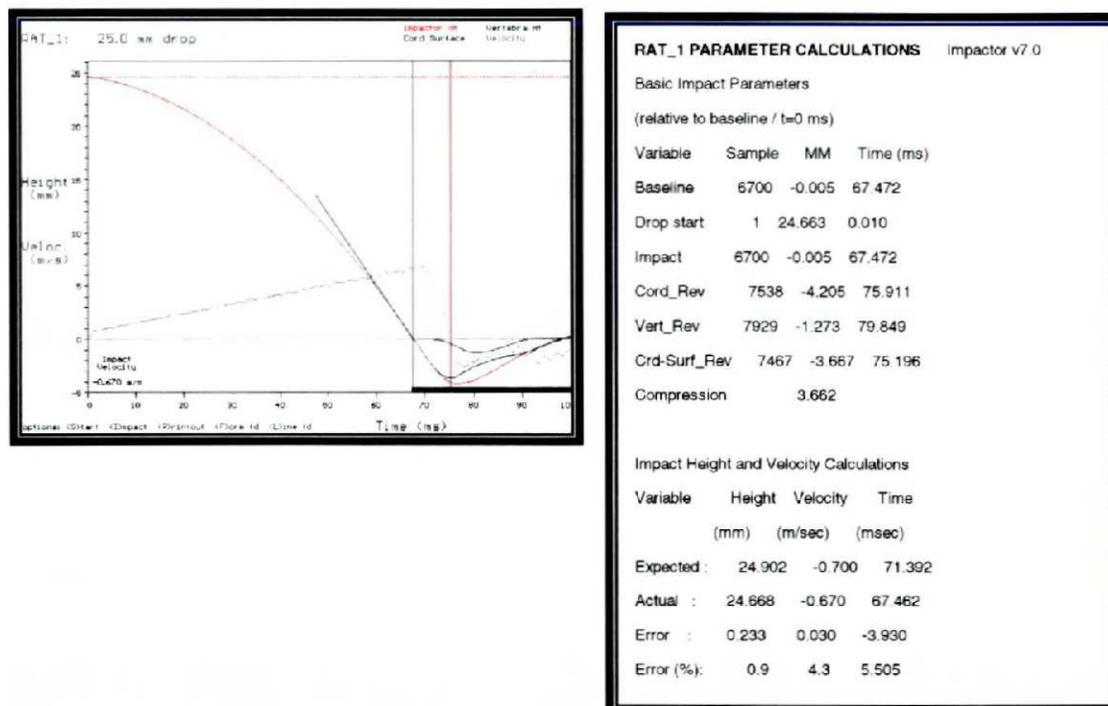
Uma vez iniciado o processo, em todos os trinta casos consecutivos não houve problemas com o sistema. Os parâmetros mais importantes, que dizem respeito à velocidade de queda do peso e ao tempo decorrido, estimados e os reais, são mostrados no anexo 1. Não houve necessidade de cancelar nenhuma das experiências devido ao funcionamento inadequado do impactor. A exatidão dos gráficos em relação à margem de erro permitida pelo sistema confirmou a correção do uso do aparelho impactor e do seu *software*. Após o término da impacção, o

software produziu um gráfico que demonstrou a deformidade produzida pela queda do peso sobre o animal. Neste gráfico, há a representação de curvas correspondentes à deformação sofrida pela coluna óssea e pela medula quando receberam o impacto do peso, e à diferença entre as duas, o que representa o desvio real sofrido pela medula. Estas curvas estão demonstradas no anexo 1.

Deve-se destacar aqui, que o *software* foi elaborado com a função específica de registrar erros cometidos ou aprovar as impacções efetuadas. O funcionamento dos dois, aparelho e *software*, é absolutamente interligado e é registrado no computador após cada operação, produzindo e imprimindo gráficos quando solicitado. Portanto, o resultado quanto aos itens 4.1 e 4.2 foi obtido de forma imediata.

A análise destes gráficos confirmou a correta aplicação do aparelho impactor e do seu *software*. Para facilitar a interpretação dos resultados, eles foram colocados lado a lado, cada um identificado com o nome *rat* e o número do experimento, de 1 a 30 (*rat_1*, *rat_2*, etc.). A Figura 16 mostra o modelo deste registro como será apresentado no anexo 1.

FIGURA 16 - O GRÁFICO DESCRITO NA FIGURA 7 E OS PARÂMETROS DE IMPACÇÃO FORNECIDOS PELO SOFTWARE PARA CADA EXPERIMENTO SERÃO MOSTRADOS LADO A LADO NO ANEXO 1, PARA FACILITAR A IDENTIFICAÇÃO ENTRE ELES



4.3 A PARALISIA DO ANIMAL

Os ratos foram examinados clinicamente, através de exame físico segundo o escore OSU já descrito, após 48 horas da contusão medular. Após os parâmetros de impacção serem reproduzidos, nenhum rato apresentou qualquer grau de função medular, ou seja, todos apresentaram paralisia completa abaixo do nível contundido, inclusive paralisia da bexiga. Estes dados estão registrados no anexo 2.

4.4 A LESÃO MEDULAR

A avaliação da lesão produzida na medula foi feita através de estudos histológicos em 20 dos 30 animais submetidos às impacções consecutivas. Para comparação foi criado um grupo controle de 4 animais, que tiveram a medula examinada com o mesmo número de cortes na mesma área, mas sem terem sofrido

impacção; isto foi necessário para mostrar que a técnica de laminectomia não produziu lesão na medula que pudesse ser confundida com o efeito da impacção.

Todos os critérios estabelecidos para avaliação de lesão medular – hemorragia, hipoxia neuronal, dano à substância branca e perda neuronal – tiveram sua expressão máxima nos cortes histológicos de número 8 a 12, correspondentes à área central de impacção. Tais achados foram consistentemente observados em todos os grupos de animais, excluindo-se os do grupo controle.

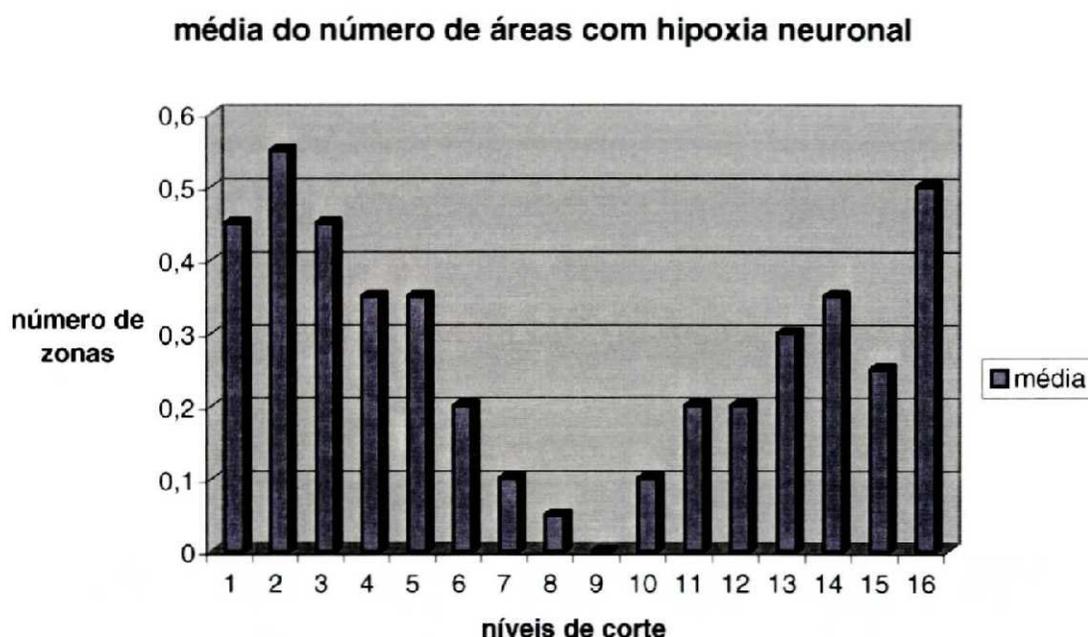
- Hemorragia

A hemorragia esteve presente praticamente ao longo de toda a extensão da área central de impacção, em todos os espécimes examinados, excetuando-se os do grupo controle. Observou-se, porém, maior número de zonas ou compartimentos comprometidos, nos níveis centrais de corte 8 a 12, coincidindo com as áreas de maior perda neuronal e dano à substância branca, resultando, graficamente, numa curva senóide. Dentro dos cortes examinados, houve maior e mais expressivo comprometimento das zonas posteriores da medula, submetidas diretamente ao impacto, mas de forma irregular no que se refere à sua intensidade e localização.

- Hipoxia neuronal

Foi observado um grande número de neurônios hipóxicos, de distribuição aleatória e difusa dentro dos cornos anteriores e posteriores, em todos os níveis de corte, no grupo controle. No grupo do estudo, após 48 horas do trauma já havia tamanha perda neuronal que não existiam neurônios para o estudo do grau de hipoxia. A figura 17 mostra estes dados.

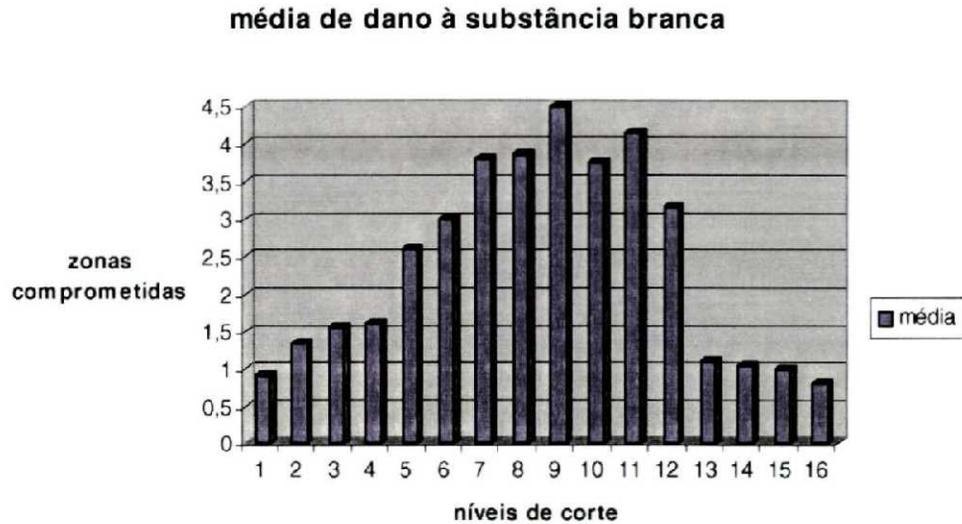
FIGURA 17 - OBSERVA-SE QUE A IDENTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS HIPÓXICOS NA ÁREA CENTRAL DA LESÃO NÃO OCORRE, PELO FATO DE HAVER DESTRUIÇÃO COMPLETA DA ESTRUTURA NEURONAL. À MEDIDA QUE SE AFASTA DA ÁREA CENTRAL, AUMENTA GRADUALMENTE O NÚMERO DE ZONAS ONDE NEURÔNIOS HIPÓXICOS SÃO IDENTIFICADOS



- Dano à substância branca

A apresentação do dano à substância branca coincidiu em grau e topografia com a hemorragia, apresentando-se em todos os grupos de animais estudados com um predomínio nas áreas de corte proximais ao centro, e, dentro destas, principalmente na coluna posterior. Houve expressão máxima do dano à substância branca, com necrose cística, circundada por variável componente inflamatório, desmielinização acentuada e conseqüente deformação medular. Isto ocorreu de forma sistemática e com a mesma intensidade em todos os animais, como está demonstrado na figura 18.

FIGURA 18 - O DANO À SUBSTÂNCIA BRANCA É MAIS IMPORTANTE NAS REGIÕES CENTRAIS DA MEDULA ESPINHAL, CAINDO GRADUALMENTE NO SENTIDO CRANIAL E DE FORMA MAIS BRUSCA NO SENTIDO CAUDAL



- Perda neuronal

A perda neuronal pôde ser inversamente correlacionada com o achado de hipoxia neuronal, manifestando-se nos níveis de corte em que não foram observados sinais de hipoxia neuronal e não tendo sido igualmente observada no grupo controle. Em adição, sua expressão máxima se deu principalmente na zona de impacção, bem como nos níveis situados cranialmente a esta. Houve significativa sobreposição da perda neuronal com o achado de disrupção, desmielinização e necrose cística da substância branca. Estes dados estão registrados nos gráficos mostrados nas figuras 19 e 20.

FIGURA 19 - NOTA-SE A PERDA NEURONAL MÁXIMA NA ZONA CENTRAL DA LESÃO, E SUA REDUÇÃO GRADUAL NO SENTIDO CRANIAL

média de zonas comprometidas por perda neuronal

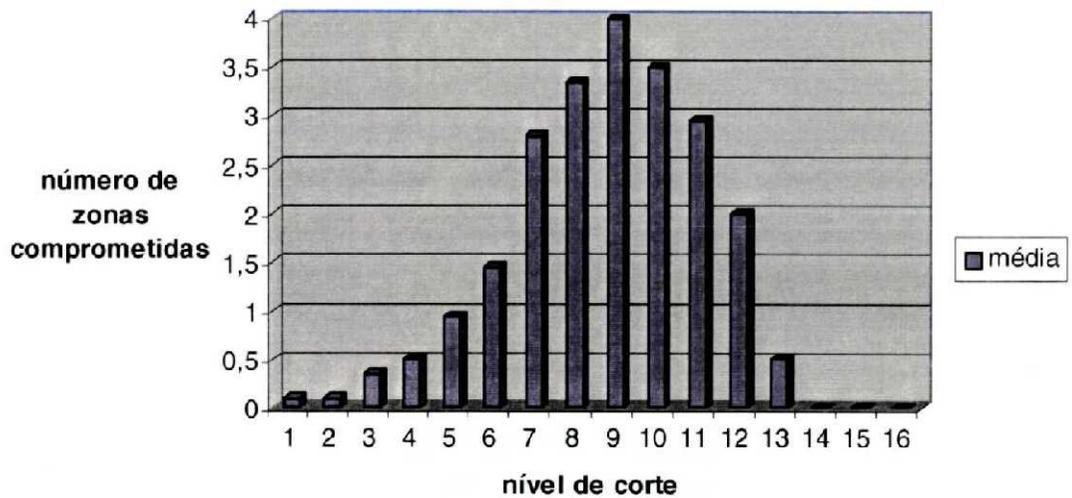
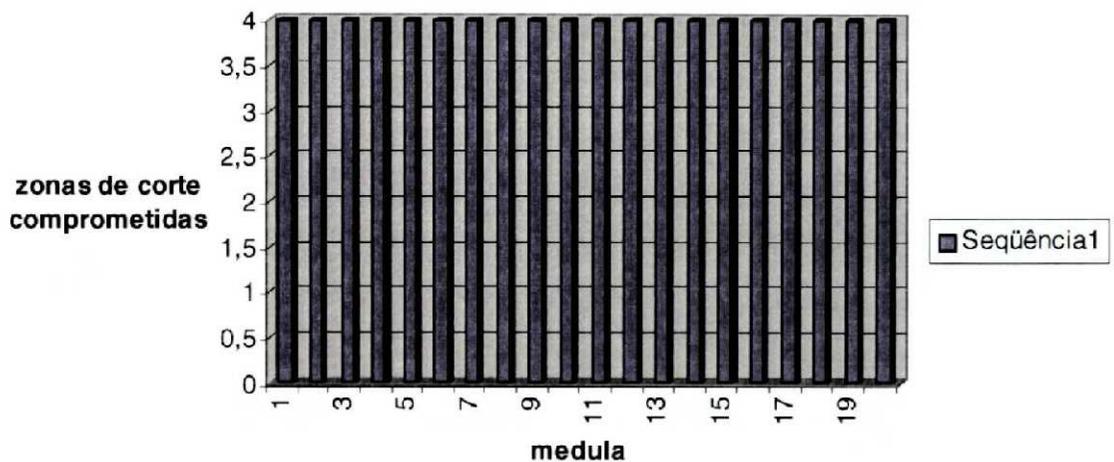


FIGURA 20 - UNIFORMIDADE DA PERDA NEURONAL MÁXIMA NA ZONA CENTRAL DA LESÃO (NÍVEL DE CORTE 9) COM TOTAL AUSÊNCIA DE NEURÔNIOS NESTE NÍVEL

perda neuronal na zona central da lesão

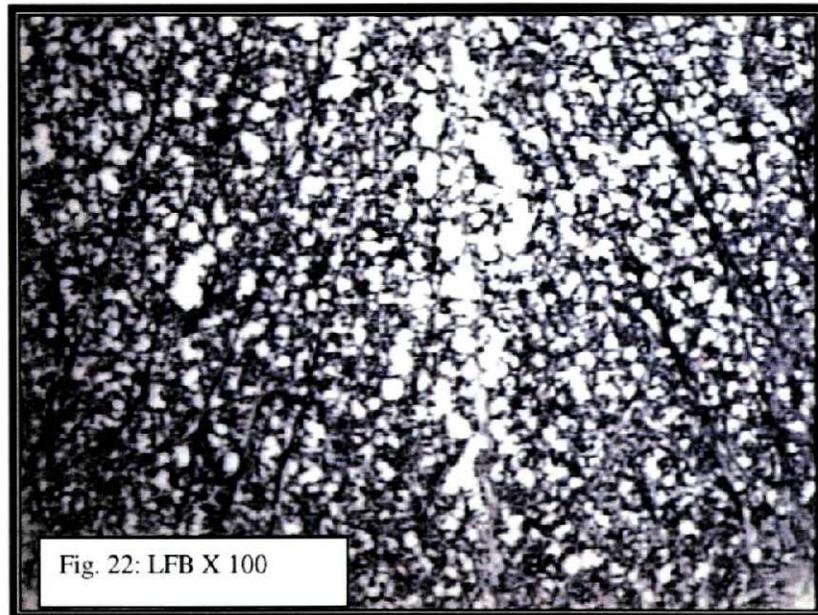
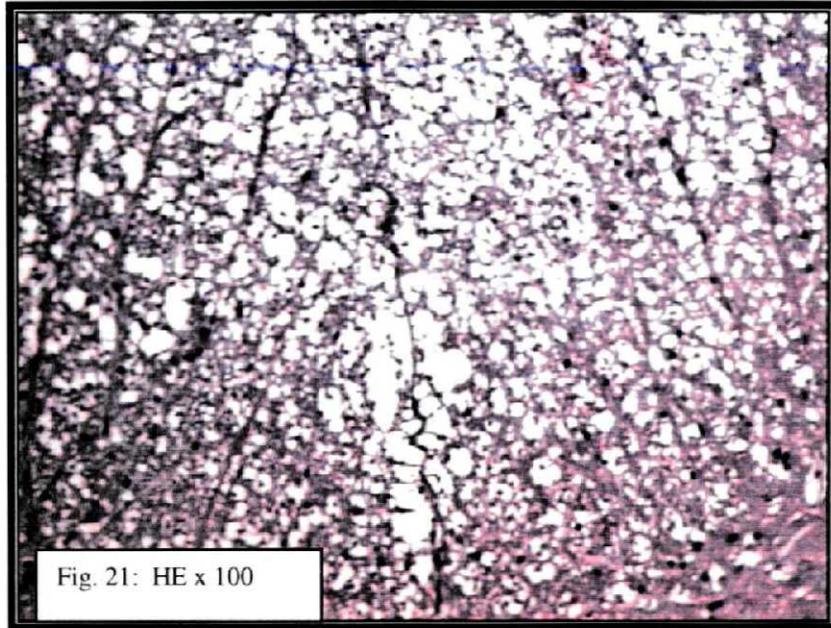


Os cortes que apresentaram sinais de lesão na sua maior intensidade foram, em todos os animais, os de 8 a 12, correspondentes à área central de impacção, mostrando que a identificação visual da zona lesada é adequada para a demarcação dos cortes histológicos. Nestas áreas a perda da arquitetura do tecido nervoso foi marcante e similar, justificando a ausência total de resposta motora dos animais avaliados.

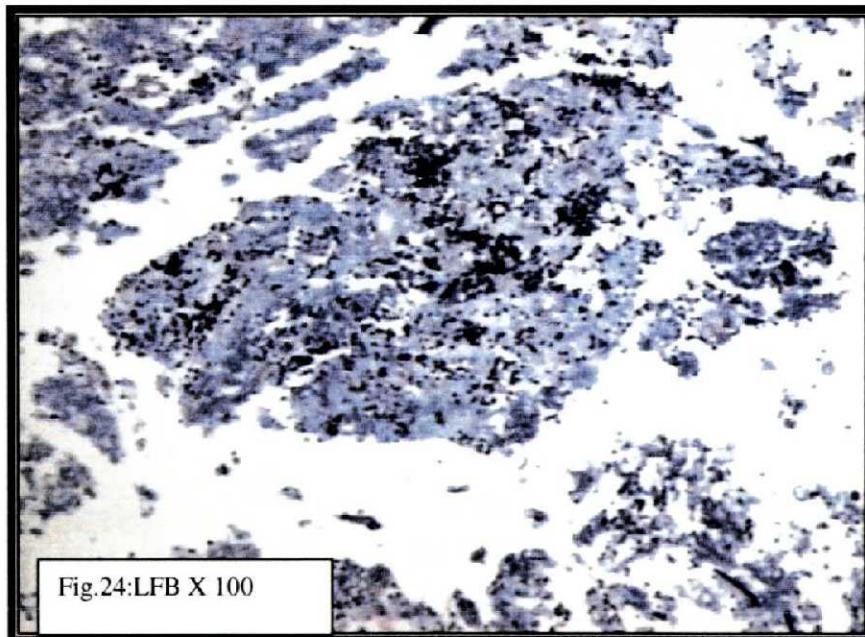
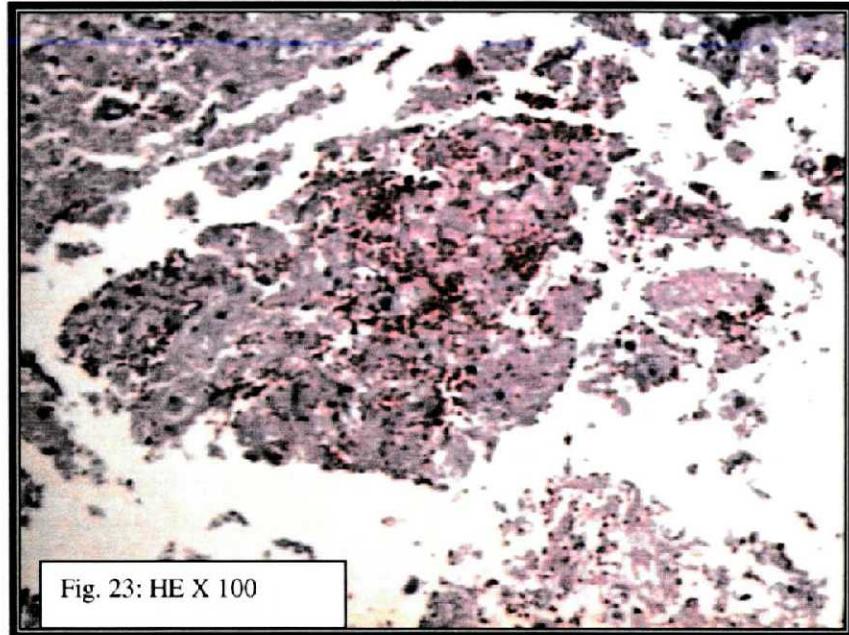
Os resultados obtidos através destes estudos histológicos comprovaram uma lesão idêntica quanto à perda neuronal e dano à substância branca nos cortes centrais da medula, quando os mesmos parâmetros de impacção foram utilizados. A hipoxia e a hemorragia não puderam ser determinantes na afirmação de que as lesões obedeciam a um padrão.

As figuras a seguir mostram alguns dos dados obtidos pelo estudo histológico; as fotos das lâminas apresentam, sucessivamente, com colorações em hematoxilina-eosina ou luxol *fast-blue*, amostras do tecido normal e pós-contusão.

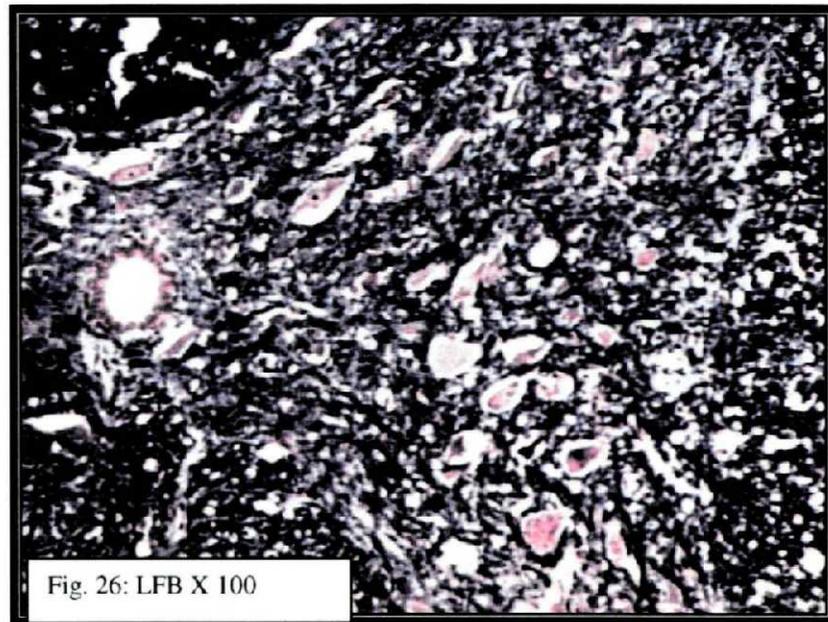
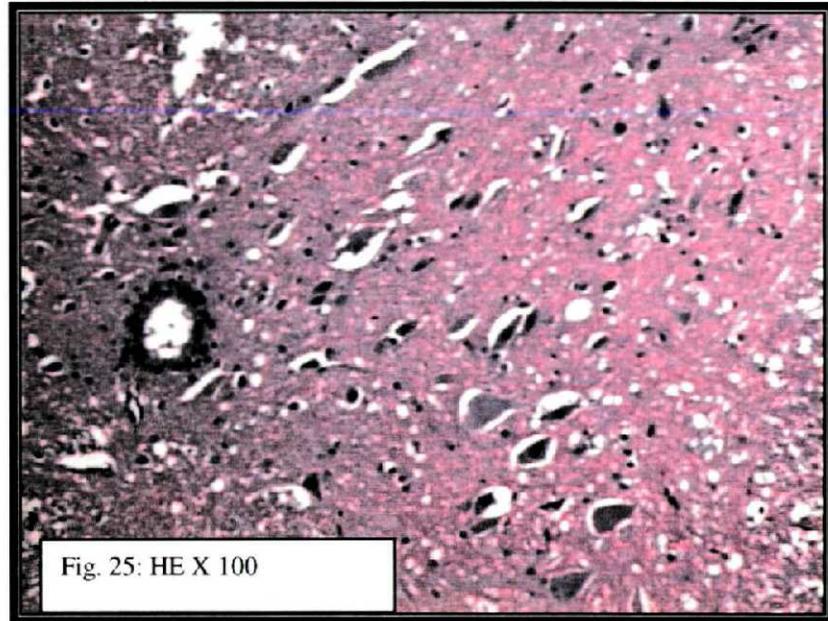
FIGURAS 21 e 22 - ASPECTO DA SUBSTÂNCIA BRANCA NORMAL NAS COLUNAS ANTERIORES



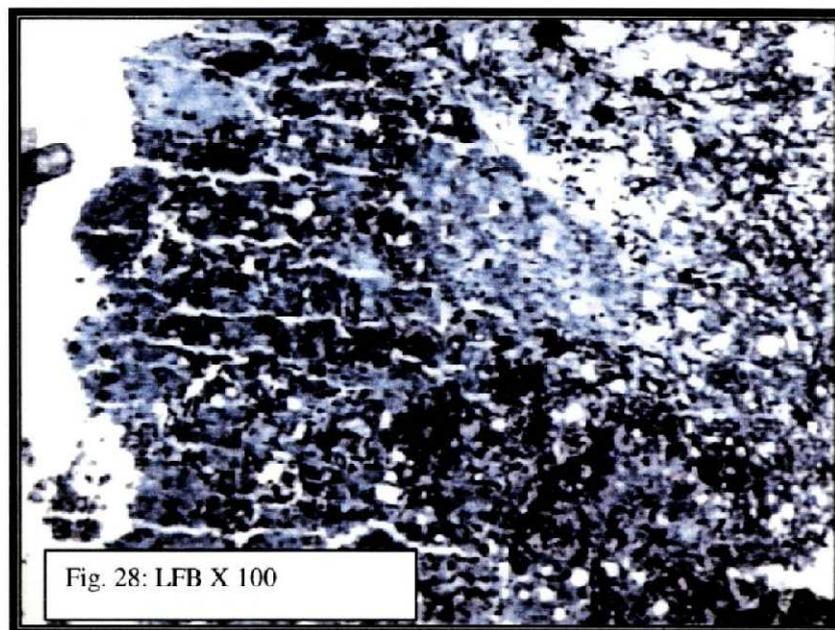
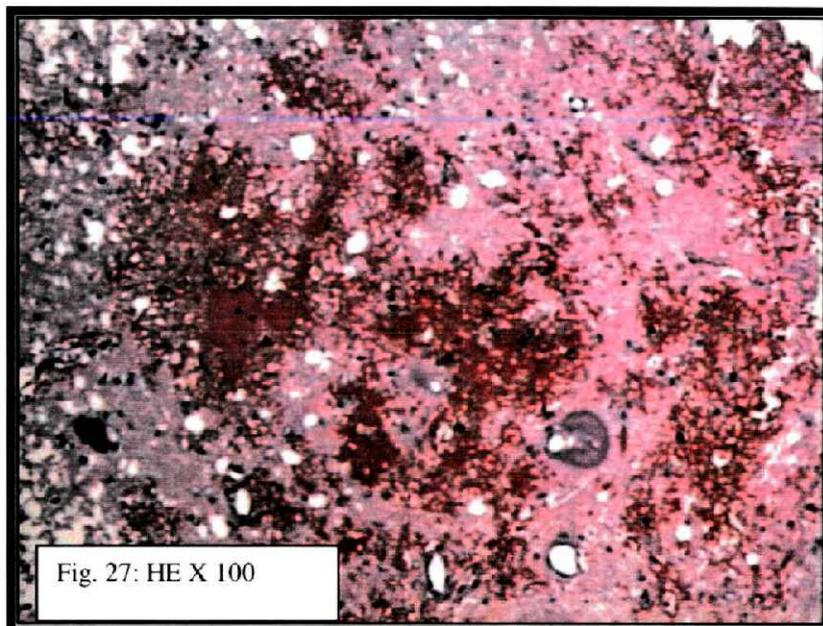
FIGURAS 23 e 24 - LESÃO ACENTUADA DA SUBSTÂNCIA BRANCA, COM NECROSE CÍSTICA, INFILTRADO INFLAMATÓRIO E ASPECTO FLOCULADO



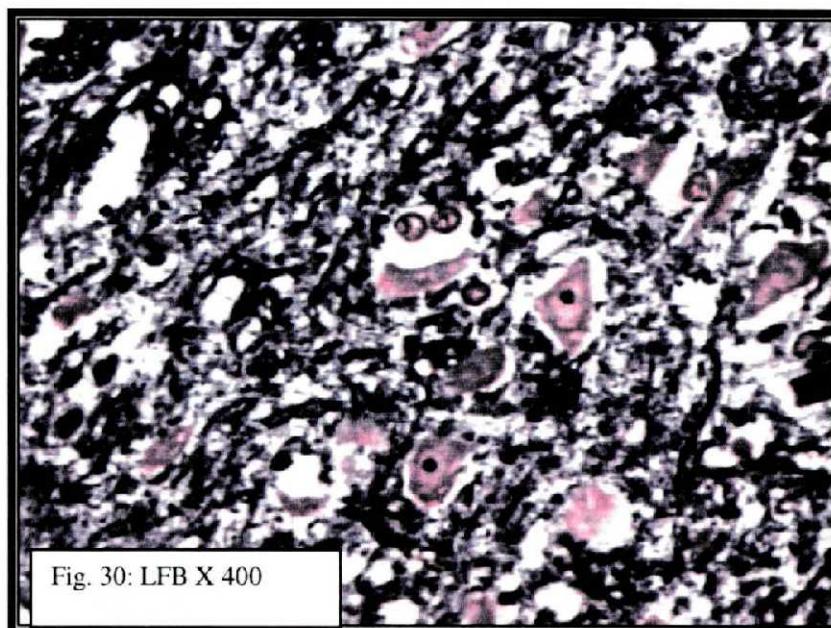
FIGURAS 25 e 26 - SUBSTÂNCIA CINZENTA NORMAL



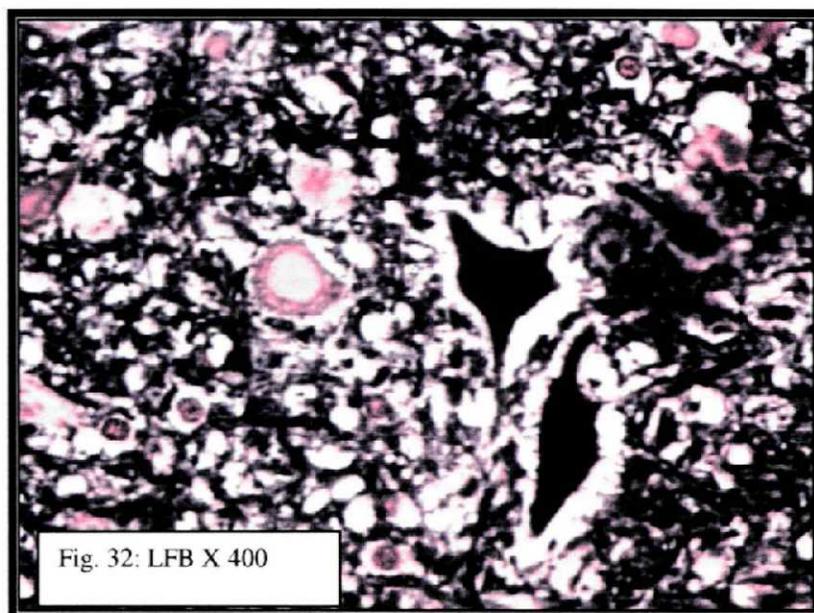
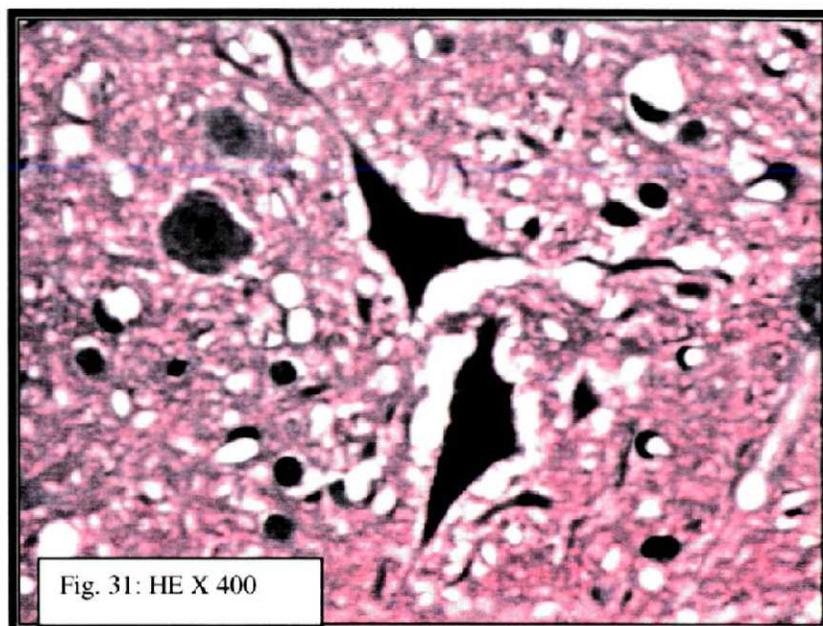
FIGURAS 27 e 28 - SUBSTÂNCIA CINZENTA COM PERDA NEURONAL E HEMORRAGIA



FIGURAS 29 e 30 - NEURÔNIO NORMAL



FIGURAS 31 e 32 - NEURÔNIOS HIPÓXICOS



5 DISCUSSÃO

Com a evolução das pesquisas sobre lesões medulares atingindo níveis que tornavam iminente a sua aplicação na prática médica, ocorreram alguns problemas que impediam a confirmação de resultados. Como os estudos eram feitos em animais, surgiu a necessidade de padronização de um método capaz de reproduzir lesões medulares semelhantes quanto ao volume de dano medular, ou área de necrose; a partir daí, os resultados terapêuticos poderiam ser comparados ou reproduzidos, testando a sua eficácia. Estes métodos de comprovada precisão, se instalados, além de diminuir o número de animais sacrificados nos estudos, permitiriam a análise mais completa dos fenômenos envolvidos na produção da lesão e na sua reparação, bem como da permanente reavaliação dos fatores envolvidos no processo de cicatrização.

As lesões medulares experimentais abertas, isto é, com exposição da medula, são as que criam as melhores condições para estudo. As lesões fechadas, produzem um sem número de fraturas da vértebra atingida cujos fragmentos alteram o curso natural da lesão medular que se pretende estudar, impedindo análises histológicas mais detalhadas. A medula exposta cirurgicamente, pode ser seccionada ou contundida. A contusão reproduz com maior fidelidade as situações reais provocadas por traumas que ocorrem com o ser humano, enquanto a secção pode implicar em alterações liquóricas que dificultam a sobrevivência do animal.

Se a padronização do método de contusão medular tornou-se uma evidente necessidade, e isto é unânime quando se consulta a literatura sobre o tema, nas publicações atuais são poucos os relatos específicos sobre detalhes técnicos do método utilizado para produzir a lesão, e as explicações, quando existem, são em geral breves.

Os aparelhos produtores de lesão medular se dividem em estáticos e dinâmicos. Os aparelhos estáticos incluem pressão com balonete inflável, cliques (tipo para aneurisma), fórceps, compressão progressiva, sendo de mais fácil execução e custo menor. Os aparelhos dinâmicos, mais complicados e caros, incluem variáveis as vezes difíceis de serem superadas mas que uma vez dominadas conseguem reproduzir com fidelidade a mesma lesão. Dentre estes aparelhos dinâmicos, se

destaca a contusão medular por queda de um peso sobre a medula, "*weight-drop technique*", como é conhecida esta técnica na literatura mundial. O aparelho utilizado nesta tese pertence a esta categoria.

Em 1993, a Sociedade Brasileira de Patologia da Coluna Vertebral, realizou em Curitiba o seu IV Congresso Nacional. A ASIA - American Spinal Injury Association, enviou alguns representantes a este Congresso, entre os quais o Dr. Wise Young, cientista da Universidade de Nova York e Diretor do Laboratório de Neurociências, o qual já havia sido visitado pelo autor. Nesta ocasião o Dr. Young divulgou experiências com a última versão, de junho de 1993, do seu modelo de impactor para lesão medular. Nesta e em outras visitas ao Dr. Young no seu laboratório, observando as experiências por ele realizadas, é que nasceu a idéia de implantar uma linha de pesquisa no Brasil baseado nos métodos lá utilizados.

O Dr. Young é ainda, coordenador do "Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study - MASCIS " Estudo Multicêntrico de Lesões Medulares em Animal, do qual participam laboratórios das seguintes universidades americanas : New York, Ohio State, Florida (Gainesville), A. I. duPont Institute, Georgetown, Califórnia (San Francisco), Washington, Miami e Yale. Estes centros utilizam o mesmo modelo e examinam 1600 ratos anualmente, submetendo-os a 3 graus padronizados de LMT e aplicam diversas medicações em horários regulares por 48 horas (fase aguda, para estudos da fisiopatologia) ou 6 semanas (fase crônica, para estudos terapêuticos).

O aparelho que produz a contusão medular do MASCIS é o mesmo aqui utilizado, sendo construído especialmente para nós e aferido em 07/03/97 ; vem com valores calculados especificamente para ele registrados no programa de computador que o acompanha. Foi originalmente desenvolvido por John Gruner, PhD., do Departamento de Farmacologia Experimental da Cephalon Incorporation, Wise Young, M.D., PhD., então diretor do Laboratório de Neurociências da New York University (NYU) Medical Center e agora na Rutgers University, e por Carl Mason, do Centro de Pesquisas e Engenharia da Reabilitação da Veterans Administration, com recursos oriundos do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos. A construção é artesanal, por funcionários da própria universidade e é chamado, junto com o Software, de "NYU Spinal Cord Contusion System" - Sistema NYU de Contusão Medular - por nós chamado de impactor NYU ou simplesmente impactor.

As modificações que foram sendo efetuadas com o seu uso, incorporando exigências e conquistas tecnológicas, transformaram este impactor em um instrumento sofisticado e de altíssima precisão. Para introduzi-lo em nosso meio, e adaptá-lo às nossas condições de pesquisa científica, procurando atingir o mesmo padrão do laboratório original foram encontradas algumas dificuldades dignas de menção.

De início, pode-se destacar a instalação do *software* e o seu manuseio e compreensão; embora preparado especialmente para ele, a leitura de um manual desta área por parte de médicos é sempre difícil. Foi necessário contar com a colaboração de um engenheiro eletrônico com especialização em informática para que os primeiros passos pudessem ser dados. Desta forma pode-se acompanhar a instalação da placa no computador e realizar os testes de funcionamento do *software*, entendendo melhor suas características e funções. Ao ser acoplado ao aparelho impactor, foi também a presença deste técnico que tornou possível a aferição inicial e a leitura dos gráficos. Mas uma vez dominados os processos de aquisição e registro de dados, não existiram complicações decorrentes da sua utilização quando feita adequadamente.

A principal dificuldade esteve relacionada com testes necessários para ajustar os parâmetros de altura, tempo e velocidade de forma a partirmos sempre, em cada experimento, ou em sua reprodução, de parâmetros iguais. Os passos envolvendo o levantamento da haste e liberação do peso foram os mais cruciais. O procedimento é muito confiável quando realizado adequadamente. Entretanto, ele requer alguma prática e aderência estrita aos passos descritos. Não se deve descuidar das etapas recomendadas; alguns segundos extras de cuidados e atenção podem salvar horas de desperdício com preparação do animal.

Mais de 50 espécimes foram utilizados até que fosse obtidas a reprodução dos testes dentro destas exigências. Como já foi mencionado na descrição do *software*, o computador é quem registra estes dados e alerta caso os valores encontrados excedam a margem de erro; como a altura pode ser estabelecida ao iniciar a experiência, e é um item que se pode escolher entre as três alturas para as quais o aparelho está preparado, as variações ocorriam sempre com a velocidade e o tempo de queda do peso. O tempo decorrido entre o início da queda e o impacto depende da velocidade com que ele cai, fazendo com que a

velocidade seja o fator mais importante de erro. Justamente aí, residuiu o erro mais comum que inutilizou grande parte dos testes, até que se percebesse que qualquer aumento do atrito entre o peso e a haste alterava esta velocidade; a limpeza da haste de deslizamento com álcool antes ou após cada teste corrigiu este problema, mas o número de ratos utilizados para que isto fosse percebido foi sem dúvida um exagero. A cada teste, portanto, era preciso desmontar a haste para remover pequenos resíduos, especialmente de sangue, que poderiam por a perder todo o preparo do animal a ser testado, como aconteceu até então.

Outra dificuldade encontrada foi na manutenção da altura do animal no aparelho, antes de receber o impacto. Sabia-se que devia estar a 8 centímetros da base e fixado pelas garras presas nas apófises espinhosas; estas, nos animais menores, são frágeis e se rompiam com facilidade. Além disso, ao receber o impacto, havia uma curvatura produzida na coluna, que se deformava muito se o animal cedia exageradamente ao peso ou se desprendia das garras de fixação; o melhor apoio encontrado foi um bloco de espuma densa sob o tórax.

Com a prática, prender os grampos vertebrais e os 10 itens do procedimento do impacto levavam cerca de 5 minutos. A laminectomia devia ser feita fora do aparelho (em uma mesa aquecida). Evitava-se machucar os locais usados para o grampeamento vertebral. Uma vez que o tempo é tão curto, o animal e a medula não esfriavam. Por isso, nenhum dispositivo de aquecimento era necessário no próprio aparelho.

Os procedimentos que envolveram o manuseio do rato não apresentaram problemas diferentes do que se costuma encontrar com este tipo de animal; sendo a lesão medular uma agressão extrema, alguns espécimes morreram nos experimentos iniciais. Nos últimos testes, o tempo total de anestesia, exposição da medula, transferência para o aparelho, impacção e sutura, para cada animal, foi de 20 minutos, abreviando a manipulação do animal, e certamente colaborando para a baixa mortalidade na fase final dos testes. A participação de cinco pessoas interessadas neste modelo, que foram adquirindo experiência com o número crescente de casos, foi fundamental para que estes resultados fossem conseguidos; também a habilidade no manuseio dos pequenos instrumentos para a laminectomia, facilitada pelo uso do microscópio, foi importante neste sentido. Com a maior rapidez no preparo do animal, foi possível trabalhar em série, isto é, um assistente fazendo a

pesagem, a anestesia e a tricotomia, outro procedendo ao ato cirúrgico, e um terceiro adaptando o rato ao aparelho e efetuando a impacção. Esta "linha de produção" mostrou-se extremamente interessante para o planejamento da atividade no laboratório; pode-se prever quantos animais e quanto tempo levaria para completar os testes programados para determinado dia. Levando em conta que é necessário o exame da medula lesada após 48 horas, para permitir a ocorrência dos fenômenos secundários pós-traumáticos, o planejamento acima citado nos permitiu programar o retorno ao laboratório para o sacrifício do animal em um horário estabelecido antecipadamente para cada espécime. Algumas surpresas ocorreram no início dos testes, com óbitos provocados por doses anestésicas equivocadas e óbitos dentro das 48 horas; como não se repetiram no decorrer do trabalho, considerou-se que a melhor qualidade do procedimento foi o fator que propiciou a solução para este problema.

No que diz respeito ao sacrifício do animal e à extração da medula, o protocolo pôde ser seguido sem complicações, bem como quanto ao acondicionamento e congelamento da peça. Mas quando se decidiu enviar algumas amostras para o Laboratório da Universidade Rutgers (New Jersey, USA), o seu transporte transformou-se numa epopéia. Em primeiro lugar pela recusa das companhias transportadoras em enviar material perecível, e em segundo porque quem concordou em transportar não o fez em prazo hábil, deixando o material descongelar e entrar em decomposição, chegando ao destino em estado de putrefação. Mesmo com acondicionamento adequado, congelação mantida com "gelo seco" em recipiente apropriado, não foi possível agilizar o transporte. A solução encontrada foi reunir um certo número de espécimes e encaminhar em mãos, através de um dos membros da equipe envolvida no trabalho. Estes primeiros espécimes e *softwares* examinados trouxeram valiosas informações para aprimorar a técnica empregada e a certeza de que se trilhava o caminho certo; foram de inestimável ajuda para aprimorar o treinamento de quatro membros da equipe envolvidos com a pesquisa, que realizaram estágio nos laboratórios da New York University e da Rutgers University.

Como já foi comentado anteriormente, havia a necessidade de saber se o método de produção de lesão medular utilizado, uma vez bem ajustado, seria capaz de produzir uma padronização, sem a qual as futuras pesquisas sobre formas de

tratamento ficariam prejudicadas. Para ter certeza de que as medulas lesadas apresentavam uma uniformidade quanto ao grau de lesão sofrido, seria necessário um estudo histológico da área lesada. Como não existia, em nosso meio, nenhuma metodologia disponível ou conhecida para esta finalidade, buscou-se na literatura e na experiência de outros centros, uma metodologia aplicável ao nosso objetivo. Decidiu-se utilizar o método de avaliação histológica quantitativa proposto por Black e colaboradores, por já ter sido aplicado em estudos de animais submetidos à contusão medular por impactores semelhantes ao do autor. Mas isto implicou na motivação de um grupo de patologistas que precisaram, por sua vez, desenvolver e adaptar uma tecnologia para conseguir realizar a análise histológica. A necessidade de ter um outro grupo de trabalho envolvido, trouxe também as dificuldades naturais de conjugar horários e esforços, prolongando o tempo deste estudo. Por outro lado, criou o interesse nos patologistas dos Departamentos de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná e da Pontifícia Universidade Católica do Paraná por esta linha de pesquisa. Isto já resultou na produção de trabalhos para a área da patologia divulgando esta forma de análise histológica, que também foi introduzida em nosso meio como um desdobramento desta tese.

A confecção das lâminas a partir dos cortes seguiu o método habitual, e a escolha dos corantes hematoxilina-eosina (HE) e luxol *fast blue* (LFB) teve razões técnicas, segundo Luna, do Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas. A coloração por HE é relativamente simples e facilmente reprodutível, da qual se obtém núcleos corados em azul, com algum grau de metacromasia, e citoplasma em várias nuances de vermelho, permitindo a identificação dos diferentes componentes tissulares. A técnica de LFB é o método histoquímico de escolha para a demonstração de mielina, baseando-se na forte afinidade do corante ftalocianina de cobre por fosfolipídes e colina, corando a substância branca em azul.

Foram realizadas e anotadas 15.744 observações a partir das lâminas obtidas após o sacrifício de 20 dos 30 animais; o motivo de não se realizar estes estudos histológicos nos 10 animais restantes foi pelo aumento espantoso de trabalho que isto acarretaria para o laboratório de patologia e também porque os 20 primeiros resultados foram considerados suficientes para a confirmação que se buscava. Estas análises representaram um considerável esforço para os

patologistas, mas ofereceram os elementos necessários para comprovar a padronização da lesão medular após a impacção, objetivo principal do autor.

Desta análise histológica percebeu-se que os dois parâmetros mais importantes para determinar a padronização da lesão foram a perda neuronal e o dano à substância branca, na área da impacção. A sua presença de maneira uniforme constituiu-se no mais importante dado para a comprovação da confiabilidade e da sua reprodutibilidade, visto que diversos pesquisadores produziram as impacções ou estiveram envolvidos em alguma de suas etapas, sem que a análise histológica fosse por isso alterada. A hemorragia e a hipoxia não puderam ser utilizadas como elementos conclusivos. A hipoxia neuronal, em estudos paralelos desenvolvidos, foi importante para determinar o agravamento da lesão ao longo das horas pós-trauma, mas como o objetivo era estudar as alterações nas 48 horas, já não havia neurônios viáveis onde este critério pudesse ser utilizado. A sua presença no grupo controle pode ser atribuída à manipulação necessária para o sacrifício (infusão intraventricular de solução de formaldeído). A hemorragia, embora presente, não o era de forma sistemática, sendo a sua presença bastante irregular quanto à intensidade e localização nas 9 zonas estudadas, impedindo o seu emprego para comprovar uma padronização.

O que mais chamou a atenção nestas avaliações histológicas foi o fato de poder-se verificar a progressão da lesão pós-trauma, isto é, a continuidade do processo secundário de degeneração neuronal. Embora esta alteração fosse conhecida, reproduzi-la nos experimentos enfatizou para a equipe envolvida, a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que possam produzir medicamentos para conter ou evitar este dano neurológico secundário.

Também merece citação o fato de observar-se, ao seguir a recomendação do protocolo de exame visceral ao sacrificar o rato, a existência de hematúria em todos os animais. Como foi mencionado antes, o rato paralisado não conseguia urinar, sendo necessário comprimir a bexiga durante o prazo de 48 horas até sacrificá-lo. Apesar das complicações urinárias serem bastante comuns no lesado medular e a sua prevenção fazer parte da rotina, não deixou de surpreender a freqüência e a precocidade deste envolvimento nos animais, o que motivou a fazer um estudo simultâneo sobre esta complicação. Certamente quando for iniciada, após a aprovação deste modelo, a fase de pesquisas de tratamentos medulares, o que

implica em manter o animal vivo por trinta dias pós-lesão, a infecção urinária terá que ser combatida de início com o uso de antibioticoterapia apropriada.

Inúmeras outras observações foram feitas durante a realização destes experimentos, como a hipotermia pós-contusão, alterações no tegumento, progressão do dano neuronal ao longo das 8 primeiras horas, que fogem do objetivo final desta tese e não devem ser aqui discutidas, mas cabe a sua menção porque deram origem ao desenvolvimento de outros estudos que estão sendo publicados ou apresentados em congressos.

Na atual fase de desenvolvimento desta linha de pesquisa, pode-se dizer que não há mais nenhuma dificuldade em produzir e reproduzir, através deste método, lesões medulares traumáticas de igual intensidade; a padronização da lesão e a estandardização do método permitiram criar uma linha de pesquisa de ampla utilização tanto na área de lesão medular como na do estudo das complicações associadas que ocorrem freqüentemente em outros órgãos. Na prática, isto resultou na fundação de um Laboratório de Estudos de Lesão Medular e Trauma Experimental no Hospital Universitário Cajuru, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde estão sendo estudados todos os fatores envolvidos na lesão medular traumática, bem como as alterações produzidas por ela em outros sistemas.

6 CONCLUSÕES

Ao terminar esta pesquisa, o autor pôde concluir que:

1. Foi possível implantar uma tecnologia de ponta, não existente em nosso meio, para a instalação de um modelo de produção de lesão medular traumática em pequenos animais, através da contusão por impacção.

2. Conseguiu-se produzir lesões padronizadas, que mostraram alterações idênticas quanto a perda neuronal e dano à substância branca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A.R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of the spinal column. **American Medical Association**, v. LVII, n.9, p.878-880, 1911.

BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Exp. Neurology**, n.139, p.244-256, 1996.

BLACK, P.; MARKOWITZ, R.S.; COOPER, V.; MECHANIC, A.; KUSHNER, H.; DAMJANOV, I.; FINKELSTEIN, S.; WACHS, K.C. Models of Spinal Cord Injury. **Neurosurgery**, v.19, n.5, p.752-762, 1986.

BRACKEN, M.B. et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. **N. Engl. J. Med.**, v.322, p.1405 – 1411, 1990.

BRESNAHAN, J.C.; BEATTIE, M.S.; TODD III, F.D.; and NOYES, D.H. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. **Exp. Neurol.**, n.95, p.548 – 570, 1987.

CONSTANTINI, S.; YOUNG, W. The effects of methylprednisolone and ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. **J. Neurosurg**, n. 80, p.97–111, 1994.

DUCKER, T.B.; KINDT, G.W.; and KEMPE, L.G. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. **J. Neurosurg.**, n.35, p.700-708, 1971.

EIDELBERG, E.; STATEN, E.; WATKINS, J.C.; MCGRAW, D.; and MCFADDEN. A model of spinal cord injury. **Surg. Neurol.**, v. 06, p. 35–38, 1976.

FALCONER, J.C.; NARAYANA, P.A.; BHATTACHARJEE, M.B.; and LIU, S.J. Quantitative MRI of spinal cord injury in a rat model. **Mag. Res. Med.**, n.32, p.484–491, 1994.

FALCONER, J.C.; PONNADA, A.; NARAYANA, P.A.; BHATTACHARJEE, M.B.; and LIU, S.J. Characterization of an experimental spinal cord injury model using waveform and morphometric analysis. **Spine**, v.21, n.1, p.104-112, 1996.

GALE, K.; KERASIDES, H.; and WRATHALL, J.R. Spinal cord contusion in the rat: Behavioral analysis of functional neurological impairment. **Exp. Neurol.**, n.88, p.123-134, 1985.

HUNG, T.; ALBIN, M.S.; BROWN, T.D.; BUNEGIN, B.S.; ALBIN, R.; and JANNETTA, J. Biomechanical responses to open experimental spinal cord injury. **Surg. Neurol.**, v.04, p.271-276, 1975.

KOOZEKANANI, S.H.; VISE, W.M.; HASHEMI, R.M.; and MCGHEE, R. Possible mechanisms for observed pathophysiological variability in experimental spinal cord injury by the method of Allen. **J.Neurosurg.**, v.44, p.429–434, 1976.

KUHN, P.L.; WRATHALL, J.R. A mouse model of graded contusive spinal cord injury. **J. of Neurotrauma**, v.15, n.2, p.125-140, 1998.

KWO, S.; YOUNG, W.; DECRESCITO, V. Spinal cord sodium, potassium, calcium, and water concentration changes in rats after graded contusion injury. **J.of Neurotrauma**, v.6, p.13–24, 1989.

LOU, J.; LENKE, L.G.; XU, F.; and O'BRIEN, M. In vivo Bcl-2 oncogene neuronal expression in the rat spinal cord. **Spine**, v.23, n.5, p.517-523, 1998.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3rd ed., American Registry of Pathology, McGraw Hill Publishers, New York, 1960.

NOBLE, L.J.; WRATHALL, J.R. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. **Exp. Neurol.** n.95, p.530–533, 1987.

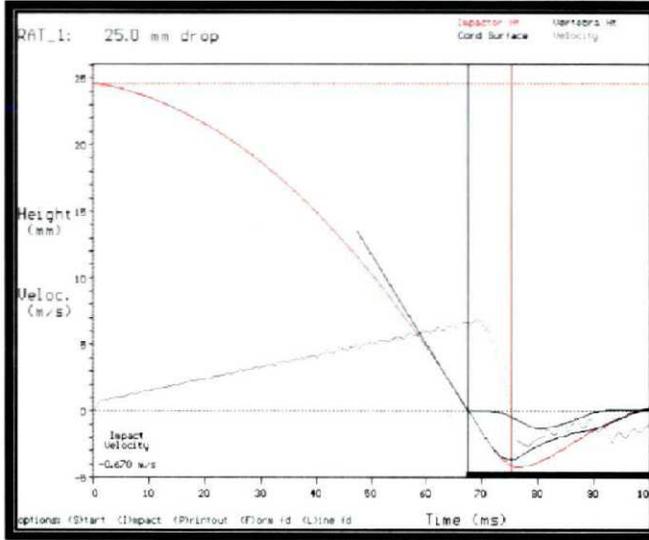
NOBLE, L.J.; WRATHALL, J.R. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. **Exp. Neurol.**, n.88, p.135–149, 1985.

RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. **Surg. Neurol.**, v.10, p.39–43, 1978.

WRATHALL, J.R.; PETEGREW, R.K.; HARVEY F. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups. **Exp. Neurol.**, v.88, p.108-122, 1985.

ANEXO 1

Registros gráficos da impacção



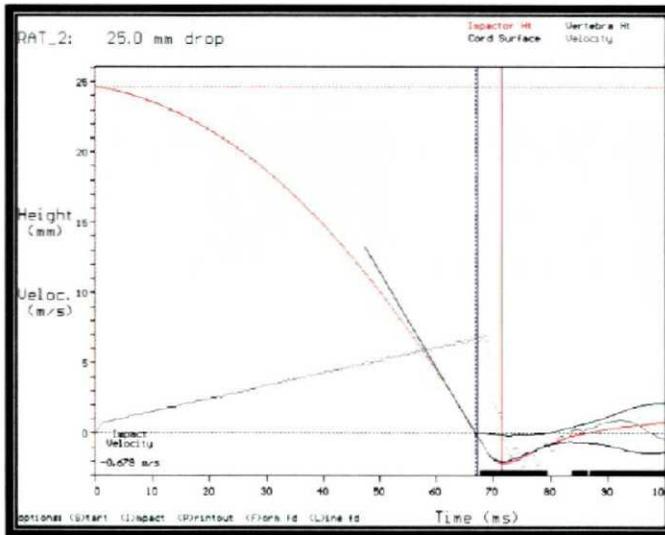
RAT_1 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6700	-0.005	67.472
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6700	-0.005	67.472
Cord_Rev	7538	-4.205	75.911
Vert_Rev	7929	-1.273	79.849
Crd-Surf_Rev	7467	-3.667	75.196
Compression		3.662	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.668	-0.670	67.462
Error :	0.233	0.030	-3.930
Error (%):	0.9	4.3	5.505



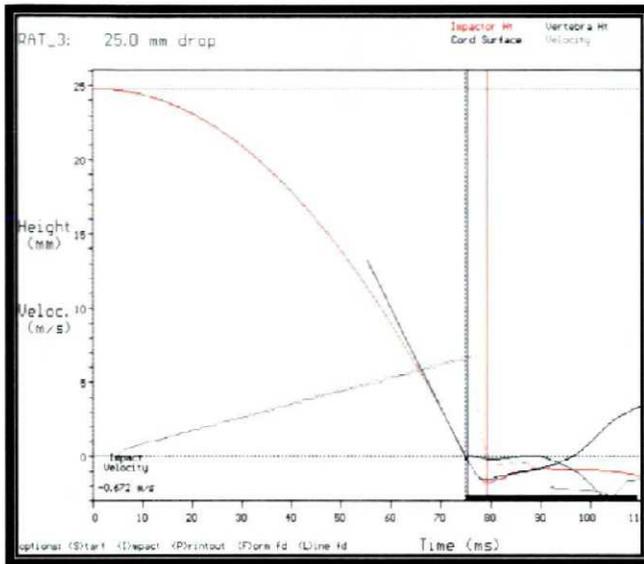
RAT_2 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6639	-0.005	66.858
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6663	-0.165	67.100
Cord_Rev	7099	-2.200	71.490
Vert_Rev	7175	-0.168	72.256
Crd-Surf_Rev	7099	-2.052	71.490
Compression		1.887	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.828	-0.676	67.090
Error :	0.073	0.024	



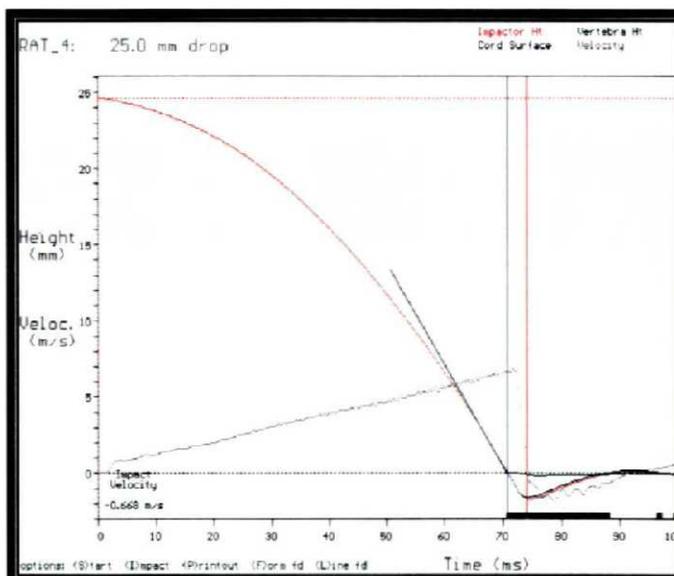
RAT_3 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7440	-0.005	74.924
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	7484	-0.305	75.368
Cord_Rev	7869	-1.800	79.245
Vert_Rev	9470	-0.742	95.368
Crd-Surf_Rev	7869	-1.613	79.245
Compression		1.308	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.127	-0.672	75.358
Error :	-0.225	0.028	3.965
Error (%):	0.9	4.0	5.554



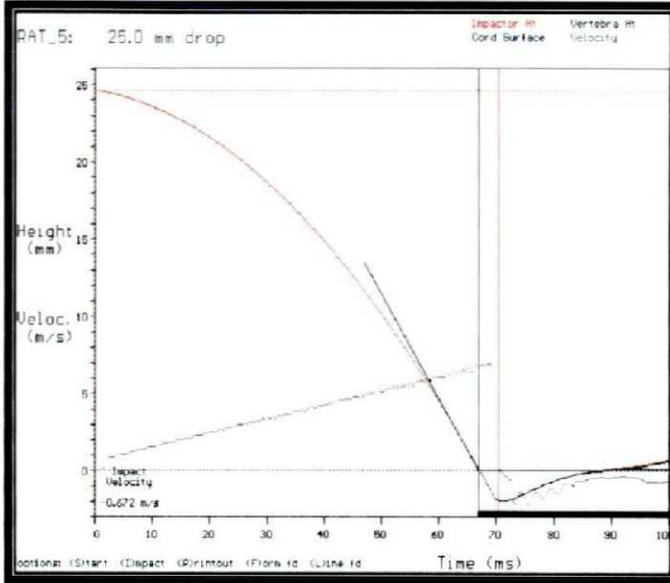
RAT_4 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7023	-0.005	70.583
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	7025	-0.018	70.603
Cord_Rev	7357	-1.720	73.940
Vert_Rev	7485	-0.168	75.226
Crd-Surf_Rev	7357	-1.628	73.940
Compression		1.610	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.682	-0.668	70.593
Error :	0.220	0.032	-0.799
Error (%):	0.9	4.6	1.119



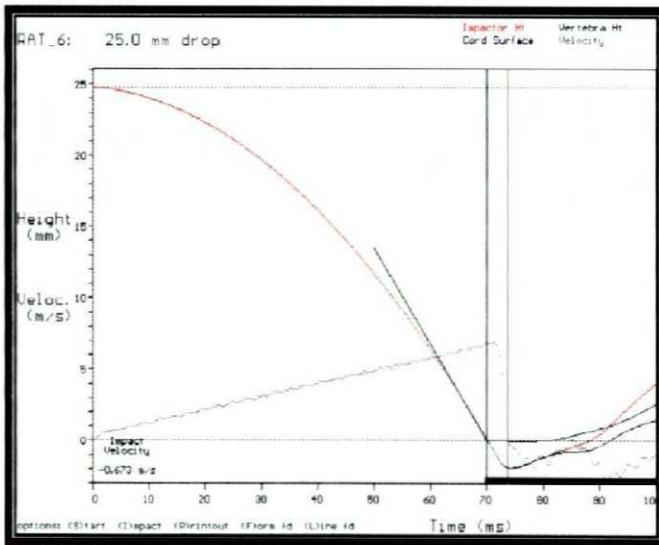
RAT_5 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6652	-0.005	56.922
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6643	0.055	66.831
Cord_Rev	6986	-1.960	70.282
Vert_Rev	6643	0.000	56.831
Crd-Surf_Rev	6986	-1.962	70.282
Compression		2.017	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.608	-0.672	56.821
Error :	0.293	0.028	-4.571
Error (%):	1.2	4.0	6.403



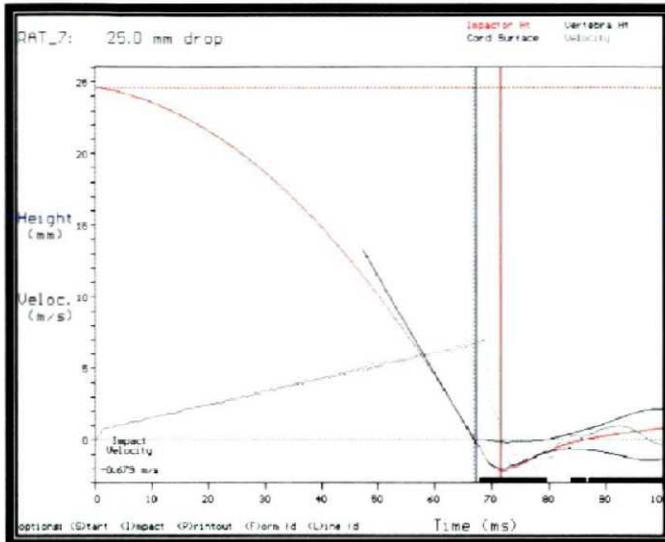
RAT_6 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6961	-0.005	69.960
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	6960	0.002	69.950
Cord_Rev	7334	-1.960	73.709
Vert_Rev	7581	-0.073	76.191
Crd-Surf_Rev	7334	-1.950	73.709
Compression		1.952	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.820	-0.673	69.940
Error :	0.082	0.027	-1.452
Error (%):	0.3	3.9	2.034



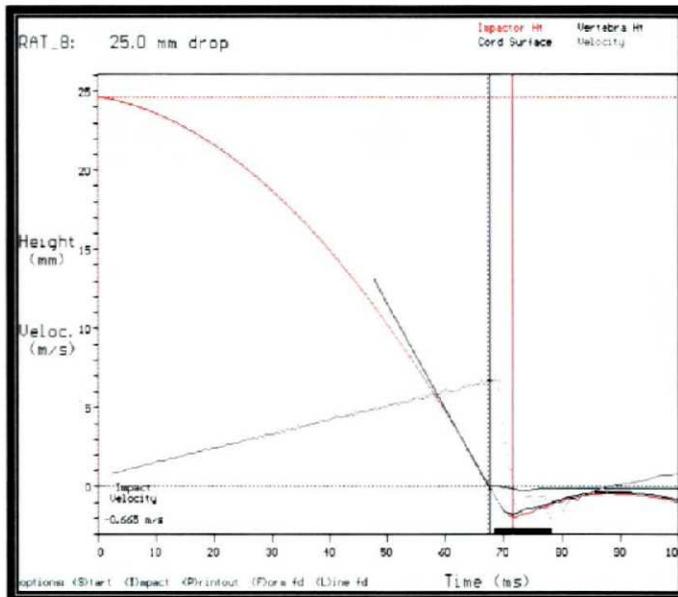
RAT_7 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6639	-0.005	66.858
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6677	-0.265	67.241
Cord_Rev	7099	-2.200	71.490
Vert_Rev	7175	-0.168	72.256
Crd-Surf_Rev	7099	-2.052	71.490
Compression		1.787	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.928	-0.679	67.231
Error :	-0.027	0.021	-4.162
Error (%) :	0.1	3.0	5.829



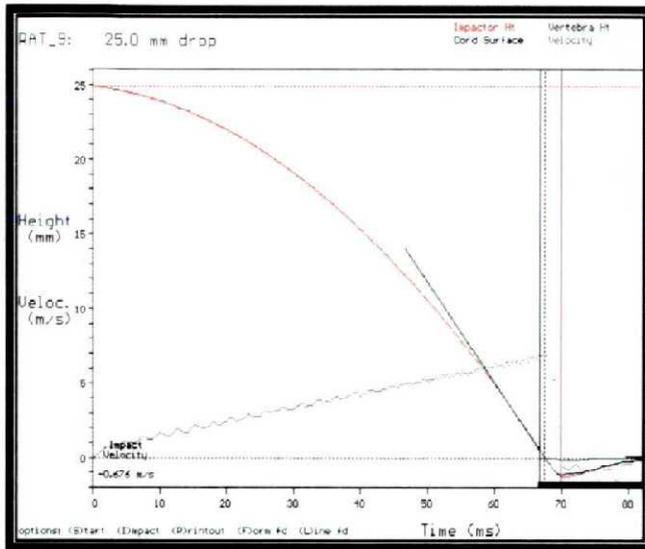
RAT_8 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6552	-0.005	67.338
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6566	-0.098	67.482
Cord_Rev	6958	-1.960	71.511
Vert_Rev	7131	-0.288	73.289
Crd-Surf_Rev	6957	-1.787	71.501
Compression		1.688	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.762	-0.666	67.472
Error :	0.140	0.035	-3.920
Error (%) :	0.6	5.0	5.491



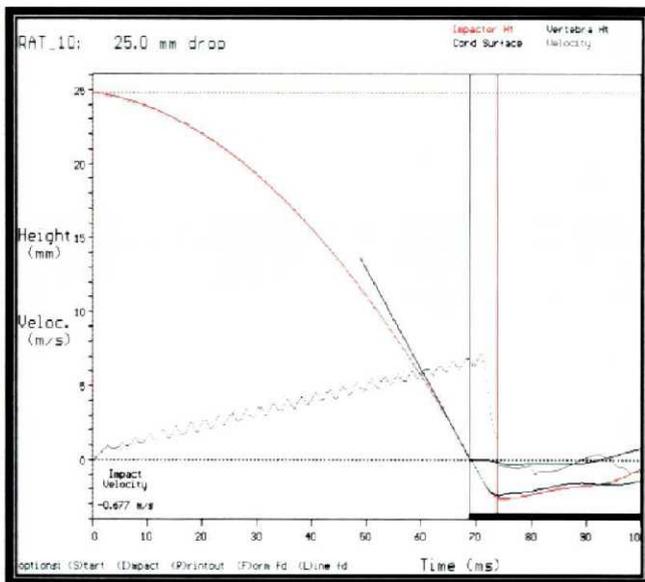
RAT_9 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	16379	0.000	67.403
Drop start	1	24.902	0.004
Impact	16202	0.495	66.675
Cord_Rev	17000	-1.320	69.959
Vert_Rev	17131	-0.192	70.498
Crd-Surf_Rev	17000	-1.168	69.959
Compression		1.663	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.407	-0.676	66.671
Error :	0.495	0.024	-4.721
Error (%) :	2.0	3.4	6.613



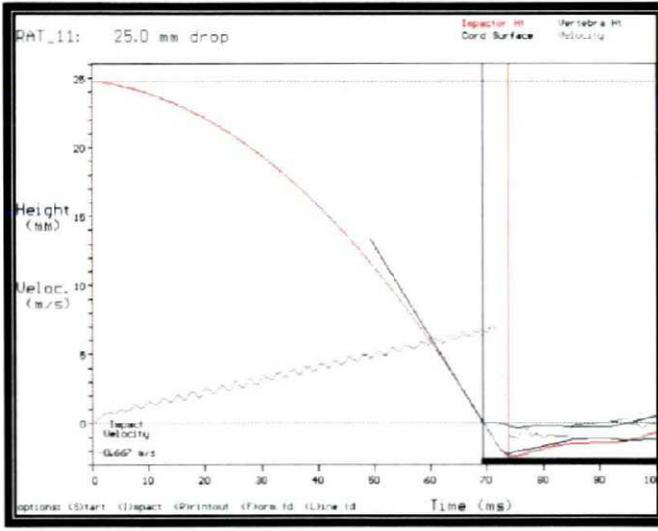
RAT_10 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6856	-0.005	68.905
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	6846	0.062	68.804
Cord_Rev	7352	-2.602	73.889
Vert_Rev	7562	-0.325	76.000
Crd-Surf_Rev	7352	-2.418	73.889
Compression		2.480	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.760	-0.677	68.794
Error :	0.142	0.023	-2.598
Error (%) :	0.6	3.3	3.639



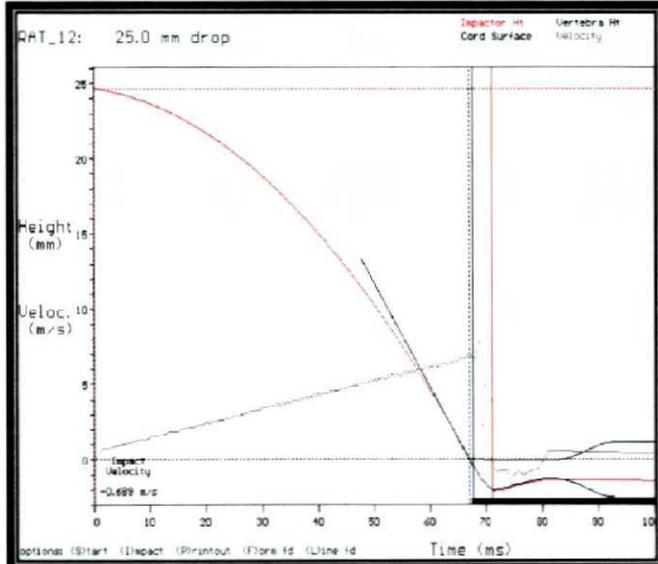
RAT_11 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6875	-0.005	69.235
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	6871	0.022	69.194
Cord_Rev	7332	-2.440	73.837
Vert_Rev	7475	-0.335	75.277
Crd-Surf_Rev	7330	-2.223	73.817
Compression		2.245	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.800	-0.667	69.184
Error :	0.102	0.033	-2.208
Error (%) :	0.4	4.7	3.093



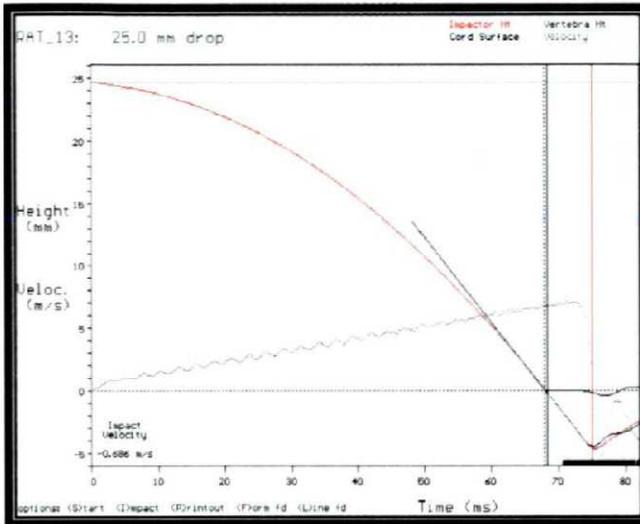
RAT_12 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6712	-0.005	66.919
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6785	-0.505	67.647
Cord_Rev	7118	-2.120	70.967
Vert_Rev	7227	-0.083	72.054
Crd-Surf_Rev	7118	-2.080	70.967
Compression		1.575	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.168	-0.689	67.637
Error :	-0.267	0.011	-3.755
Error (%) :	1.1	1.6	5.260



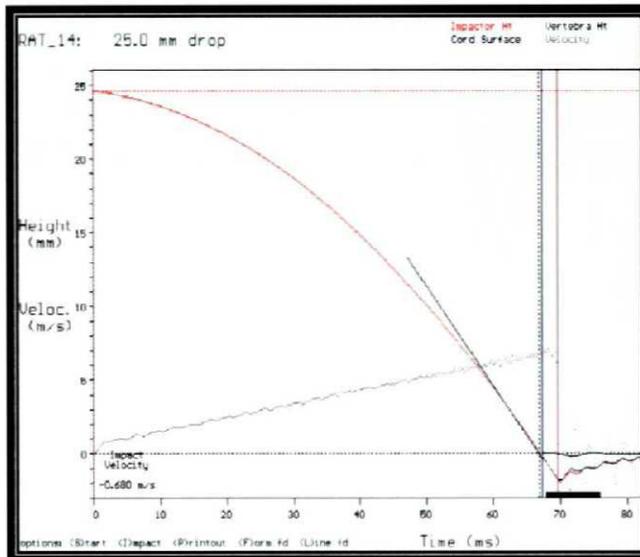
RAT_13 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	16483	-0.002	67.915
Drop start	1	24.663	0.004
Impact	16491	-0.023	67.948
Cord_Rev	18205	-4.687	75.010
Vert_Rev	18613	-0.445	76.691
Crd-Surf_Rev	18202	-4.498	74.998
Compression		4.475	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.687	-0.681	67.944
Error :	0.215	0.019	-3.448
Error (%) :	0.9	2.7	4.830



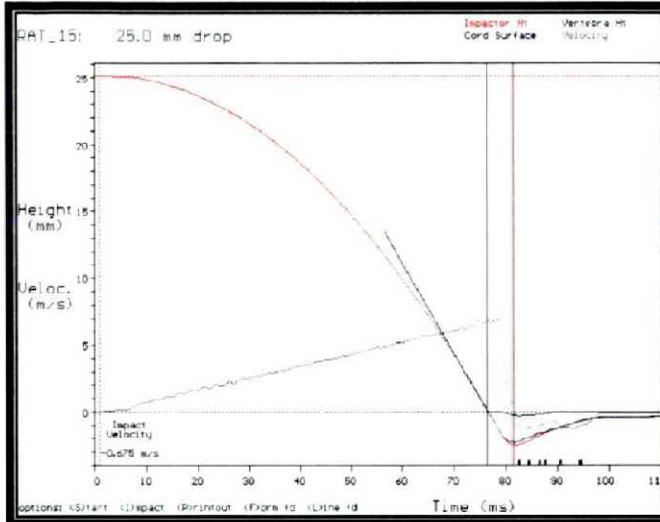
RAT_14 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	16239	-0.002	66.827
Drop start	1	24.663	0.004
Impact	16285	-0.128	67.016
Cord_Rev	16927	-1.880	69.658
Vert_Rev	17358	-0.205	71.432
Crd-Surf_Rev	16927	-1.843	69.658
Compression		1.715	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.792	-0.674	67.012
Error :	0.110	0.026	-4.380
Error (%) :	0.4	3.7	6.135



RAT_15 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

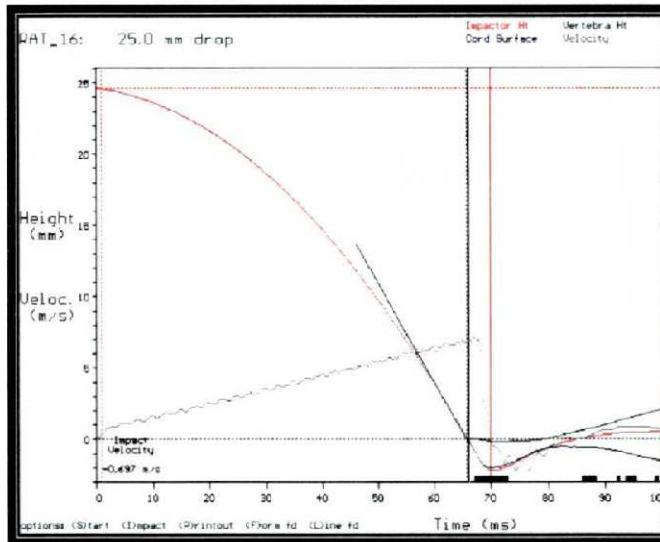
Basic Impact Parameters

(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7514	-0.003	76.600
Drop start	93	25.128	0.936
Impact	7614	-0.003	76.600
Cord_Rev	8122	-2.520	81.710
Vert_Rev	8199	-0.288	82.485
Crd-Surf_Rev	8122	-2.258	81.710
Compression		2.255	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.132	-0.675	75.664
Error :	-0.230	0.025	4.272
Error (%) :	0.9	3.6	5.984



RAT_16 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

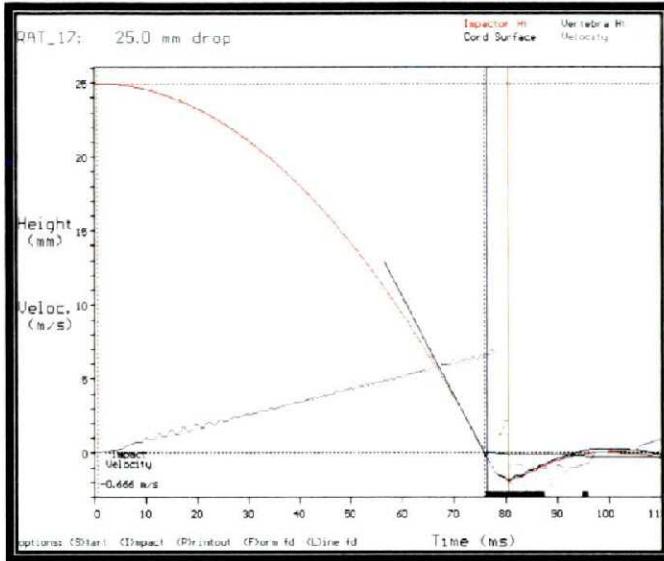
Basic Impact Parameters

(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6532	-0.005	65.714
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6613	-0.577	66.529
Cord_Rev	6955	-2.200	69.970
Vert_Rev	7022	-0.203	70.644
Crd-Surf_Rev	6955	-2.035	69.970
Compression		1.458	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.240	-0.700	66.519
Error :	-0.338	0.000	-4.873
Error (%) :	1.4	0.1	6.826



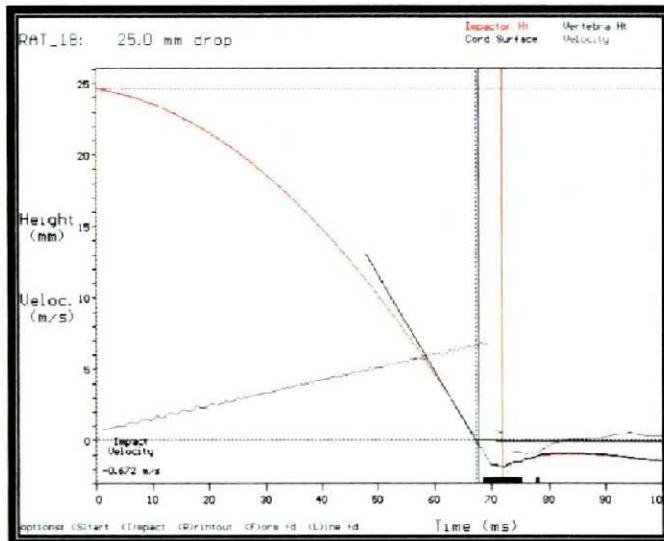
RAT 17 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7552	-0.005	75.899
Drop start	53	24.972	0.533
Impact	7614	-0.418	76.523
Cord_Rev	8015	-1.960	80.553
Vert_Rev	9582	-0.253	96.302
Crd-Surf_Rev	8015	-1.857	80.553
Compression		1.438	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.390	-0.666	75.990
Error :	-0.488	0.034	4.598
Error (%):	2.0	4.9	6.440



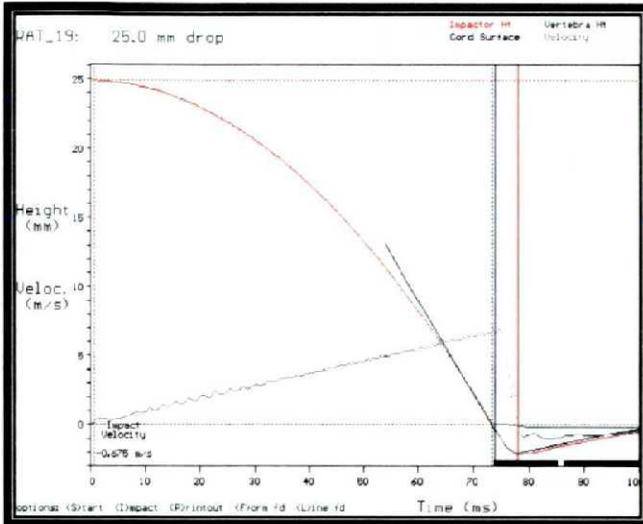
RAT 18 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6680	-0.005	67.203
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6741	-0.412	67.817
Cord_Rev	7151	-1.880	71.942
Vert_Rev	7907	-0.085	79.547
Crd-Surf_Rev	7151	-1.842	71.942
Compression		1.430	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.075	-0.672	67.807
Error :	-0.173	0.028	-3.585
Error (%):	0.7	4.0	5.022



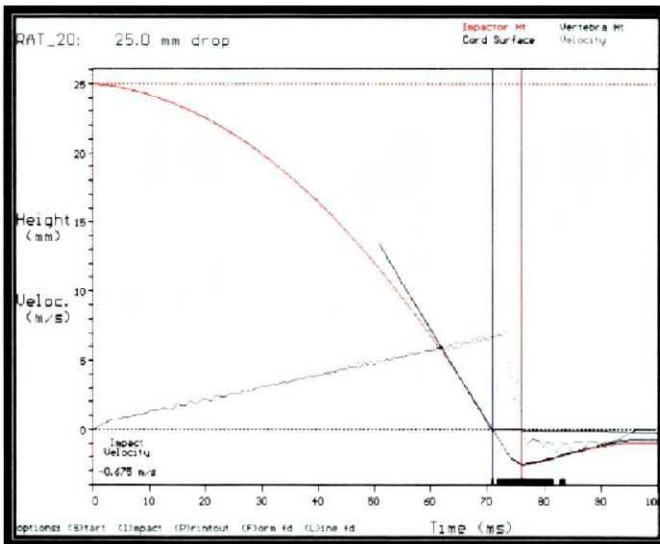
RAT_19 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7289	-0.003	73.256
Drop start	62	24.938	0.623
Impact	7356	-0.458	73.930
Cord_Rev	7757	-2.200	77.960
Vert_Rev	9259	-0.195	93.055
Crd-Surf_Rev	7755	-2.105	77.940
Compression		1.647	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.397	-0.675	73.307
Error :	-0.495	0.025	1.914
Error (%) :	2.0	3.6	2.681



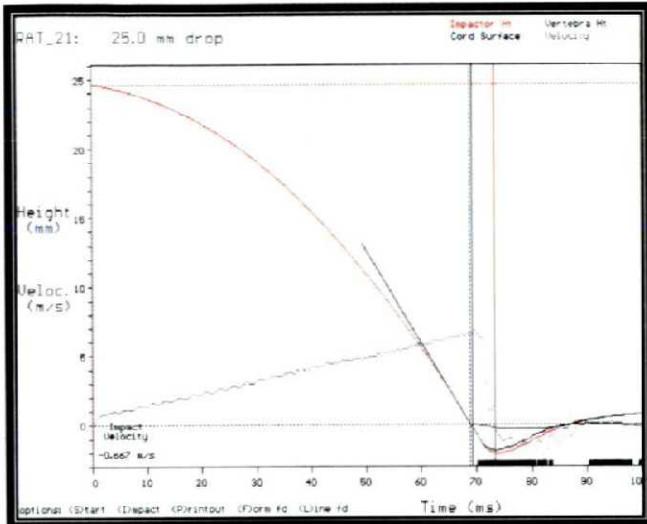
RAT_20 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7033	-0.003	70.755
Drop start	1	24.982	0.010
Impact	7041	-0.058	70.835
Cord_Rev	7555	-2.602	76.006
Vert_Rev	9027	-0.117	90.815
Crd-Surf_Rev	7555	-2.557	76.006
Compression		2.498	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.040	-0.675	70.825
Error :	-0.138	0.025	-0.567
Error (%) :	0.6	3.6	0.794



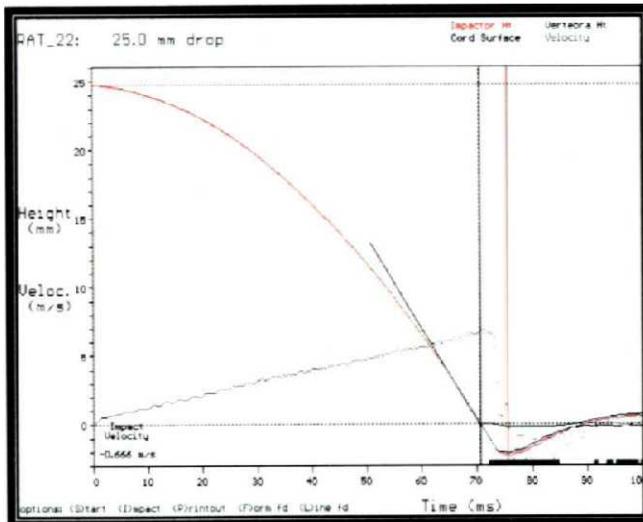
RAT_21 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6842	-0.005	68.833
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6876	-0.232	69.175
Cord_Rev	7279	-2.120	73.229
Vert_Rev	7545	-0.302	75.905
Crd-Surf_Rev	7279	-1.892	73.229
Compression		1.660	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.895	-0.667	69.155
Error :	0.007	0.034	-2.227
Error (%) :	0.0	4.8	3.120



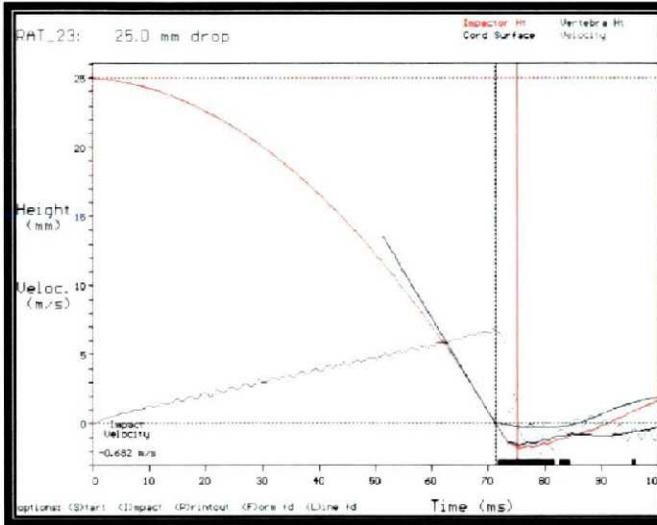
RAT_22 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7004	-0.005	70.534
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	7018	-0.098	70.675
Cord_Rev	7508	-2.360	75.609
Vert_Rev	7707	-0.230	77.613
Crd-Surf_Rev	7508	-2.160	75.609
Compression		2.062	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.920	-0.666	70.665
Error :	-0.018	0.035	-0.728
Error (%) :	0.1	4.9	1.019



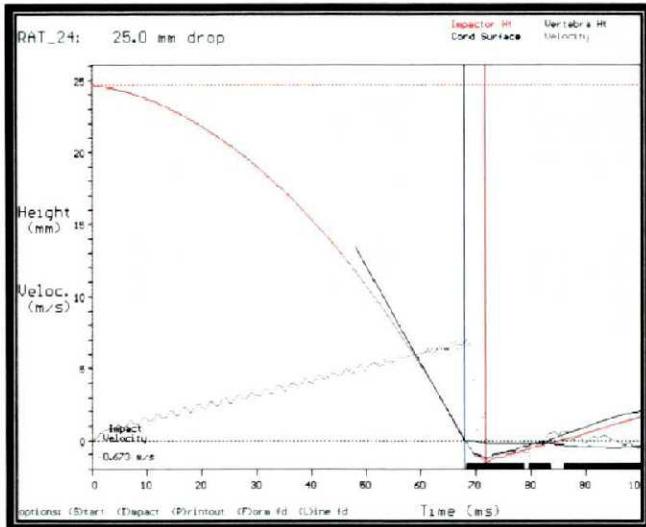
RAT_23 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7069	-0.003	71.117
Drop start	1	24.982	0.010
Impact	7088	-0.133	71.308
Cord_Rev	7463	-1.800	75.080
Vert_Rev	7665	-0.287	77.113
Crd-Surf_Rev	7463	-1.580	75.080
Compression		1.447	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.115	-0.682	71.298
Error :	-0.213	0.018	-0.094
Error (%):	0.9	2.6	0.132



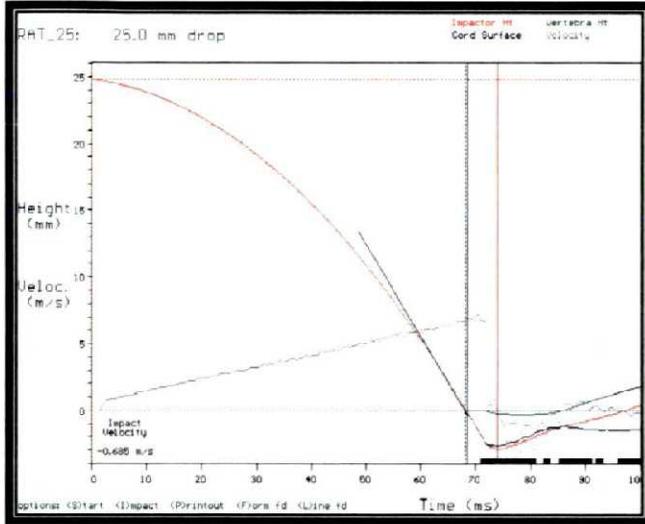
RAT_24 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6749	-0.005	67.966
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6748	0.002	67.956
Cord_Rev	7123	-1.480	71.732
Vert_Rev	7442	-0.263	74.945
Crd-Surf_Rev	7123	-1.267	71.732
Compression		1.268	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.662	-0.673	67.946
Error :	0.240	0.028	-3.447
Error (%):	1.0	3.9	4.828



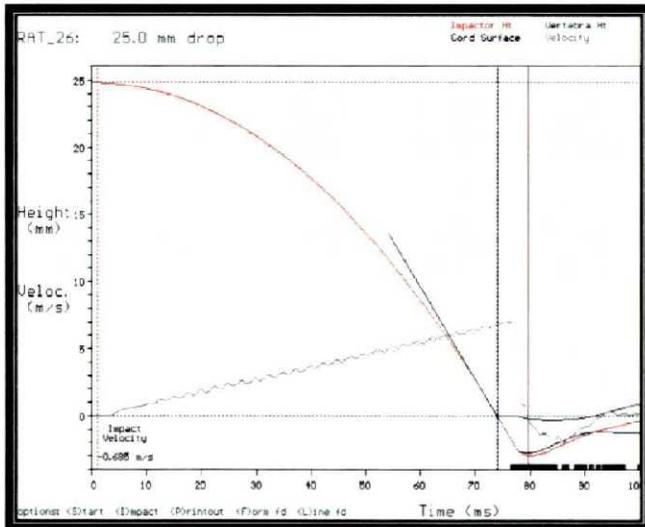
RAT_25 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6782	-0.003	68.161
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	6824	-0.292	68.583
Cord_Rev	7362	-2.922	73.990
Vert_Rev	7627	-0.288	76.653
Crd-Surf_Rev	7360	-2.680	73.970
Compression		2.388	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.113	-0.685	68.573
Error :	-0.212	0.016	-2.819
Error (%):	0.9	2.3	3.949



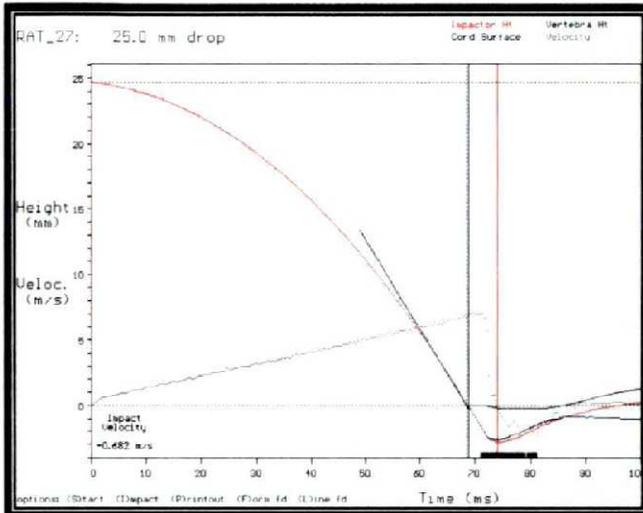
RAT_26 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7349	-0.005	73.934
Drop start	110	24.795	1.107
Impact	7375	-0.185	74.195
Cord_Rev	7918	-3.002	79.658
Vert_Rev	8206	-0.288	82.555
Crd-surf_Rev	7915	-2.775	79.628
Compression		2.590	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.980	-0.685	73.089
Error :	-0.078	0.015	1.696
Error (%):	0.3	2.2	2.376



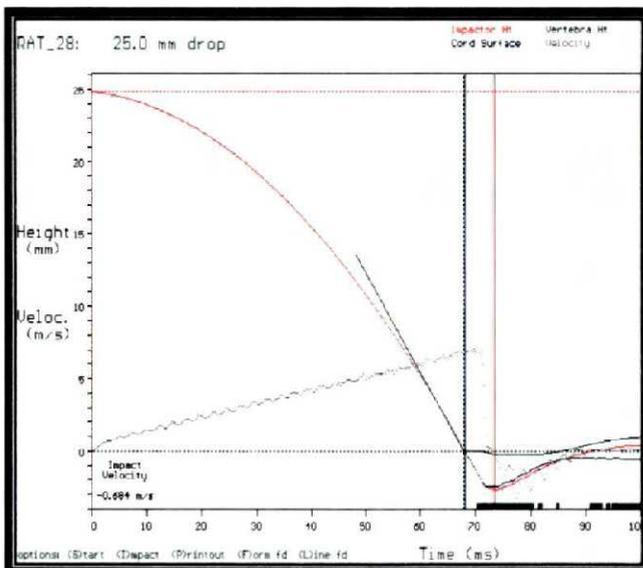
RAT_27 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6813	-0.005	68.541
Drop start	1	24.663	0.010
Impact	6848	-0.243	68.893
Cord_Rev	7363	-2.842	74.074
Vert_Rev	7643	-0.277	76.891
Crd-Surf_Rev	7363	-2.618	74.074
Compression		2.375	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.907	-0.682	68.883
Error :	-0.005	0.018	-2.509
Error (%) :	0.0	2.6	3.514



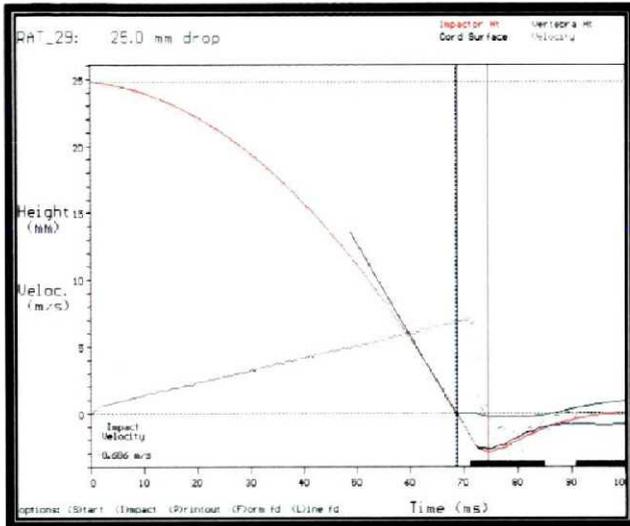
RAT_28 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6756	-0.003	67.968
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	6780	-0.170	68.209
Cord_Rev	7306	-2.682	73.501
Vert_Rev	7534	-0.265	75.795
Crd-Surf_Rev	7305	-2.450	73.491
Compression		2.280	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.992	-0.684	68.199
Error :	-0.090	0.016	-3.193
Error (%) :	0.4	2.3	4.472



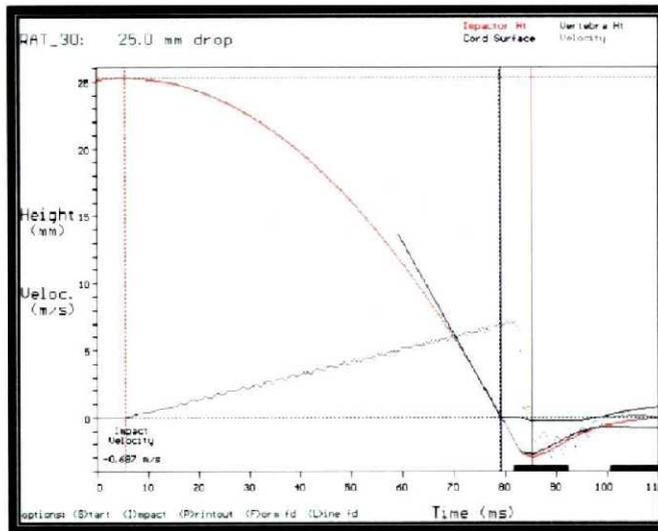
RAT_29 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	6818	-0.005	68.523
Drop start	1	24.822	0.010
Impact	6838	-0.140	68.724
Cord_Rev	7405	-2.822	74.422
Vert_Rev	7630	-0.265	76.683
Crd-Surf_Rev	7405	-2.685	74.422
Compression		2.545	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	24.962	-0.686	68.714
Error :	-0.060	0.014	-2.679
Error (%) :	0.2	2.1	3.752



RAT_30 PARAMETER CALCULATIONS Impactor v7.0

Basic Impact Parameters
(relative to baseline / t=0 ms)

Variable	Sample	MM	Time (ms)
Baseline	7869	-0.005	79.165
Drop start	540	25.295	5.433
Impact	7877	-0.058	79.245
Cord_Rev	8475	-3.002	85.262
Vert_Rev	8703	-0.277	87.555
Crd-Surf_Rev	8475	-2.757	85.262
Compression		2.698	

Impact Height and Velocity Calculations

Variable	Height (mm)	Velocity (m/sec)	Time (msec)
Expected :	24.902	-0.700	71.392
Actual :	25.353	-0.687	73.813
Error :	-0.452	0.014	2.421
Error (%) :	1.8	2.0	3.391

ANEXO 2

Modelo do protocolo para exame físico do animal

ESCALA DE LOCOMOÇÃO DE B.B.B.

ANIMAL Nº:	MEMBRO DIREITO	MEMBRO ESQUERDO
1)MOVIMENTO DO QUADRIL		
2)MOVIMENTO DO JOELHO		
3)MOVIMENTO DO TORNOZELO		
4)POSIÇÃO DO TRONCO		
5)ABDOME		
6)POSICIONAMENTO DA PATA		
7)MARCHA		
8)COORDENAÇÃO		
9)IMPULSÃO DOS DEDOS		
10)POSIÇÃO DA PATA		
11)INSTABILIDADE DO TRONCO		
12)CAUDA		

Pontuação:

1,2,3: movimento ausente, leve (<50%) ou amplo (>50%).

4: lateralizado (qual lado), médio (normal), suporte com a cauda.

5: no solo, paralelo ao solo, mais alto que o normal.

6: discreto, amplo sem suportar peso, suportando peso.

7: dorsal, onde utiliza dorso da pata, mais de quatro vezes em quatro minutos, ou plantar, que deve ser ocasional (<50% dos passos) freqüente (50-94%) ou consistente (>94%).

8: coordenação entre passos das patas, ausente (0%), ocasional (<50% dos passos) freqüente (50-94%) ou consistente (>94%).

9: ausente (0%), ocasional (<50% dos passos) freqüente (50-94%) ou consistente (>94%).

10: rotação ao contato inicial (rotação interna, externa ou paralela ao solo) e à retirada da pata do solo.