

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIENCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PREDNISONA E MELOXICAM NO TRATAMENTO DE
RATOS SUBMETIDOS AO TRAUMA AGUDO DA
MEDULA ESPINHAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Graciane Aiello

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**PREDNISONA E MELOXICAM NO TRATAMENTO DE RATOS
SUBMETIDOS AO TRAUMA AGUDO DA MEDULA ESPINHAL**

por

Graciane Aiello

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Alexandre Mazzanti

Santa Maria, RS, Brasil
2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PREDNISONA E MELOXICAM NO TRATAMENTO DE RATOS
SUBMETIDOS AO TRAUMA AGUDO DA MEDULA ESPINHAL**

elaborada por
Graciane Aiello

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Alexandre Mazzanti, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Eliane Gonçalves de Melo, Profa. Dra. (UFMG)

Cynthia Melazzo Mazzanti, Profa. Dra. (UFSM)

Santa Maria, 29 de fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço a vida, a saúde e a oportunidade de buscar a realização dos meus ideais, colocando em meu caminho pessoas capazes de me instruir para meu crescimento.

Aos meus pais, Sérgia e Marcos, por não mediram esforços para me proporcionar um lar com muito carinho e amor. Obrigada por toda a educação dispensada, pelas oportunidades e por fazerem os meus sonhos os de vocês. Amo vocês!

Ao meu irmão Glauber pelo companheirismo e carinho. Sempre muito solícito em ajudar sempre que preciso. Obrigada por todo apoio!

Aos meus avôs, Elza e Arlito, pelo carinho e incentivo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Prof. Alexandre Mazzanti, pela receptividade, pelos valiosos ensinamentos e por toda dedicação. Um exemplo de profissional a ser seguido.

A Profa. Mônica Vicky Bahr Arias, que me guiou ao longo da minha jornada acadêmica, proporcionando muitos ensinamentos e oportunidades. Obrigada pelo carinho e pela amizade.

Agradeço aos amigos Diego Beckmann, Rosmarine Passos e Amanda Oliveira, por toda disponibilidade e responsabilidade para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, companheirismo e principalmente pela amizade.

Aos estagiários, Angel, Bruna, Verônica, Josi, Anieli e Matheus, por toda a ajuda para a realização deste experimento. Obrigada pela disponibilidade, pelo companheirismo e por dispensarem horas de aula, feriados, finais de semana para que tudo fosse feito da melhor forma possível. Obrigada, também, pelos cuidados com os ratinhos. Admirável o amor e carinho para com eles. Certamente não conseguiria realizar este sem a enorme ajuda de vocês.

Agradeço toda a equipe do LACVET, principalmente a Heloísa E. Palma, Profa. Cinthia Mazzante, Patricia Wolkmer e Verônica Castro pela ajuda na realização das eutanásias e do perfil oxidativo. Obrigada pela dedicação e pela disponibilidade.

Ao meu amigo Guilherme S. Cardoso pela cumplicidade, amor, dedicação, ensinamento e incentivo. Obrigada por estar presente diariamente, mesmo há 1500km de distância. Amo muito você, meu grande amigo!

A querida amiga Livia Maria F. Pires, obrigada por estar sempre ao meu lado, mesmo estando muito longe.

Aos amigos André Soares, Rogério Guedes e Francieli Marconato pela grande amizade que construimos. Obrigado por sempre estarem sempre ao meu lado, pela cumplicidade e companheirismo. Foram muito importantes também para a realização deste trabalho, acompanhando-me durante as madrugadas ao ratário para auxiliar nos cuidados com os ratinhos.

As famílias que me acolheram em Santa Maria, Neusa e Cláudio Marconato e Júlia e Olavo Soares. Obrigada pela receptividade e pelo carinho.

Aos professores da Pós-graduação em Medicina Veterinária, em especial André Soares, Cíntia Mazzanti, Alceu G. Raiser e Ney L. Pippi, pela disponibilidade e conhecimentos oferecidos.

Com muito respeito, agradeço a cada ratinho que fizeram parte deste estudo.

Aos funcionários do Hospital Veterinário por toda ajuda.

Agradeço a CNPq/CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PREDNISONA E MELOXICAM NO TRATAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO TRAUMA AGUDO DA MEDULA ESPINHAL

AUTORA: GRACIANE AIELLO
ORIENTADOR: ALEXANDRE MAZZANTI
Santa Maria, 29 de fevereiro de 2012.

Considerando a relevância dos estudos destinados às lesões traumáticas da medula espinhal em humanos e animais, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da prednisona e meloxicam na terapia de ratos submetidos ao modelo experimental de trauma agudo da medula espinhal induzida pelo cateter de *Fogarty 2Fr*, mediante avaliação do perfil oxidativo, dos testes neurológicos e exame histopatológico da medula espinhal. Foram utilizados 90 ratos Wistar, distribuídos em seis grupos denominados GCS ou salina (n=15), GCP ou controle prednisona (n=15), GCM ou controle meloxicam (n=15), GTS ou trauma mais salina (n=15), GTP ou trauma mais prednisona (n=15) e GTM ou trauma mais meloxicam (n=15). Cada grupo foi redistribuído em três subgrupos de acordo com o tempo de tratamento no pós-operatório de 24h, 72h e sete dias. Todos os grupos foram submetidos à laminectomia e nos grupos GTS, GTM e GTP, após a exposição da medula espinhal, foi realizado o trauma medular compressivo utilizando o cateter *Fogarty 2Fr*. Os grupos GCS e GTS foram tratados com solução salina (0,5ml/rato/dia), os GSM e GTM receberam meloxicam (2mg/kg/dia) e os grupos GSP e GTP receberam prednisona (2mg/kg/dia). Foram realizados testes neurológicos (BBB, plano inclinado e percepção a dor profunda) 24 horas antes e após o procedimento cirúrgico e repetido a cada 48 horas até a realização da eutanásia, ou seja, 24h, 72h e sete dias. Foram avaliados os parâmetros do estresse

oxidativo através da enzima catalase, quantificado as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e realizado exame histopatológico da medula espinhal. Os ratos dos grupos GTM e GTP e nos diferentes tempos (24h, 72h e sete dias) tiveram pontuação zero na escala BBB, ou seja, nenhum movimento observado no membro pélvico; no plano inclinado, permaneceram com pontuação 3, ou seja, em um ângulo dez graus menor que antes da cirurgia e perda da percepção da dor profunda. Os grupos GTM e GTS apresentaram menor atividade da catalase e níveis de TBARS quando comparado ao grupo GTS e foi mais evidente nas primeiras 72 horas de PO, indicando um possível efeito antioxidante. No grupo GTS, houve persistência desta ação até o sétimo dia pós-trauma. No exame histopatológico da medula espinhal foi constatada degeneração Waleriana e necrose da substância cinzenta de intensidades variáveis, não apresentando diferença entre os grupos submetidos ao trauma. Conclui-se que o meloxicam e a prednisona apresentam possível efeito antioxidante e neuroprotetora, mas não impedem a necrose e a degeneração Walleriana da medula espinhal de ratos submetidos a trauma medular agudo utilizando o cateter de *Fogarty 2Fr*.

Palavras-chave: peroxidação lipídica, catalase, cateter de *Fogarty 2Fr*.

ABSTRACT

Ms dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

Prednisone and meloxicam in the treatment of rats submitted to compressive spinal cord injury

AUTHOR: GRACIANE AIELLO

ADVISER: ALEXANDRE MAZZANTI

Santa Maria, February 29nd 2012.

Considering the relevance of study of traumatic spinal cord injury in humans and animals, the aim of the study was investigated the use of the prednisone and meloxicam in treatment of rats submitted the experimental model of acute spinal cord injury with 2Fr Fogarty catheter with evaluation of oxidative stress, Neurological tests and histological exam. Ninety rats were divided in six groups: GCS or saline (n=15), GCP or prednisone control (n=15), GCM or meloxicam control, GTS or trauma saline (n=15), GTP or trauma meloxicam (n=15) and GTM or trauma prednisone (n=15). Each group was divided into three subgroups according to treatment time in the postoperative period of 24h, 72h and seven days. All groups were submitted laminectomy and in the groups GTS, GTM and GTP, after exposure of the spinal cord was performed compressive spinal cord injury with 2Fr Fogarty catheter. The GCS and GTS was treated with saline (0,5ml/rat/day), GSM and GTM with meloxicam (2mg/kg/day) and GSP and GTP with prednisone (2mg/kg/dia). Neurological tests were performed (BBB, inclined plane and deep pain) 24 hours before and after surgery and repeated every 48 hours until the day of euthanasia. The parameters of oxidative stress were evaluated and performed histopathological analysis of the spinal cord. The groups GTS, GTM and GTP in the different times were no point in the BBB scale and three points in the inclined plane and absence

of deep pain. GTM and GTS groups had lower catalase activity and TBARS levels when compared to the GTS and they were more evident to 72 hours postoperative period, indicating possible antioxidant effect. In the GTS group, there was persistence of this action until the seventh day after trauma. In the histopathological exam were found Wallerian degeneration and necrosis of gray matter of intensity variation, with no significant difference between undergone to trauma. Meloxicam and prednisone can have neuroprotective and antioxidant effect, but the necrosis and Wallerian degeneration were not stop in rats submitted the acute spinal cord injury with 2Fr Fogarty catheter.

Key words: lipid peroxidation, catalase, 2Fr Fogarty catheter.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Valores dos níveis de TBARS (A, B, C) e atividade da catalase (D, E F) em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com meloxicam e prednisona, decorridos 24h, 72h e sete dias de pós-operatório. **GCS**: Grupo controle salina; **GCM**: Grupo controle meloxicam; **GCP**: Grupo controle prednisona, **GTS**: Grupo tratado salina; **GTM**: Grupo tratado meloxicam; **GTP**: Grupo tratado prednisona..... 46
- FIGURA 2** - Representação microscópica da medula espinhal em ratos submetidos a trauma agudo de medula espinhal com cateter *Fogarty* 2Fr. Nota-se no grupo controle (A e C) ausência de lesões no parênquima medular. No rato do grupo submetido ao trauma (B e D), verifica-se lesão em parênquima medular, com presença de necrose (seta espessa) e degeneração Walleriana (seta fina) no parênquima medular..... 47
- FIGURA 3** - Intensidade da degeneração Walleriana (A) e necrose (B) da medula espinhal de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com meloxicam e prednisona, decorridos 24h, 72h e sete dias de pós-operatório. **GCS**: Grupo controle salina; **GCM**: Grupo controle meloxicam; **GCP**: Grupo controle prednisona, **GTS**: Grupo tratado salina; **GTM**: Grupo tratado meloxicam; **GTP**: Grupo tratado prednisona..... 48

ANEXOS

ANEXO A - Exame neurológico através da escala BBB em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal.....	58
ANEXO B - Exame neurológico através do plano inclinado em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal utilizando cateter Fogarty 2Fr.....	61
ANEXO C – Valores dos níveis de TBARS e atividade da catalase em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com meloxicam e prednisona, decorridos 24h, 72h e sete dias de pós-operatório.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

COX₁ - Ciclooxigenase 1
COX₂ - Ciclooxigenase 2
Ca⁺² - Íon cálcio
BBB - Basso, Beatie and Bresnahan
PDP - Percepção da dor profunda
ERs - Espécies reativas
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
NMDA - N-metil-D-asparato
DNA - Ácido desoxirribonucleico
O₂⁻ - Superóxido
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HOCL - Ácido hidrocloroso
ON - Óxido nítrico
NO₂⁻ - Dióxido de nitrogênio
ONOO⁻ - Peroxinitrito
HNO₂ - Óxido nitroso
RONOO - Peroxinitrato sup
SOD - superóxido desmutase
NO⁻ - oxido nítrico
CAT, E.C.1.11.1.6 - Catalase
GSH-Px, E.C.1.11.1.9 - Glutationa peroxidase
GR, E.C.1.6.4.2 - Glutationa redutase .
SNC - Sistema Nervoso Central
O₂ - Átomo de Oxigênio
ATPase - Adenosine triphosphatase

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ANEXOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Trauma medular	17
2.2 Modelos experimentais de trauma medular agudo	20
2.2.1 Modelo experimental de trauma medular agudo por balão.....	20
2.3 Teste neurológicos	21
2.3.1 BBB.....	21
2.3.2 Plano inclinado.....	22
2.4 Radicais livres.....	22
2.5 Defesas Antioxidantes.....	23
2.5.1 Catalase.....	24
2.6 Estresse oxidativo.....	24
2.7 Peroxidação lipídica.....	24
2.8 Radicias livres e o Sistema nervoso Central.....	26
2.9 Tratamento do trauma agudo de medula espinhal.....	26
2.9.1 Prednisona.....	26
2.9.2 Meloxicam.....	27
3 CAPÍTULO 1 - Prednisona e meloxicam no tratamento de ratos submetidos ao trauma agudo da medula espinhal	29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e Métodos.....	33
Resultados e Discussão.....	37

Conclusão.....	41
Referências Bibliográficas.....	41
4 CONCLUSÕES.....	49
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
6 ANEXOS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Os eventos que ocorrem na lesão da medula espinhal são geralmente divididos entre primários e secundários (OLBY, 2010). A lesão traumática primária inicia minutos a dias após o trauma e desencadeia uma série de eventos secundários. Estes incluem hemorragia e destruição do leito microvascular, repentina mudança na concentração intracelular do íon Ca^{+2} , excitotoxicidade, produção de radicais livres e inflamação (SHORES, 1992; KORNEGAY, 1998; LEE et al., 2005).

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) é caracterizada como o evento mais importante na patogênese do trauma medular agudo. As espécies reativas são implicadas como mediadores de danos axonais, pelos níveis locais de radicais livres que aumentam consideravelmente em condições inflamatórias e esgotam o potencial de defesa antioxidante no interior das lesões, gerado principalmente por macrófagos ativados e microglia (MEERTEREN et al., 2005; HORSSSEN et al., 2011).

A lesão medular pode resultar em incapacidade permanente do paciente e o seu tratamento ainda permanece um desafio tanto para a medicina humana como veterinária (BLIGHT, 2000), não apresentando um consenso sobre o tratamento ideal (OLBY & JEFFERY, 2003). O conhecimento e a utilização precoce de medicamentos, que preservem a integridade estrutural do neurópilo medular, podem fazer a diferença na recuperação das deficiências neurológicas (OLBY & JEFFERY, 2003).

As opções para efetivos fármacos neuroprotetores eficazes para serem administrados são escassas. Atualmente há poucos estudos sobre as abordagens farmacológicas e não farmacológicas para amenizar os efeitos secundários ocorridos no trauma medular agudo. Os antiinflamatórios esteroidais são usados extensivamente desde 1960 no tratamento clínico do trauma medular, com o intuito de reduzir os eventos secundários (JEFFERY, 1995). Apesar do uso amplo e empírico dos corticóides, os benefícios deste fármaco são limitados e estão relacionados a frequentes efeitos colaterais (MEINTJES; HOSGOOD; DANILOFF, 1996). Já, os antiinflamatórios não esteroidais, como por exemplo, o meloxicam, têm demonstrado características neuroprotetoras relevantes ao reduzir o estresse oxidativo em ratos com trauma medular agudo e está associada a mínimos efeitos colaterais (HAKAN et al., 2011).

Considerando a relevância dos estudos destinados às lesões traumáticas da medula espinhal em humanos e animais, o objetivo deste estudo foi investigar o uso da prednisona e

meloxicam na terapia de ratos submetidos ao modelo experimental de trauma agudo da medula espinhal induzida pelo cateter de *Fogarty 2Fr*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Trauma medular

O trauma medular agudo é um problema comum nas medicinas humana e veterinária, que pode ocasionar deficiências neurológicas motoras, sensoriais e autônomas severas. Os danos à medula espinhal variam consideravelmente dependendo da gravidade, velocidade e duração da injúria (OLBY, 2010).

As lesões ao sistema nervoso central (SNC) podem ser causadas por fatores extrínsecos e/ou intrínsecos. Os fatores extrínsecos incluem atropelamentos, quedas, chutes, mordidas e armas de fogo (BAGLEY et al., 2000). As causas intrínsecas compreendem protrusão do disco intervertebral, malformação vertebral, fraturas patológicas devido à osteopenia, osteomielite, e massas compressivas extramedulares como abscessos e neoplasias (HOERLEIN, 1971).

Os eventos que ocorrem na lesão da medula espinhal são geralmente divididos entre primários e secundários (OLBY, 2010). Os eventos primários caracterizam por danos mecânicos que causam contusão, compressão ou laceração (ROWLAND et al., 2008). A concussão decorre de um impacto agudo à medula espinhal, geralmente sem compressão residual, afetando inicialmente a substância cinzenta da medula espinhal, propagando-se para a substância branca e podendo levar a destruição progressiva do tecido nervoso (KRAUS, 2000). A compressão das estruturas neuronais, devido a fragmentos de ossos fraturados, material do disco intervertebral, lesões dos ligamentos (MCDONALD; SADOWSKY, 2002) e hematoma epidural, causa comprometimento da perfusão sanguínea local e consequente lesão à bainha de mielina e axônio. A interrupção anatômica do parênquima da medula espinhal é a laceração física do tecido nervoso, cujos efeitos são considerados como não tratáveis e irreversíveis (KRAUS, 2000).

Na maioria das vezes, as agressões primárias não são suficientes para causarem danos permanentes, mas desencadeiam uma série de eventos secundários progressivos que agravam essas agressões (RIVLIN & TATOR, 1979; BAGLEY, 2000; MALLEI et al., 2005). Os eventos secundários incluem hemorragia e destruição do leito microvascular, produção de radicais livres, rápidas mudanças na concentração intracelular de íons Ca^{+2} , excitotoxicidade e inflamação. O ponto final desta cascata destrutiva é muitas vezes a apoptose, que pode ocorrer por um longo período de tempo após a lesão (OLBY, 2010).

A lesão da vascularização local causa a formação de petéquias e trombozes microvasculares, que associadas ao edema e ao vaso-espasmo no local da injúria, resulta em uma acentuada hipoperfusão e isquemia do parênquima medular (TATOR; FEHLINGS, 1991). Após este período pode ocorrer reperfusão local, na qual pode aumentar a formação de radicais livres que exacerba os eventos secundários (OLBY, 2010).

As rápidas mudanças intracelulares nas concentrações de íons após a lesão da membrana celular estão associadas à redução do fluxo sanguíneo na medula espinhal. A concentração de L-Glutamato, que é um neurotransmissor excitatório, é regulada por um mecanismo ativo e eficiente efetuado por astrócitos. O dano mecânico aos neurônios associado à falta de energia local, leva ao aumento da liberação neural de glutamato e decréscimo da ação do mecanismo dos astrócitos sobre o mesmo, elevando a concentração deste neurotransmissor a níveis tóxicos. A interação do L-glutamato com o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), um receptor para L-glutamato nas membranas pós-sinápticas (JANSSENS, 1991; JEFFEREY, 1995; OLBY, 1999), abre os canais de sódio, cloreto e principalmente cálcio. (JEFFEREY, 1995; OLBY; JEFERY, 2003).

O aumento da concentração do cálcio intracelular ativa proteases como a calpaína e a caspase, que destroem o citoesqueleto e o DNA cromossomal, iniciando a necrose e a apoptose e ativação da fosfolipase A2 que inicia a resposta inflamatória. A ativação da fosfolipase A2 desencadeia a produção de leucotrienos, tromboxanos, histamina e prostaglandinas. O aumento nos níveis de prostaglandinas causa o aumento da permeabilidade vascular e vasoconstrição ou vasodilatação. Ocorre também alteração da função plaquetária, que pode causar obstrução de vasos sanguíneos e liberação de serotonina, na qual também ativa a permeabilidade vascular, favorecendo a formação de edema (JANSSENS, 1991).

Os infiltrados inflamatórios constituídos por polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos produzem uma reação auto-imune no local da lesão que inibe a regeneração axonal (DELAMARTER et al., 1995). A quimiotaxia de leucócitos, principalmente neutrófilos, ocorre três a seis horas após a lesão. Em três dias, os macrófagos derivados dos monócitos sanguíneos são evidentes e diminuem por volta do quinto dia (SUMMERS et al., 1995). A fagocitose que se inicia poucos dias após a lesão resulta na formação de cavitações no parênquima medular (JANSSENS, 1991).

Muitos estudos experimentais sugerem que a formação de radicais livres desempenham um importante papel na patogênese dos mecanismos de lesão secundária ao trauma medular (KALAYCI et al., 2005). Estes são gerados por produtos normais ou atípicos de processos metabólicos que utilizam moléculas de oxigênio. A reatividade destas moléculas é atribuída a um elétron desemparelhado da órbita atômica (BRAUGHLER; HALL, 1992). São formados pela isquemia, elevação intracelular concentrações de cálcio, cobre, ferro e pela reação inflamatória (BRAUND et al., 1990b).

As espécies reativas de nitrogênio e oxigênios são os principais produtos do metabolismo celular normal e sua concentração é controlada por antioxidantes e sistemas varredores de radicais livres. O desequilíbrio ocorre no metabolismo celular devido a um trauma ou isquemia que leva ao aumento de sua produção, ultrapassando as defesas naturais. Os radicais livres interagem com todos os componentes celulares, mas reagem principalmente com os ácidos graxos insaturados da membrana fosfolipídica (BRAUND et al., 1990b; COUGHLAN, 1993; ARAÚJO, 2005), alterando a integridade da membrana celular, a fluidez e a manutenção dos gradientes iônicos. A peroxidação acontece também como resultado final da interação da cascata de ácido aracdônico com as cicloxigenases e lipoxigenases resultando em produtos como o potente vasoconstritor tromboxano e radicais livres de oxigênio que se acumulam e destróem componentes da membrana celular (JANSSENS,1991; SHORES,1992).

Um estudo avaliou a duração da peroxidação lipídica no trauma medular agudo em ratos e observou que a mesma persistiu por até 120 horas após o trauma, sendo constatados dois picos de atuação distintos, o primeiro de uma a seis horas e o segundo de 24 a 120 horas pós-trauma (CHRISTIE et al., 2008).

A morte neuronal e de oligodendrócitos após o trauma interfere com a conectibilidade e induz degeneração da bainha de mielina. Nos próximos sete dias pós-trauma ocorre um aumento progressivo da área de lesão e as cavitações aumentam com mais morte neuronal e glial. Uma segunda onda de apoptose, dessa vez de oligodendrócitos, é detectada no sétimo dia e está associada com a degeneração axonal. Os oligodendrócitos tardiamente mortos reduzirão a possibilidade de remielinização após lesão axonal. Essa distribuição da apoptose em neurônios e células da glia pode ser responsável pela contínua expansão da lesão e pela prolongada desmielinização de axônios em regiões distantes do epicentro da lesão (LU et al., 2000).

A lesão medular pode resultar em incapacidade permanente e seu tratamento ainda permanece um desafio tanto para a medicina humana como veterinária (BLIGHT, 2000), pois além dos neurônios no sistema nervoso central não regenerarem efetivamente (JEFFERY et al., 2001), não há consenso sobre o tratamento ideal (OLBY; JEFFERY, 2003). O conhecimento e a utilização precoce de fármacos e/ou procedimentos cirúrgicos específicos, que preservem a integridade estrutural do neurópilo medular, podem ser importantes na recuperação do paciente (OLBY; JEFFERY, 2003).

2.2 Modelos experimentais de trauma medular agudo

O desenvolvimento de uma abordagem racional para o tratamento de trauma medular requer um modelo experimental padronizado e reprodutível, em que o estímulo traumático pode ser correlacionado com a recuperação funcional e morfológica (KAKULAS, 1984; GEISLER et al., 1991).

O primeiro modelo experimental de trauma medular foi descrito por Allen (1911), com a técnica de compressão por peso. Outros modelos foram sequencialmente desenvolvidos, como transecção (BASSO et al., 1996), impacto pneumático (ORO et al., 1999), lesão eletromagnética (BEHRMANN et al., 1992; STOKES et al., 1992; HIRUMA et al., 1999), clip compressivo (RIVLIN; TATOR, 1978; WALLACE et al., 1987) e compressão da medula espinhal por balão de silicone inflável (TARLOV et al., 1953).

Em um estudo, Khan & Griebel (1983) compararam três modelos experimentais para compressão da medula espinhal com o cateter de *Forgaty 2Fr*, clip compressivo e por peso. Foi observado que o modelo, no qual utilizou o cateter apresentou maior similaridade às injúrias observadas na rotina clínica e foi a de mais fácil execução dentre as demais.

2.2.1 Modelo experimental de trauma medular agudo por balão

Tarlov et al. (1953) foram os primeiros a descrever a técnica de compressão baseado na utilização de cateter com balão inflável em cães, posteriormente o mesmo foi aplicado em macacos (TATOR; DEECKE, 1973), gatos (MARTIN; BLOEDEL, 1973), ferrões (EIDELBERG et al., 1976) e ratos (KHAN; GRIEBEL, 1983).

Khan & Griebel (1983) foi o pioneiro a realizar uma laminectomia da coluna vertebral para inserir o cateter com balão, no qual foi posicionado na face dorsal da medula espinhal no espaço subdural. Vanicky et al. (2001) modificaram a técnica de compressão por balão utilizando o catéter de *Fogarty 2Fr*.

O cateter de *Fogarty 2Fr* é flexível, constituído de poliuretano, descartável, estéril, que contém um balão de látex na sua extremidade que pode ser inflado com ar ou solução salina. Na medicina este é utilizado principalmente em cirurgias de embolectomias (VANICKY et al., 2001).

O modelo experimental de trauma medular que utiliza o cateter de *Fogarty 2Fr*, tem sido muito aplicado em estudos recentes. Este se baseia na realização prévia de laminectomia da coluna vertebral, seguido da introdução do cateter de *Fogarty 2Fr* no espaço subdural, posicionado na face dorsal da medula espinhal e conduzido cranialmente até o espaço intervertebral desejado (KHAN; GRIEBEL, 1983; VANICKY et al., 2001). Para inflar o balão este cateter é preenchido com 0,20ml de solução isotônica ou ar.

O tempo prolongado de compressão medular é prejudicial devido a isquemia local (RIVLIN; TATOR, 1978). Portanto, o intervalo de compressão em modelo experimental de trauma medular com duração de cinco minutos é utilizado devido este ser inferior ao limiar de lesão reversível do tecido da medula espinhal (TAIRA; MARSALA, 1996).

2.3 Teste neurológicos

2.3.1 BBB

O BBB é o nome dado pelas iniciais dos nomes dos autores desta técnica, Basso, Beatie and Bresnahan. Este teste é o mais comumente usado para avaliar a função locomotora em ratos submetidos a trauma medular (BASSO et al., 1995). Os ratos são colocados individualmente em uma superfície anti-derrapante, no qual os examinadores analisam a marcha, a coordenação, a movimentação dos membros pélvicos, a posição do tronco e do abdome; a acomodação das patas na superfície; a capacidade de limpar as patas; a posição predominante das patas traseiras; a instabilidade do tronco e a posição da cauda (BASSO et al., 1995).

As observações são anotadas em uma ficha com pontuações, desenvolvida pelos autores do teste, o que possibilita a interpretação dos achados. A pontuação varia de 0 (ausência de capacidade locomotora espontânea) a 21 pontos (movimentação normal). Os valores de 1 a 7 indicam o retorno de movimentos isolados das articulações do joelho, quadril e tornozelo. A pontuação de 8 a 13 refere-se ao retorno do reposicionamento do membro e movimentos coordenados com os membros torácicos. E de 14 a 21 indicam o retorno da liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, da estabilidade do tronco e do posicionamento da cauda (BASSO et al., 1995).

A escala BBB tem sido muito utilizada em muitos trabalhos com ratos submetidos a trauma da medula espinhal para avaliar a recuperação funcional aos diferentes tratamentos realizados (RESNICK, 1998; SEDÝ et al., 2008; CARLTON et al., 2009).

2.3.2 Plano inclinado

O teste de plano inclinado foi desenvolvido por Rivlin e Tator (1977). Este teste avalia a capacidade do rato em manter a posição do corpo em uma superfície que é gradualmente aumentada em ângulos crescentes. O animal é colocado sobre a superfície em diferentes posicionamentos, como de cabeça para baixo, para cima, para a direita e para a esquerda (RIVLIN; TATOR, 1977). Após o animal ser posicionado o ângulo de inclinação é gradualmente aumentado em direção a posição vertical até o animal não conseguir manter a posição durante cinco segundos (Rivlin e Tator, 1977). Este teste é utilizado para avaliação do trauma medular em ratos, e tem como objetivo testar a força do animal (VON EULER et al, 1997) e a integridade do trato medular rubroespinhal e outros não piramidais após a lesão medular (FEHLINGS; TATOR, 1995).

2.4 Radicais livres

Radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Essa configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meia vida relativamente curta e quimicamente muito reativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem radicais livres, como: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil (OH), peroxil (RO_2), hidroperoxil ($HRO_2^{\cdot-}$), assim como espécies não radicalares, que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados são muito instáveis, como por exemplo: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hidrocloroso (HOCL). As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) incluem radicais livres que incluem o óxido nítrico (ON) e dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot-}$), assim como espécies não radicalares, por exemplo: peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), óxido nitroso (HNO_2) e peroxinitrato (RONOO) (TURKO et al, 2001; EVANS et al., 2002).

No trauma medular há uma extensa formação de radicais livres de oxigênio primordial, denominado de superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este é formado em poucos minutos a horas após a injúria devido a cascata do ácido aracdônico, respiração mitocondrial, atividade da xantina oxidase, oxidação de hemoglobina extravasada, ativação da microglia e infiltração de neutrófilos e macrófagos (HALL, 2011).

O superóxido é o primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do oxigênio molecular na formação de H_2O (HARRIS, 1995) e a partir dele podem se formar outras espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio (ESTERBAUER et al., 1993). Em condições fisiológicas, o H_2O_2 é formado na mitocôndria em função da atividade metabólica (CHANCE et al., 1979). Este é formado a partir do superóxido por meio de dismutação, sendo catalisada pela enzima superóxido desmutase (SOD) (FRIDOVICK, 1978). O radical livre mais reativo é o OH^{\cdot} , que pode ser gerado pelo H_2O_2 quando reage com íons cobre ou ferro. Esta reação é conhecida de reação de Fenton (HALLIWELL, 2003).

As ERNs são formadas tanto no citosol como na mitocôndria. Há 20 anos, Beckman et al. (1991) introduziram a teoria que o principal radical livre gerado nas desordens neurológicas são as RNS peroxidonitrito. Este é formado pela interação do óxido nítrico (NO^-) e o radical superóxido. O NO^- é gerado a partir da arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (RIOBO et al., 2002). O peroxidonitrito formado se difunde para os meios intra e extracelular e promove a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (BECKMAN et al., 1991).

A toxicidade exercida pelas ERs não está somente relacionada a danos biológicos ao organismo, mas também podem exercer uma atividade benéfica, como eliminação de bactérias fagocitadas através de neutrófilos (PACKER et al., 1996).

2.5 Defesas Antioxidantes

Halliwell e Gutteridge (1990) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C.1.11.1.6), a glutathione peroxidase (GSH-Px, E.C.1.11.1.9) e a glutathione reductase (GR, E.C.1.6.4.2). Os processos não-enzimáticos incluem a glutathione tripeptídeo (GSH) e as vitaminas A, C e E (SIES, 1997). A ausência ou falha na defesa antioxidante permite uma ação mais intensa da peroxidação lipídica, podendo acelerar suas reações prejudiciais à célula (RAO et al., 2000).

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destaca-se a catalase (CAT, E.C.1.11.1.6). A catalase constitui um importante sistema de defesa no combate às EROs *in vivo*. Apesar de quase todos os organismos possuírem defesa antioxidante e sistemas de reparo que são designados a protegê-los dos danos oxidativos, esses sistemas, muitas vezes, são insuficientes para prevenir tais danos por si só, necessitando de substâncias que forcem suas atividades (MADHAVI; SALUNKHE, 1995).

2.6 Estresse oxidativo

Halliwell e Gutteridge (1990) definiram o estresse oxidativo como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes com a potencialidade de exercer efeitos deletérios. Esse desequilíbrio pode representar um mecanismo fundamental para as doenças. Os danos induzidos por estes agentes podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo o DNA, o RNA, os lipídios, as proteínas e os carboidratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.7 Peroxidação lipídica

Os radicais livres podem lesionar todos os componentes celulares, mas reagem principalmente com os ácidos graxos insaturados da membrana fosfolipídica (BRAUND et al., 1990b; COUGHLAN, 1993; ARAÚJO, 2005). A peroxidação dessa camada causa desalinhamento dos lipídios, alterando a integridade da membrana, a fluidez e a manutenção dos gradientes iônicos. Este é o efeito mais grave dos radicais livres, pois leva a destruição rápida e

muitas vezes irreversível de tecidos após lesão ou isquemia (BROWN; HALL, 1992). Tem sido implicado como a maior causa de degeneração do sistema nervoso central após o trauma com início precoce (BROWN; HALL, 1992; GERNDT et al., 1997). Essa peroxidação é acelerada por alguns componentes sanguíneos como cobre e ferro e por produtos da degradação de hemácias, substâncias essas que estão aumentadas na lesão medular (BRAUND et al., 1990b).

Os radicais livres também podem causar lesões diretas ao tecido neuronal e contribuir para as lesões isquêmicas através de danos à microvascularização. A quebra da membrana celular pelos radicais livres é uma fonte potencial de ácido aracdônico para ser metabolizado pelas vias da lipoxigenase e cicloxigenase. Através da cicloxigenase há formação de variantes das prostaglandina, tromboxanos e prostaciclina. As prostaglandinas induzem a vasodilatação e a agregação plaquetária e estimula a degranulação de mastócitos, com liberação de histamina. Nessas condições ocorre hiperemia, aumento da permeabilidade vascular e formação de edema. Ao passo que, o tromboxano é um potente vasoconstritor. Através das lipoxigenases são produzidos os leucotrienos, liderando a quimiotaxia para polimorfonucleares (JANSSENS, 1991).

A presença de leucócitos polimorfunucleares fagocíticos nas adjacências das paredes dos vasos sanguíneos e as áreas de hemorragias são indicativos de reação inflamatória aguda na medula traumatizada. Essa reação determina a ativação de lipases induzida pelo trauma que também podem hidrolisar os fosfolípidios da membrana e liberar o ácido aracdônico potencializando a inflamação (BRAUND et al., 1990b). Portanto, em decorrência da destruição celular ocorre liberação de radicais livres que reagem com diversos componentes celulares causando peroxidação dos lípidios (JANSSENS, 1991). Essa peroxidação acontece também como resultado final da interação da cascata de ácido aracdônico com as cicloxigenases e lipoxigenases resultando em produtos como o potente vasoconstritor tromboxano e radicais livres de oxigênio que se acumulam e destroem componentes da membrana celular (JANSSENS,1991; SHORES,1992).

Não existe uma doença causada especificamente pelos radicais livres, mas eles podem agravar vários distúrbios como no trauma da medula espinhal. O SNC é um tecido que consiste substancialmente de membranas e ácidos graxos, o que aumenta a vulnerabilidade dos constituintes da membrana lipídica aos danos oxidativos e a ação direta dos radicais livres (ARAÚJO, 2005).

2.8 Radicais livres e o Sistema nervoso Central

Todos os tecidos aeróbicos podem sofrer dano oxidativo, porém o tecido nervoso é o mais susceptível em comparação aos demais tecidos. Uma das razões é seu alto consumo de O_2 , já que é responsável por aproximadamente 20% do consumo basal de oxigênio corporal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além disso, este apresenta altos níveis de ferro e ascorbato, que são cruciais para peroxidação lipídica da membrana, através da Reação de Fenton; níveis relativamente baixos de agentes protetores antioxidantes; capacidade da micróglia (macrófagos do SNC) de produzir ROS sob ativação e secretar citocinas inflamatórias; altas concentrações de neurotransmissores auto-oxidáveis (dopamina, noradrenalina) que reagem com O_2 produzindo ROS; presença de aminoácidos excitotóxicos (glutamato); presença de enzimas (monoamino oxidase, tirosina, etc) que produzem H_2O_2 como produtos finais de suas atividades e alto tráfego de Ca^{+2} através da membrana neuronal, interferindo com transporte de íons, pela ruptura de metabolismo energético (PASSI et al., 2006; GAETA et al., 2005; SMITH et al., 2007). O SNC também apresenta altas concentrações de lipídios, que servem como substrato para a peroxidação lipídica (WAGNER et al., 2004).

2.9 Tratamento do trauma agudo de medula espinhal

2.9.1 Prednisona

Os antiinflamatórios esteroidais são usados extensivamente desde 1960 no tratamento clínico do trauma medular, com o intuito de reduzir o edema, a inflamação e as lesões vasculares que ocorrem após o trauma agudo à medula espinhal (JEFFERY, 1995).

Os corticóides inibem ambas as vias da inflamação, a da cicloxigenase e da lipoxigenase (MCDONALD; LANGSTON, 1997; ANDRADE, 2002). A supressão da inflamação acontece através da inibição dos leucócitos, incluindo quimiotaxia, fagocitose, síntese de mediadores inflamatórios e liberação de enzimas lisossomais. Eles inibem a fosfolipase A2 impedindo a liberação do ácido aracdônico da membrana fosfolipídica e consequente formação de eicosanóides e radicais livres (TAOKA; OKAJIMA, 1998).

Estudos experimentais mostraram que o corticóide exibe um potencial efeito neuroprotetor através da inibição da peroxidação lipídica, do influxo de íons cálcio e do efeito

inflamatório (BRAUGHLER; HALL, 1992), como também aumentar o fluxo sanguíneo espinhal e a perfusão da microcirculação melhorando clinicamente a recuperação neurológica (YOUNG; FLAMM, 1982; TATOR; FEHLINGS, 1991).

Tem sido proposto um efeito antioxidante de altas doses de corticóides. Estes reduzem a peroxidação de lipídios e protegem enzimas como a ATPase e neurofilamentos, reverterem o acúmulo de ácido láctico e recuperam o cálcio extracelular. Mas a ação mais expressiva parece ser a prevenção da quebra da membrana através da inibição da peroxidação e hidrólise de lipídios. Outro efeito da inibição da peroxidação de lipídios é a redução de produtos vasoativos provenientes do metabolismo do ácido aracdônico e consequente aumento do fluxo sanguíneo na medula (FADEN et al., 1984; TAOKA; OKAJIMA, 1998).

A prednisona é um corticóide comumente utilizado no tratamento de cães com lesão de medula espinhal (BONDY; COHN, 2002a). Esta é um corticóide sintético que precisa de conversão hepática para se transformar no composto ativo, a prednisolona. Entretanto as duas drogas podem ser utilizadas de maneira similar em aplicações sistêmicas, pois a conversão é rápida e completa (BONDY; COHN, 2002b).

Os efeitos colaterais associados à administração de corticóide são frequentes, nos quais se destacam as hemorragias, úlceras e perfurações gastrointestinais, imunossupressão, pancreatite (DUCKER; HAMIT; 1969; COLTER; RUCKER, 1988; BRAUND et al., 1990a; BAGLEY et al., 2000) e retardo na cicatrização (GERNDT et al., 1997).

2.9.2 Meloxicam

O meloxicam é um antiinflamatório não esteroidal que apresenta uma maior seletividade de inibição da isoforma ciclooxigenase-2 (COX-2) do que contra a isoforma ciclooxigenase-1 (COX-1) (ENGELHARDT et al., 1996). A inibição da COX-1 está associada com graves efeitos colaterais, como agregação plaquetária, lesão renal e gastrointestinal. Este fármaco por ter propriedade seletiva, apresenta uma maior segurança no tratamento.

Estudos têm demonstrado que ambas as isoformas da ciclooxigenases (COX-1 E COX-2), são expressivas na medula espinhal, conferindo aos antiinflamatórios não esteroidais atuação na medula espinhal por inibir a síntese de prostaglandinas (VANE et al., 1998). A inibição da síntese de prostaglandinas causa diminuição da permeabilidade vascular e vasoconstrição ou vasodilatação. Evita também a alteração da função plaquetária, não causando obstrução de vasos

sanguíneos e liberação de serotonina, na qual também não altera a permeabilidade vascular, evitando a formação de edema (JANSSENS, 1991) no trauma.

Fármacos que inibem a isoforma COX-2 são caracterizados como neuroprotetores devido a redução da síntese de radicais livres ou pelo controle no metabolismo do ácido aracídico através de um metabolismo alternativo (STRAUSS, 2002). Tem sido proposto que o meloxicam pode modular o estado oxidante através do seu efeito sobre a peroxidação lipídica (AGHA et al., 1999; ARAFA et al., 2007). Hakan et al. (2011) observaram que o meloxicam apresenta características neuroprotetoras ao determinar que o mesmo reduziu o estresse oxidativo em ratos com trauma medular agudo através da inibição da peroxidação lipídica, da depleção de glutatona e fragmentação de DNA.

3 CAPÍTULO 1

Prednisona e meloxicam no tratamento de ratos submetidos ao trauma agudo da medula espinhal

Graciane Aiello e Alexandre Mazzanti

(Artigo a ser submetido para publicação – Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMG)

Prednisona e meloxicam no tratamento de ratos submetidos ao trauma agudo da medula espinhal

[Prednisone and meloxicam in the treatment of rats submitted to acute compressive spinal cord injury]

Graciane Aiello *¹, Alexandre Mazzanti²

RESUMO

Considerando a relevância dos estudos destinados às lesões traumáticas da medula espinhal em humanos e animais, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da prednisona e meloxicam na terapia de ratos submetidos ao modelo experimental de trauma agudo da medula espinhal induzida pelo cateter de *Fogarty 2Fr* mediante avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo no sangue, dos testes neurológicos e do exame histopatológico da medula espinhal. Foram utilizados 90 ratos Wistar, distribuídos em seis grupos denominados GCS ou salina (n=15), GCP ou controle prednisona (n=15), GCM ou controle meloxicam (n=15), GTS ou trauma mais salina (n=15), GTP ou trauma mais prednisona (n=15) e GTM ou trauma mais meloxicam (n=15). Cada grupo foi redistribuído em três subgrupos de igual número de acordo com o tempo de tratamento no pós-operatório de 24h, 72h e sete dias. Todos os grupos foram submetidos à laminectomia e nos grupos GTS, GTM e GTP, após a exposição da medula espinhal, foi realizado o trauma medular compressivo utilizando o cateter de *Fogarty 2Fr*. Os grupos GCS e GTS foram tratados com solução salina (0,5ml/rato/dia), os GSM e GTM receberam meloxicam (2mg/kg/dia) e os grupos GSP e GTP receberam prednisona (2mg/kg/dia), sendo administrados pela via intraperitoneal (IP). Foram realizados testes neurológicos (BBB, plano inclinado e percepção a dor profunda) 24 horas antes e após o procedimento cirúrgico e repetido a cada 48 horas até a realização da eutanásia, ou seja, 24h, 72h e sete dias. Os ratos dos grupos GTS, GTM e GTP nos diferentes tempos (24h, 72h e sete dias), tiveram pontuação zero

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105900, Santa Maria, RS, Brasil. e-mail alexamazza@yahoo.com.br *Autor para correspondência.

² Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

na escala BBB, ou seja, nenhum movimento observado no membro pélvico; no plano inclinado, permaneceram com pontuação 3, ou seja, em um ângulo dez graus menor que antes da cirurgia e perda da percepção da dor profunda. Os grupos GTM e GTP apresentaram menor atividade da catalase e de níveis de TBARS quando comparado ao grupo GTS e essa redução foi mais evidente nas primeiras 72 horas de pós-operatória, indicando um possível efeito antioxidante desses fármacos. No grupo GTS, houve persistência desta ação até o sétimo dia pós-trauma. No exame histopatológico da medula espinhal foi constatada degeneração Walleriana e necrose da substância cinzenta de intensidades variáveis, não apresentando diferença entre os grupos submetidos ao trauma. Conclui-se que o meloxicam e a prednisona apresentam efeito antioxidante, mas não impedem a necrose e a degeneração Walleriana da medula espinhal de ratos submetidos a trauma medular agudo utilizando o cateter de *Fogarty 2Fr*.

Palavras-chave: peroxidação lipídica, catalase, cateter de *Fogarty 2Fr*.

ABSTRACT

Considering the relevance of study of traumatic spinal cord injury in humans and animals, the aim of the study was investigated the use of the prednisone and meloxicam in treatment of rats submitted the experimental model of acute spinal cord injury with 2Fr Fogarty catheter with evaluation of oxidative stress, neurological tests and histological exam. Ninety rats were divided in six groups: GCS or saline (n=5), GCP or prednisone control (n=5), GCM or meloxicam control, GTS or trauma saline (n=5), GTP or trauma meloxicam (n=5) and GTM or trauma prednisone (n=5). Each group was divided into three subgroups according to treatment time in the postoperative period of 24h, 72h and seven days. All groups submitted laminectomy and in the groups GTS, GTM and GTP, after exposure of the spinal cord was performed compressive spinal cord injury with 2Fr Fogarty catheter. The GCS and GTS were treated with saline (0,5ml/rat/day), GSM and GTM with meloxicam (2mg/kg/day) and GSP and GTP with prednisone (2mg/kg/dia). Neurological tests were performed (BBB, inclined plane and deep pain) 24 hours before and after surgery and repeated every 48 hours until the day of euthanasia. The parameters of oxidative stress was evaluated and performed histopathologica analysis of the spinal cord. The groups GTS, GTM and GTP in the different times were zero

point in the BBB scale and three points in the inclined plane and absence of deep pain. GTM and GTS groups had lower catalase activity and TBARS levels when compared to the GTS and they were more evident to 72 hours postoperative period, indicating a possible antioxidant effect. In the GTS group, there was persistence of this action until the seventh day after trauma. In the histopathological analysis were found Wallerian degeneration and necrosis of gray matter of intensity variation, with no significant difference between undergone to trauma. Meloxicam and prednisone can have neuroprotective and antioxidant effect, but the necrosis and Wallerian degeneration were not stop in rats submitted the acute spinal cord injury with 2Fr Fogarty catheter.

Key words: *lipid peroxidation, catalase, 2Fr Fogarty catheter.*

INTRODUÇÃO

O trauma medular agudo é um problema comum na medicina humana e veterinária, que pode ocasionar graves deficiências neurológicas motoras, sensoriais e autônomas (Olby, 2010). Os eventos que ocorrem na lesão da medula espinhal são geralmente divididos em primários e secundários (Olby, 2010). Os eventos primários caracterizam por danos mecânicos que causam contusão, compressão ou laceração (Rowland et al., 2008). Na maioria das vezes, as agressões primárias não são suficientes para causarem danos permanentes, mas desencadeiam uma série de eventos secundários progressivos (Rivlin & Tator, 1979; Bagley, 2000; Mallei et al., 2005).

Os eventos secundários incluem hemorragia e destruição do leito microvascular, produção de radicais livres, rápidas mudanças na concentração intracelular de íons, excitotoxicidade e inflamação. O ponto final desta cascata destrutiva é muitas vezes a apoptose, que pode ocorrer por um longo período de tempo após a lesão (Olby, 2010).

A formação precoce de radicais livres tem sido implicada como a maior causa de degeneração do sistema nervoso central após o trauma (Brown & Hall, 1992; Gerndt et al., 1997). Eles atacam todos os componentes celulares, mas reagem principalmente com os ácidos graxos insaturados da membrana fosfolipídica (Braund et al., 1990b; Araújo, 2005). A peroxidação lipídica causa desalinhamento dos lipídios, alterando a integridade da membrana, a fluidez e a manutenção dos gradientes iônicos. Este é o efeito mais grave dos radicais livres, pois leva a destruição rápida e

muitas vezes irreversível de tecidos após lesão ou isquemia (Brown & Hall, 1992). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um dos principais marcadores biológicos desse tipo de lesão em membranas celulares (Draper & Hadley, 1990). Como proteção e reparação que podem prevenir o acúmulo de radicais livres (Diploch, 1991; Goode & Webster, 1993), os organismos desenvolvem sistemas de defesa antioxidantes e entre as principais enzimas responsáveis por essa defesa destaca-se a catalase (CAT), a qual constitui a segunda defesa endógena de neutralização dos radicais livres (Wendel, 1981).

Como o trauma primário não pode ser evitado e tampouco amenizado com tratamento farmacológico, os mecanismos secundários têm sido alvos de tais terapias. Cada agente terapêutico atua sobre um ou mais mecanismos da lesão secundária, objetivando conferir neuroproteção e/ou restauração do tecido lesado (Hulsebosch, 2002; Fehlings & Baptiste, 2005).

Os antiinflamatórios esteroidais, representados pelos glicocorticóides têm sido exaustivamente pesquisados em trauma medular por suas diversas ações moduladoras sobre os mecanismos secundários da lesão, porém, seus efeitos colaterais são frequentes (Colter & Rucker, 1988; Braund et al., 1990a; Gerndt et al., 1997; Bagley et al., 2000). Já, os antiinflamatórios não esteroidais, como por exemplo o meloxicam, têm demonstrado características neuroprotetoras relevantes ao reduzir o estresse oxidativo em ratos com trauma medular agudo e estão associadas a mínimos efeitos colaterais (Hakan et al., 2011). Estudos têm demonstrado que o meloxicam foi capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (Jollicot et al., 1997) e ter propriedades neuroprotetoras ao reduzir a geração de radicais livres (Villegas, 2000; Nivsarkar et al., 2006; Hakan et al., 2011).

Considerando a relevância dos estudos destinados às lesões traumáticas da medula espinal em humanos e animais, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da prednisona e meloxicam na terapia de ratos submetidos ao modelo experimental de trauma agudo da medula espinal induzida pelo cateter de *Fogarty 2Fr*, mediante avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo no sangue, dos testes neurológicos e do exame histopatológico da medula espinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 90 ratos Wistar, machos, com peso corporal variando entre 290 e 360 g, provenientes do Biotério Central da UFSM e distribuídos aleatoriamente em seis grupos de igual número (n=15) denominados de **GCS** ou controle salina, **GCP** ou controle prednisona, **GCM** ou controle meloxicam, **GTS** ou trauma mais salina, **GTP** ou trauma mais prednisona e **GTM** ou

trauma mais meloxicam. Cada grupo foi redistribuído em três subgrupos (n=5) de acordo com os tempos de avaliações pós-operatório, ou seja, 24h, 72h e sete dias. Os ratos receberam ração comercial para roedores e água *ad libitum* e foram mantidos em temperatura ambiente controlada ($21^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e com ciclos de 12 horas com luz e 12 horas sem luz. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol³, na dose de 10mgkg^{-1} , por via subcutânea e indução e manutenção anestésica com isofluorano⁴ administrado por meio de máscara em sistema semi-aberto. Após a realização da tricotomia e em plano anestésico, os ratos foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica seguido de anti-sepsia da pele com álcool-iodo-álcool. Realizou-se incisão cutânea e do tecido subcutâneo entre a primeira e quarta vértebras lombares. Os músculos epaxiais sobre L3 foram incisados e rebatidos utilizando o elevador de periósteo para expor as lâminas ósseas dorsais e os processos espinhosos.

O acesso à medula espinhal foi realizado pela técnica de laminectomia, utilizando uma perfuratriz elétrica de baixa rotação acoplado a uma broca sulcada de 2mm de diâmetro efetuando o desgaste das lâminas externa e interna dorsais de L3. Simultaneamente ao desgaste, foi realizada a irrigação com solução fisiológica 0,9% com intuito de se evitar necrose térmica óssea.

Em seguida, nos ratos dos grupos GCS, GCM e GCP foi realizada a síntese da musculatura epaxial com padrão de sutura simples contínuo e da pele com Wolff, ambos com fio de mononilon 4-0⁵. Nos ratos dos grupos GTS, GTM e GTP, após a exposição da medula espinhal pela técnica cirúrgica de laminectomia, foi realizado o trauma medular compressivo utilizando o cateter de *Fogarty 2Fr*⁶. O cateter foi introduzido no espaço subdural posicionado na face dorsal da medula espinhal e conduzido cranialmente, conforme técnica descrita por Khan & Griebel (1983) e Vanicky et al. (2001) até o espaço intervertebral T12 e T13. Em seguida, o balonete do cateter foi inflado injetando-se 0,20ml de ar ambiente, com o auxílio de uma seringa, permanecendo inflado durante cinco minutos. A síntese da musculatura epaxial e da pele foi

³ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Av. Paoletti 363, Itapira – SP.

⁴ Biochimo, Rod. Presidente Dutra, Km 310, Itatiaia – RJ.

⁵ Medsuture, Rod. SC 407, 4405, São José – SC.

⁶ Edwards Lifesciences, Rua Verbo Divino, 1549 - 1º andar, São Paulo – SP

realizada utilizando o mesmo padrão de sutura e o tipo de fio anteriormente descrito para os grupos GCS, GCP e GCM.

Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram acondicionados em uma gaiola aquecida por uma luz incandescente de 100 watts de coloração vermelha, a uma distância mínima de 50cm, durante aproximadamente 15 minutos e recolocados nas gaiolas de origem. Os ratos de todos os grupos receberam analgesia pós-operatória com cloridrato de tramadol³ (10mg/kg, via subcutânea) a cada oito horas durante 24 horas. Os animais que foram submetidos ao trauma medular experimental (GTS, GTP e GTP) apresentaram retenção urinária, sendo realizada massagem vesical individualmente a cada oito horas.

Os animais dos grupos GCS e GTS foram tratados com solução salina a 0,9%⁴ na dose de 0,5ml/rato, intraperitoneal, a cada 24 horas, GCP e GTP com prednisona⁷ na dose de 2mg/kg, intraperitoneal, a cada 24 horas e GCM e GTM com meloxicam⁷ na dose de 2mg/kg, intraperitoneal, a cada 24 horas. A administração dos fármacos iniciou 60 minutos após o término do procedimento cirúrgico nos ratos de todos os grupos. A duração do tratamento variou de acordo com os subgrupos, sendo os de 24h de pós-operatório (PO) tratados com uma aplicação das soluções correspondentes (salina, meloxicam ou prednisona) e submetidos a eutanásia 24 horas da cirurgia; os de 72 horas de PO tratados com três aplicações e realizada a eutanásia após 72 horas e, os subgrupos de sete dias de PO tratados com sete aplicações e feita a eutanásia após sete dias de PO.

Os testes neurológicos foram realizados em todos os animais através da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995), do plano inclinado quatro (Rivlin & Tator, 1977) (Anexo A e B) e da percepção a dor profunda (Olby et al., 2003). A escala BBB observa os movimentos da articulação do quadril, joelho, tornozelo, e posição do tronco, cauda e patas traseiras. A partir destas observações, foram atribuídos pontos de zero a 21, sendo zero o correspondente à ausência total de movimentos e 21 à presença de movimentos normais. (Anexo A).

No teste do plano inclinado os animais foram colocados individualmente em um plano inclinado emborrachado ajustável em diferentes ângulos (10° até 90°). O ângulo foi gradualmente aumentado de zero até o ângulo que o animal não conseguia mais se manter na posição inicial

⁷ Sigma –Aldrich, Co, 3050 Spruce Street, St Louis, MO - USA.

por cinco segundos (Rivlin & Tator, 1977). Utilizou-se uma escala de 1 a 4, no qual 1 o animal permaneceu em um de ângulo 30° menor do que antes da cirurgia e 4 permaneceu no mesmo ângulo antes do procedimento cirúrgico (Anexo B).

A percepção à dor profunda (PDP) foi mensurada pela compressão das falanges (periósteo) e da cauda com o auxílio de uma pinça hemostática. A PDP foi considerada ausente quando os animais não reagiram ao estímulo doloroso com vocalização e/ou olhar para o membro.

Estas avaliações foram feitas 24 horas antes e depois ao procedimento cirúrgico, seguido de intervalos de 48 horas. Os teste de avaliação de percepção a dor profunda foi realizado 24 horas após ao procedimento cirúrgico apenas nos ratos dos grupos GTS, GTM e GTP. Os resultados foram anotados em fichas individualizadas.

Para avaliar os parametros do estresse oxidativo os animais foram anestesiados em uma câmara com isofluorano e realizada a coleta de sangue por punção cardíaca (10ml) e, em seguida, submetidos a eutanásia utilizando o mesmo agente anestésico. Foi quantificado o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através de amostras de soro (Jentsch et al., 1996) e pela atividade da catalase obtida do sangue total segundo o método espectrofotométrico de Nelson & Kiesow (1972).

Para análise histopatológica, os segmentos da medula espinhal de T11 a L1 foram fixados em solução de formol tamponado a 10% por um período mínimo de 72 horas e encaminhado para processamento pela técnica de inclusão em parafina. Foram cortados longitudinalmente e sagitalmente e montados em lâminas e posteriormente foram coradas pela técnica de Hematoxilina de Harris e Eosina. A estrutura analisada foi o parênquima medular entre T12-T13. As alterações observadas na medula espinhal foram a presença de degeneração walleriana e da necrose e classificadas em ausente, leve, moderada e acentuada.

Para análise estatística da atividade da catalase e dos níveis de TBARS aplicou-se análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste de comparações múltiplas de Duncan. Todos os resultados foram indicados pela média \pm do Erro Padrão da Média (EPM). As análises histopatológicas foi feito teste de comparações multiplas de Tukey e Wilcoxon Score, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O modelo experimental de trauma medular utilizando cateter *Fogarty 2Fr* foi escolhido com base nos estudos de Tarlov et al. (1953), Khan e Griebel (1983) e Vanicky et al. (2001). O método se mostrou eficiente e de fácil execução e tem sido utilizado frequentemente em diferentes espécies como macaco (Tator & Deecke, 1973), ferrets (Eidelberg et al., 1976), gato (Martin & Bloedel, 1973), rato (Khan & Griebel, 1983, Ondrejčák et al., 2004) e cão (Jung et al., 2009). Além disso, este modelo ocasiona lesões medulares severas, uma situação que pode ser evidenciada na rotina clínica de pequenos animais.

Em relação aos testes neurológicos (escala BBB, plano inclinado e percepção a dor profunda), os ratos dos grupos GCS, GCM, GCP que foram submetidos a laminectomia sem a realização do trauma medular não apresentaram deficiências neurológicas nos diferentes tempos de observação. Este resultado corrobora com o de Kaptanoglu et al. (2003) que também não observaram alterações. Por outro lado, todos os ratos submetidos ao modelo experimental de trauma medular (GTS, GTM e GTP) e nos diferentes tempos (24h, 72h e sete dias) tiveram pontuação zero na escala BBB, ou seja, nenhum movimento observado nos membros pélvicos, no plano inclinado, permaneceram com pontuação 3, ou seja, em um ângulo de dez graus menor que o anterior a cirurgia e perderam a percepção da dor profunda (Tabela 2). Segundo Bergman et al. (2000a) este pode ser um sinal clínico cujo prognóstico é desfavorável em relação ao retorno da deambulação. Quanto ao tempo de pós-operatório, a falta de retorno da deambulação após 24h, 72h e sete dias de PO corroboraram com os achados de Beatti et al. (2000) que verificaram nas lesões medulares experimentais severas o início da recuperação funcional espontânea ocorre após uma semana da indução da lesão.

Um dos mecanismos moleculares mais investigados na fisiopatologia secundária à lesão aguda da medula espinhal são a formação de radicais livres e a peroxidação lipídica (Amar & Levy, 1999; Hall, 2001). Para determinar os seus níveis utilizam-se as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), considerado um dos principais marcadores biológicos desse tipo de lesão em membranas celulares (Draper & Hadley, 1990).

Neste contexto, foi verificado nesta pesquisa que o nível de TBARS não apresentou diferença significativa nos grupos controles (GCS, GCM e GCP) decorridos 24h e 72h de PO (Figura 1A). Já, aos sete dias de PO, os ratos dos grupos controles (GCS, GCM e GCP) apresentaram o nível de TBARS maior quando comparado aos demais tempos de avaliação pós-

operatória, indicando que a peroxidação lipídica foi maior, mesmo sem os estímulos provocados pelo trauma. Ainda, neste mesmo período de avaliação, o GCS apresentou níveis de TBARS inferior ($p < 0,05$) aos grupos GCM e GCP (Figura 1C).

Nos grupos traumatizados, o nível de TBARS após 24 horas de PO nos grupos GTM e GTP apresentaram níveis inferiores ao GTS ($p < 0,05$) (Figura 1A). Isto demonstra que os ratos submetidos ao trauma medular e tratados com os antiinflamatórios esteroidal e não esteroidal comparados ao grupo tratado com o veículo salina apresentaram menor peroxidação lipídica e formação de radicais livres. O grupo GTP também apresentou um nível de TBARS inferior ao grupo GTM ($P < 0,05$), demonstrando que a prednisona mostrou-se um efeito antioxidante melhor neste período ao ser comparado ao GTM. Decorridas 72 horas de PO, o grupo GTS também apresentou nível de TBARS maior que os demais grupos tratados ($p < 0,05$), porém, ao contrário do resultado observado nas primeiras 24 horas de PO, no grupo GTM o nível de peroxidação lipídica foi inferior ao grupo GTP ($P < 0,05$) (Figura 1B), indicando a persistência da atividade antioxidante e inibição da formação de radicais livres promovida pelo meloxicam. Aos sete dias de PO, no entanto, os níveis de peroxidação lipídica do GTS reduziram aos valores próximos aos dos grupos GTM e GTP, não havendo diferença significativa entre eles.

Quanto à atividade da catalase, não houve diferença significativa nos grupos controles (GCS, GCM e GCP) decorridos 24h e 72h e sete dias de pós-operatório (PO). Este resultado demonstra que a atividade desta enzima foi semelhante nos grupos que não tiveram trauma medular e não receberam nenhum tipo de fármaco (Figuras 1D e 1E). Já nos grupos traumatizados, ou seja, GTS, GTM e GTP, decorridos 24 e 72 horas de PO, verificou-se que os grupos GTM e GTP apresentaram atividade da CAT inferior aos GTS ($p < 0,05$) e semelhantes aos grupos controles não traumatizados GCS, GCM e GCP, indicando que o meloxicam e a prednisona apresentaram uma atividade antioxidante e impediram um aumento no estresse oxidativo. Aos sete dias de PO, no entanto, verificou-se que o grupo GTM apresentou uma atividade da catalase inferior aos grupos GTS e GTP ($p < 0,05$) e se igualou aos controles não traumatizados (Figura 1F), indicando que o meloxicam continuou por um tempo mais prolongado sua atividade antioxidante e possível ação neuroprotetora, corroborando com os achados de Strauss (2002). Hakan et al. (2011) também observaram em ratos submetidos a trauma medular agudo que o tratamento com meloxicam na mesma dose administrada nesta

pesquisa, apresentou características neuroprotetoras ao determinar que o mesmo reduziu o estresse oxidativo através da inibição da peroxidação lipídica e da fragmentação de DNA.

Nesta pesquisa, não foi observado no exame histopatológico do fragmento da medula espinhal dos ratos dos grupos controles GCS, GCM e GCP lesões na meninge e no parênquima medular em nenhum dos tempos avaliados (Figuras 2A e 2C). Este dado é similar aos de Kaptanoglu et al. (2003), no qual também não observaram alterações microscópicas em ratos submetidos à laminectomia sem trauma medular, diferindo, porém, no período de avaliação que foi até oito horas pós-trauma. Já nos ratos dos grupos submetidos ao trauma medular (GTS, GTM e GTP) foram observadas lesões de necrose da substância cinzenta e degeneração Walleriana de intensidades variáveis (Figuras 2B e 2D) e em todos os tempos de observações (24h, 72h e sete dias). Estes resultados coincidem com os de Cemil et al. (2010) e Toklu et al. (2010) que verificaram estas mesmas alterações após o trauma medular agudo e com início geralmente após 24h do trauma (Braund et al., 1990b).

A degeneração Walleriana é o termo empregado para degeneração de axônios e suas bainhas de mielina (substância branca) e geralmente de origem traumática (Carlton, 2005). Com relação a este achado, foi verificado nos ratos do grupo GTS 33,33% de intensidade leve e 66,37% moderada e, no grupo GTM 100% de intensidade moderada e no GTP 100% de intensidade acentuada após 24h do trauma. Após 72h de PO, foi observado no grupo GTS 66,37% de intensidade leve e 33,33% acentuada, no GTM 33,33% de intensidade moderada e 66,67% leve e, no GTP 33,33% de intensidade leve, 33,33% moderada e 33,3% ausência de degeneração Walleriana. Já nos ratos de sete dias de PO, o grupo GTS apresentou 66,67% de intensidade leve e 33,33% ausente, no GTM 33,33% moderada e 66,67% acentuada e, no GTS 66,67% de intensidade acentuada e 33,33% ausência de degeneração Walleriana. Não houve diferença significativa entre os grupos nos tempos de observação PO, porém foi observada uma redução na intensidade da lesão decorrida 72 horas de PO nos grupos GTM e GTP quando comparado ao grupo GTS que se manteve estável (Figura 3A). Hakan et al. (2010) também observaram que o grupo submetido ao trauma medular e tratado com meloxicam durante sete dias apresentaram degeneração menos intensa comparado ao grupo tratado com solução salina. Já Silva et al. (2008) em seu estudo não observaram diferenças histopatológicas entre os grupos tratados com diferentes doses de prednisona ao grupo tratado com placebo.

Em relação à necrose da medula espinhal foi verificado nos ratos do grupo GTS 33,33% de intensidade leve e 66,37% moderada e, no grupo GTM 66,67% de intensidade leve e 33,33% moderada e, no GTP, 100% de intensidade moderada após 24 horas de PO. Decorridos 72h de PO, foi observado no grupo GTS 66,37% de intensidade acentuada e 33,33% moderada, no GTM 33,33% de intensidade leve e 66,67% acentuada e, no GTP 66,67% de intensidade leve e 33,33% moderada. Já nos ratos de sete dias de PO, o grupo GTS apresentou 100% de intensidade acentuada, GTM 33,33% moderada e 66,67% acentuada e, no GTS 66,67% de intensidade moderada e 33,33% acentuada (Figura 3B). A necrose aumentou em todos os grupos de acordo com a evolução do PO. Não foi observada diferença significativa entre os grupos GTS, GTM e GTP entre os tempos de observação, porém os grupos GTM e GTP apresentaram intensidade inferior ao grupo GTS.

Com os resultados encontrados neste estudo pôde-se sugerir que o meloxicam e a prednisona apresentaram efeito antioxidante quando comparado ao grupo controle e foi mais evidente nas primeiras 72h pós-trauma. O meloxicam possuiu uma ação mais prolongada que a prednisona principalmente na diminuição da atividade da catalase, porém, nenhum deles apresentaram vantagens na indicação no tratamento de ratos submetidos a trauma agudo de medula espinhal empregando o cateter de *Fogarty 2Fr*.

Com relação às lesões microscópicas da medula espinhal, tanto o meloxicam como a prednisona não impediram a necrose e a degeneração Walleriana, porém, a intensidade foi discretamente menor nos ratos tratados com estes fármacos quando comparado ao grupo controle (salina). Embora necessita-se de mais investigações a respeito, a relevância clínica deste estudo foi a possível influência no prognóstico, haja vista que a preservação de 5% dos tratos motores poderá recuperar a deambulação em ratos (Blight & Decrescito, 1986; Basso et al., 1996). Novos estudos com maior amostragem de ratos são indicados para avaliar o efeito destes fármacos por um período prolongado de pós-operatório, estudar outros marcadores na medula espinhal como acetilcolinesterase, quantificar os tratos motores e sensoriais da medula espinhal e correlacioná-los com os sinais neurológicos.

CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que os ratos submetidos a trauma medular agudo utilizando o cateter de *Fogarty 2Fr* e tratados com meloxicam e prednisona apresentam severas deficiências neurológicas; ambos os fármacos apresentam possível ação antioxidante e não impedem a necrose e a degeneração Walleriana na medula espinhal.

REFERÊNCIAS

- AMAR, A. & LEVY, M. 1999. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*, 44:1027–1039.
- ARAÚJO, I.S. 2005. Presence of free radicals in spinal cord injury. Experimental evidence in rats. *Revista Brasileira de Neurologia*. 41(1):23-29.
- BAGLEY, R.S. 2000. Spinal fracture or luxation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 30(1):133-153.
- BASSO, D.M. et al. 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma*. 12:1-21.
- BASSO M.D., BEATTIE M.S. & BRESNAHAN J.C. 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology*. 139:244–256.
- BEATTI, M.S.; FAROOQUI, A. & BRESNAHAN, J.C. 2000. Apoptosis and Secondary Damage After Experimental Spinal Cord Injury. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*. 6(2):14–26.
- BERGMAN, R.; LANZ, O. & SHELL, L. 2000a. Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. *Veterinary Medicine*. 95(11):846-849.
- BLIGHT A.R. & DECRESCITO V. 1986. Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. *Neuroscience*. 19:321–341.
- BRAUND, K.G.; SHORES, A. & BRAWNER, W.R. 1990a. Recovering from spinal cord trauma: the rehabilitative steps, complications, and prognosis. *Veterinary Medicine*, v.85, p.740-743, 1990a.

- BRAUND, K.G.; SHORES, A. & BRAWNER, W.R. 1990b. The etiology, pathology, and pathophysiology of acute spinal cord trauma. *Veterinary Medicine*. 85:684-691.
- BROWN, S.A. & HALL, E.D. 1992. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *The Journal of the American Veterinary Medical Association*. 200(12):1849-1858.
- CARLTON, S.M. et al. 2009. Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain*. 147:265–276.
- CEMIL, B., TOPUZ, K., DEMIRCAN, M.N., KURT, G. , TUN K., KUTLAY M., IPCIOGLU O. & KUCUKODACI, Z. 2010. Curcumin improves early functional results after experimental spinal cord injury. *Acta Neurochirurgica*. 152(9):1583–1590.
- CHRISTIE, S.D., COMEAU, B., MYERS, T., SADI, D., PURDY, M. & MENDEZ, I. 2008. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. *Neurosurgery Focus*. 25(5):1-7.
- COLTER, S. & RUCKER, N.C. Acute injury to the central nervous system. 1988. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 18(3):545-563.
- DIPLOCH, A. 1991. Antioxidant nutrients and disease prevention an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 53:189-193.
- DRAPER, H.H. & HADLEY, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 186:421-431.
- ESTERBAUER, H. KOLLER, E. SLEE, R.G. & KOSTER, J.F. 1993. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Journal of Biochemistry*. 3:37-52.
- FEHLINGS, M.G. & BAPTISTE, D.C. 2005. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury*. 36:113-122.
- GERNDT, S.J. RODRIGUEZ, J.L., PAWLIK, J.W., TAHERI, P.A., WAHL, W.L. & MICHEALS, A.J. 1997. Consequences of high-dose steroid therapy for acute spinal cord injury. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 42(2):279-284.
- GOODE, H. F. & WEBSTER, N. R. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Critical Care Medicine*. 21(1):1770-1776.
- HALL, E.D. 2001. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *Journal of Spinal Cord Medicine*. 24:142–146.

- HALL, E.D. 2011. Antioxidant Therapies for Acute Spinal Cord Injury. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 8:158-167.
- HALLIWELL, B. 2003. Wood Deterioration and Preservation – Advances in our Changing p.845-860. In: World; Goodell, B.; Nicholas, D.D. & Schultz, T. P. (Ed), ACS Symp. Ser, American Chemical Society: Washington.
- HAKAN, T., TOKLU, H.Z., BIBER, N., CELIK, H., ERZIK C., OGÜNC A.V., ÇETINEL S. & SENER G. 2011. Meloxicam Exerts Neuroprotection on Spinal Cord Trauma in Rats. *International Journal of Neuroscience*. 121:142–148.
- HULSEBOSCH, C.E. 2002. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in Physiology Education*. 26(1-4):238-255.
- JENTZSCH, A.M. BACHMANN, H., FÜRST, P. & BIESALSKI, H.K. 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical & Medicine*. 20(2):251-256.
- JOLLIET, P., SIMON, N., BRÉE, F., URIEN, S., PAGLIARA, A., CARRUPT, A., TESTA, B. & TILLEMEN, J. 1997. Blood-to-brain transfer of various oxicams: effect of plasma binding on their brain delivery. *Pharmaceutical Research*. 14(5):650-656.
- JUNG, D., HA, J., KANG, B, KIM, J, QUAN F., LEE, J., WOO, E. & PARK H. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 285:67–77.
- KAPTANOGLU, E, BESKONAKLI E., OKUTAN, O., SURUCU H.S., & TASKIN Y. 2003. Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. *Journal of Clinical Neuroscience*. 10(3):329-334.
- KHAN, M. & GRIEBEL, R. 1983. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 10:161–165.
- LIU, J.B., TANG, T.S., YANG, H.L. & XIAO, D.S. 2004. Antioxidation of melatonin against spinal cord injury in rats. *Chinese Medical Journal (English)* 117:571-575.
- MALLEI, A., ADEN, S.A., BACHIS, A., BRANDOLI, C., ONGINI, E. & MOCCHETTI, I. 2005. The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. *Brain Research*. 1062:16-25.

- MARTIN, S.H. & BLOEDEL, J.R. 1973. Evaluation of experimental spinal cord injury using cortical evoked potentials. *Journal of Neurosurgery*. 39:75–81.
- NELSON, D.P. & KIESOW, L.A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*. 49(2):474-478.
- NIVSARKAR, M., BANERJEE, A., SHAH, D., TRIVEDI J., PATEL M., CHERIAN, B. & PADH H. 2006. Reduction in Aluminum Induced Oxidative Stress by Meloxicam in Rat Brain. *Iranian Biomedical Journal*. 10(3):151-155.
- OLBY, N. 2010. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 40(5):791-807.
- OLBY, N. & JEFERRY, N. 2003. Pathogenesis of diseases of the central nervous system, p.1132-1147. In: SLATTER, D. *Textbook of small animal surgery*. 3.ed. Philadelphia: Saunders.
- ONDREJCÁK, T.; VANICKÝ, I. & GÁLIK, J. 2004. Ischemic preconditioning does not improve neurological recovery afterspinal cord compression injury in the rat. *Brain Research*. 995: 267– 273.
- QIAN, H. & LIU, D. 1997. The time course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measured by microdialysis and high pressure liquid chromatography. *Neurochemical Research*. 22:1231-1236.
- RESNICK D.K., GRAHAM S.H., DIXON, C.E. & MARION, D.W. 1998. Role of cyclooxygenase-2 in acute spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 15:1005–1013.
- RIVLIN, A.S. & TATOR, C.H. 1979. Effect of vasodilators and myelotomy on recovery after acute spinal cord injury in rats. *Journal of Neurosurgery*. 50:349-352.
- ROWLAND, J.W. 2008. Current Status of Acute Spinal Cord Injury - Pathophysiology and Emerging Therapies: Promise on the Horizon. *Neurosurgical Focus*. 25(5):E2.
- SILVA, C.M.O., MELO, E.G., ALMEIDA, A.E.R.F., GOMES, M.G., SILVA, C.H.O, RACHID, M.A., JÚNIOR, D.V., VIEIRA, N.T. & FRANÇA, S.A. 2008. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(3):641-650.

- STRAUSS, K.I. & MARINI, A.M. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death. *Journal of Neurotrauma*. 19:627–638.
- TARLOV, I.M. et al. 1953. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Archives of Neurology & Psychiatry*. 70:813–819.
- TATOR, C.H. & DEECKE, L. 1973. Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma. *Journal of Neurosurgery*. 39:52–64.
- TOKLU, H.Z. et al. 2010. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. *Journal of Spinal Cord Medicine*. 33(4):401–409.
- VANICKÝ, I., URDZÍKOVÁ, L., SAGANOVÁ, K. ČÍZKOVÁ, D. & GÁLIK J. 2001. A Simple and Reproducible Model of Spinal Cord Injury Induced by Epidural Balloon Inflation in the Rat. *Journal of Neurotrauma*. 8(12):1399-1407.
- VILLEGAS, I., MARTÍN, M.J., LA CASA, C., MOTILVA, V., & LASTRA, C.A. 2000. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. *Inflammation Research*. 49(7):361-366.
- WENDEL, A. 1981. Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*. 77:325-332.

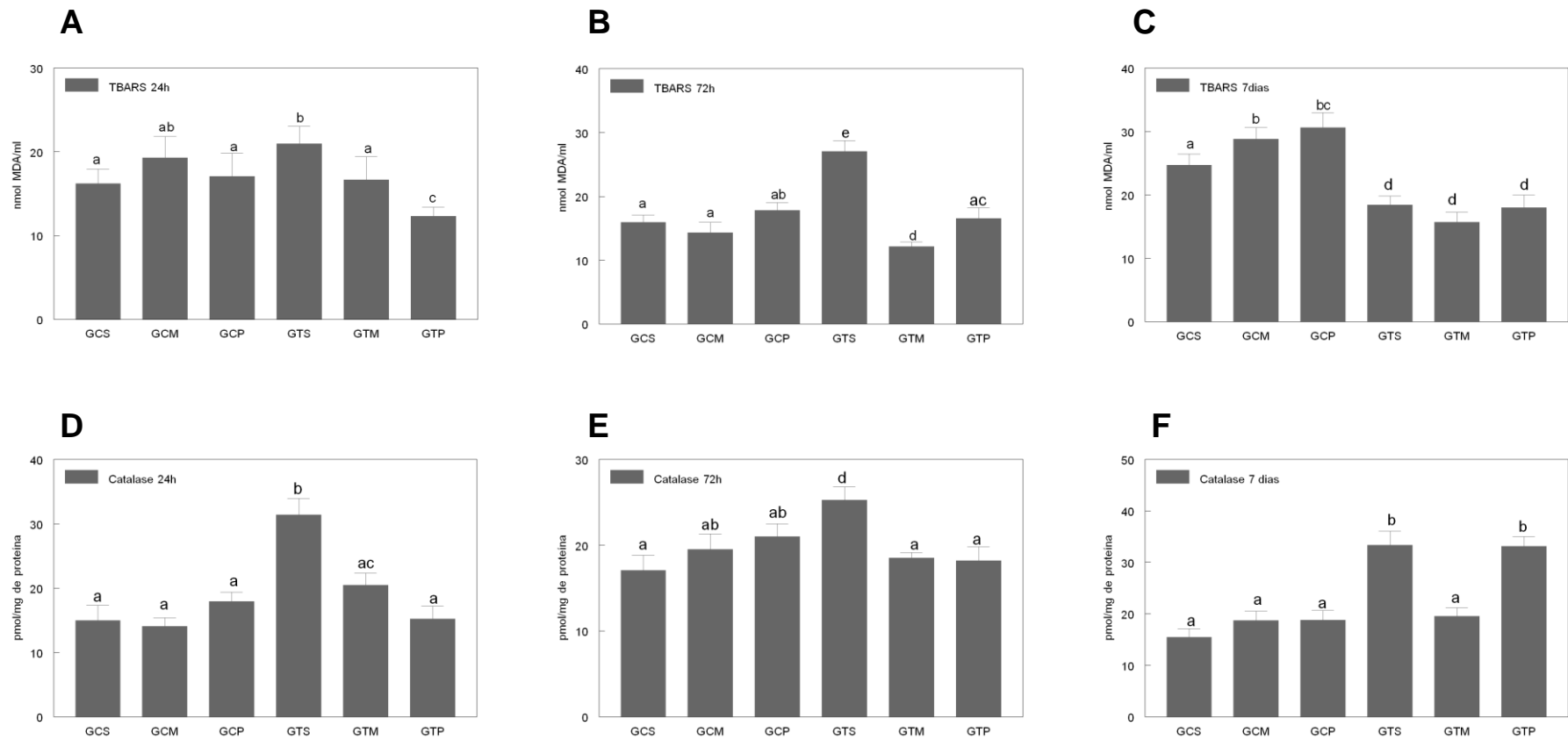


Figura 1. Valores dos níveis de TBARS (A, B, C) e atividade da catalase (D, E F) em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com meloxicam e prednisona, decorridos 24h, 72h e sete dias de pós-operatório. **GCS:** Grupo controle salina; **GCM:** Grupo controle meloxicam; **GCP:** Grupo controle prednisona, **GTS:** Grupo tratado salina; **GTM:** Grupo tratado meloxicam; **GTP:** Grupo tratado prednisona.

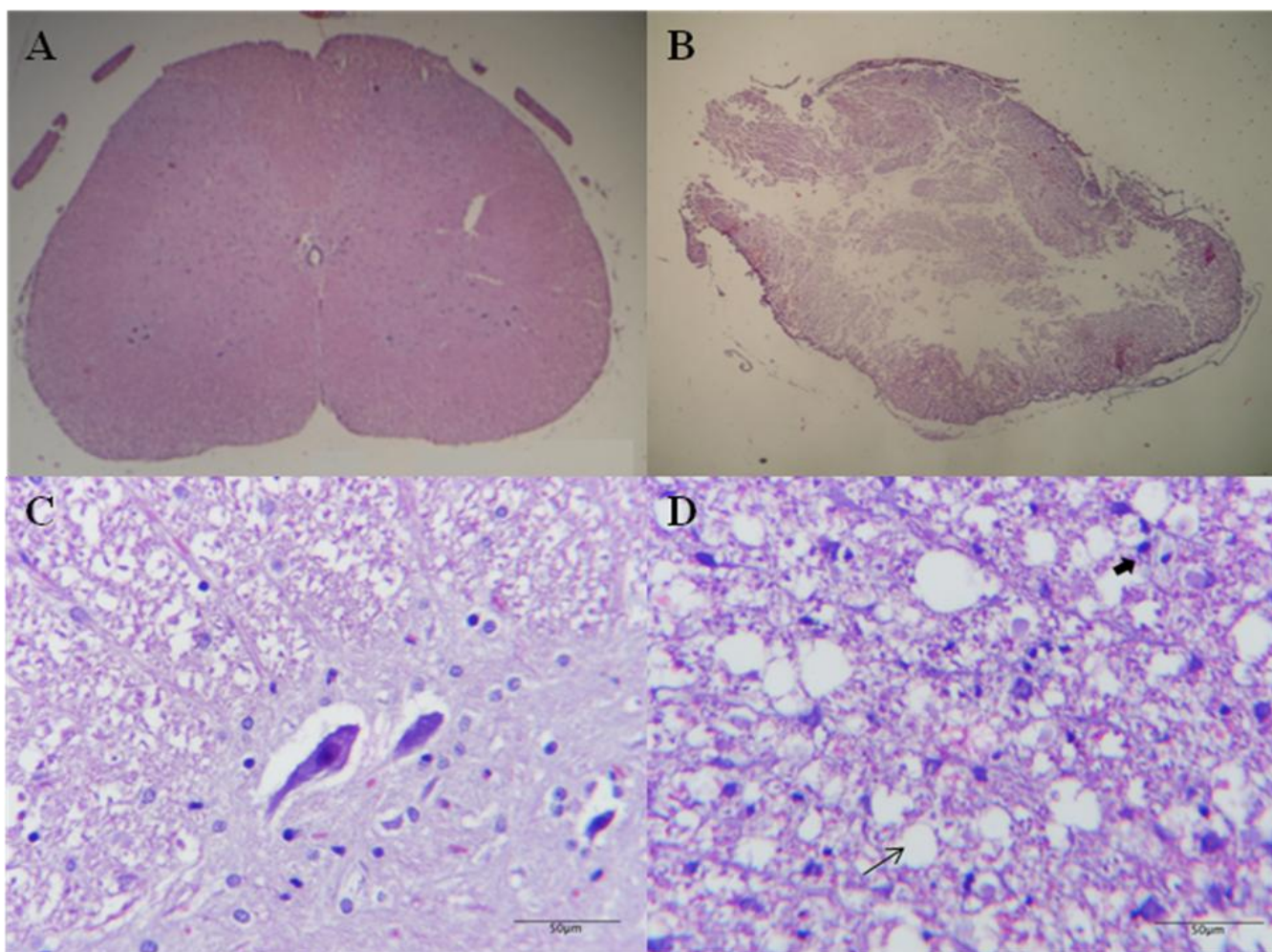


Figura 2. Representação microscópica da medula espinhal em ratos submetidos a trauma agudo de medula espinhal com cateter de *Fogarty* 2Fr. Nota-se no grupo controle (A e C) ausência de lesões no parênquima medular. No rato do grupo submetido ao trauma (B e D), verifica-se lesão em parênquima medular, com presença de necrose (seta espessa) e degeneração Walleriana (seta fina).

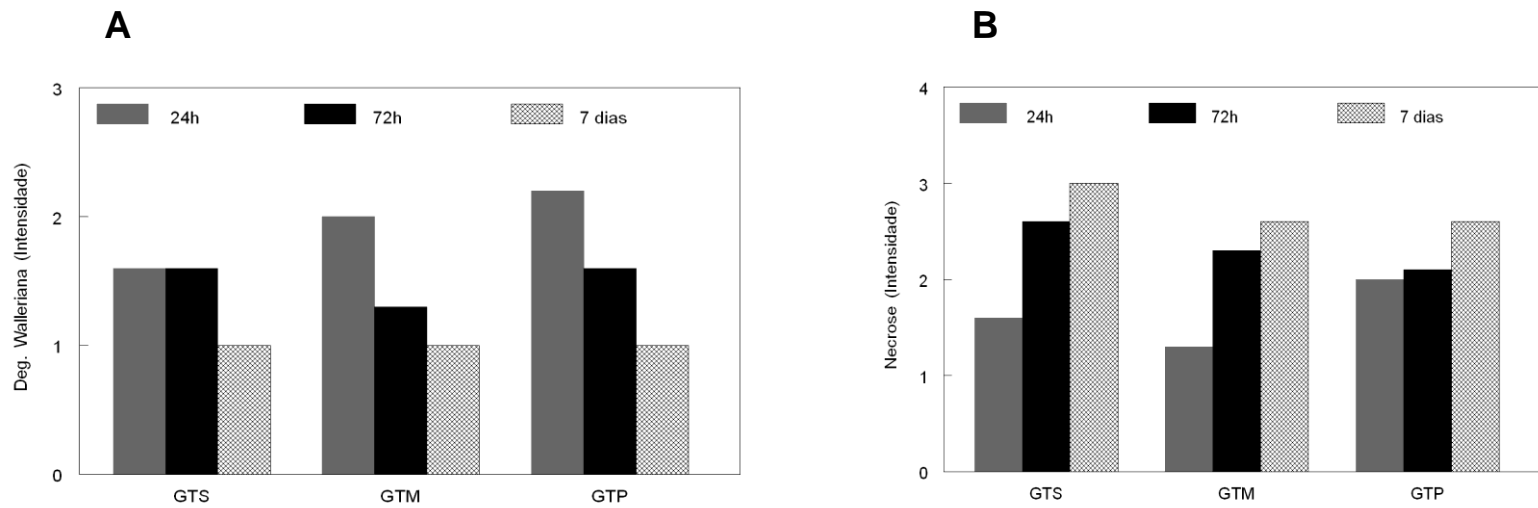


Figura 3. Intensidade da degeneração Walleriana (A) e necrose (B) da medula espinhal de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com meloxicam e prednisona, decorridos 24h, 72h e sete dias de pós-operatório. **GTS:** Grupo tratado salina; **GTM:** Grupo tratado meloxicam; **GTP:** Grupo tratado prednisona.

4 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que os ratos submetidos a trauma medular agudo utilizando o cateter de *Fogarty 2Fr* e tratados com meloxicam e prednisona apresentam severas deficiências neurológicas; ambos os fármacos apresentam possível ação antioxidante e não impedem a necrose e a degeneração Walleriana na medula espinhal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHA, A.M. et al. 1999. Modulation of oxidant status by meloxicam in experimentally induced arthritis. **Pharmacology Research**. 40:385–392.

ALLEN, A.R.. Surgery of experimental lesions of spinalcord equivalent to crush injury of fracture dislocation ofspinal column. A preliminary report. **Journal of American Medical Association**, v.57, p.878–880, 1911.

AMAR, A.; LEVY, M. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. **Neurosurgery**, v.44, p.1027–1039, 1999.

ANDRADE, M.M.J. Antiinflamatórios esteróidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNADI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.22, p.224-239.

ARAF, H.M. et al. 2007. Anti-fibrotic effect of meloxicam in a murine lung fibrosis model. **European Journal of Pharmacology**. 564:181–189.

ARAÚJO, I.S. Presence of free radicals in spinal cord injury. Experimental evidence in rats. **Revista Brasileira de Neurologia**, v.41, n.1, p.23-29, 2005.

BAGLEY, R.S. Spinal fracture or luxation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.30, n.1, p.133-153, 2000.

BASSO, D.M. et al. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of neurotrauma**, v.12, p.1-21, 1995.

BASSO MD, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Experimental Neurology**, v.139 p.244–256, 1996.

BASSO, D.M. et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. **Journal of Neurotrauma**, v.13, p.343– 359, 1996.

BEATTI, M.S.; FAROOQUI, A.; BRESNAHAN, J.C. Apoptosis and Secondary Damage After Experimental Spinal Cord Injury. **Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation**, v.6, n.2, p.14–26, 2000.

BECKMAN JS. The double-edged role of nitric oxide in brainfunction and superoxide-mediated injury. **Journal Developmental Physiology**, v.15, p.53-59, 1991.

BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. **Veterinary Medicine**, v.95, n.11, p.855-866, 2000a.

BLIGHT, A.R. New drugs for spinal trauma. In: **American College of Veterinary Internalmedicine Forum**, 18., 2000, Seattle. Proceedings Seattle, 2000. p.292-293

- BONDY, P.J.; COHN, L.A. Choosing an appropriate glucocorticoid treatment plan. **Veterinary Medicine**, v.97, n.11 , p.841-849, 2002a.
- BONDY, P.J.; COHN, L.A. Physiological effects and pharmacologic considerations of glucocorticoids. **Veterinary Medicine**, v.97, n.11, p.836-839, 2002b.
- BRAUGHLER, J. M.; HALL, E. D. Central nervous system trauma and stroke. 1. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.6, p.289-301, 1992.
- BRAUND, K.G. et al. Recovering from spinal cord trauma: the rehabilitative steps, complications, and prognosis. **Veterinary Medicine**, v.85, p.740-743, 1990a.
- BRAUND, K.G. et al. The etiology, pathology, and pathophysiology of acute spinal cord trauma. **Veterinary Medicine**, v.85, p.684-691, 1990b.
- BROWN, S.A.; HALL, E.D. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. **The Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n. 12, p.1849-1858, 1992.
- CARLTON, S.M. et al. Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury. **Pain**, v.147, p.265–276, 2009.
- CEMIL, B. et al. Curcumin improves early functional results after experimental spinal cord injury. **Acta Neurochirurgica**, v.152, n.9, p.1583–1590, 2010.
- CHANCE, et al. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**, v.59, p.527-605, 1979.
- CHRISTIE, S.D. et al. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. **Neurosurgery Focus**, v.25, n.5, p. 1-7, 2008.
- COLTER, S.; RUCKER, N.C. Acute injury to the central nervous system. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.18, n.3, p.545-563, 1988.
- COUGHLAN, A. R. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. **Journal of Small Animal Practices**, v.34, p. 117-122, 1993.
- DELAMARTER, R. B. et al. Pathophysiology of spinal cord injury. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.77, n.7, p.1042-1049, 1995.
- DIPLOCH, A. Antioxidant nutrients and disease preventionan overview. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p.189-193, 1991.
- DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p.421-431, 1990.
- DUCKER, T.B.; HAMIT, H.F. Experimental treatments of acute spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery**, v.30, p.693-697, 1969.

EIDELBERG, E., et al. A model of spinal cord injury. **Surgical Neurology**, v.6, p.35–38, 1976.

ENGELHARDT, G. et al. Meloxicam: Influence on arachidonic acid metabolism. Part II. In vivo findings. **Biochemistry and Pharmacology**, v.51, p.29–38, 1996.

ESTERBAUER, H. et al. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. **Journal of Biochemistry**, v.3, p.37-52, 1993.

EVANS, J.L. et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrinology Reviews**, v.23, p.599-622, 2002.

FADEN, A.I. et al. Megadose corticosteroid therapy following experimental traumatic spinal injury. **Journal of Neurosurgery**, v.60, p.712-716, 1984.

FEHLINGS, M.G.; BAPTISTE, D.C. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. **Injury**, v.36, p.113-122, 2005.

FEHLINGS, M.G.; TATOR, C.H. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual. Neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v.132, p.220-228, 1995.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygens radicals. **Science**, v.201, p.875-880, 1978.

GAETA A. et al. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. **British Journal of Pharmacology**, v.146, p.1041-1059, 2005.

GEISLER, F. H. et al. Recovery of motor function after spinal cord injury-a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. **The New England Journal of Medicine**, v.324, p.1829-1838, 1991.

GERNDT, S.J. et al. Consequences of high-dose steroid therapy for acute spinal cord injury. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 42, n.2, p.279-284, 1997.

GOODE, H. F.; WEBSTER, N. R. Free radicals and antioxidants in sepsis. **Critical Care Medicine**, v.21, n.1, p. 1770-1776, 1993.

GRILL, R.J. User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. **Experimental Neurology**, v. 196, p. 1 – 5, 2005.

HAKAN, T. et al. Meloxicam Exerts Neuroprotection on Spinal Cord Trauma in Rats. **International Journal of Neuroscience**, v.121, p.142–148, 2011.

HALL, E.D. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? **Journal of Spinal Cord Medicine**, v.24, p.142–146, 2001.

HALL, E.D. Antioxidant Therapies for Acute Spinal Cord Injury. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v.8, p.158-167, 2011.

HALLIWELL, B. Wood Deterioration and Preservation – Advances in our Changing In: World; Goodell, B.; Nicholas, D. D.; Schultz, T. P., ed.; **ACS Symposium Series** 845, American Chemical Society: Washington, 2003, cap. 2.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. New York: Oxford University, 2007. p 851.

HARRIS, K. C. et al. Prevention of noise-induced hearing loss with Src-PTK inhibitors. **Hearing Research**, v.208, p.14–25, 2005.

HIRUMA, S. et al. Simple and reproducible model of rat spinal cord injury induced by a controlled cortical impact device. **Neurological Research**, v.21, p.313–323, 1999.

HOERLEIN, B. F. General spinal disorders. In:____.**Canine Neurology: Diagnosis and Treatment**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders company, 1971, cap.10, p.233-302.

HORSSSEN, J.V. et al. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1812, n.2, p.141–150, 2011.

HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Advances in Physiology Education**, v.26, n.1-4, p.238-255, 2002.

JANSSENS, L.A.A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. **Journal of Small Animal Practice**, v.32, p.527-579, 1991.

JEFFERY, N.D. Medical and conservative therapy. In:____. **Handbook of small animal spinal surgery**. London: Saunders, 1995. Cap.15, p.215-221 a.

JEFFERY, N. et al. Bridging the divide: spinal cord repair by cellular transplantation—from research laboratory to therapeutic application. **Journal of Small Animal Practice**, v.42, p.428-432, 2001.

JENTZSCH, A.M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical & Medicine**, v.20, n.2, p.251-256, 1996.

JOLLIOT, P. et al. Blood-to-brain transfer of various oximes: effect of plasma binding on their brain delivery. **Pharmaceutical Research**, v.14, n.5, p.650-656, 1997.

KAKULAS, B.A. Pathology of spinal injuries. **Central Nervous System Trauma**, v.1, p.117-129, 1984.

KALAYCI M. et al. Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. **Neurochem Research**, v.30, p.403-410, 2005.

KAPTANOGLU, E. et al. Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.10, n.3, p.329-334, 2003.

KHAN, M., GRIEBEL, R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v.10, p.161–165, 1983.

KORNEGAY, J.N. Patogênese das afecções do sistema nervosa central. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1998. v.1, cap.71, p.1231-1249.

KRAUS, K.H. Medical management of acute spinal cord disease. In: KIRK, R. W. **Current veterinary therapy XIII: small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. p.186-190.

LEE, B.H. et al. Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord rats. **The Journal of Korean Medical Science**, n.20, p.132-138, 2005.

LIU, J.B. et al. Antioxidation of melatonin against spinal cord injury in rats. **Chinese Medical Journal (English)**, v.117, p.571-575, 2004.

LU, J. et al. Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. **Spine**, v.25, n.14, p.1859-1866, 2000.

MADHAVI, D.L.; SALUNKHE, D.K. Toxicological aspects of food antioxidants. In: **Food Antioxidants**. Dekker: New York, 267p., 1995.

MALLEI, A. et al. The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. **Brain Research**, v.1062, p.16-25, 2005.

MARTIN, S.H., BLOEDEL, J.R. Evaluation of experimental spinal cord injury using cortical evoked potentials. **Journal of Neurosurgery**, v.39, p.75–81, 1973.

McDONALD, R.K.; LANGSTON, V.C. Uso de corticóides e medicamentos antiinflamatórios não esteróidais. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997, v.1, p.406-418.

MCDONALD, J.W., SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. **The Lancet**, v.359, n.9304, p.417-425, 2002.

MEERTEREN, M.E. et al. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.1347–1361, 2005.

MEINTJES, E.; HOSGOOD, G.; DANILOFF, J. Pharmaceutic treatment of acute spinal cord trauma. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.18, n. 6, p. 625-635, 1996.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v.49, n.2, p.474-478, 1972.

NIVSARKAR, M. et al. Reduction in Aluminum Induced Oxidative Stress by Meloxicam in Rat Brain. **Iranian Biomedical Journal**, v.10, n.3, p.151-155, 2006.

OLBY, N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p.399-407, 1999.

OLBY, N. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.40, n.5, p.791-807, 2010.

OLBY, N.; JEFERRY, N. Pathogenesis of diseases of the central nervous system. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.1132-1147.

ONDREJCÁK, T.; VANICKÝ, I.; GÁLIK, J. Ischemic preconditioning does not improve neurological recovery afterspinal cord compression injury in the rat. **Brain Research**, v.995, p.267– 273, 2004.

ORO, J.J. et al. Balloon device for experimental graded spinal cord compression in the rat. **Journal of Spinal Disorders**, v.12, p.257– 261, 1999.

PACKER, L. et al. Eletron spin resonance-compute tomography: Brain imaging and epilepsy. In: **Free Radicals in Brain Physiology and Disorders**. San Diego: academic Press, 1996. p.185-195

PASSI S. et al. Oxidative stress in brain: neurodegenerative disease and possible treatment. **Progressive Nutrition**, v.8, p.241-56, 2006.

QIAN, H.; LIU, D. The time course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measured by microdialysis and high pressure liquid chromatography. **Neurochemical Research**, v.22, p.1231-1236, 1997.

RAO, G.M. et al. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. **Clinica Chimica Acta**, v.296, n.1-2, p.203-212, 2000.

RESNICK, D.K. et al. Role of cyclooxygenase-2 in acute spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v.15, p.1005–1013, 1998.

RIOBO, N.A. et al. The modulation of mitochondrial nitric oxide syntase activity in rat brain development. **The Journal of Biologicak Chemistry**, v. 277, p.42447-42455, 2002.

RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. **Journal of Neurosurgery**, v.47, n.4, p.577-581, 1977.

RIVLIN, A.S., TATOR, C.H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. **Surgical Neurology**, v.10, p.38-43, 1978.

RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Effect of vasodilators and myelotomy on recovery after acute spinal cord injury in rats. **Journal of Neurosurgery**, v.50, p.349-352, 1979.

ROWLAND, J.W. Current Status of Acute Spinal Cord Injury Pathophysiology and Emerging Therapies: Promise on the Horizon. **Neurosurgical Focus**, v.25, n.5, E2 2008.

SHORES, A. Spinal trauma: pathophysiology and management of traumatic spinal injuries. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.22, n.4, p.859-887, 1992.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, n.2, p.291-295, 1997.

SILVA C.M.O. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.641-650, 2008.

SMITH D.G. et al. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. **Biochim Biophys Acta**, v.1768, p.1976-1990, 2007.

STRAUSS, K.I.; MARINI, A.M. Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death. **Journal of Neurotrauma**, v.19, p.627-638, 2002.

STOKES, B.T. et al. An electromechanical spinal injury technique with dynamic sensitivity. **Journal of Neurotrauma**, v.9, p.187-195, 1992.

SUMMERS, B. A. et al. Injuries to the central nervous system. In:____. **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Ed. Mosby, 1995. cap.4, p.189-207.

TAIRA, Y., MARSALA, M. Effect of proximal arterial perfusion pressure on function, spinal cord blood flow, and histopathologic changes after increasing intervals of aortic occlusion in the rat. **Stroke**, v.27, p.1850-1858, 1996.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. **Progress in Neurobiology**, v.56, p.341-358, 1998.

TARLOV, I.M. et al. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. **AMA Archives of Neurology & Psychiatry**, v.70, p.813-819, 1953.

TATOR, C.H., DEECKE, L. Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma. **Journal of Neurosurgery**, v.39,p. 52–64, 1973.

TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **Journal of Neurosurgery**, v.75, p.15-26, 1991.

TOKLU, H.Z.et al. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. **Journal of Spinal Cord Medicine**, v.33, n.4, p.401–409, 2010.

TURKO, I.V.; MARCONDES, S.; MURAD, F. Diabetes- associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v.281, p.H2289-H2294, 2001.

VANE J.R. et al. Cyclo-oxygenases 1 and 2. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v.38, p.97–120, 1998.

VANICKY, I et al. A Simple and Reproducible Model of Spinal Cord Injury Induced by Epidural Balloon Inflation in the Rat. **Journal of Neurotrauma**, v.18, n.12, 2001.

VILLEGAS, I., et al. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. **Inflammation Research**, v.49, n.7, p.361-366, 2000.

VON EULER, M., et al. Motor Performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, v.137, n.2, p.242-254, 1996.

WAGNER, M. et al. The role of oxidative damage in the neurophalogy of organic acidurias: insights from animal studies. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v.27, p.427-448, 2004.

WALLACE, M.C. et al. Chronic regenerative changes in the spinal cord after cord compression injury in rats. **Surgical Neurology**, v.27, p.209-219, 1987.

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.77, p.325-332, 1981.

YOUNG, W.; FLAMM, E.S. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. **Journal of Neurosurgery**, v.57, p.667-673, 1982.

6 ANEXOS

Anexo A - Exame neurológico através da escala BBB em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal.

PONTUAÇÃO	
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma das articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreto de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para

	frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorrem consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada.

DEFINIÇÕES:

Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de	Contração dos músculos extensores do membro posterior

peso	durante a pisada plantar da pata ou elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para a frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.
Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alteram.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes $\leq 50\%$.
Freqüente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51-94%.
Consistente	Quase sempre ou sempre, 95-100%.
Instabilidade do tronco	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco.

Anexo B - Exame neurológico através do plano inclinado em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal utilizando cateter Fogarty 2Fr.

1	Permanece em um ângulo 30° menor do que antes da cirurgia
2	Permanece em um ângulo 20° menor do que antes da cirurgia
3	Permanece em um ângulo 10° menor do que antes da cirurgia
4	Permanece no mesmo ângulo que antes da cirurgia

Anexo C – Valores dos níveis de TBARS e atividade da catalase em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com meloxicam e prednisona, decorridos 24h, 72h e sete dias de pós-operatório.

24 horas de PO			72 horas de PO			7 dias de PO		
Grupo	Catalase	TBARS	Grupo	Catalase	TBARS	Grupo	Catalase	TBARS
GCS1	12,40	17,95	GCS1	20,53	16,24	GCS1	13,41	27,71
GCS2	14,92	16,20	GCS2	15,24	14,96	GCS2	15,22	23,37
GCS3	13,81	17,81	GCS3	17,04	14,96	GCS3	15,44	24,86
GCS4	18,76	13,82	GCS4	13,08	17,67	GCS4	13,11	24,11
GCS5	14,97	15,24	GCS5	19,32	15,95	GCS5	20,02	23,51
GCM1	14,90	21,23	GCM1	14,40	12,82	GCM1	14,91	30,78
GCM2	14,94	19,27	GCM2	19,38	12,54	GCM2	18,68	30,06
GCM3	16,06	21,94	GCM3	20,73	14,53	GCM3	24,54	26,22
GCM4	16,17	18,38	GCM4	19,51	16,24	GCM4	17,17	28,03
GCM5	18,27	15,52	GCM5	23,53	15,53	GCM5	18,11	29,02
GCP1	19,45	15,39	GCP1	21,03	16,95	GCP1	21,73	23,51
GCP2	17,95	15,96	GCP2	20,89	18,52	GCP2	23,35	34,48
GCP3	15,98	15,24	GCP3	17,78	16,53	GCP3	18,07	37,47
GCP4	19,24	17,09	GCP4	24,29	17,84	GCP4	16,30	27,03
GCP5	17,14	21,80	GCP5	20,98	19,38	GCP5	14,37	30,61
GTS1	41,94	17,24	GTS1	26,04	28,78	GTS1	30,95	19,23
GTS2	34,39	25,22	GTS2	23,95	26,57	GTS2	45,46	18,52
GTS3	30,02	20,94	GTS3	25,96	24,36	GTS3	33,19	19,80
GTS4	24,28	25,08	GTS4	28,62	27,77	GTS4	33,34	16,10
GTS5	29,33	16,24	GTS5	22,44	27,70	GTS5	23,77	18,41
GTM1	15,61	16,67	GTM1	19,09	12,68	GTM1	22,29	17,52
GTM2	23,83	12,11	GTM2	18,22	11,82	GTM2	15,87	16,81
GTM3	20,45	17,67	GTM3	18,74	12,68	GTM3	17,36	15,67
GTM4	24,15	19,38	GTM4	19,02	11,11	GTM4	20,58	14,96
GTM5	18,21	17,52	GTM5	17,62	12,54	GTM5	21,54	13,39
GTP1	12,94	13,39	GTP1	17,39	13,96	GTP1	36,32	16,81
GTP2	16,18	10,68	GTP2	17,41	16,10	GTP2	31,40	13,39
GTP3	10,68	11,97	GTP3	19,86	18,38	GTP3	32,14	22,80
GTP4	21,09	12,54	GTP4	14,49	17,67	GTP4	33,26	18,95
GTP5	15,22	13,11	GTP5	21,73	16,52	GTP5	32,70	17,98

GCS: Grupo controle salina; GCM: Grupo controle meloxicam; GCP: Grupo controle prednisona, GTS: Grupo tratado salina; GTM: Grupo tratado meloxicam; GTP: Grupo tratado prednisona