

Paraplegia em ratos induzida por clampeamento aórtico: Estudo Experimental

Paraplegia in rats induced by aortic clamping: An experimental study

Lúcia Ximena Zubieta Alves¹; Prof. Dr. Paulo César Espada²

1- Acadêmica do 6 ano do curso de Medicina da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Endereço para correspondência: Av. Jamil Ferez Kfoury, 90 apto 21 – São José do Rio Preto – SP CEP 15091 – 240 Telefone: 17- 81320005 email: luciaxzalves@gmail.com 2- Professor da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pela disciplina de Clínica Cirúrgica. O seguinte trabalho foi submetido a aprovação do Comitê de Ética em experimentação em Animais (CEEA – São José do Rio Preto – S.P. - 2010-2011). Pesquisa realizada na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP - Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São' Pedro - 15090-000 São José do Rio Preto – SP

Resumo *Introdução:* A oclusão temporária da aorta, ou clampeamento aórtico, é realizada principalmente em pacientes vítimas de trauma grave com sangramento vultoso. Essa oclusão do vaso visa controlar o sangramento da cavidade para reparo cirúrgico adequado durante laparotomia de emergência. O clampeamento da aorta abdominal quando obtém sucesso, pode causar sequelas graves, como a paraplegia de membros inferiores após isquemia medular. *Materiais e Metodologia:* O presente estudo propõe um modelo experimental que cause de modo controlado paraplegia após o clampeamento aórtico em ratos Wistar. Quinze ratos foram submetidos ao clampeamento da aorta abdominal por 20 minutos. Após o tempo proposto tiveram sua circulação restabelecida e foram observados e testados, 45 minutos e 3 horas após o procedimento. *Resultados:* Evidenciou-se, 45 minutos após, paraplegia em 100% dos ratos submetidos ao procedimento. Foi observado em todos os animais retorno parcial dos movimentos e em diferentes graus após 3 horas do procedimento. *Discussão:* Os ratos foram avaliados quanto a suas funções motoras e sensitivas e classificados segundo a escala de Kunh e Wrathall¹, atribuindo notas de 0 até 6, de acordo com a resposta obtida após estímulos. *Conclusão:* O modelo experimental demonstrou a possibilidade de recriar de forma fácil e controlada a situação de isquemia medular e suas seqüelas, semelhante a ocorrida em pacientes submetidos ao clampeamento aórtico. Este modelo pode ser considerado uma possível forma de estudo para drogas e meios para a prevenção da paraplegia, após clampeamento aórtico.

Palavras-chave Paraplegia. Traumatismos abdominais. Trauma.

Abstract *Introduction:* The temporary occlusion of the aorta or aortic clamping is carried out mainly in trauma patients with severe bleeding bulky. This vessel occlusion aims to control the bleeding cavity suitable for surgical repair during emergency laparotomy. The clamping of the abdominal aorta when successful can cause serious sequelae, such as paraplegia of the lower limbs after spinal cord ischemia. *Materials and Methods:* This study proposes an experimental model in a controlled manner inducing paraplegia after aortic clamping in Wistar rats. Fifteen rats underwent clamping of the abdominal aorta for 20 minutes. After the proposed time its circulation had been restored, observed and tested; 45 minutes and 3 hours after the procedure. *Results:* Paraplegia occurred in 100% of these rats after 45 minutes. Partial return of the movements in different degrees was observed in all animals after 3 hours. *Discussion:* The rats were evaluated according to their sensory and motor functions and classified according to the scale of Kunh and Wrathall¹, assigning scores from 0 to 6, according to the response obtained after stimulation. *Conclusion:* This experimental model has demonstrated the ability to recreate in an easy and controlled manner the event of spinal cord ischemia and sequelae, as similar in patients undergoing aortic clamping. Therefore, it can be considered a proper way to study drugs and means to prevent paraplegia after aortic clamping.

Keywords Paraplegia. Abdominal Injuries, Trauma.

Não há conflito de interesse

Fonte de Financiamento: Bolsa de Iniciação Científica 2010-2011.

Introdução

O trauma, contuso e penetrante, constitui a terceira maior causa de morte no mundo e a segunda mais comum no Brasil (2). Muitos pacientes, devido a gravidade de suas lesões, morrem nos primeiros segundos após o trauma, antes de qualquer atendimento (3). Os pacientes que conseguem ser atendidos, 15 a 20% (3), são internados, e necessitam de intervenção cirúrgica, como a laparotomia de urgência. Não é raro que estes pacientes sofram com graves injúrias vasculares abdominais, o que provoca vultosos sangramentos.

Um das possíveis condutas adotadas para conter o choque hemorrágico é o clampeamento aórtico, que consiste em bloquear mecanicamente o fluxo sanguíneo aórtico para que haja controle da hemorragia e adequado reparo cirúrgico. Porém, o bloqueio sanguíneo pode causar complicações e sequelas diversas. Dentre as possíveis sequelas decorrentes da isquemia medular pós clampeamento aórtico observa-se, comumente, a paraplegia irreversível dos membros inferiores.

Objetivos

O projeto tem como maior interesse elaborar um modelo experimental de isquemia medular padronizado e de execução simples e eficaz para iniciar uma linha de pesquisa nesta Instituição, na qual através de drogas ou outros procedimentos, possa prevenir sequelas após a realização de procedimentos como o clampeamento aórtico, realizados na prática médica cirúrgica. Trabalhos na literatura médica têm procurado minimizar os danos causados por este clampeamento testando o uso de substâncias (5,6,7) e induzindo à hipotermia (8). Porém, ainda que apresentem resultados positivos não existe uma padronização nos métodos, o que dificulta a discussão na avaliação de seus feitos e principalmente na comparação entre os agentes protetores usados em diferentes estudos, na busca de um procedimento eficaz e de simples realização. Materiais e Métodos:

Trata-se de um trabalho experimental, onde foram utilizados 15 ratos Wistar machos, com peso entre 250 e 350 gramas.

Os animais formaram um grupo único que passaram pelo procedimento com “clampeamento” aórtico de 20 minutos.

- Preparo Pré-Operatório:

Os animais foram alojados no biotério da FAMERP / FUNFARME com alimentação a base de ração e água.

Conforme consta em protocolos pré-anestésicos em animais de pequeno porte, os animais que foram submetidos aos procedimentos sem a necessidade de jejum pré-operatório.

- Preparo Anestésico:

A via de escolha para a administração do anestésico foi intraperitoneal, sendo esta a mais utilizada na experimentação com roedores (9).

Os anestésicos utilizados foram: cetamina e xilazina. A cetamina é comercializada a 5% e a 10% e a xilazina a 2% e a 10%.

As doses e tempo de ação dos anestésicos, próprias para ratos foram as seguintes (9):

- Xilazina 5 a 10 mg/Kg + 50 a 75 mg/Kg Cetamina misturadas na mesma seringa.

- Período de latência: 2 a 5 min

- Período hábil: 30 min

Preparação da solução anestésica:

Componentes:

- Cetamina a 10%; (100mg/ml)

- Xilazina a 2% (20mg/ml)

a) Foi associado : 1,0ml de cetamina + 0,5ml de xilazina + 8,5ml de água para injeção

Volume total: 10ml

Cetamina: ~10mg/ml

Xilazina: ~2mg/ml

b) Conservada frasco estéril e com tampa de borracha e alumínio, a exemplo das apresentações comerciais desses produtos.

c) O frasco foi identificado e mantido em ambiente fresco e sem muita luminosidade.

d) Foi aplicada a aplicada a dose de anestésico individual para cada rato, ajustando a quantidade de acordo com o peso (entre 250g a 300g) e respeitando as doses recomendadas de cetamina e xilazina para os ratos (9).

e) Quando necessário foi repetida $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da dose inicial.



Figura 1 Figura 1- Incisão mediana toraco-abdominal mostrando o trajeto da aorta e seu ponto de “clampeamento” sinalizado pela seta - Foto do arquivo pessoal da pesquisa -2011.

Procedimento Cirúrgico:

Após 2 a 5 minutos da administração do anestésico, os ratos foram fixados em suporte de madeira pelas patas, foi realizada tricotomia abdominal, expondo a área cirúrgica. Incisão mediana, interessando pele, aponeurose do músculo reto-abdominal e peritônio. Inventário da cavidade abdominal, com identificação da aorta logo abaixo do pinçamento diafragmático. Dissecção, isolamento e “clampeamento” temporário da aorta abdominal através de fio de algodão 2.0. Realizamos a ligadura com um fio de algodão que após envolver o vaso, foi passada por dentro de um segmento de dispositivo para infusão intravenosa 25G (scalp infantil), de cerca de 6 cm, sem as extremidades perfurocortantes e da válvula. O seguimento do dispositivo é deslizado

cuidadosamente até ocluir a luz do vaso por compressão externa, e mantida a tensão com a colocação de uma pinça Kelly na extremidade do dispositivo fora da cavidade abdominal. O animal é suturado por planos: aponeurose do músculo reto-abdominal com fio de algodão – chuleio simples, pele com fio de algodão – sutura simples. O segmento do scalp infantil é mantido externamente ao abdome. Após 20 minutos a pinça Kelly é liberada e um dos fios é cortado rente a pele. O dispositivo é então, gentilmente removido da cavidade para que o fluxo seja restabelecido.

Pós-operatório:

Em seguida os ratos foram armazenados em gaiolas disponíveis no Biotério, próprias para acomodar os animais, onde repousaram até a sua recuperação anestésica.

Testes e estímulos:

Os animais, após 45 minutos já se mostravam despertos, sem efeitos sedativos, e foram submetidos a testes adaptados do escore combinado de comportamento utilizado em ratos submetidos a lesão medular experimental (1,9), conforme apresentado na tabela 1. Após a realização dos testes para avaliação motora, os ratos foram sacrificados com dose excessiva de anestésico.

Resultados

Trata-se de um estudo experimental, que avalia a resposta motora e sensitiva dos ratos submetidos ao “clampeamento” da aorta abdominal simulando o procedimento feito em homens. Os animais disponíveis para o experimentos eram todos machos com peso entre 250 e 350 gramas, sendo aleatória a ordem em que foram submetidos ao procedimento. Os resultados apresentados constam na tabela 2 e foram classificados de acordo com a classificação de Kuhn e Wrathall (tabela 1). 100% dos animais apresentaram déficit motores e sensitivos em membros inferiores, sem nenhuma resposta após 45 minutos. Após 3 horas do procedimento, 100% dos animais apresentaram alguma resposta aos estímulos, em graus variáveis o conforme descrito também na tabela 2.

Discussão

Quanto as modificações na realização ao trabalho

O trabalho inicialmente foi programado para realizar o estudo com dois grupos de 10 ratos cada, grupo A e grupo B, sendo o tempo de clampeamento para o grupo A será de 20 minutos e o tempo de clampeamento do grupo B de 40 minutos. Tal divisão foi programada, pois acreditávamos que o tempo de 20 minutos não seria suficiente para programar isquemia e conseqüentemente paraplegia. Porém após o clampeamento dos 10 ratos *wistar* referentes ao grupo A - 20 minutos - todos os animais apresentaram sinais de paraplegia. Ampliamos a amostra para 15 animais e a paraplegia se mostrou presente em todos os animais, conforme descrito na tabela 2. Diante desses resultados, consideramos nosso objetivo atingido, não sendo necessário o teste no grupo B - clampeamento por 40 minutos – uma vez que em tempo inferior os animais já demonstravam a efetividade do modelo experimental para a criação de um modelo para paraplegia dos membros inferiores.

Quanto ao termo “clampeamento”

O Clampeamento consiste na aplicação do clamp vascular que pressiona a parede vascular, obstruindo dessa maneira a luz do vaso, impedindo a passagem de sangue por este. A técnica desenvolvida durante este procedimento, a rigor, não pode ser classificada como um clampeamento vascular, pois não há um clamp vascular, propriamente dito, sendo o nome “clampeamento aórtico” utilizado neste trabalho apenas com fim de melhor entendimento pela similaridade com a técnica realizada em humanos. A técnica utilizada pode ser mais bem descrita como uma ligadura modificada sem pinçamento (12) porém não definitivo.

A ligadura sem pinçamento é um método de hemostasia feita sem pinçamento prévio do vaso sanguíneo, utilizado em vasos de grosso calibre e de difícil acesso, uma vez que, devido sua localização, a pinça dificilmente conseguiria chegar nesse vaso para realizar o pinçamento prévio (12).

Descrevemos como não-definitivo, pois após o período de 20 minutos cortamos o fio próximo a base e restabelecemos o fluxo. Descrevemos a técnica como uma ligadura sem pinçamento modificada, pois para conferir a qualidade de não-definitiva e não prejudicar a frágil parede endotelial da aorta, realizamos a ligadura com um fio de algodão que após envolver o vaso, é passada por dentro de um segmento de dispositivo para infusão intravenosa 25 (scalp infantil), de cerca de 6 cm, sem as extremidades perfuro-cortantes e da válvula. O seguimento do dispositivo é deslizado cuidadosamente até ocluir a luz do vaso por compressão externa. A seguir a outra extremidade, colocamos uma pinça Kelly para que a pressão seja mantida. O animal é suturado por planos mantendo o segmento externamente ao abdome. Após 20 minutos a pinça Kelly é liberada e um dos fios é cortado rente a pele. O dispositivo é então gentilmente removido da cavidade para que o fluxo seja restabelecido.



Figura 2 - Material utilizado para Ligadura não definitiva da aorta abdominal – Foto do arquivo pessoal da pesquisa -2011.

A escolha do dispositivo para infusão intravenosa (scalp infantil) foi feita devido a flexibilidade do material e ao fato do material quando cortado não apresentar bordas grosseiras e cortantes que poderiam agredir externamente o vaso causando o seu rompimento.

Conclusões

O sucesso do procedimento que mostrou 100% de paraplegia nos animais nos leva a crer que o procedimento é eficaz e de fácil realização, sendo assim atingido nosso objetivo que determinar um modelo experimental para causar paraplegia em ratos após a isquemia medular causado por “clampeamento aórtico”. Sendo de essa forma possível prosseguir o estudo que em uma segunda fase testaria técnicas e drogas possíveis de proteção a isquemia medular e suas possíveis seqüelas, como a paraplegia dos membros inferiores.

Tabela 1 - Avaliação da lesão medular segundo a escala de Kunh e Wrathall

	0	1	2	3	4	5	6
A - Escala motora: Teste de coordenação da função motora	Nenhum movimento da pata traseira, não suportar o peso do corpo sobre a mesma ;	Escassos movimentos percebidos na pata, não consegue suportar o peso do corpo sobre a pata;	Frequentemente e/ou vigoroso movimento em MMII, não consegue suportar o peso;	Consegue suportar o peso sobre a pata traseira, podendo dar um ou dois passos;	Suporta todo o peso do corpo, consegue dar passos consistentes usando a porção distal da pata;	Caminha com leve déficit;	Caminha movimentando normalmente todas as articulações da pata traseira;
B – Extensão dos dedos: reflexo de extensão dos dedos da pata traseira quando o animal é levantado pelo rabo	Nenhuma extensão	Mínima extensão, dedos flácidos	Normal extensão dos dedos	Hiperextensão com tremores dos dedos ou da pata	-	-	-
C – Retirada em extensão: reflexo de	Sem flexão de retirada	Fraco ou lento movimento contra	Retirada normal da pata traseira	Hiperflexão da pata traseira contra o	-	-	-

C – Retirada em extensão: reflexo de retirada da pata traseira contra o corpo quando está é manualment e estendida.	Sem flexão de retirad a, pata traseir a flácida ;	Fraco ou lento movimen to contra o corpo;	Retirada normal da pata traseira contra o corpo;	Hiperflex ão da pata traseira contra o corpo;	-	-	-
D – Retirada contra dor: reflexo de retirar a pata em direção ao corpo em resposta a estímulo aplicado na eminência hipotênar da pata.	Nenhu ma respost a da pata aperta da;	Movimen to abrupto da pata traseira contra o corpo;	Normal, rápida retirada da pata traseira contra o corpo;	Hiperflex ão da pata traseira, com tremores da mesma;	-	-	-
E - Resposta à ventralizaã o: é o reflexo no qual o	Anima l contin ua na posiçã	Lento retorno a posição prona, mais de 0,5	Retorno médio a posição prona;	Retorno rápido a posição prona, em 0,5 sedundos	-	-	-

<p>E - Resposta à ventralização: é o reflexo no qual o animal endireita-se, voltando a sua posição habitual, quando colocada de costas numa superfície lisa</p>	<p>Animal continua na posição o supina;</p>	<p>Lento retorno a posição prona, mais de 0,5 segundos ;</p>	<p>Retorno médio a posição prona;</p>	<p>Retorno rápido a posição prona, em 0,5 segundos</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>F - Ato de agarrar a barra com a pata traseira: reflexo de percepção, em resposta ao contato da pata traseira a uma barra de pequeno diâmetro.</p>	<p>Não responde ao toque da barra contra a pata;</p>	<p>A pata traseira responde ao toque mas não consegue agarrá-la;</p>	<p>A pata traseira agarra com sucesso a barra, mas de modo fraco;</p>	<p>A pata traseira agarra fortemente e a barra e puxa-a contra seu corpo.</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>

Tabela 2 – Dados e resultados dos experimentos

Animais¹	Score²						45 minutos						3 horas						Total
Rato 1	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0/1
Rato 2 *	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0/3	
Rato 3	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0/1	
Rato 4*	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0/4	
Rato 5*	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0/2	
Rato 6*	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0/2	
Rato 7	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0/1	
Rato 8	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0/1	
Rato 9	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0/1	
Rato 10*	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0/4	
Rato 11	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0/2	
Rato 12*	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0/3	
Rato 13*	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0/4	
Rato 14*	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0/4	
Rato 15	A	B	C	D	E	F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0/2	

1-Todos os animais são machos. 2- Score de acordo com a Avaliação da lesão medular segundo a escala de Kunh e Wrathall – tabela 1.

3- Valor encontrado após 45 minutos/ Valor encontrado após 3 horas.

***Animais que apresentaram resposta aos estímulos predominantemente em membro inferior direito, após 3 horas.**

Referências bibliográficas

- 1- A MOUSE MODEL OF GRADUAL CONTUSIVE SPINAL CORD INJURY – Khun P.L., Wrathal J. R. - J. Neurotrauma 15: 125-140, 1998.
- 2- SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE MORTALIDADE NO BRASIL- SIM – Brasil DATASUS 2004
- 3- AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS. Advanced trauma life support course – ATLS. 7 ed, Chigaco: American College of Surgeons, 2008
- 4- RASSLAN, S - Fatores preditivos de morbidade e mortalidade na cirurgia de urgência. Cirurgia de urgência – 1995.
- 5- INSULIN ADMINISTRATION PROTECTS FROM PARAPLEGIA IN THE RATAORTIC OCLUSIO MODEL. Daniel R. LeMay, B.S., Alice C. Lu, Gerald B. Zelenock, M.D. and Louis G. DÁlecy, D.M.D., Ph.D. - Journal of Surgical Reserch 44, 352-358 (1998)
- 6- INTRATHECAL MAGNESIUM SULFATE PROTECTS THE SPINAL CORD FROM ISCHEMIC INJURY DURING THORACIC AORTIC CROSS-CLAMPING. Joseph I. Simpson, M.D., Thomas R. Eide, M.D., Gerald A. Schiff, M.D., PhD. Anesthesiology, V 81, No 6, Dec 1994. Philadelphia -SA
- 7- EFEITOS DO EXTRATO DE COPAIBANAS LESÕES RENAIIS DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO NO TECIDO RENAL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS. SOARES, B.L.F., FREITAS, M.A.L., SAAD, P.F., MOURA, J.C., NEVES, P.C.F., SAAD, K.R., MEDEIROS, M.A., SEGUNDO, B.M
- 8- PROTECTING THE ISCHEMIC SPINAL CORD DURING AORTIC CLAMPING: THE INFLUENCE OF SELETIVE HYPORTEMIA AND SPINAL CORD PERFUSION PRESSURE. Willem Wisselink, MD, Mark O. Becker, MD, Justin H. Nguyen, MD, Samuel R. Money, MD, and Larry H. Hollier, MD,. New Orleans, La. Journal of vascular Surgery volume 19, number 5, May 1994
- 9- CURSO DE MANIPULAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO. Ministério da Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Organizado por de Paiva F. P., Maffili, V. V., Santos, A. C. S. – Salavador – BA – Brasil. Maio, 2005
- 10- SPINAL CORD CONTUSION IN THE RAT: BEHAVIORAL ANALYSIS OF FUNCTIONAL NEUROLOGIC IMPAIRMENT. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Exp Neurol 1985; 88:123-34;
- 11- AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO MOTORA EM RATOS SUBMETIDOS A LESÃO MEDULAR EXPERIMENTAL – Vialle, E., Vialle, R. G., Rasesa, E., Cechinel, C., Leonel, I. Seboth, C. – Revista Brasileira de Ortopedia – Vol. 37, No 3 – Março, 2002
- 12- TÉCNICA OPERATÓRIA E CIRURGIA EXPERIMENTAL – Marques, R. G. – Editora Guanabara – 1 edição – 2005.