



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
DOUTORADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES

USO DO PLASMA RICO EM FIBRINA ASSOCIADO AO CLORIDRATO DE
TRAMADOL NA LESÃO MEDULAR AGUDA EM RATOS

Belém – Pará
2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
DOUTORADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES

USO DO PLASMA RICO EM FIBRINA ASSOCIADO AO CLORIDRATO DE
TRAMADOL NA LESÃO MEDULAR AGUDA EM RATOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação como parte das exigências do Curso de Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Terapias Celulares, para obtenção do título de Doutora, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Rita de Lima e Coorientação do Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues e do Prof. Dr. Nelson Elias Abrahão da Penha.

Belém – Pará
2019

Chaves, Rosa Helena de Figueiredo

Uso do plasma rico em fibrina associado ao cloridrato de tramadol na lesão medular aguda em ratos. / Rosa Helena de Figueiredo Chaves. - Belém, 2019.

93 f.

Tese (Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Belém, 2019.

1. Traumatismos da medula espinal. 2. Produtos de degradação da fibrina e do fibrinogênio. 3. Tramadol. 4. Neuroproteção. 5. Regeneração.

CDD –



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
DOUTORADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES

**USO DO PLASMA RICO EM FIBRINA ASSOCIADO AO CLORIDRATO DE
TRAMADOL NA LESÃO MEDULAR AGUDA EM RATOS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Clínica de pequenos e animais silvestres, para obtenção do título de Doutora.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ana Rita de Lima - Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima – 1º Examinador
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

Prof. Dr. Marcus Vinicius Henriques Brito – 2º Examinador
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

Prof. Dr. Walther Augusto de Carvalho – 3º Examinador
CENTRO UNIVERSITÁRIO DO ESTADO DO PARÁ

Prof^ª. Dr^ª. Erika Renata Branco – 4º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

À minha família, a base de tudo em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A Nossa Senhora de Nazaré, pelas horas em que acalmou meu coração e principalmente por me manter firme em meio às dificuldades.

À minha mãe Érika Maria, meu eterno porto seguro. Seu cuidado e dedicação me deram a esperança para seguir e sua presença me deu a certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

Aos meus filhos “Fê” e “Gui” e minha sobrinha “Bebela”, que são a minha fonte inesgotável de felicidade. Que fazem com que cada dia seja melhor, simplesmente por existirem em minha vida. Foram eles que indiretamente mais sofreram com a minha ausência e é por eles que concluo mais essa etapa.

Ao meu padraсто, Beto, pelo empenho incansável na idealização e confecção da mesa cirúrgica, além de ceder os materiais necessários para a realização dos procedimentos cirúrgicos.

Às minhas irmãs, Ana Laura, Amanda e Marcella, amigas e cúmplices de todas as horas. Pela presença constante e imprescindível em minha vida.

Aos meus avós Erika e Evaldo (*in memoriam*), pelos conselhos sempre bem empregados, pelo carinho e devoção que nunca me faltaram.

Aos meus familiares que, com muito amor e carinho, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa, e por sempre me fazerem crer que tudo é possível.

Ao meu namorado, Thyago, pela dedicação, apoio, carinho e pelo auxílio com as figuras desse trabalho.

À minha Orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Ana Rita de Lima, por acreditar e se fazer presente durante a realização deste estudo. Pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta Tese.

Ao meu Coorientador Dr. Nelson Elias Abraão da Penha, pela amizade que cresceu ao longo dessa trajetória. Pelo auxílio, disponibilidade, atenção e carinho em me auxiliar e por me mostrar que não existem limites para se obter conhecimentos.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues, por sempre me ensinar, conduzir e apoiar em todos os momentos.

Ao Prof. Anderson Bentes, Coordenador do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde, pela amizade e suporte em todos os momentos. Por permitir que este trabalho fosse realizado em suas dependências.

Ao amigo e Prof. e Dr Marcus Vinicius Henriques Brito, Coordenador do Laboratório de Cirurgia Experimental, pelos ensinamentos na área da experimentação animal e pelo apoio sempre presente.

Em especial, aos meus queridos estagiários e fiéis escudeiros Daniel Santos, Emanuelle Rodrigues, Carolina Oliveira e Renata Silva, pela dedicação e apoio irrestrito durante a realização desta pesquisa, sem vocês esse sonho não seria possível.

Aos funcionários do GPE, Guilherme, Edilma, Mário, Diego e Danilo, serei eternamente grata pela colaboração, auxílio e pela gentileza com que sempre cuidaram dos animais em todos os dias do procedimento.

Aos queridos amigos Prof^a. Dr^a. Ismari Furlaneto, Prof. Dr. Juarez Quaresma, Prof^a. Dr^a. Tinara Aarão, Prof. Ms. Renan Teixeira e Prof^a. Dr^a. Celice Souza, que com sua sapiência e destreza me auxiliaram na condução do estudo. Pela disponibilidade, paciência em explicar cada detalhe e pela amizade que cresceu ao longo desse trabalho.

À Direção do Cesupa, em nome do Prof. João Paulo Mendes Filho, pelo apoio irrestrito durante a realização do Doutorado.

À Funadesp, pela bolsa de estudos concedida junto ao CESUPA, permitindo o devido investimento nesta pesquisa.

Aos professores membros da banca, por disponibilizarem seu tempo e por complementarem esse trabalho com suas experiências.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) por me acolher como estudante de pós-graduação durante o mestrado e doutorado, contribuindo imensamente para o meu crescimento profissional.

Aos meus amigos queridos, a família que Deus me permitiu escolher, simplesmente por existirem em minha vida.

Agradeço em especial aos animais usados neste experimento. Almejamos que os resultados obtidos justifiquem sua utilização.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A lesão da medula espinal é considerada uma das principais causas de imobilidade na clínica de cães e gatos, ocorrendo principalmente devido à acidentes, e desponta como uma das condições patológicas mais graves e mais debilitantes à saúde do animal. A busca por tratamentos que minimizem os danos neurológicos ocorridos e estimulem a recuperação do paciente afetado é uma constante. Os resultados obtidos com os fármacos empregados têm sido divergentes, favorecendo a pesquisa com outras terapias como o plasma rico em fibrina, que vem sendo aplicado na reparação de diversos tecidos, permitindo uma melhor cicatrização. O cloridrato de tramadol é analgésico amplamente utilizado em lesões musculoesqueléticas e neurológicas, conferindo uma analgesia multimodal, além de apresentar maior segurança em relação a outros opióides. Recentemente foi descrita ação antiedematogênica do tramadol, sugerindo a possibilidade da atuação benéfica deste na lesão medular. O objetivo deste estudo foi analisar o potencial terapêutico empregando o plasma rico em fibrina e sua associação com o cloridrato de tramadol na fase aguda da lesão de medula em ratos adultos. Para isso foram utilizados 23 ratos Wistar, machos, adultos divididos em 4 grupos: **GCo** – controle, **GMF** – matriz de fibrina, **GMFTr** – matriz de fibrina associado ao tramadol, **GTr** – tramadol. Os animais foram submetidos à hemiseção da medula espinal ao nível de T8 e tratados de acordo com o grupo proposto, sendo avaliados 24 horas, 3, 7 e 14 dias após a lesão, com aplicação das escalas Grimace e BBB para avaliação de dor e funcionalidade respectivamente. Os resultados demonstraram melhora funcional quando comparados os tempos 24 horas e 14 dias pós-operatório em todos os grupos estudados, no entanto, não foi encontrada diferença entre os grupos quanto à função motora avaliada. Foi verificada intensa correlação negativa entre os resultados da escala BBB e a Escala Grimace no **GCo** e uma grande correlação negativa no **GTr**. No histopatológico o **GTr** demonstrou melhor preservação tecidual, seguido do grupo **GMFTr** em comparação aos demais. Não foi observada melhora na avaliação funcional dos animais com o uso da matriz de fibrina ou sua associação com o tramadol, no entanto o emprego do analgésico diminuiu consideravelmente os níveis de dor dos animais. No histopatológico foi identificado que **GTr** e **GMFTr** apresentaram melhor preservação tecidual.

Palavras-chave: traumatismos da medula espinal; produtos de degradação da fibrina e do fibrinogênio; tramadol; neuroproteção; regeneração.

ABSTRACT

Spinal cord injury is considered one of the main causes of immobility in dogs and cats, occurring mainly due to accidents, and appears as one of the most serious and debilitating pathological conditions of the animal. The search for treatments that minimize the neurological damages that occur and stimulate the recovery of the affected patient are a constant. The results obtained with the used drugs have been divergent, favoring the research with other therapies such as the fibrin-rich plasma, which has been applied in the repair of several tissues, allowing a better cicatrization. Tramadol hydrochloride is an analgesic widely used in musculoskeletal and neurological lesions, conferring a multimodal analgesia, besides being more secure in relation to other opioids. Tramadol has recently been described as an antiedematogenic action, suggesting the possibility of its beneficial action on the spinal cord injury. The objective of this project was to analyze the therapeutic potential using fibrin-rich plasma and its association with tramadol hydrochloride in the acute phase of bone marrow injury in adult rats. Twenty - three male Wistar rats were divided into 4 groups: **GCo** - control, **GMF** - fibrin matrix, **GMFTr** - tramadol - associated fibrin matrix, **GTr** - tramadol. The animals were submitted to hemisection of the spinal cord at the T8 level and treated according to the proposed group, being evaluated 24 hours, 3, 7 and 14 days after the injury, and applied the Grimace and BBB scales for pain and functional evaluation respectively. The results showed functional improvement when the 24-hour and 14-day postoperative days were compared. However, no difference was found between the groups regarding motor function. There was an intense negative correlation between the results of the BBB scale and the Grimace Scale in the **GCo** and a large negative correlation in the tramadol group. In the histopathological study the **GTr** showed better tissue preservation, followed by the **GMFTr** group in comparison to the others. There was no improvement in the functional evaluation of the animals with the use of the fibrin matrix or its association with tramadol, however the use of the analgesic considerably reduced the pain levels of the animals. In the histopathological study it was identified that **GTr** and **GMFTr** presented better tissue preservation.

Keywords: spinal cord injuries, fibrin fibrinogen degradation products, tramadol, neuroprotection, regeneration.

LISTA DE FIGURAS

AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM FIBRINA ASSOCIADO AO CLORIDRATO DE TRAMADOL NA LESÃO MEDULAR AGUDA EM RATOS

Figura 1 - Croqui da mesa produzida (A). Animal anestesiado posicionado na mesa cirúrgica (B).....	36
Figura 2 - Identificação da artéria dorsal, para realização de hemisseção medular.....	36
Figura 3 - Coleta de sangue para produção do PRF por punção da veia caudal (A) e veia safena (B).....	37
Figura 4 - Separação dos segmentos após centrifugação (A); Coleta do coágulo PRF B).....	37
Figura 5 - Administração do Coágulo PRF (A); Coágulo PRF após administração (B).....	38
Figura 6 - Campo aberto forrado com EVA (A) e suporte (B) para aplicação do Teste BBB.....	39
Figura 7 - Avaliação dos animais em campo aberto forrado com EVA para aplicação do Teste BBB e aplicação da escala Grimace.....	39
Figura 8 - Aplicação da Escala Grimace para ratos. Animais sem padrão de dor (A e B). Posição normal do nariz (A) e área orbital (B). Animais com padrão de dor (C e D). Achatamento do nariz (C); Modificação na orientação da orelha - forma pontiaguda e estreitamento da área orbital (D).....	40
Figura 9 - Identificação macroscópica da lesão após retirada da medula espinal.....	41
Figura 10 – Função motora dos ratos Wistar estimada pela escala BBB nos tempos 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias, de acordo com o grupo.....	45
Figura 11 - Função motora dos ratos Wistar estimada pela escala BBB nos tempos 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias, comparação intergrupos.....	46
Figura 12 - Comparação dos níveis de dor em ratos Wistar estimada pela escala GRIMACE, segundo o grupo e o tempo avaliados.....	48
Figura 13 – Identificação microscópica da lesão produzida.....	50

INFLUENCE OF TRAMADOL ON FUNCTIONAL RECOVERY OF ACUTE SPINAL CORD INJURY IN RATS

Figure 1 - Evolution of score of Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale according each group.....	80
Figure 2 - Evolution of score of rat grimace scale according each group.....	81

LISTA DE TABELAS

AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM FIBRINA ASSOCIADO AO CLORIDRATO DE TRAMADOL NA LESÃO MEDULAR AGUDA EM RATOS

Tabela 1 - Delineamento dos grupos experimentais.....	33
Tabela 2 – Distribuição do peso médio dos animais ao início do tratamento.....	43
Tabela 3 – Avaliação da função motora dos ratos estimada pela escala BBB, de acordo com o grupo avaliado.....	44
Tabela 4 – Avaliação da dor em ratos estimada pela escala GRIMACE, de acordo com o grupo.....	47
Tabela 5 – Correlação entre os escores obtidos na escala GRIMACE e na escala BBB, segundo o grupo e o tempo de avaliação.....	49

INFLUENCE OF TRAMADOL ON FUNCTIONAL RECOVERY OF ACUTE SPINAL CORD INJURY IN RATS

Table1 - Mean scores of BBB and rat grimace scales according groups.....	79
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
β APP	proteína precursora de beta amiloide
CESUPA	Centro Universitário do Estado do Pará
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EGF	fator de crescimento epidermal
EGR	Escala Grimace para Ratos
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio
FGF	fator de crescimento fibroblástico
GFAP	glial fibrillary acidic protein / proteína glial fibrilar ácida
GPE	Grupo de Pesquisa Experimental
HE	hematoxilina-eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	Instituto Evandro Chagas
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-15	interleucina 15
IL-8	interleucina 8
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
Kg	quilos
L	litro
LCE	Laboratório de Cirurgia Experimental
LME	lesões de medula espinal
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
NMDA	N-metil D-aspartato
PDEGF	fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PRF	plasma rico em fibrina
PRP	plasma rico em plaquetas
RGS	Rat Grimace Scale
rpm	rotações por minuto
SB	substância branca
SC	substância cinzenta
SNC	sistema nervoso central
T10	10 ^a vértebra torácica
T8	8 ^a vértebra torácica
TGF- β	fator de crescimento beta
TRM	trauma-raquimedular
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES DA MEDULA ESPINAL	18
2.1.1 Fases da Lesão Medular	19
2.2 TRATAMENTOS PARA LME	23
2.2.1 Plasma Rico em Fibrina (PRF)	24
2.2.2 Cloridrato de Tramadol	27
2.3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA LESÃO MEDULAR – ESCALA BBB	28
2.4 ESCALA GRIMACE PARA RATOS - ERG	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 GERAL	32
3.2 ESPECÍFICOS	32
4 MÉTODO	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	33
4.2 TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	33
4.3 GRUPO PILOTO	34
4.4 TÉCNICA ANESTÉSICA	34
4.5 TRICOTOMIA E ANTISSEPSIA	35
4.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	35
4.7 PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM FIBRINA	36
4.8 CUIDADOS PÓS CIRÚRGICOS	39
4.9 ADMINISTRAÇÃO DO PLASMA RICO EM FIBRINA E CLORIDRATO DE TRAMADOL	39
4.10 APLICAÇÃO DA ESCALA BBB	39
4.11 APLICAÇÃO DA ESCALA GRIMACE PARA RATOS	40
4.12 EUTANÁSIA	40

4.13 PROTOCOLO DE PERFUSÃO E PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA	41
4.14 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	42
4.15 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS EUTANÁSIA	42
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO 1 – Influence of tramadol on functional recovery of acute spinal cord injury in rats	75
ANEXO 2 – TRADUÇÃO DA DESCRIÇÃO DAS PONTUAÇÕES REFERENTES À ESCALA BBB	87
APÊNDICE A – PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO	89
APÊNDICE B - TRADUÇÃO DA ESCALA GRIMACE PARA RATOS	90
APÊNDICE C – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA CEUA-CESUPA	93

1 INTRODUÇÃO

Lesões traumáticas na coluna vertebral com comprometimento da medula espinal ocorrem de forma frequente em animais e no ser humano, levando a importantes sequelas, como perda parcial ou completa das funções motoras, sensoriais e viscerais (BERGMAN *et al.*, 2000). O trauma-raquimedular (TRM) foi definido pelo Banco de Dados Nacional de Lesão Medular (2013), como toda injúria às estruturas contidas no canal vertebral, culminando na perda temporária ou permanente das funções motora, sensorial e/ou autonômicas (ARAÚJO, 2013).

A lesão de medula espinal (LME) é considerada uma enfermidade grave, afetando aproximadamente 180.000 pacientes por ano, em todo o mundo (FITZHARRIS *et al.*, 2014). É um tipo de evento traumático que contribui para a interferência da função cerebral normal, como funções sensitivas, motoras e autonômicas, e subsequentemente afeta o bem-estar físico, psicológico e social do paciente (YANG *et al.*, 2016; BI *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017). A compressão crônica da medula espinal pode resultar na perda de neurônios motores no corno ventral (LIAO *et al.*, 2016), levando ao comprometimento motor, podendo causar também dor crônica central, que se mostra de difícil tratamento (HAINS; WAXMAN, 2006; ZHANG *et al.*, 2016).

Ocorre como resultado de uma lesão inicial que pode advir de uma contusão ou compressão, seguida de uma lesão secundária que leva à formação de uma cicatriz glial associado à regulação positiva de fatores inibitórios, limitando a extensão axonal e posteriormente a recuperação funcional (SCHWAB; BARTHOLDI, 1996; BURDA; SOFRONIEW, 2014).

De acordo com Silva (2013) aproximadamente dois milhões e meio de pessoas convivem com lesão medular, sendo descritos cerca de 130 mil novos casos por ano no mundo. No Brasil, o último censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), realizado em 2010, descreveu cerca de 200.000 paraplégicos (RODRIGUES *et al.*, 2012).

As pesquisas atuais visam tornar o tratamento e cuidado do paciente mais eficiente. A maioria concentra-se na descrição de métodos cirúrgicos, de procedimentos de medicina física e reabilitação ou de fármacos. Dentre essas modalidades, as estratégias farmacológicas são as mais estudadas, tendo como objetivo a redução dos efeitos nocivos causados pela lesão secundária, além de estimular a regeneração tecidual (RAMER *et al.*, 2014). No entanto, a maioria dos estudos demonstrou eficácia terapêutica limitada e insatisfatória (VARMA *et al.*, 2013).

Até o presente momento, não foi identificada a incidência exata dessa afecção em pequenos animais, no entanto observa-se que ela é frequentemente citada em trabalhos científicos, e muitas vezes determina a morte ou eutanásia desses pacientes (SILVA, 2013). Os impactos externos podem resultar em fratura, subluxação, luxação vertebral (BAGLEY *et al.*, 1999), hemorragia, hematoma, edema medular, lesões compressivas, laceração medular ou das raízes associadas, incluindo a síndrome da cauda equina (GRASMUECK; STEFFEN, 2004).

Apesar dos recursos cirúrgicos e farmacológicos disponíveis na área veterinária, nenhum se mostra capaz de reverter totalmente os danos neurológicos após a instalação da lesão (GEBRIN *et al.*, 1997a). A terapêutica cirúrgica restringe-se à descompressão da medula, retirada de fragmentos e estabilização da coluna vertebral (PRATT *et al.*, 1990). Na terapia medicamentosa, estudos indicam que as LME podem ser minimizadas por fármacos, que devem ser administrados em curto espaço de tempo após o trauma (GEBRIN *et al.*, 1997b).

Modelos terapêuticos multifuncionais estão recebendo cada vez mais atenção pela sua vantagem única de combinar a multiestratégia para superar as barreiras inibitórias e melhorar ainda mais a recuperação funcional (WILEMS; SAKIYAMA-ELBERT, 2015; LI *et al.*, 2016; FÜHRMANN *et al.*, 2017; ROPPER *et al.*, 2017).

Na última década vêm sendo estudados sistemas de entrega de medicamentos, que são tecnologias projetadas para liberação de fármacos usando hidrogéis, (ZHANG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016) nanopartículas, (KIM *et al.*, 2009; ROMAN *et al.*, 2016) e estruturas sustentadoras como portadores (WILEMS; SAKIYAMA-ELBERT, 2015; LI *et al.*, 2016b), tendo sido propostos para a incorporação de agentes terapêuticos, como monossialogangliosídeo, metilprednisolona e fatores neurotróficos, para conseguir uma liberação sustentada do fármaco no local da lesão (LIU *et al.*, 2016).

Frente aos resultados divergentes com o uso de medicamentos, outras abordagens terapêuticas têm sido pesquisadas em pacientes com LME, se destacando a terapia biológica, que consiste na utilização de células presentes no organismo do próprio paciente (CÍZKOVÁ *et al.*, 2006; CRISTANTE, 2007; VITELLARO-ZUCCARELO *et al.*, 2007).

Estudos recentes apontam que modelos experimentais para LME têm aprimorado o conhecimento da fisiopatologia destas lesões, proporcionando novas oportunidades de estratégias terapêuticas *in vivo* (SU *et al.*, 2015), sendo empregadas metodologias de reprodução de LME em pequenos roedores, principalmente ratos (MARQUES *et al.*, 2009).

Nesse sentido, têm-se buscado o emprego de novas biotecnologias, que possam ser utilizadas visando o restabelecimento funcional da Lesão, dentre elas pode-se destacar o Plasma

Rico em Fibrina (PRF), definido como um coágulo natural que atua otimizando o processo de cicatrização natural. É considerada uma matriz de fibrina homogênea e forte sem as células vermelhas do sangue, que transporta plaquetas, leucócitos e células mesenquimais indiferenciadas circulantes em seu concentrado. Essa estrutura forma um suporte natural complexo, que permite o repovoamento com células do próprio organismo (MARQUI *et al.*, 2017).

O PRF é produzido sem qualquer modificação do sangue, e é a consequência natural da coagulação durante a centrifugação, sendo considerado um tecido vivo e um biomaterial sólido capaz de preencher um espaço (MARQUI *et al.*, 2017). Os concentrados de plaquetas contidos nessa matriz liberam fatores de crescimento que aceleram o processo de regeneração, promovendo também angiogênese, considerado de grande importância na cicatrização tecidual (CHOUKROUN *et al.*, 2006).

Os estudos que envolvem a lesão neurológica têm se tornado cada vez mais amplos e frequentes no meio científico, porém, a precaução e o cuidado com a analgesia dos modelos experimentais não têm acompanhado o desenvolvimento dos projetos, não sendo notada a aplicação adequada de protocolo analgésico pós-operatório, nivelado à intensidade da dor e desconforto causado. Com o objetivo de refinar esses aspectos, alguns estudos citam o emprego de opioides para controle da algia após o procedimento de lesões neuropáticas (HESTEHAVE *et al.*, 2017).

O cloridrato de tramadol é um analgésico clinicamente eficaz e muito utilizado nos casos agudos e condições de dor crônica, como dor neuropática, câncer e pós-operatório. Ele age como um agonista μ -opioide, mas também tem uma variedade de outras propriedades que podem contribuir para o seu efeito analgésico, incluindo a inibição da receptação de serotonina e norepinefrina (KIMURA *et al.*, 2012; KANEKO *et al.*, 2014).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do plasma rico em fibrina associado ao uso do cloridrato de tramadol, no tempo agudo da lesão na medula espinal em ratos Wistar, por meio da avaliação da função motora e modificações histológicas e a avaliação da modulação da dor com o emprego do cloridrato de tramadol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A lesão da medula espinal compromete a condução da informação nervosa, motora e/ou sensitiva, entre o cérebro e o restante do corpo (NUNES *et al.*, 2017; KOU *et al.*, 2018). Além da perda funcional, são observadas complicações como infecções urinárias, espasticidade, disreflexia autonômica, problemas psicológicos (KALSO *et al.*, 2004; GUVEN *et al.*, 2005) e dor neuropática crônica (SNEDECOR *et al.*, 2013).

As causas de lesão medular podem ser de origem traumática e não traumática. Dentre as perturbações não traumáticas pode-se citar: disfunções vasculares, infecções, neoplasmas espinhais, subluxações vertebrais secundárias à artrite reumatoide ou doença articular degenerativa, além da degeneração do disco intervertebral, sendo esta a mais comum em medicina veterinária de pequenos animais. As lesões traumáticas são as mais frequentes na população humana, resultando de danos causados por acidentes de automóveis, quedas, lesões por arma de fogo ou arma branca e agressão intencional (PENHA *et al.*, 2011; PENHA, 2014).

A LME é denominada completa, quando existe ausência de sensibilidade e motricidade abaixo do nível da lesão, permanecendo apenas reflexos involuntários. Na lesão incompleta ocorre a preservação de pelo menos uma das modalidades (sensitiva ou motora), posterior ao nível da lesão. A caracterização da lesão medular completa ou incompleta só deve ser realizada quando o paciente não estiver em choque medular (GULY *et al.*, 2008).

A tetraplegia é caracterizada pela perda da função motora nos membros superiores e inferiores e resulta de uma lesão medular cervical, enquanto que a paraplegia refere-se à perda da função motora nos membros inferiores, que ocorre de forma secundária à lesão do segmento torácico, lombar ou sacral da medula espinal (DITUNNO; FORMAL, 1994). A disfunção autonômica das vísceras, principalmente da bexiga e intestino, acontece em ambos os casos (BATTAGLINO *et al.*, 2012).

2.1 FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES DA MEDULA ESPINAL

A lesão primária ocorre devido às lesões físicas imediatas, causada pela laceração, contusão, compressão ou contração do tecido neural. As principais alterações patológicas são ruptura dos vasos sanguíneos, dano mecânico direto às células da glia, corpos celulares e axônios seccionados (VARMA *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2014), resultando em interrupções fisiológicas e/ou morfológicas dos impulsos nervosos (RUCKER, 1990; BAGLEY *et al.*, 1999).

Após o trauma inicial, começa um processo endógeno de desenvolvimento mais lento chamado de lesão secundária, que envolve vários processos, como inflamação, edema,

isquemia, hemorragia, desequilíbrios eletrolíticos, apoptose e peroxidação lipídica induzida por radicais livres. Esses fenômenos levam à expansão da lesão primária e cavitação da medula espinal, interferindo na regeneração celular e culminando na morte neuronal e de células da Glia (CUNHA, 2008; ARAÚJO, 2013; RAMOS; ALEGRETE, 2015).

Essa fase é marcada pela destruição adicional de células neuronais e gliais em resposta à inflamação, levando à expansão do local da lesão, dano oxidativo e formação de cicatriz glial (VARMA *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2014), e os processos resultantes dificultam a sobrevivência neuronal, tornando o ambiente inóspito para a regeneração neural e recuperação funcional (MARTINI, 2015).

A LME causa danos e degeneração não somente de neurônios, mas também de oligodendrócitos, astrócitos e precursores celulares no local da lesão. Qualquer cavidade ou cisto resultante dessas mortes pode interromper os tratos axonais, levando à alterações neurológicas, como paresia e paralisia, muitas vezes com perda permanente da função abaixo do nível da lesão (SILVA, 2013; FÜHRMANN *et al.*, 2015). Esses eventos fazem com que a sobrevivência neuronal seja reduzida e a recuperação funcional prejudicada. Nesse momento da lesão, o ambiente celular torna-se inóspito para a regeneração e remielinização (MCDONALD; SADOWSKY, 2002; VAWDA; FEHLINGS, 2013; DASARI *et al.*, 2014).

Outra consequência observada é a hipertrofia de astrócitos, acompanhada do aumento na produção de seus filamentos intermediários, como a proteína glial fibrilar ácida (glial fibrillary acidic protein - GFAP). Esse processo é chamado de astrocitose reativa ou astrogliose, que juntamente com o recrutamento de mais tipos celulares incluindo a microglia, macrófagos e células progenitoras, culminam na formação da cicatriz glial, impedindo a regeneração do axônio por atuar como barreira física, além de acumular moléculas que inibem o crescimento axonal (ARAÚJO, 2013; MELO, 2014).

2.1.1 Fases da Lesão Medular

A classificação temporal das LME está disposta em três fases: aguda, subaguda e crônica. O dano secundário subsequente inicia na fase aguda precoce, tendo duração de duas a 48 horas após o trauma (AGRAWAL; FEHLINGS, 1996; FEHLINGS *et al.*, 2012). Esta divisão temporal pode ser considerada arbitrária segundo De La Torre (1984), Rowland *et al.* (2008) e Forner (2015), que descrevem nova classificação das fases da lesão, dividindo-as em: imediata, aguda, intermediária e crônica.

Nos 30 minutos após a lesão são observadas pequenas hemorragias no espaço perivascular e modificação nos padrões axonais. Uma hora após a lesão são identificados danos na região da substância cinzenta (SC). Estudos demonstraram a presença de vacúolos após lesão excitotóxica na medula espinal de ratos três dias após a lesão (GOMES-LEAL *et al.*, 2004). As primeiras duas horas após o trauma resultam em morte neuronal e glial acompanhada de choque medular e consequente perda funcional motora ao nível e abaixo da lesão (DITUNNO *et al.*, 2004; NORENBORG *et al.*, 2004; BOLAND *et al.*, 2011).

Cerca de quatro horas após a lesão primária, é possível identificar o acúmulo de organelas como mitocôndrias, lisossomos e neurofilamentos, incluindo a proteína precursora de beta amilóide (β APP), que produzem edema (GENTLEMAN *et al.*, 1993). O dano inicialmente mais evidente na SC atinge a substância branca (SB) cerca de 8 horas após a lesão, sendo que as células gliais parecem estar afetadas da mesma maneira nesse momento (BRUCE *et al.*, 2000). É descrito que após trauma da medula espinal, o aumento do fluxo sanguíneo ocorre primeiro na SB e em seguida na SC (SCHWAB; BARTHOLDI, 1996).

A fase subaguda se estende até duas semanas (SCHWARTZ; FEHLINGS, 2002) sendo caracterizada pela progressão do acidente secundário e início da resposta inflamatória, com ativação microglial e astrocitária, recrutamento de neutrófilos, células de Schwann, células meníngeas e fibroblastos (SCHNELL *et al.*, 1999; GOMES-LEAL *et al.*, 2005). Nesse estágio ocorre a progressão de alguns eventos da fase aguda, como o deslocamento de eletrólitos, edema e morte celular necrótica, além do aparecimento de novos eventos, como a formação de radicais livres, influxo de cálcio tardio, resposta ou inflamação do sistema imune e morte celular por apoptose (LIVERMAN *et al.*, 2005).

A fase crônica inicia aproximadamente 2 semanas após a lesão medular (NAGOSHI *et al.*, 2015), e nesse momento o processo inflamatório já se encontra concluído. Nesta fase a cicatriz glial e cavidades na medula espinal já estão desenvolvidas e estabelecidas. Os cistos são resultado da perda de tecido neural e representam barreira física, impedindo a regeneração axonal (FORNER, 2015).

A cavidade marca o sítio da lesão primária, e culmina no aparecimento da cicatriz glial, constituída por proliferação de astrócitos e/ou células do mesoderma (FAWCETT; ASHER, 1999). Nesse momento a degeneração Walleriana (retração axonal) continua e pode levar anos até que os corpos celulares e os restos de axônios degenerados sejam totalmente removidos do sítio da lesão (FORNER, 2015).

A desmielinização na fase secundária pode estar relacionada a mecanismos excitotóxicos devido à presença de receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) na SB e em células da glia (astrócitos e oligodendrócitos). Estes receptores podem ser ativados por concentrações patológicas de glutamato no meio extracelular, lesando a bainha de mielina, mas não diretamente os axônios (GARCIA-BARCINA; MATUTE, 1998; MATUTE *et al.*, 2001; GOMES-LEAL *et al.*, 2005).

Embora haja um debate sobre a definição da fase crônica, é amplamente aceito que uma duração de mais de 6 meses pode ser considerada crônica. Neste estágio as estratégias terapêuticas se concentram em aumentar a regeneração dos axônios danificados e remielinização usando várias medidas farmacológicas ou terapias de transplante celular. Outro objetivo de pesquisa nesta etapa é superar a principal barreira patológica: as cicatrizes gliais (KIM *et al.*, 2017).

Logo após o trauma ocorre a perda da autorregulação do fluxo sanguíneo no segmento medular acometido e a pressão de perfusão se torna diretamente relacionada à pressão arterial sistêmica, que na maioria das vezes se encontra baixa devido às lesões sistêmicas concomitantes (COUGHLAN, 1993; CAMBRIDGE; BAGLEY, 1997; OLBY, 1999).

O microambiente encontrado na medula, após a lesão, desfavorece a regeneração axonal apresentando vários obstáculos, como a secreção de moléculas inibitórias pelos astrócitos e oligodendrócitos, interrupção no fornecimento de fatores neurotróficos, além da proliferação de astrócitos, microglia e células endoteliais, e ainda de fibroblastos em torno da medula. A cicatriz neuroglial formada atua como barreira físico-química responsável pela produção de várias moléculas de matriz extracelular, inibindo o brotamento axonal no sistema nervoso central (SNC), levando à morte neuronal (MELO, 2014; TAKEDA *et al.*, 2015; BISCOLA, 2016).

O fluxo sanguíneo na SC diminui consideravelmente nas primeiras duas horas após a lesão, permanecendo dessa forma nas primeiras 24 horas (JANSSENS, 1991; COUGHLAN, 1993; JEFFERY, 1995), ocasionando uma reperfusão vascular na região isquêmica, podendo causar um acúmulo de radicais livres derivados de oxigênio, propiciando o aumento da lesão secundária (KWON *et al.*, 2004). O fluxo também reduz na substância branca, uma a seis horas após o trauma, mas retorna ao normal, podendo aumentar dentro de 24 horas (JEFFERY, 1995).

A necrose hemorrágica traumática inicia na SC e se propaga para a SB, promovendo a apoptose, resultando em perda progressiva das células do parênquima da medula espinal, primariamente oligodendrócitos (diminuindo os níveis de mielina dos axônios) acarretando a

disfunção (LI *et al.*, 1996). Como a medula espinal está localizada em um canal vertebral não expansivo, a compressão tende a distribuir a pressão transversalmente por todo o parênquima, comprometendo sua funcionalidade, sendo a substância cinzenta relativamente preservada nesse processo (KRAUS, 2000).

A morte celular pode ocorrer devido aos danos primários e secundários, sendo consideradas duas vias distintas: necrose e apoptose. A necrose ocorre devido à ruptura mecânica da célula ou dano celular, podendo acontecer de forma passiva durante a cascata de alterações secundárias, enquanto que a apoptose é considerada uma morte celular fisiológica ou programada, e ocorrendo devido à uma resposta ativada por indução celular a um estímulo específico (ABRAMS *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 2004).

A lesão traumática do SNC acarreta uma resposta inflamatória (OLBY; JEFFERY, 2003), resultando na produção de citotoxinas e agentes protetores. Os mediadores inflamatórios prejudicam a condução iônica e transmissão sináptica, alterando a função neuronal (SMITH; McDONALD, 1999). A infiltração celular na resposta inflamatória da lesão medular acontece em duas fases: primeiramente ocorre um influxo de neutrófilos, que atingem os níveis máximos em poucas horas, ocorrendo em seguida o recrutamento de macrófagos, cujo pico se estabelece após cinco a sete dias (DUSART; SCHWAB, 1994). A segunda fase de infiltração celular coincide com a desmielinização secundária e perda de axônios (OLBY; JEFFERY, 2003).

É possível identificar a presença de leucócitos polimorfonucleares fagocíticos na medula espinal lesionada, no interior e próximo às paredes vasculares e áreas de hemorragia, sugerindo que o trauma induz a ativação das lipases das membranas, hidrolizando os fosfolípídeos presente nestas, e liberando vários ácidos graxos, principalmente o ácido araquidônico (OLBY; JEFFERY, 2003).

A excitotoxicidade pode ser definida como a morte celular mediada, principalmente pelo glutamato (OLNEY, 1990). O aminoácido L-glutamato está envolvido com funções cerebrais normais como cognição, memória e aprendizagem, sendo considerado o principal mediador de sinais excitatórios no SNC dos mamíferos (FONNUM, 1984; HEADLEY; GRILLNER, 1990).

A concentração deste aminoácido usualmente é regulada por um mecanismo ativo e eficiente realizado pelos astrócitos. O dano mecânico aos neurônios, associado à falta de energia local, causa o aumento da liberação neuronal de glutamato e a redução da ação do mecanismo dos astrócitos sobre o mesmo, elevando a concentração deste neurotransmissor a níveis tóxicos. (JANSSENS, 1991; COUGHLAN, 1993; JEFFERY, 1995b; OLBY, 1999).

Durante a isquemia ocorre um esgotamento das reservas de adenosina trifosfato (ATP) e acúmulo de produtos do metabolismo celular, levando à produção de radicais livres. Estes são descritos como moléculas muito reativas e instáveis, que são desativadas por um sistema varredor de radicais livres e outros antioxidantes (CAMBRIDGE; BAGLEY, 1997). Estas moléculas atacam principalmente a porção fosfolipídica da membrana celular, desencadeando o processo denominado “peroxidação lipídica” (BRAUGHLER; HALL, 1989; OLBY, 1999), causando a lesão dos neurônios e células da glia (OLBY, 1999).

Outro processo patológico bem caracterizado é a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (AZBILL *et al.*, 1997; XIONG *et al.*, 2007), que elevam os níveis de cálcio intracelular, disfunção mitocondrial, degradação de ácido araquidônico e ativação de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (HALL; SPRINGER, 2004; MCTIGUE, 2008), promovendo a peroxidação lipídica e dano oxidativo e nitrativo para proteínas e ácidos nucleicos (XU *et al.*, 2005).

2.2 TRATAMENTOS PARA LME

A busca por um tratamento farmacológico adequado capaz de minimizar os danos neurodegenerativos provocados pela LME tem sido um desafio para os cuidados à saúde em decorrência dos prejuízos primários e secundários provocados pela lesão (NASIRINEZHAD *et al.*, 2015).

Os tratamentos aplicados ao trauma medular incluem condutas que visam conter a progressão da lesão, buscando a manutenção das estruturas não danificadas, por meio de procedimentos cirúrgicos que visam estabilizar e descomprimir a medula espinal. Além disso, se faz necessário o manejo intensivo da hipotensão arterial, temperatura corporal e cuidados de reabilitação. Apesar dos esforços empregados, essas terapias fornecem apenas benefícios modestos para os pacientes (BAPTISTE; FEHLINGS, 2007).

Os glicocorticoides esteroidais, principalmente a metilprednisolona, começaram a ser utilizados para o tratamento clínico de pacientes com LME desde a década de 1970 (ALBAYRAK *et al.*, 2015). Este fármaco tem sido associado aos tratamentos para humanos e animais em decorrência dos seus efeitos neuroprotetores (BRACKEN, 1992), sendo descritos redução de eventos neurodegenerativos durante as lesões primárias e secundárias, como: inibição da isquemia pós-traumática, atenuação da permeabilidade vascular, diminuição da resposta inflamatória, recuperação neurológica, suporte energético aeróbico e ação antioxidante

(HOLTZ *et al.*, 1990; XU *et al.*, 1992; BEHRMANN *et al.*, 1994; FAROOQUE *et al.*, 1996; XU *et al.*, 2001).

Os estudos divergem quanto à efetiva ação neuroprotetora deste agente (BOWERS *et al.*, 2016; SÁMANOET *al.*, 2016; LI *et al.*, 2018), existindo um consenso quanto à necessidade de emprego de altas doses para seu efeito, sendo observados efeitos adversos importantes com seu emprego, como o aumento do potencial de complicações, como infecção pós-operatória, respiratória, hiperglicemia e sangramento gastrointestinal, e por isso sua aplicação ainda é controversa (SHORT *et al.*, 2000; BOTELHO *et al.*, 2009; CHIKUDA *et al.*, 2014).

Outros fármacos têm sido testados em pesquisa como opção de tratamento das LME, como a dexmedetomidina, observando-se um efeito análogo à metilprednisolona (CELIK *et al.*, 2013). O riluzol (um anticonvulsivante utilizado para o tratamento de esclerose lateral amiotrófica) também foi utilizado em pacientes com LME, apontando alguma melhora clínica (WILSON; FEHLINGS, 2014). A minociclina (um antibiótico da família das tetraciclina) também já foi testada como estratégia terapêutica para fases agudas da LME em ratos, apesar de seus efeitos neuroprotetores serem bastante questionados (ARAS *et al.*, 2015).

O plasma rico em fibrina propõe uma aceleração na cicatrização de tecidos (moles e duros) por meio do aumento da concentração de fatores de crescimento, como o Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), Fator de crescimento fibroblástico (FGF), Fator de crescimento epidermal (EGF) e Fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas (PDEGF), conferindo capacidade hemostática e o aumento da intensidade da vascularização (angiogênese) dos tecidos, podendo acelerar o processo de reparação tecidual em uma área submetida a uma lesão acidental ou cirúrgica (MARQUI *et al.*, 2017).

2.2.1 Plasma Rico em Fibrina (PRF)

Também conhecido como fibrina rica em plaquetas, o plasma rico em fibrina foi desenvolvido na França para uso em cirurgia oral e maxilo-facial, sendo definido como um aglomerado de plaquetas dispostas sobre uma membrana de fibrina, conferindo um alto potencial de reparação tecidual (CHOUKROUN *et al.*, 2006).

O PRF difere do seu antecessor, o plasma rico em plaquetas (PRP), por vários parâmetros que podem ser resumidos da seguinte forma: a simplicidade da sua preparação e a sua implementação. O tempo de preparação e o custo de preparação são ambos

significativamente mais baixos, já que o PRF não requer a ativação direta com fatores adicionais, como a trombina bovina ou anticoagulantes extrínsecos (CHOUKROUN *et al.*, 2001).

Devido à sua estrutura fibrosa, o PRF retém um número maior de citocinas e fatores de crescimento em uma estrutura de suporte de fibrina tridimensional para migração celular (TOFFLER *et al.*, 2009). No tecido, o PRF se dissolve mais lentamente que o PRP, formando uma matriz sólida de fibrina lentamente remodelada no estilo de um coágulo sanguíneo natural (MIRON *et al.*, 2017).

Essa biotecnologia visa coletar e reunir os componentes mais ativos da amostra de sangue: plaquetas (ricas em fatores de crescimento), fibrina e leucócitos, produzindo uma estrutura clinicamente utilizável. Esse preparado pode ser apresentado na forma de soluções ou géis, possibilitando que sejam injetadas ou acomodadas no sítio cirúrgico, diretamente sobre a ferida ou área injuriada, para regenerar os tecidos danificados (KUMAR *et al.*, 2016).

Este protocolo não exige adição de anticoagulante, trombina, ou qualquer outro agente de geleificação, empregando somente o sangue centrifugado. Para obtenção do coágulo de PRF é necessária a retirada de uma amostra de sangue, que é imediatamente centrifugada a 3000 rpm e processada sem anticoagulante por 10 minutos (MARQUI *et al.*, 2017).

Pela falta de anticoagulante, a cascata de coagulação é ativada rapidamente, assim como a síntese de trombina, induzindo a formação de fibrina e ativação das plaquetas. O coágulo de fibrina se deposita no meio do tubo, estando disposta entre a camada inferior (composta por eritrócitos) e a superior do tubo (constituída de plasma acelular), sendo as plaquetas presas maciçamente nas malhas de fibrina (CHOUKROUN *et al.*, 2006).

Para garantir o sucesso do protocolo, deve-se atentar especialmente para a velocidade da coleta do sangue e início da centrifugação, visto que, devido a ausência do anticoagulante, o sangue inicia a coagulação quase que imediatamente após o contato com o tubo, sendo necessário poucos minutos de centrifugação para concentrar o fibrinogênio (MARQUI *et al.*, 2017). A principal falha no protocolo reside na demora entre a coleta de sangue e a centrifugação, ocorrendo a polimerização da fibrina de forma difusa no tubo, sendo mantida uma pequena quantidade de coágulo sem consistência. (MARX *et al.*, 1998; DOHAN *et al.*, 2006).

O coágulo produzido contém plaquetas ativadas, fatores promotores de cicatrização e pró-regenerativos, além de anticorpos e elementos de imunidade e resistência à infecção, presentes no sangue inicialmente coletado (FIORAVANTI *et al.*, 2016), podendo ser utilizado

diretamente como um coágulo (preenchendo a lesão) ou, após compressão, como uma membrana protetora e resistente (KHORSHIDI *et al.*, 2016).

As plaquetas e citocinas são então efetivamente retidas e liberadas gradualmente ao longo do tempo. O coágulo PRF permite uma liberação lenta contínua de fatores de crescimento e citocinas um período de 10 dias, em contraste com o PRP que libera a maioria de seus fatores de crescimento no primeiro dia (KOBAYASHI *et al.*, 2016).

As propriedades angiogênicas do PRF podem ser explicadas pelas estruturas tridimensionais encontradas na matriz de fibrina, onde são encontrados vários fatores de crescimento e citocinas, que são fortemente estimuladas e incorporadas na matriz incluindo PDGF, TGF- β 1, IGF e VEGF. A matriz de fibrina também estimula a expressão da integrina “avb3”, permitindo que as células se liguem à fibrina, fibronectina e vitronectina. Esta cascata de eventos se mostra de fundamental importância para iniciar o processo de angiogênese, promovendo a cicatrização das feridas teciduais (MIRON *et al.*, 2017).

O fibrinogênio é o substrato final de todas as reações de coagulação, sendo uma proteína solúvel, e transformado em fibrina insolúvel pela trombina, enquanto o gel de fibrina polimerizada constitui a primeira matriz cicatricial da ferida local (CLARK, 2001; HINSBERGH *et al.*, 2001), ou seja, a fibrina é considerada a forma ativada do fibrinogênio (MOSESSON *et al.*, 2001).

Esta molécula solúvel e maciçamente presente no plasma e plaquetas, desempenha um papel determinante na agregação plaquetária durante a hemostasia, sendo transformada em um tipo de cola biológica, com capacidade de consolidar o agregamento inicial de plaquetas, constituindo, uma barreira de proteção ao longo de violações vasculares durante a coagulação (CLARK, 2001). A rede de fibrina formada apresenta uma organização homogênea, tridimensional, e mais coerente do que coágulos de fibrina naturais (DOHAN *et al.*, 2006).

As citocinas desempenham um papel importante no início da cicatrização (RODEO, 2007), e são dispostas em: (1) Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF β) – considerando sua isoforma mais abundante TGF-1; (2) Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF); (3) Fator de Crescimento Insulino-Dependente (IGFs) I e II. Sendo estes reguladores responsáveis por induzir a cicatrização fibrosa, regular a migração, proliferação e sobrevivência da linhagem de células mesenquimatosas, e pela proliferação e diferenciação da maioria das células, além de regulação do mecanismo de apoptose (DOHAN *et al.*, 2006).

Os leucócitos presentes nesse concentrado influenciam a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, e de fatores de crescimento, verificando-se também que a degranulação dos

granulos- α plaquetários possuem participação ativa na liberação destes produtos (DOHAN *et al.*, 2009). Os subprodutos resultantes como as interleucinas IL-8, IL-15 e a quimiocina MIP1-a, atuam na quimiotaxia dos neutrófilos e células “Natural Killer”, elevando a proteção contra microorganismos ao nível do tecido lesionado (GUILLEREY *et al.*, 2016).

A ativação neutrofílica causa a secreção de proteases que facilitam sua penetração na membrana basal dos vasos sanguíneos, além da contribuição para degradar o coágulo de fibrina. Os neutrófilos aprisionados no coágulo de fibrina atuam para eliminar bactérias e patógenos presentes no local da ferida por fagocitose e produção de radicais livres tóxicos e enzimas digestivas. Isso contribui para a prevenção da contaminação bacteriana dentro do sítio cirúrgico (Clark, 2001). A ação antimicrobiana deste material ainda se encontra em estudo, entretanto, estudos recentes descrevem a ação antimicrobiana do concentrado plaquetário pela indução do Peptídeo Humano Beta-Defensina 29 e Beta-Defensina 3 (BAYER *et al.*, 2017).

2.2.2 Cloridrato de Tramadol

O cloridrato de tramadol é um analgésico opioide amplamente utilizado no tratamento de dor moderada, severa e crônica, como a dor neuropática, oncológica e pós-operatória (KIMURA *et al.*, 2012; KANEKO *et al.*, 2014; SZKUTNIK-FIEDLER *et al.*, 2014). É um analgésico com ação no sistema nervoso central, apresentando estrutura química semelhante à da morfina. Foi primeiramente sintetizado em 1962, mas seu uso clínico no tratamento da dor foi inicialmente descrito em 1977 na Alemanha (SCHENCK; AREND, 1978; GROND; SABLITZKI, 2004). É uma mistura racêmica com dois enantiômeros, (+) tramadol e (-) tramadol.

O (+) tramadol tem moderada afinidade com o receptor μ , se mostrando melhor que o (-) tramadol. O (+) tramadol tem como mecanismo de ação a inibição da recaptação de serotonina e o (-) tramadol é um potente inibidor de norepinefrina no sistema nervoso central (DEMIRARAN *et al.*, 2005). Além disso, estudos sugerem o cloridrato de tramadol atua inibindo os receptores NMDA, o que explica seu efeito nociceptivo (HARA *et al.*, 2005).

Age como um agonista do receptor opioide μ_1 e inibidor da recaptação de monoamina e como alvo para alguns canais iônicos receptores de proteína acoplados e dependentes de ligantes (MINAMI *et al.*, 2015; TANAKA *et al.*, 2016), assim como tem atuação na inibição da captação neuronal de noradrenalina e serotonina (5-HT) (RAFFA *et al.*, 1992).

Possui atuação em vários canais iônicos e receptores, incluindo canais de sódio, receptores GABA, receptores NMDA e receptores nicotínicos de acetilcolina (SHIRAIISHI *et*

al., 2002; HARA *et al.*, 2005; KATSUKI *et al.*, 2006). O tempo de vida do tramadol é de aproximadamente 6-8 horas, independente da via de administração. O efeito analgésico é dose-dependente e concentrações séricas de 0,1 a 0,3 mg/L são consideradas efetivas (COMPENDIUM, 2015).

O tramadol é considerado um analgésico relativamente seguro, tendo como principais reações adversas náusea, tontura, vômito, sonolência e convulsões, não causando depressão respiratória clinicamente relevante e apresenta baixo potencial de dependência (WHO, 2015; TANAKA *et al.*, 2016). Esse agente geralmente provoca uma baixa incidência de efeitos adversos quando comparado aos opioides clássicos, como a morfina e o fentanil (SANTOS *et al.*, 2015).

Apesar de considerado um analgésico opioide fraco, o tramadol é classificado como analgésico de ação multimodal, pois sua ação não é restrita aos mecanismos opioides. Foi demonstrado que sua afinidade para o receptor μ opioide de aproximadamente 6000 vezes menor que a morfina, e que apenas 40% de seu efeito antinociceptivo pode ser antagonizado pela naloxona (antagonista não-seletivo opioide) indicando que outro efeito não-opioide pode contribuir para a ação analgésica completa do tramadol (RAFFA *et al.*, 1992).

Estudos relatam que o tramadol pode atuar modulando as transmissões sinápticas no corno dorsal da medula espinal, ativando principalmente os receptores μ -opioides e inibindo a recaptação de monoaminas no SNC. No entanto, o modo preciso de modulação ainda é desconhecido (YAMASAKI *et al.*, 2015). Estudos recentes apontam ação antiedematosa do tramadol na articulação, em modelos experimentais de osteoartrite em coelhos (OLIVEIRA, 2017).

Seus efeitos analgésicos foram relatados após sua administração sistêmica em modelos de dor aguda e crônica em ratos (CODD *et al.*, 2008; KIMURA *et al.*, 2012). Estudos comportamentais na mesma espécie demonstraram uma inibição das respostas nociceptivas por administração intravenosa e pela via subcutânea (RAFFA *et al.*, 1992; PEHRSON *et al.*, 2003). Em estudos realizados com rãs foi identificado bloqueio de condução no nervo ciático com o uso deste agente, de forma semelhante aos anestésicos locais como a lidocaína (GUVEN *et al.*, 2005).

2.3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA LESÃO MEDULAR – ESCALA BBB

Os estudos de lesão medular completa ou parcial permitem a utilização de um método de avaliação da capacidade neuronal, onde se aplica um escore relacionado ao comportamento

motor e a marcha dos animais, sendo amplamente empregado para a avaliação motora em estudos de lesão em ratos (DUGAN; SHUMSKY, 2015, PAN *et al.*, 2018).

A escala BBB (nome empregado a partir das iniciais de seus desenvolvedores Basso, Beattie e Bresnahan), é um teste aplicado em ratos, específico para lesões medulares que resultam em comprometimento dos membros pélvicos sendo realizada mediante registro da movimentação voluntária dos animais em um aparato de campo aberto (“*open field*”), (SHINOZAKI, *et al.*, 2013).

Se mostra um teste relativamente simples e fidedigno, e que não requer tanta experiência e prática por parte do examinador (SHINOZAKI, *et al.*, 2013), podendo ser realizada em diferentes dias após a lesão (BARROS, 2017; PAN *et al.*, 2018). Nessa avaliação os animais recebem pontuações entre 0 (que representa a ausência de função motora) e 21 (animais que apresentam função motora completa) (XU *et al.*, 2016).

A avaliação consiste na observação de 10 categorias de comportamento dos ratos após lesão medular, incluindo a movimentação dos membros pélvicos, equilíbrio de tronco e abdome e a posição/movimentação da cauda do animal. Em cada categoria, os observadores determinam e definem atributos como qualidade de movimentos articulares (se não há movimento articular, se é discreto ou extenso) ou frequência de descarga de peso nos passos, por exemplo (se não descarrega peso nos membros membros ou se essa descarga é ocasional, frequente ou consistente) (BASSO *et al.*, 1995).

Barros (2017) descreve os 10 atributos utilizados para a avaliação da recuperação da função locomotora: 1) movimentação dos membros pélvicos; 2) posição do tronco; 3) posição do abdome; 4) acomodação da perna; 5) marcha; 6) coordenação; 7) capacidade de limpar a perna; 8) posição predominante dos pés; 9) instabilidade do tronco; 10) posição da cauda de acordo com os termos descritos na escala de avaliação.

A vantagem de se usar uma escala com várias categorias é o aumento da confiabilidade e diminuição de erros na avaliação. A principal desvantagem desta escala é a subjetividade, podendo haver diferenças inter-avaliadores (BASSO *et al.*, 1995). Com isso, a escala permite a avaliação da recuperação funcional motora dos animais após a instituição de uma lesão medular, possibilitando a avaliação dos efeitos de técnicas terapêuticas na recuperação dos animais após esse procedimento (BARBOSA, 2014; XIAN-HUI *et al.*, 2016; PAN *et al.*, 2018).

2.4 ESCALA GRIMACE PARA RATOS - EGR

Quantificar com segurança a dor em curso se mostra um grande desafio (TAPPE-THEODOR; KUNER, 2014). Na maior parte dos pacientes a dor espontânea é relatada usando escalas de dor (WILLIAMSON; HOGGART, 2005; NEOGI, 2014), questionários (PLESH *et al.*, 2000; CÔTÉ *et al.*, 2004) e descrições de sensações (BACKONJA, STACEY, 2004; THAKUR *et al.*, 2014). No entanto, esses métodos não podem ser empregados para populações não-verbais, por isso, foi criada a expressão facial com o intuito de mensurar a dor espontânea.

O Sistema de Codificação de Ação Facial transferiu o movimento da expressão facial humana para unidades de ação (EKMAN; FRIESEN, 1969) e o Sistema de Codificação Facial Neonatal foi criado e amplamente aplicado em populações infantis (GRUNAU; CRAIG, 1987) e pacientes com demência, sendo recentemente validada para a avaliação da dor em ratos, camundongos e coelhos (ASGAR, 2015), expandindo a capacidade de avaliar a dor em roedores e detectar falhas no projeto de pesquisa (DE RANTERE *et al.*, 2016).

Várias abordagens têm sido desenvolvidas na tentativa de monitorar com segurança a dor em curso em modelos animais experimentais (MOGIL, 2009; MOGIL *et al.*, 2010; GREGORY *et al.*, 2013; TAPPE-THEODOR; KUNER, 2014; BURMA *et al.*, 2017; MUNRO *et al.*, 2017). Uma das abordagens mais promissoras baseia-se na análise de expressões faciais, uma capacidade evolutivamente conservada de expressar emoções, incluindo a dor (DARWIN, 1872; WILLIAMS, 2002; CROOK *et al.*, 2014).

Várias técnicas foram desenvolvidas para avaliar a dor espontânea em animais por análise da expressão facial (SOTOCINAL *et al.*, 2011; CHAMBERS; MOGIL, 2015). A escala Grimace para camundongos adaptou essa pontuação, utilizando cinco características faciais como indicadores para avaliar a dor (LANGFORD *et al.*, 2010) e um sistema de codificação facial de quatro características também foi desenvolvido para ratos (SOTOCINAL *et al.*, 2011), apresentado no APÊNDICE B Essa abordagem tem sido capaz de detectar níveis mais baixos de dor do que observação padrão em gaiola ou análise comportamental automatizada (LEACH *et al.*, 2012; FALLER *et al.*, 2015).

Quantificar a dor dos animais durante os procedimentos é imprescindível, visto que permite avaliar a gravidade dos procedimentos experimentais e/ou aplicar a terapia analgésica adequada. Tradicionalmente, a avaliação da dor era feita pelo registro das alterações fisiológicas e, posteriormente, pela observação comportamental, sendo ambos limitados pelo fato de parâmetros fisiológicos (como frequência cardíaca ou frequência respiratória) ou alterações comportamentais não refletirem a intensidade da dor (MOGIL *et al.*, 2010).

Em animais de laboratório as taxas de administração de analgésicos no pós-operatório se mostram substancialmente reduzida (15% - 20%), sendo explicitado em alguns casos o não uso dos agentes em procedimentos invasivos como cirurgias ortopédicas, toracotomias, etc, devido à possibilidade de interferência do resultado no protocolo experimental. Foi verificada uma variabilidade de dados relacionados à observação da presença de dor e do emprego de analgésicos nas pesquisas com animais, destacando-se que a modulação de dor é sempre considerada um fator importante durante os estudos experimentais (STOKES *et al.*, 2009; CARBONE, 2011; BRITO *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que alguns delineamentos experimentais permitem a retirada da analgesia do protocolo de pesquisa (mesmo em procedimentos extremamente invasivos) justificando a possibilidade de alteração do resultado esperado. No entanto, esses estudos buscam, em sua maioria, a aplicação em seres humanos, onde a necessidade terapêutica para modulação da dor está bem definida, e de incontestável necessidade (CARBONE, 2011).

Aspectos como a perda de peso, são parâmetros também utilizados, no entanto, se mostram pouco específicos (ROUGHAN *et al.*, 2014). O reconhecimento precoce da dor, associado à intervenção apropriada, atenderiam ao refinamento da pesquisa *in vivo* preconizado nas diretrizes do uso de animais em pesquisa (CARBONE, 2011; MATSUMIYA *et al.*, 2012; WAITE *et al.*, 2015, CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2016).

A Escala Grimace para Ratos (EGR) consiste em quatro “unidades de ação” faciais (aperto orbital, aparência de nariz / bochecha, posições de orelha e bigode) que são pontuadas usando imagens estáticas por um observador (SOTOCINAL *et al.*, 2011). O ERG foi validado, demonstrando conteúdo e validade de construto e confiabilidade (inter e intraobservador) (SOTOCINAL *et al.*, 2011; OLIVER *et al.*, 2014).

Escalas faciais são cada vez mais utilizadas em várias espécies, incluindo ratos (KAWANO *et al.*, 2014; DE RANTERE *et al.*, 2015) equinos (DALLA COSTA *et al.*, 2014), gatos (HOLDEN *et al.*, 2014) e coelhos (KEATING *et al.*, 2012), pois consomem menos tempo, sendo consideradas mais específicas para a dor do que as técnicas mais complexas baseadas em etogramas (LANGFORD *et al.*, 2010; SOTOCINAL *et al.*, 2011; LEACH *et al.*, 2012). Mogil *et al.* (2009) citaram que essas escalas se mostram confiáveis para quantificar a dor de duração moderada (de minutos a horas). Descreve também que dias e semanas após a indução da dor os animais não apresentavam características faciais distintas, sugerindo que as expressões faciais não devem ser usadas como uma métrica confiável de dor contínua em modelos de dor neuropática ou em modelos de dor crônica.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o efeito do plasma rico em fibrina e sua associação com o cloridrato de tramadol na fase aguda da lesão de medula espinal induzida em ratos adultos.

3.2 ESPECÍFICOS

- a. Analisar o efeito da terapia com o plasma rico em fibrina associado ao cloridrato de tramadol sobre a recuperação funcional após lesão experimental da medula espinal aplicando o teste BBB, avaliando o escore obtido pelos animais nos dias propostos.
- b. Descrever os padrões lesivos histopatológicos após lesão traumática experimental da medula espinal em ratos;
- c. Avaliar a analgesia promovida pelo cloridrato de tramadol e a redução do potencial de dor promovido pelo emprego do analgésico no pós-operatório.

4 MÉTODO

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi realizada atendendo aos preceitos da Lei 11.794 e os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário do Estado do Pará (CESUPA), aprovação sob protocolo nº 06.17 e realizada pela doutoranda e médica veterinária Rosa Helena Chaves.

4.2 TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Estudo experimental, prospectivo longitudinal, com intervenção, estatístico-comparativo, grupo controle presente, pesquisa em sujeitos, com dor ou desconforto para o sujeito, coleta de material biológico em único centro, local.

Foram utilizados 23 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, adultos, com aproximadamente 90 dias de idade, pesando entre 450g a 550g, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC). Estes foram previamente adaptados ao Biotério do CESUPA, onde foram mantidos por um período de 15 dias.

Os animais foram distribuídos de acordo com a Tabela 1 sendo mantidos em gaiolas plásticas forradas com maravalha industrializada, em sala refrigerada a 22°C, com umidade de 60%, luminosidade (ciclo de 12h com luz e 12h sem luz) e ruído controlados; com água e ração oferecidos *ad libitum* e troca das gaiolas realizada 2 vezes na semana.

Tabela 1 - Delineamento dos grupos experimentais.

GRUPO	EXPERIMENTO	ANIMAIS (n)
PIL	PILOTO – Animais submetidos ao procedimento cirúrgico (laminectomia), para treinamento da técnica.	3
GCo	CONTROLE – Animais lesionados e tratados com solução fisiológica, avaliados em 24 horas, 3, 7 e 14 dias.	5
GMF	MATRIZ DE FIBRINA – Animais lesionados e tratados somente com matriz de fibrina, avaliados em 24 horas, 3, 7 e 14 dias.	5
GMFTr	MATRIZ DE FIBRINA ASSOCIADO AO CLORIDRATO DE TRAMADOL – Animais lesionados e tratados com matriz de fibrina associado ao cloridrato de tramadol, avaliados em 24 horas, 3, 7 e 14 dias.	5
GTr	CLORIDRATO DE TRAMADOL – Animais lesionados e tratados somente com cloridrato de tramadol, avaliados em 24 horas, 3, 7 e 14 dias.	5
	TOTAL	23

O procedimento de lesão medular dos animais foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará, mediante parceria firmada entre este Laboratório, o Grupo de Pesquisa Experimental do Centro Universitário do Estado do Pará e o Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia. Este local foi definido devido possuir materiais apropriados, como mesa para lesão, microscópio cirúrgico, material para microcirurgia, entre outros.

No dia do procedimento os animais foram levados do Biotério do CESUPA para o Laboratório de Morfofisiologia da UEPA no período matutino, sendo mantidos em sala refrigerada, silenciosa, no intuito de evitar o estresse. A cirurgia foi realizada 1 hora após a chegada dos animais, sendo 2 à 3 animais por dia, e ao final do procedimento foram levados para o Biotério do CESUPA, onde concluíram a fase de recuperação anestésica, evitando a deambulação dos mesmos durante o traslado, de forma a reduzir os riscos de lesão.

4.3 GRUPO PILOTO

Foram utilizados 3 animais para treino da técnica de lesão medular e avaliação dos protocolos propostos, que não foram incluídos no estudo.

4.4 TÉCNICA ANESTÉSICA

Para realização da técnica anestésica, os animais foram pesados e anestesiados com a associação de 60 mg/kg de Cloridrato de Cetamina a 10% (Dopalen®) 8 mg/kg de Cloridrato de Xilazina a 2% (Anasedan®) e 0,03 mg/kg de Citrato de Fentanila (Fentanest®) pela via intraperitoneal, de acordo com protocolo padrão adotado pelo GPE-CESUPA, estando o animal sob supervisão de um médico veterinário durante todos os procedimentos.

Os animais se mantiveram em respiração espontânea durante o procedimento, sendo testados o reflexo caudal, pinçamento caudal e podálico, por pressão interdigital e das vibrissas, os quais se mantiveram ausentes. Foi realizado o repique do fentanil a cada 30 minutos, sendo no primeiro repique mantida a dose inicial, e a partir do segundo repique, adotado $\frac{1}{2}$ da dose. Nos casos necessários, procedeu-se o repique anestésico pela via intraperitoneal, de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ da dose inicial de cetamina e xilazina.

4.5 TRICOTOMIA E ANTISSEPZIA

Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral e os pelos foram retirados com auxílio de um depilador elétrico, na região dorsal entre as porções cervical e lombar da coluna vertebral, seguido de antissepsia com tintura de poliviniliodopirrolidona.

4.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO - LAMINECTOMIA

Foi realizado o modelo adotado por Penha (2016), descrito abaixo, em função da semelhança de seu mecanismo de lesão com a realidade dos traumas clínicos e também por ser de fácil reprodução. Os animais foram posicionados em uma mesa de ferro galvanizado, idealizada e construída para esse procedimento (Figura 1).

Para identificar o local da incisão foi realizada a palpação da última costela do animal e do processo espinhoso da décima vértebra torácica T10 (considerado o mais proeminente), seguida de incisão de 3 cm na região dorsal média, afastando-se a musculatura paravertebral, que foi rebatida, expondo a coluna vertebral do animal e permitindo a identificação da última costela, realizando-se a contagem das costelas, no sentido caudal-cranial, sendo identificada a vértebra T8 para realização da lesão.

Em seguida procedeu-se a laminectomia ao nível da vértebra T8, com o auxílio de um alicate cirúrgico de precisão, expondo o tecido nervoso da medula espinal de forma cuidadosa sob magnificação. As análises da abertura do campo cirúrgico, laminectomia e hemisseção medular ao nível de T8 foram realizadas com auxílio de microscópio cirúrgico (DFV, Modelo: MC-M1232).

Após o rebatimento da dura-máter, foi levada em consideração a artéria dorsal, para determinação da hemisseção medular à direita (Figura 2), produzida com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 12, sendo nesse momento observado o reflexo de pulso do animal durante a lesão. A hemostasia após a lesão foi realizada com o auxílio de um cotonete, sendo em seguida realizada a aproximação da musculatura com Nylon 5-0 (monofilamento preto-TECHNOFIO®) e a pele fechada com utilização de Nylon 4-0 (monofilamento preto-TECHNOFIO®).

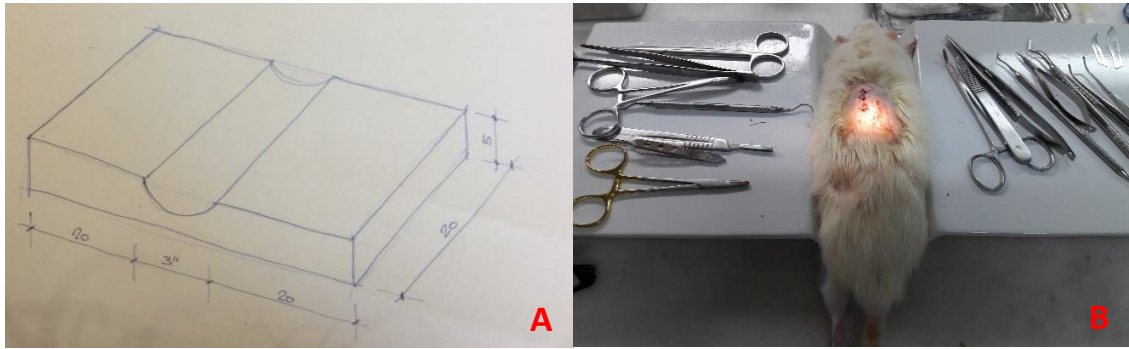


Figura 1 – Croqui da mesa produzida (A). Animal anestesiado posicionado na mesa cirúrgica (B).

Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

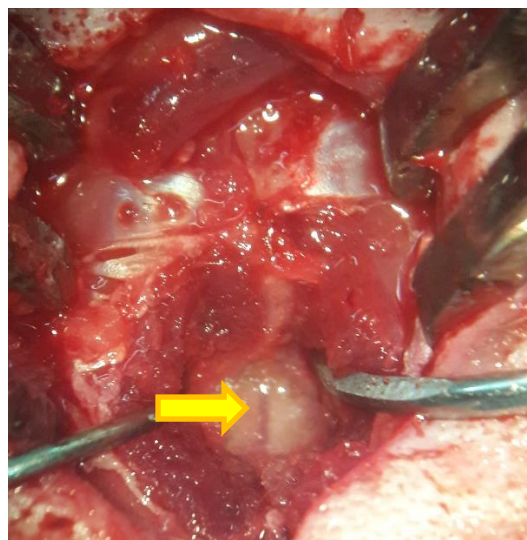


Figura 2 – Identificação da artéria dorsal, para realização de hemisseção medular.

Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

4.7 PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM FIBRINA

A coleta de material para a produção do coágulo de fibrina foi realizada pela punção da veia caudal ou safena do próprio animal, antes do procedimento de lesão medular (Figura 3), com auxílio de uma seringa de 1 ml acoplada à uma agulha 24G (20x0,55) ou somente agulha, sendo coletado um volume de 0,5 ml de sangue, que foi imediatamente inserido em microtubo (Eppendorf®) de 1 ml sem adição de anticoagulante. O sangue foi centrifugado uma única vez, a 3.000 rpm (400 X g) (DOHAN *et al.*, 2006) durante 10 minutos (Figura 4-A), em uma centrífuga de microtubos: Marca Vision; Modelo: COD. 732 66-4.



Figura 3 – Coleta de sangue para produção do PRF por punção da veia caudal (A) e veia safena (B).

Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

Na parte inferior do tubo se encontrou depositada a camada de células vermelhas e na superior o coágulo de PRF propriamente dito. A membrana de PRF foi retirada do tubo com pinça após a centrifugação (Figura 4-B) e aplicado imediatamente após a produção da lesão (Figura 5).

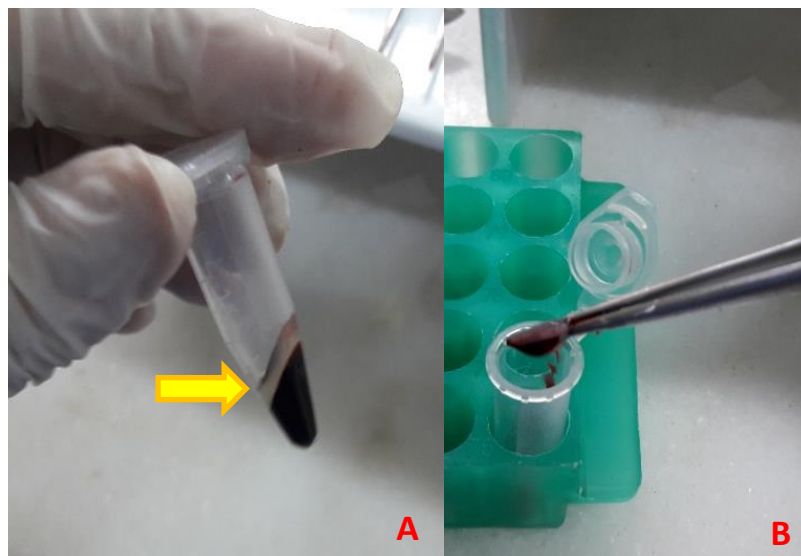


Figura 4 – Separação dos segmentos após centrifugação (A); Coleta do coágulo PRF (B).

Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

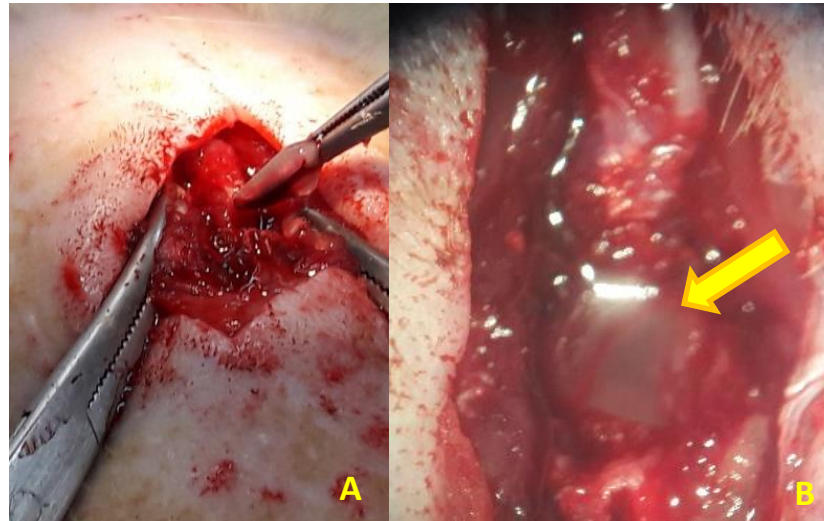


Figura 5 – Administração do Coágulo PRF (A); Coágulo PRF no local da lesão (B).
Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

4.8 CUIDADOS PÓS CIRÚRGICOS

Após conclusão do procedimento foi empregado o protocolo pós-operatório administrando-se enrofloxacina na dose 10 mg/kg a cada 24 horas, durante 7 dias e analgesia com cloridrato de tramadol na dose de 4 mg/kg a cada 12 horas, durante 5 dias, ambos pela via subcutânea, (nos grupos em que o tramadol fazia parte do tratamento testado), de forma a garantir a analgesia pós-operatória, sendo administrada também a pomada de lidocaína no local da cirurgia, a cada 12 horas, durante 5 dias, em todos os animais.

Os animais foram mantidos isolados em gaiolas-padrão até 3 dias pós-procedimento, buscando-se reagrupar os animais após esse intervalo, de forma a evitar o estresse oriundo do isolamento. Como consequência da lesão medular os animais ficaram incapazes de deambular sendo adotados cuidados básicos fundamentais, tais como: inspeção diária dos animais, com ênfase na pele e forragem completa do fundo da caixa, para evitar úlceras de pressão.

4.9 ADMINISTRAÇÃO DO PLASMA RICO EM FIBRINA E CLORIDRATO DE TRAMADOL

A matriz de fibrina foi administrada localmente, em seguida ao procedimento de lesão de medula, por meio do posicionamento do coágulo com pinça, evitando-se qualquer tipo de lesão decorrente desse procedimento.

O cloridrato de tramadol foi administrado na dose de 4mg/Kg, pela via subcutânea, a cada 12 horas, durante 5 dias.

4.10 APLICAÇÃO DA ESCALA BBB

As pontuações foram tabuladas de acordo com a avaliação de cada membro pélvico. A escala BBB aplicada neste estudo foi utilizada a partir da tradução realizada por SOUZA (2017), apresentada no ANEXO 2, onde estão descritas as pontuações e análises funcionais.

Para a aplicação da escala foi utilizada uma caixa de plástico com dimensão 40 x 20 cm forrada com folhas de EVA, para garantir o efeito antiderrapante (Figura 6-A).

Foram realizadas filmagens nos tempos propostos (24 horas, 3, 7 e 14 dias) com o auxílio de um Celular marca Samsung S7 Edge, fixados em suporte (Figura 6-B), por um tempo mínimo de 5 minutos e máximo de 7 minutos. Nas situações em que os animais se mantiveram estáticos por mais de 30 segundos, foi aplicada a manipulação manual, com o intuito de estimular a marcha.

A avaliação dos animais foi realizada por um único pesquisador, pelo tempo mínimo de cinco minutos, com experiência prévia na aplicação da escala, e que não teve acesso ao grupo ou espaço temporal no qual o animal se encontrava. As observações (Figura 7) foram realizadas de 8:00 às 11:00 nos dias propostos.



Figura 6 – Campo aberto forrado com EVA (A) e suporte (B) para aplicação do Teste BBB.
Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

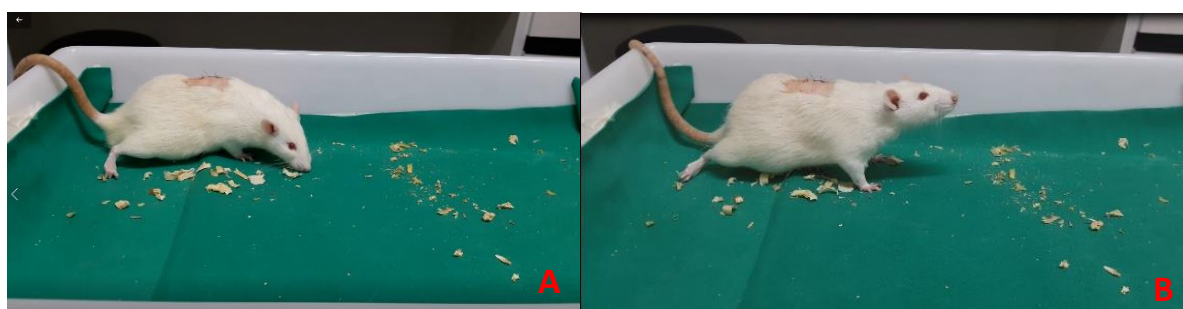


Figura 7 – Avaliação dos animais em campo aberto forrado com EVA para aplicação do Teste BBB e aplicação da escala Grimace.
Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

4.11 APLICAÇÃO DA ESCALA GRIMACE PARA RATOS

A Escala Grimace para Ratos (Rat Grimace Scale - RGS) consiste em quatro unidades de ação facial: aperto orbital, aparência do nariz / bochecha, posição da orelha e das vibrissas, que são pontuadas usando imagens a partir de uma observação. O EGR é usado principalmente para observar e diagnosticar a dor espontânea (DREANCĂ *et al.*, 2017).

Para isso foram coletadas imagens a partir da avaliação funcional (Teste BBB), onde foram retirados 3-10 momentos, buscando a representação facial do animal (Figuras 8 e 9) em questão nos tempos propostos (24 horas, 3, 7 e 14 dias). A aplicação da pontuação foi feita por um único pesquisador, que não teve acesso ao espaço temporal ou grupo ao qual o animal pertencia.

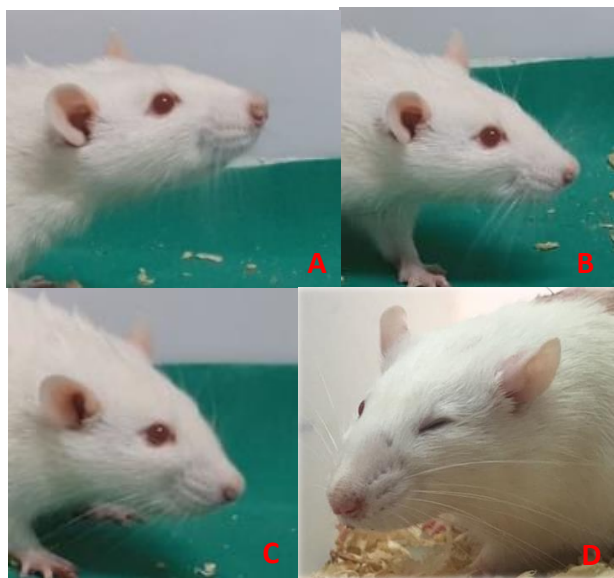


Figura 8 – Aplicação da Escala Grimace para ratos. Animais sem padrão de dor (A e B).
Posição normal do nariz (A) e área orbital (B).
Animais com padrão de dor (C e D)
Achatamento do nariz (C); Modificação na orientação da orelha - forma pontiaguda e estreitamento da área orbital (D).
Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

4.12 EUTANÁSIA

Todos os animais foram acompanhados diariamente por 14 dias após a lesão espinal. No 14º dia, após a filmagem para aplicação do teste BBB e da escala Grimace, foi realizada a eutanásia dos animais, sendo administrado novo protocolo anestésico (mesmo descrito anteriormente para confecção da lesão), seguido de perfusão com solução tamponada e formaldeído à 4% para preparação e coleta do material para a avaliação microscópica. Após a perfusão, a medula espinal foi removida manualmente (Figura 9) e processada para estudo histopatológico do local da lesão.



Figura 9 – Identificação macroscópica da lesão após retirada da medula espinal.
Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

4.13 PROTOCOLO DE PERFUSÃO E PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA

Os animais foram perfundidos após os tempos de sobrevida descritos na Tabela 1. Para a realização da perfusão, após protocolo anestésico descrito anteriormente, foi realizada toracotomia dos animais e inserção de agulha 24G no ventrículo esquerdo do coração, por onde foram administrados 500 ml de solução salina a 0,9% com heparina (0,5 ml/L) e em seguida 500 ml de formaldeído a 4% com auxílio de bomba de perfusão (Marca Milan, Modelo:626).

A preparação do formaldeído tamponado seguiu o preconizado por Santin *et al.* (2017) e consistiu na adição de formaldeído (fórmula comercial - 37,5 a 40%, 100 ml), água destilada (900 ml), fosfato de sódio monobásico (4 gramas), fosfato de sódio dibásico (6,5 gramas), sendo necessário o ajuste de pH em 7,0.

Em seguida, a parte da medular espinal compreendida entre T4 e L1 foi extraída, e pós-fixada de forma íntegra em formaldeído a 4% em temperatura ambiente por 72 horas. Para o processamento, foi realizado o corte no centro da lesão, e cortes seriados a cada 1 cm nos sentidos cranial e caudal, em seguida esse material foi processado em uma bateria de álcool com diferentes concentrações e imerso em xilol, para em seguida ser embebidas em parafina.

Após inclusão em parafina, foram obtidas secções transversais e longitudinais de 6 μ m, que foram montadas em lâminas que passaram previamente por procedimentos de lavagem e armazenamento em álcool 70%, e em seguida foram coradas com hematoxilina-eosina (HE).

4.14 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Para análise qualitativa, foram analisadas as lâminas coradas em hematoxilina e eosina em microscópio óptico (Bioval, L2000C). Para análise das lâminas, as mesmas foram encaminhadas e analisadas por um patologista que não teve acesso ao grupo ao qual os animais pertenciam, sendo descritas as principais alterações encontradas.

4.15 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS EUTANÁSIA

As carcaças oriundas dos animais utilizados foram armazenadas em sacos com identificação para lixo biológico, e mantidos em refrigeradores do biotério, até a coleta por empresa especializada do Centro Universitário do Pará, bem como todo material perfuro-cortante resultante dos procedimentos foi descartado em local apropriado (Descarpak®) evitando possíveis acidentes e contaminações.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tratados utilizando estatística descritiva e, segundo a natureza das variáveis, expressos sob a forma de média \pm desvio padrão ou mediana e desvio interquartilico, Intervalo de Confiança de 95%, valores mínimo e máximo, e exibidos em tabelas e/ou figuras.

A normalidade dos dados contínuos foi testada pelo teste D'Agostino-Pearson. A comparação entre postos de mais de dois grupos independentes (diferentes grupos, mesmo tempo e peso dos grupos) foi realizada utilizando a Análise de Variância de Kruskal-Wallis e, para dois grupos independentes, essa comparação foi efetuada pelo teste de Mann-Whitney. No caso de mais de duas amostras dependentes (mesmo grupo em função do tempo), a análise dos postos foi feita utilizando a Análise de Variância de Friedman e pós-teste de Dunn no caso de diferenças significativas.

As tabelas foram construídas com as ferramentas do software Microsoft Word e os gráficos com o software GraphPad Prism versão 7.00. Todos os testes foram executados com o auxílio do software GraphPad Prism versão 7.00 e resultados com $p \leq 0.05$ (bilateral) foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

Durante a realização do estudo, um animal veio a óbito no procedimento cirúrgico. Apesar de ter sido realizada hemisseção medular, três animais apresentaram paraplegia em ambos os membros pélvicos e dois animais não apresentaram déficit neurológico, permitindo inferir a ocorrência de lesão total da medula ou ausência de lesão, fator de exclusão desse estudo, e por isso foram submetidos à eutanásia e realizada a substituição destes nos devidos grupos.

Foi observada a necessidade de repique anestésico (quetamina e xilazina) em apenas 30% dos animais. Este fato se deve principalmente ao uso de um opioide analgésico (fentanil) integrado no protocolo anestésico.

O tempo médio de realização do procedimento cirúrgico foi de 40 minutos (30 – 50 minutos), compreendendo o momento da incisão da pele até o fechamento da mesma, e o tempo de recuperação dos animais foi em média de 6 horas (4 – 8 horas).

Não foram observadas infecção, autofagia ou úlceras de pressão, provavelmente devido ao protocolo anestésico empregado, da técnica cirúrgica asséptica, além da manutenção dos animais em ambiente com temperatura controlada e gaiolas com quantidade dobrada de maravalha.

Este estudo analisou 20 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem Wistar com aproximadamente 90 dias de idade, submetidos a lesão da medula espinhal no segmento T8, os quais foram divididos em quatro grupos: grupo Controle (**GCo**), com cinco animais, grupo Matriz de Fibrina (**GMF**), com quatro animais, grupo Tramadol (**GTr**), com quatro animais e grupo Matriz de Fibrina + Cloridrato de Tramadol (**GMFTr**), com cinco animais. A distribuição do peso dos animais é apresentada na Tabela 2, não sendo observada diferença estatística significativa, de acordo com o valor de $p < 0,05$.

Tabela 2 – Distribuição do peso médio dos animais ao início do tratamento.

Grupo	Tempo da avaliação				p-valor*
	GCo	GTr	GMF	GMFTr	
Média ± dp	538,0 ± 27,8	550,0 ± 39,2	491,0 ± 50,7	506,2 ± 43,2	0,1694
Mínimo –	510,0 –	510,0 –	418,0 –	450,0 –	
máximo	580,0	600,0	530,0	571,0	
IC95%	503,5 – 572,5	487,7 – 612,3	410,3 – 571,7	452,6 – 559,8	

*Análise de Variância de Kruskal-Wallis. GCo, Grupo Controle; GMF, Grupo Matriz de Fibrina; GTr, Grupo Tramadol; GMFTr, Grupo Matriz de Fibrina + Tramadol. Mín., escore mínimo; Máx., escore máximo, DIQ, desvio interquartil; P25/P75, percentis 25 e 75; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Fonte: Protocolo de Pesquisa, 2018.

A tabela 3 apresenta a comparação dos resultados da avaliação da função motora dos ratos estimada pela escala BBB, segundo o tempo da avaliação e o grupo. Observou-se, nos quatro grupos estudados, significativa melhora funcional quando comparados os tempos 24 horas *versus* 14 dias após a lesão medular.

Tabela 3 – Avaliação da função motora dos ratos estimada pela escala BBB, de acordo com o grupo avaliado.

Grupo	Tempo da avaliação				p-valor*
	24h	3 dias	7 dias	14 dias	
GCo					
Mín. – Máx.	0 – 4	1 – 8	1 – 15	8 – 17	<0,0001 [†]
Mediana (DIQ)	3 (3,5) [¶]	6 (5)	8 (9,5)	13 (7) [¶]	
P25/P75	0/3,5	2,5/7,5	2,5/12	8,5/15,5	
IC95%	0 – 4	1 – 8	1 – 15	8 – 17	
GMF					
Mín. – Máx.	0 – 9	4 – 15	4 – 16	8 – 18	0,0003 [†]
Mediana (DIQ)	0 (6,75) [¶]	5 (8,75)	12,5 (10,25)	15 (7,5) [¶]	
P25/P75	0/6,75	4/12,75	5,5/15,75	9,75/17,25	
IC95%	0 – 9	4 – 15	4 – 16	8 – 18	
GTr					
Mín. – Máx.	0 – 7	0 – 12	0 – 16	8 – 17	0,0004 [†]
Mediana (DIQ)	0 (5,25) [¶]	6 (10)	12 (13)	13,5 (7,5) [¶]	
P25/P75	0/5,25	1/11	2,5/15,5	9/16,5	
IC95%	0 – 7	0 – 12	0 – 16	8 – 17	
GMFTr					
Mín. – Máx.	0 – 8	1 – 11	4 – 16	10 – 17	0,0002 [†]
Mediana (DIQ)	3 (7) [¶]	5 (8,5)	11 (10,5)	15 (5) [¶]	
P25/P75	0,5/7,5	2,5/11	4/14,5	11,5/16,5	
IC95%	0 – 8	1 – 11	4 – 16	10 – 17	

*Análise de Variância de Friedman. [†]Estatisticamente significativo. [¶]Comparações que apresentaram diferenças significativas. GCo, Grupo Controle; GMF, Grupo Matriz de Fibrina; GTr, Grupo Tramadol; GMFTr, Grupo Matriz de Fibrina + Tramadol. Mín., escore mínimo; Máx., escore máximo, DIQ, desvio interquartilico; P25/P75, percentis 25 e 75; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Fonte: Protocolo de Pesquisa, 2018.

Quando comparados entre si nos diferentes tempos de avaliação, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à função motora (Figuras 10 e 11).

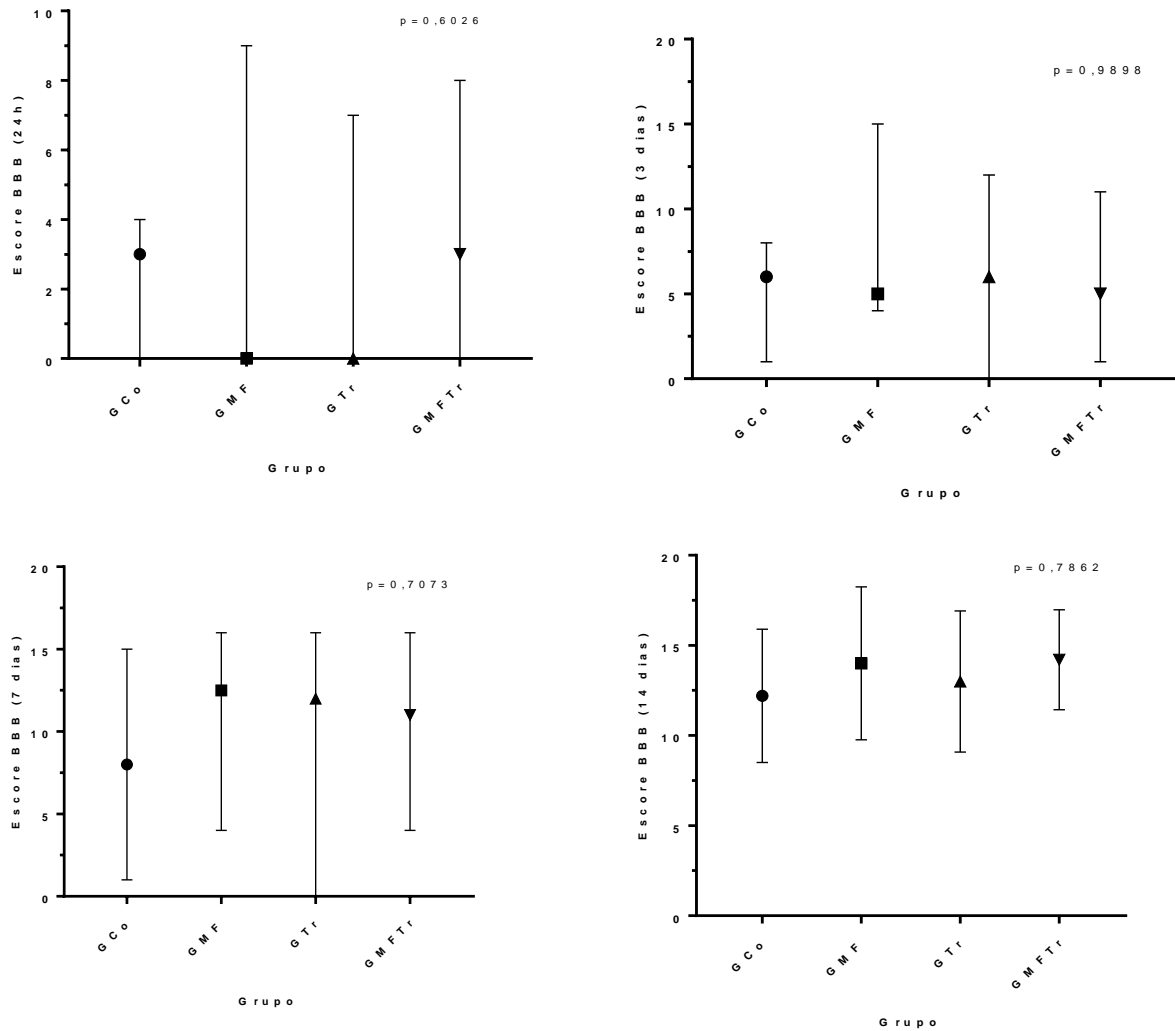


Figura 10 – Função motora dos ratos Wistar estimada pela escala BBB nos tempos 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias, de acordo com o grupo.

Análise de Variância de Kruskal-Wallis. GCo, Grupo Controle; GMF, Grupo Matriz de Fibrina; GTr, Grupo Tramadol; GMFTr, Grupo Matriz de Fibrina + Tramadol.

Fonte: Protocolo de Pesquisa, 2018.

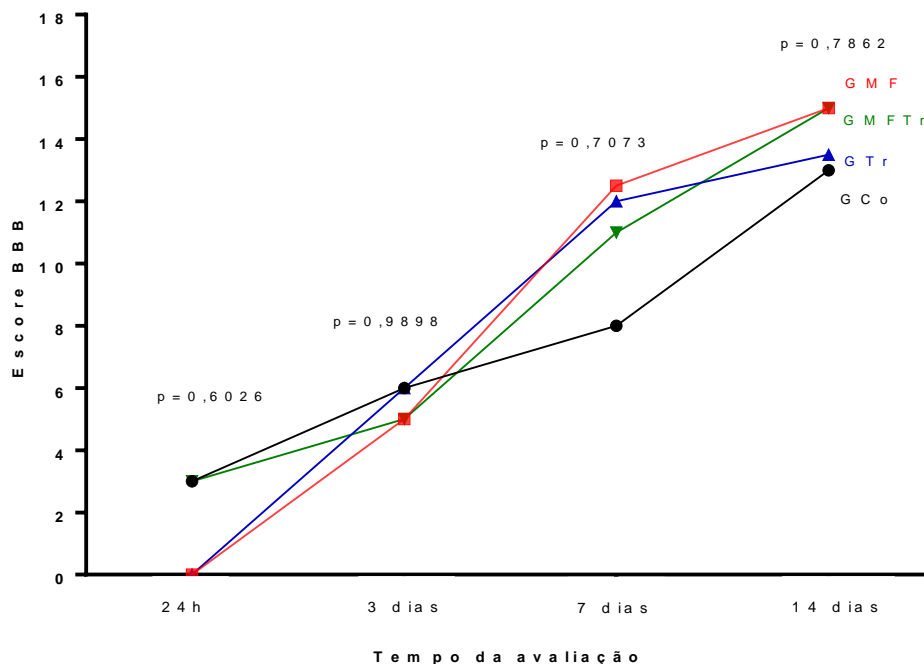


Figura 11 – Função motora dos ratos Wistar estimada pela escala BBB nos tempos 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias, comparação intergrupos. Análise de Variância de Kruskal-Wallis. GCo, Grupo Controle; GMF, Grupo Matriz de Fibrina; GTr, Grupo Tramadol; GMFTr, Grupo Matriz de Fibrina + Tramadol. Fonte: Protocolo de Pesquisa, 2018.

Após a conclusão dos procedimentos experimentais, foi possível identificar que todos os animais dos grupos **GCo** e **GMF** se apresentaram hiper-reativos, nos três primeiros dias do pós-operatório, reagindo com tentativa de mordedura e durante a manipulação para a aplicação de antibiótico pós-operatório e traslado da gaiola para a caixa de teste, sendo observado também que estes apresentavam ranger de dentes e reação a qualquer barulho nas avaliações funcionais (aplicação do teste BBB).

Além disso, buscou-se integrar esses animais em duplas nas gaiolas (com o intuito de evitar o estresse do isolamento) 3 dias após o procedimento, no entanto os ratos dos grupos **GCo** e **GMF** não permitiram a integração até os 7 dias pós-procedimento, sendo observado durante as tentativas vocalização, ranger de dentes, resistência à aproximação do outro animal, além de brigas. Os ratos dos grupos **GTr** e **GMFTr** se mostraram menos reativos, permitindo o agrupamento em gaiolas, assim como uma melhor manipulação e traslado para a caixa de teste sem grandes complicações.

Inicialmente a administração do tramadol seria realizada em todos os animais do experimento, no entanto foi identificado no grupo **PIL** que o mesmo poderia alterar de forma

significativa os resultados, culminando em sua incorporação como grupo a ser testado neste trabalho.

A partir desta observação, idealizou-se a aplicação da escala Grimace para ratos nos animais do grupo **GCo** e **GTr**, buscando-se avaliar a analgesia conferida por esse opioide, e a possível interferência nos resultados funcionais e histopatológicos neste trabalho. Durante a condução desse estudo, não foi necessária a realização da massagem vesical ou qualquer outro estímulo para micção e defecação, visto que os animais mantiveram as atividades fisiológicas consideradas normais para a espécie.

Apesar de se reconhecer a necessidade do emprego de protocolo pós-operatório nos animais deste trabalho, foi observado a partir do 4º dia pós-operatório o aparecimento de abscessos, oriundos das aplicações subcutâneas, mesmo com uso de antissépticos antes de cada aplicação. Além disso, é importante ressaltar a necessidade de contenção para a administração das medicações, resultando em estresse durante o procedimento.

A Tabela 4 apresenta a comparação dos níveis de dor espontânea aferidos nos animais, a partir da Escala Grimace, segundo o grupo e o tempo proposto. Observou-se que os níveis medidos no 14º dia no grupo **GCo** foram significativamente inferiores aos apresentados em 24h ($p < 0,0001$), no entanto não foi observada diferença estatística no grupo **GTr** em função do dia ($p = 0,2344$).

Tabela 4 – Avaliação da dor em ratos estimada pela escala GRIMACE, de acordo com o grupo.

Grupo	Tempo da avaliação				p-valor*
	24h	3 dias	7 dias	14 dias	
GCo					
Mín. – Máx.	0,92 – 1,25	0,92 – 1,17	0,50 – 0,75	0,08 – 0,42	<0,0001 [†]
Mediana (DIQ)	1,17 (0,33) [‡]	1,08 (0,21)	0,58 (0,21)	0,25 (0,25) [‡]	
P25/P75	0,92/1,25	0,96/1,17	0,50/0,71	0,17/0,42	
IC95%	0,92 – 1,25	0,92 – 1,17	0,50 – 0,75	0,08 – 0,42	
GTr					
Mín. – Máx.	0,00 – 0,75	0,00 – 0,50	0,00 – 0,33	0,00 – 0,25	0,2344
Mediana (DIQ)	0,38 (0,63)	0,17 (0,42)	0,17 (0,25)	0,17 (0,23)	
P25/P75	0,06/0,69	0,02/0,44	0,04/0,29	0,02 – 0,25	
IC95%	0,00 – 0,75	0,00 – 0,50	0,00 – 0,33	0,00 – 0,25	

*Análise de Variância de Friedman. [†]Estatisticamente significativo. [‡]Comparações que apresentaram diferenças significativas. GCo, grupo controle; GMF, grupo matriz de fibrina; GTr, grupo tramadol. Mín., escore mínimo; Máx., escore máximo, DIQ, desvio interquartilico; P25/P75, percentis 25 e 75; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Fonte: Protocolo de Pesquisa, 2018.

Entretanto, quando comparados entre si, os níveis de dor foram significativamente menores no grupo **GTr** quando comparado ao grupo **GCo** nos momentos 24h ($p=0,0159$), 3 dias ($p=0,0159$) e 7 dias ($p=0,0079$), sendo semelhantes no 14º dia (Figura 12).

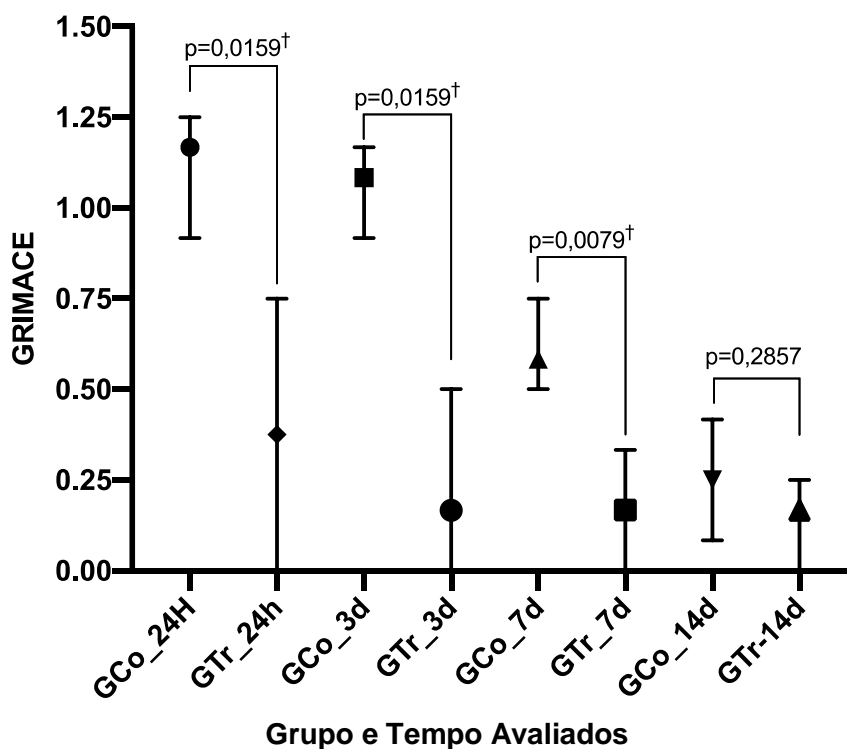


Figura 12 – Comparação dos níveis de dor em ratos Wistar estimada pela escala GRIMACE, segundo o grupo e o tempo avaliados.

Teste de Mann-Whitney. †Estatisticamente significativo. GCo, grupo controle; GMF, grupo matriz de fibrina; GTr, grupo tramadol; GMFTr, grupo matriz de fibrina + tramadol.

Fonte: Protocolo de Pesquisa, 2018.

Os resultados da correlação entre a escala Grimace e a escala BBB estão apresentados na Tabela 5, sendo identificada uma correlação entre a escala Grimace e a escala BBB no **GCo** no 7ª dias, assim como, na avaliação geral foi verificada intensa correlação negativa entre a escala BBB e a escala Grimace no **GCo** [r (Pearson): -0,78 IC (95%) -0,53 - -0,91; $p < 0,0001$] e uma grande correlação negativa entre a escala BBB e escala de Grimace no **GTr** [r (Pearson): -0,51 IC (95%) -0,02 - -0,80; $p = 0,0433$].

Tabela 5 - Correlação entre os escores obtidos na escala GRIMACE e na escala BBB, segundo o grupo e o tempo de avaliação.

Grupo/Escala/Tempo	Coefficiente de Correlação de Pearson	p-valor
GCo		
GRIMACE vs. BBB, 24h	0,16	0,7970
GRIMACE vs. BBB, 3d	-0,53	0,3507
GRIMACE vs. BBB, 7d	-0,91	0,0291 [†]
GRIMACE vs. BBB, 14d	-0,57	0,3124
GRIMACE vs. BBB (GERAL)	-0,78	<0,0001[†]
GTr		
GRIMACE vs. BBB, 24h	0,25	0,6811
GRIMACE vs. BBB, 3d	-0,77	0,1224
GRIMACE vs. BBB, 7d	-0,48	0,4097
GRIMACE vs. BBB, 14d	-0,83	0,0790
GRIMACE vs. BBB (GERAL)	-0,51	0,0433[†]

*Coeficiente de correlação de Pearson. [†]Estatisticamente significativo. GCo, Grupo Controle; GTr, Grupo Tramadol.

Fonte: Protocolo de Pesquisa, 2018.

Durante o processamento do material para realização do exame histopatológico foram identificadas alterações morfológicas em todas as medulas observadas, permitindo a identificação da presença da lesão, confirmando a efetiva produção de lesão medular, de acordo com o experimento proposto (Figura 13).

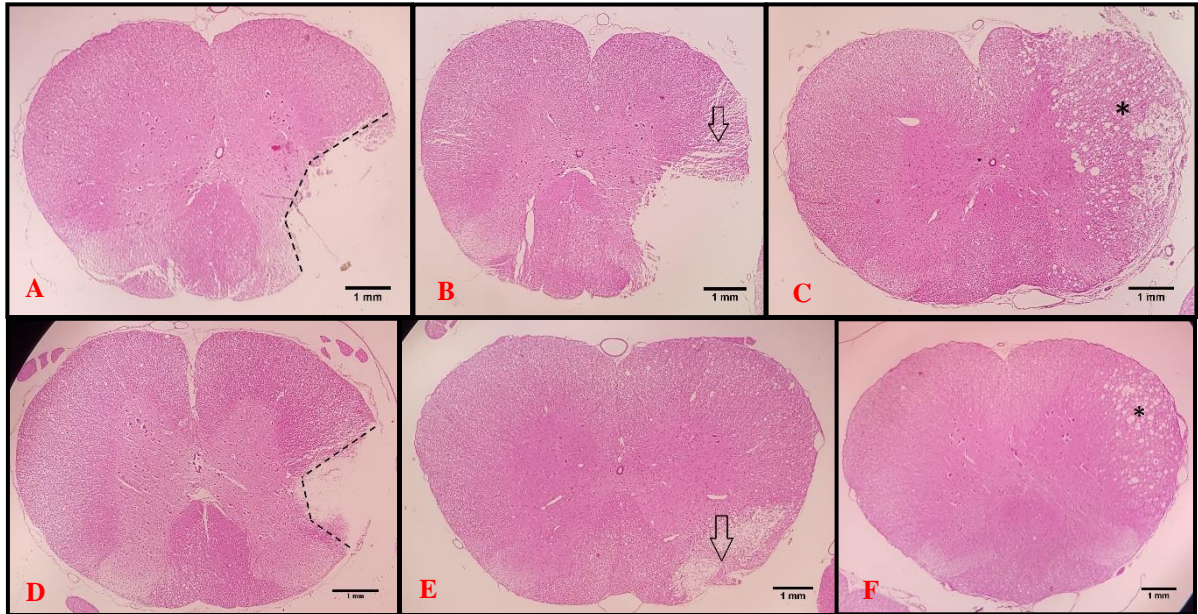


Figura 13 – (---) Identificação microscópica da lesão produzida, (↓) necrose, (*) cavitação.
 (A, B, C) – **Gco** (Grupo Controle); (D, E, F) – **GTr** (Grupo Tramadol).
 Aumento de 40x. Barra de Escala (1mm).
 Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

Nos cortes analisados, foi possível identificar que o grupo que recebeu o cloridrato de tramadol (**GTr**) demonstrou melhor preservação tecidual, seguido da associação Tramadol e Matriz de Fibrina (**GMFTr**) demonstrando diminuição da quantidade de cavitações e de infiltrado de células inflamatórias, quando comparados aos demais grupos avaliados. No grupo onde foi administrada a Matriz de Fibrina isolada não foram observados sinais de preservação tecidual. O **GTr** demonstrou ainda cavitação e infiltrado inflamatório, enquanto que o **GMFTr** apresentou redução do infiltrado, no entanto não demonstrou melhora na cavitação e/ou área de lesão.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, adotou-se a secção parcial (hemissecção) da medula espinal de ratos adultos a nível de T8, visando a produção de disfunção motora moderada nos animais (monoplegia). A definição do local da lesão se deve à facilidade de identificação do espaço, além de ser um dos locais mais comuns de lesão medular na medicina veterinária (PENHA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2017). A hemissecção proporciona um controle mais preciso do local e menor extensão da lesão, além de não ser uma lesão tão brusca quanto uma secção completa da medula (SOUZA, 2017), facilitando os cuidados, visto que as disfunções autonômicas são menos severas, favorecendo a sobrevivência dos animais (NOUT *et al.*, 2012).

Neste estudo foi utilizado um modelo de hemissecção medular em nível de T8, implementado com sucesso em ratos adultos (PENHA, 2016). Diversos autores descrevem diferentes modelos de lesão experimental da medula espinal em roedores, podendo ocorrer por compressão ou contusão (SILVA *et al.*, 2014), no entanto, até o presente momento, não foi encontrado um modelo universalmente aceito de lesão experimental da medula espinal, devido à diversidade de parâmetros analisados e tratamentos empregados (CRISTANTE *et al.*, 2010).

Além da definição do local da lesão, a utilização da mesa confeccionada em aço galvanizado, o correto posicionamento dos ratos e a identificação da artéria dorsal, associado à utilização de protocolo previamente treinado, material de microcirurgia e microscópio cirúrgico permitiram a reprodução da lesão medular proposta, no entanto, os resultados dos testes funcionais e do histopatológico demonstraram que as lesões produzidas se mostraram desiguais, fato este também descrito por Cristante *et al.* (2010).

O rato é uma espécie comumente empregada em estudos de lesão de medula espinal devido a semelhança na resposta histológica frente às lesões promovidas em comparação às lesões encontradas em pacientes humanos (CENTENARO, 2012). No entanto, é importante ressaltar, que os animais diferem entre si, assim como se mostram diferentes as lesões ocorridas naturalmente daquelas provocadas experimentalmente (RODRIGUES *et al.*, 2010). Este fato foi observado durante a condução desse experimento, podendo-se constatar que as lesões realizadas se mostravam únicas, sendo necessário, portanto, a avaliação do mesmo animal durante todo o espaço temporal proposto, inviabilizando a avaliação microscópica em cada momento do estudo.

A análise funcional da escala BBB não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados de acordo com os dias propostos, no entanto foi observada significativa melhora funcional em todos os grupos quando comparados os tempos

24 horas e 14 dias após o procedimento. É esperado que os animais apresentassem déficits funcionais após a lesão medular quando avaliados por meio da escala BBB demonstrando algum grau de recuperação espontânea parcial (BASSO *et al.*, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2012; SAKAI *et al.*, 2012) fato este observado neste trabalho, o que justifica a melhora encontrada inclusive no grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento ou analgesia pós-operatória.

A avaliação dos resultados ocorreu pelo emprego de parâmetros funcionais, por meio da aplicação da escala BBB e parâmetros histopatológicos, sendo ambos considerados parâmetros de avaliação diretos de regeneração da medula espinal (NARAZAKI *et al.*, 2006).

De acordo com a American Spinal Injury Association, a avaliação neurológica deve incluir escores motores e pontuações sensoriais (BONATTO, 2013), porém, alguns trabalhos afirmam que métodos que utilizam escalas qualitativas ou semiquantitativas tem baixa reprodutibilidade e falta de precisão e sensibilidade, especialmente para pequenas respostas (BARROS FILHO; MOLINA, 2008; SILVA, 2013). Isso pode justificar o fato de não terem sido identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais no que se refere a avaliação funcional, visto que essas diferenças podem ter sido sutis e assim não detectadas pelos testes aplicados.

Apesar de vários estudos descreverem a obtenção de resultados satisfatórios e promissores com o emprego do plasma rico em fibrina em procedimentos como pleurodese (ALAMDARI *et al.*, 2018), cicatrização de feridas e regeneração óssea (SRINIVAS *et al.*, 2018) implantes dentários (ÖNCÜ *et al.*, 2016), reparo de defeitos meniscais (WONG *et al.*, 2017) e na regeneração de defeitos ósseos (JEON *et al.* 2018), neste trabalho não foi identificado melhora estatisticamente significativa no teste funcional ou no histopatológico dos animais tratados com esse material.

Este fato também foi citado por Gülşen e Şentürk (2017), que não encontraram efeito significativo com o uso do PRF no inchaço e dor após a cirurgia bucal em pacientes humanos, e por Bertolini *et al.* (2017) que não verificaram melhora com o uso isolado ou associado da PRF com exercícios físicos no modelo de compressão do nervo mediano em ratos.

Segundo Silva (2013) a ocorrência de alteração comportamental nos animais pode ser evitada com o uso de analgesia preemptiva e pós-operatória, associado a cuidados com a assepsia, permitindo uma boa cicatrização da ferida cirúrgica. Neste estudo foi empregado o fentanil para modulação da dor intraoperatória e o protocolo analgésico pós-operatório adotado baseou-se no estudo de Falavigna *et al.* (2013), sendo administrado tramadol a cada 12 horas,

extendendo-se a administração até 5 dias após a cirurgia (e não 48 horas, como proposto pelos autores).

A curto prazo a dor serve para proteger o indivíduo de danos, entretanto, a longo prazo, pode se tornar uma condição debilitante. O objetivo da dor é alertar para que ocorra a retirada do estímulo imediato de dano tecidual, evitando danos adicionais ao local da lesão durante o processo de cicatrização (COX *et al.*, 2006). Este fato foi observado neste trabalho, visto que os grupos **GCo** e **GTr** mostraram relação inversamente proporcional entre a Escala Grimace do Rato (escala de dor) e a escala de BBB (escala funcional), sugerindo que, quanto menor a dor, maior a função do membro comprometido.

Durante o tempo de duração deste estudo não foram observados casos de automutilação em nenhum animal, mesmo nos grupos que não receberam o analgésico, diferente do relatado por Rosa-Ballaben (2018), que descreveu automutilação em ratos, informando a necessidade de complementação analgésica, realizada com paracetamol diluído em água.

Philips *et al.* (2017) avaliaram a dor neuropática em um modelo de radiculopatia cervical em ratos e verificaram a persistência de dor após a lesão nos dias 1 e 7, o que confirma os dados verificados neste estudo, onde o **GCo** apresentou maior escore na Escala Grimace para Ratos até o 7º dia pós-operatório, não sendo observada diferença entre os grupos no 14º dia. É importante ressaltar que o **GTr** não apresentou diferença no escore nos dias avaliados, confirmando a presença da analgesia promovida pelo tramadol durante o experimento.

Embora a escala detecte mais sensivelmente a dor em momentos agudos (LANGFORD *et al.*, 2010; SOTOCINAL *et al.*, 2011; DE RANTERE *et al.*, 2016; PHILIPS *et al.*, 2017), o desaparecimento das características faciais não é necessariamente indicativo da resolução da dor espontânea (SOTOCINAL *et al.*, 2011), visto que, adaptações naturais levaram espécies de presas, como roedores, a inibir a exposição da feição dolorosa sempre que possível, para que não se tornem alvo de predadores (STASIAK *et al.*, 2003).

Ao esconder expressões dolorosas, a dor pode persistir por mais tempo do que o detectável pela Escala Grimace. Essa hipótese já foi sugerida anteriormente para condições viscerais, inflamatórias e neuropáticas (SOTOCINAL *et al.*, 2011; PHILIPS *et al.*, 2017). Outros testes de comportamentos espontâneos, como preferência de local condicionado e monitoramento de atividades, também não conseguem capturar comportamentos de dor moderada após os tempos agudos (KLINCK *et al.*, 2017).

A avaliação histopatológica da medula espinal se mostra importante para avaliar o grau de dano celular e evidências de alterações morfológicas neuronais. A medula espinal coletada

após a eutanásia dos animais foi encaminhada para o histopatológico, utilizando-se o método de coloração de hematoxilina e eosina com a finalidade de verificar alguma evidência de lesão tecidual.

De acordo com Barros (2017) estudos realizados no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sugerem que a coloração com hematoxilina e eosina não é sensível o bastante para detectar diferenças significativas na avaliação microscópica da medula espinal.

O resultado do exame histopatológico demonstrou que o grupo que recebeu o cloridrato de tramadol apresentou melhor preservação tecidual, seguido da associação Tramadol e Matriz de Fibrina em comparação aos demais grupos avaliados. Nagakannan *et al.* (2012) demonstraram que o tramadol protege o cérebro contra a lesão transitória da isquemia do prosencéfalo, reduzindo os níveis de peroxidação lipídica e melhorando a disfunção motora pós-isquêmica. Yamasaki *et al.* (2015), descrevem a ação do tramadol em neurônios da substância gelatinosa, e Oliveira (2017) descreve que a administração deste agente pela via intratecal confere grande potencial antinociceptivo e antiedematogênico na osteoartrite em coelhos.

A recuperação funcional após produção de lesão medular experimental não apresenta resultados homogêneos na literatura consultada, se mostrando de difícil comparação entre os resultados encontrados neste estudo, visto que a produção do trauma ocorre de diferentes formas, assim como os tratamentos empregados, tempo de avaliação, doses e vias de administração. No entanto, percebe-se um crescente interesse na busca por estratégias terapêuticas que possam atuar de forma satisfatória após o trauma medular (HU *et al.*, 2010; AHUJA *et al.*, 2016).

Muitas pesquisas que envolvem a lesão medular não empregam qualquer analgesia pós-operatória, alegando a possibilidade de interferência destes agentes no modelo de pesquisa empregado. Nesse sentido, se mostra de suma importância o estudo acerca de possíveis interferências de analgésicos nos protocolos empregados, de forma a permitir a administração desses agentes, visando garantir a redução da dor ocasionada pelos procedimentos experimentais realizados.

7 CONCLUSÃO

Não foram encontrados resultados que sugerem melhora funcional com o uso da matriz de fibrina ou sua associação com o tramadol na fase aguda da lesão medular em ratos, sendo observado que o uso do tramadol no pós-operatório reduziu significativamente os indícios de dor nos animais, sugerindo que a modulação da dor confere uma maior funcionalidade do membro, além de garantir o bem-estar dos mesmos durante os procedimentos.

O histopatológico demonstrou que os grupos que utilizaram o tramadol apresentaram melhor preservação tecidual em comparação aos demais grupos estudados. Nesse sentido, mais estudos devem ser realizados com o intuito de confirmar a possível interferência desse agente nos protocolos de lesão medular, visto a necessidade regulamentada por lei de se garantir o menor estresse ou desconforto dos animais durante os procedimentos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, J. M. et. al. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. **Development**, v. 117, n. 1, p. 29-43, 1993.
- AGRAWAL, S. K.; FEHLINGS, M. G. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 545-552, 1996.
- AHUJA, C.S.; MARTIN, A.R.; FEHLINGS, M. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000 Res.*, v.5, 2016.
- ALAMDARI, D.H.; ASADI, M.; RAHIM, A.N.; MADDAAH, G.; AZIZI, S.; SHAHIDSALES, S.; MEHRABIBAHAR, M. Efficacy and Safety of Pleurodesis Using Platelet-Rich Plasma and Fibrin Glue in Management of Postoperative Chylothorax After Esophagectomy. **World Journal of Surgery**, v.42, p.1046–1055, 2018.
- ALBAYRAK, S. et. al. Effect of carnosine, methylprednisolone and their combined application on irisin levels in the plasma and brain of rats with acute spinal cord injury. **Neuropeptides**, v. 52, n. p. 47-54, 2015.
- ARAS, M. et. al. Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. **Injury**, v. 46, n. 8, p. 1471-1474, 2015.
- ARAÚJO, B. M. et. al. Estudo clínico e epidemiológico em cães com fraturas e luxações vertebrais toracolombares. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 8, p. 866-870, 2017.
- ARAÚJO, M. R. *Avaliação Histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos Wistar tratados com células-tronco mesenquimais*. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- ASGAR, J. et. al. The Role of TRPA1 in Muscle Pain and Mechanical Hypersensitivity under Inflammatory Conditions In Rats. **NeuroScience**, v310; p 206-215, 2015.
- AZBILL, R.D. et. al. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. **Brain Research**, v. 765, n. 2, p.283–290, 1997.
- BACKONJA, M. M.; STAECEY, B. Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. **The Journal of Pain**, v.5, n. 9, p.491–497, 2004.
- BAGLEY, R.S. et. al. Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v.21, n.12, p.1138-1144, 1999.
- BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Update on the treatment of spinal cord injury. **Progress in Brain Research**, v. 161, p. 217-33, 2007.

BARBOSA, R.A. **Efeitos neuroprotetor do extrato hidroetanólico de própolis vermelha após lesão de nervo ciático em ratos.** 2014.78 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Em Saúde E Ambiente. Universidade Tiradentes, Aracaju, 2014.

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

BARROS, A. G. C. **Avaliação do efeito da interleucina-6 e da eritropoetina na lesão medular em ratos.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ortopedia e Traumatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.5.2018.tde-15032018-093626

BASSO, M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 1995.

BATTAGLINO, R. A. et.al. Spinal Cord Injury-Induced Osteoporosis: Pathogenesis and Emerging Therapies. **Current Osteoporosis Reports**, v. 10, n. 4, p.278-285, 2012.

BAYER, A. et. al. The Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin-3 Is Induced by Platelet-Released Growth Factors in Primary Keratinocytes. **Mediators Inflamm**, 2017.

BEHRMANN, D. L.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S. Modeling of acute spinal cord injury in the rat: neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. **Experimental Neurology**, v. 126, n. 1, p. 61-75, 1994.

BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. **Veterinary Medicine**, v.95, n.11, p.846-849, 2000.

BERTOLINI, G.R.F.; KAKIHATA, C.M.M.; PERETTI, A.L.; BERNARDINO, G.R.; KARVAT, J.; SILVA, J.L.C.; BRANCAALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C. Effects of the platelet-rich fibrin associated with physical exercise in a model of median nerve compression. **Motriz: Revista de Educação Física**, v.23, n.4, 2017.

BI Y. et. al. Effect of Shikonin on Spinal Cord Injury in Rats Via Regulation of HMGB1/TLR4/NF-kB Signaling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p.481-491, 2017.

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

BOLAND, R.A.; LIN, C.S.; ENGEL, S.; KIERNAN, M.C. Adaptation of motor function after spinal cord injury: novel insights into spinal shock. **Brain**, v. 134, n. 2, p. 495-505, Fev, 2011.

BONATTO, F. A. **Múltipla aplicação de células mononucleares da medula óssea melhora a locomoção de ratos com lesão medular independente de expressão de citocinas inflamatórias.** 2013.81f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC-RS. Porto Alegre, 2013.

BOTELHO, V.R.; DANIEL, J.W.; BOULOSA, J.L.; COLLI, B.O.; FARIAS, R.D.E.L., MORAES, O.J.; PIMENTA, W.E.; RIBEIRO, C.H.; BORGES RIBEIRO, F.R.; TARICCO, M.A.; DE CARVALHO, M.V.; BERNARDO, W.M. Effectiveness of methylprednisolone in acute spinal cord injury – a systematic review of randomized controlled trials. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p.729-37, 2009.

BOWERS, C. A. KUNDU, B.; ROSENBLUTH, J.; HAWRYLUK, G.W.J. Patients with Spinal Cord Injuries Favor Administration of Methylprednisolone. **PLoS One**, v. 11, n.1, 2016.

BRACKEN, M. B. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: current status and future prospects. **Paraplegia**, v. 30, n. 2, p. 102-107, 1992.

BRAUGHLER, J. M.; HALL, E. D. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 3, p. 289-301, 1989.

BRITO, C. V. B.; SOARES, R. H. F. C.; BOTELHO, N. M. Analgesia de animais de laboratório: responsabilidade dos comitês de ética e obrigação dos pesquisadores. **Revista Bioética**, v. 24, n. 3, p.528-31, 2016.

BRUCE, J. H.; NORENBURG, M.D.; KRAYDIEH, S.; PUCKETT, W.; MARCILLO, A.; DIETRICH, D. Schwannosis: role of gliosis and proteoglycan in human spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 17, n. 9, p. 781-788, 2000.

BURDA, J.E.; SOFRONIEW, M.V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 229–248, 2014.

BURMA, N. E. et. al. Animal models of chronic pain: advances and challenges for clinical translation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 6, p.1242–1256, 2017.

CAMBRIDGE, A. J.; BAGLEY, R. S. Traumatismo espinal: evaluación clínica e tratamiento. **Waltham Focus**, London, v.7, n.3, p.20-26, 1997.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Three Rs Microsite**. Available at: <http://3rs.ccac.ca> Acesso em 16/10/2017.

CARBONE, L. Pain in laboratory animals: the ethical and regulatory imperatives. **PLoS One**, v. 6, 2011.

CELIK, F.; GÖÇMEZ, C.; KAMAS, K.; TUFEK, A.; GUZEL, A.; TOKGOZ, O.; FIRAT, U.; EVLIYAOGU, O. The comparison of neuroprotective effects of intrathecal dexmedetomidine and methylprednisolone in spinal cord injury. **International Journal of Surgery**, v. 11, n. 5, p. 414–18, 2013.

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

CHAMBERS, C.T.; MOGIL, J.S. Ontogeny and phylogeny of facial expression of pain. **Pain**, v. 156, p. 798–799, 2015.

CHIKUDA H.; YASUNAGA, H.; TAKESHITA, K.; HORIGUCHI, H.; KAWAGUCHI, H.; OHE, K.; FUSHIMI, K.; TANAKA, S. Mortality and morbidity after high-dose methylprednisolone treatment in patients with acute cervical spinal cord injury: a propensity-matched analysis using a nationwide administrative database. **Journal of Emergency Medicine**, v. 31, n. 3, p.201–6, 2014.

CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.; MOUHYI, J.; DOHAN, D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p.56-60, 2006.

CHOUKROUN, J.; ADDA, F.; SCHOEFFLER, C.; VERVELLE, A. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. **Implantodontie**, v.42, p.55-62, 2001.

CÍZKOVÁ, D.; ROSOCHA, J.; VANICKÝ, I.; JERGOVÁ, S.; CÍZEK, M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, p.1167-1180, 2006.

CLARK, R.A. Fibrin and wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.936, p.355-67, 2001.

CODD, E.E.; MARTINEZ, R.P.; MOLINO, L.; ROGERS, K.E.; STONE, D.J.; TALLARIDA, R.J. Tramadol and several anticonvulsants synergize in attenuating nerve injury-induced allodynia. **Pain**, v. 134, n. 3, p.254–62, 2008.

COMPENDIUM, E. M. **Tramadol hydrochloride.** 2015. Disponível em: < <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/24186/SPC#companyDetails> >.

CÔTÉ, P.; CASSIDY, J.D.; CARROLL, L.J.; KRISTMAN, V. The annual incidence and course of neck pain in the general population: A population-based cohort study. **Pain** 112, p. 267–273, 2004.

COUGHLAN, A.R. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, n. 3, p.117-22, 1993.

COX, J. J. et. al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**, v. 444, p. 894–898, 2006.

CRISTANTE, A. F.; DAMASCENO, M.L.; MARCON, R.M.; OLIVEIRA, R.P.; BARROS FILHO, T.E.P. Viability of fetal central Nervous System Cells in the treatment

of spinal cord injury in rats. **Acta Ortopedica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 284-290, 2010.

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

CROOK, R.J., DICKSON, K.; HANLON, R.T.; WALTERS, E.T. Nociceptive sensitization reduces predation risk. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 1121–1125, 2014.

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

DALLA-COSTA, E. MINERO, M.; LEBELT, D.; STUCKE, D.; CANALI, E.; LEACH, M.C. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. **PLoS One**, v.9, 2014

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals**. J. Murray, London, 1872.

DASARI, V. R.; VEERAVALLI, K. K.; DINH, D. H. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 120-33, Abril, 2014.

DE LA TORRE, J.C. Spinal cord injury models. **Progress in Neurobiology**, v. 22, n. 4, p. 289-344, 1984.

DE RANTERE, D. et. al. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental models. **European Journal of Pain**, v. 20, n. 3, p. 417- 426, 2016.

DEMERIAN, Y.; KOCAMAN, B.; AKMAN, R.Y. A comparison of the postoperative analgesic efficacy of single-dose epidural tramadol versus morphine in children. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, p. 510–513, 2005.

DITUNNO JR. et. al. Spinal shock revisited: a four-phase model. **Spinal Cord**, v. 42, n. 7, p. 383-95, Jul, 2004.

DITUNNO JR., J. F.; FORMAL, C. S. Chronic spinal cord injury. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 8, p. 550-6, Feb 24, 1994.

DO VALE-RAMOS, R. C.; ALEGRETE, N. The role of pharmacotherapy in modifying the neurological status of patients with spinal and spinal cord injuries. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 50, n. 6, p. 617-624, 2015.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I:

technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. 37-44, Mar, 2006.

DOHAN-EHRENFEST, D.M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 158-67, 2009.

DUGAN, E.A.; SHUMSKY, J. S. A combination therapy of neural and glial restricted precursor cells and chronic quipazine treatment paired with passive cycling promotes quipazine-induced stepping in adult spinalized rats. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 38 n. 6, P. 796-804, 2015.

DUSART, I.; SCHWAB, M. E. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v.6, n. 5, p.712-724, 1994.

EKMAN, P.; FRIESEN, W. The repertoire of nonverbal behavior: categories, origins, usage, and coding. **Semiotica**, v. 1, n. 1, p. 49-98, 1969.

FALAVIGNA, A. et. al. Experimental model of spinal cord injury (SCI) in rats: management guidelines. **Coluna/Columna**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 70-72, 2013.

FALLER, K.M. et. al. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 2, p. 164-172, 2015.

FAROOQUE, M.; HILLERED, L.; HOLTZ, A.; OLSSON, Y. Effects of methylprednisolone on extracellular lactic acidosis and amino acids after severe compression injury of rat spinal cord. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, n. 3, p. 1125-1130, 1996.

FAWCETT, J.W.; ASHER, R.A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Research Bulletin**, v. 49, n. 6, p. 377-391, 1999.

FEHLINGS, M.G. et. al. Riluzole for the treatment of acute traumatic spinal cord injury: Rationale for and design of the NACTN Phase I clinical trial. **Journal of Neurosurgery Spine**, v. 17, Suppl. 1, p. 151-156, 2012.

FIORAVANTI, C. et. al. Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. **Journal of Oral Implantology**. v. 8, n. 4, p.96-113, 2016.

FITZHARRIS, M.; CRIPPS, R.A.; LEE, B.B. Estimating the global incidence of traumatic spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 52, n. 2, p. 117-122, 2014.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1-11, 1984.

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

FÜHRMANN, T.; ANANDAKUMARAN, P.N.; SHOICHET, M.S. Combinatorial therapies after spinal cord injury: how can biomaterials help? **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 10, 1601130, 2017.

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

GARCIA-BARCINA, J.M.; MATUTE, C. AMPA-selective glutamate receptor subunits in glial cells of the adult bovine white matter. **Molecular Brain Research**, v. 53, n. 1-2, p. 270-276, 1998.

GEBRIN, A.S. et. al. Intervenções farmacológicas no trauma raquimedular: uma nova visão terapêutica. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 123-36, 1997a.

GEBRIN, A.S. et. al. Perspectivas de recuperação do lesado medular. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 32, n. 2, p. 103-8, 1997b.

GENTLEMAN, S.M.; NASH, M.J.; SWEETING, C.J.; GRAHAM, D.I.; ROBERTS, G.W. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. **Neuroscience Letters** v. 160, n. 2, p. 139-144, 1993.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; PICANCO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Research**, v. 1066, n. 1-2, p. 57-70, 2005.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; FREIRE, M.A.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; PERRY, V.H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 190, n. 2, p. 456-467, 2004.

GRAPHPAD PRISM versão 7.00, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com

GRASMUECK, S.; STEFFEN, F. Survival rates and outcomes in cats with thoracic and lumbar spinal cord injuries due to external trauma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 45, n. 6, p.284-288, 2004.

GREGORY, N.S. et. al. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **Journal of Pain**, v.14, n. 11, p. 1255–1269, 2013.

GROND, S.; SABLITZKI, A. Clinical pharmacology of tramadol. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 13, p. 879–923, 2004

GRUNAU, R. V. E.; Craig, K. D. Pain expression in neonates: facial action and cry. **Pain**, v. 28, n. 3, p. 395–410, 1987

GUILLEREY, C.; HUNTINGTON, N.D.; SMYTH, M.J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. **Nature Immunology**, v. 17, p. 1025-36, 2016.

GÜLŞEN, U.; ŞENTÜRK, M.F. Effect of platelet rich fibrin on edema and pain following third molar surgery: a split mouth control study. **BMC Oral Health**, v.17, p.79, 2017.

GULY, H.R.; [BOUAMRA, O.](#); [LECKY, F.E.](#) The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department. **Resuscitation**, v. 76, n. 1, p. 57-62, Jan, 2008.

GUVEN, M.; MERT, T; GUNAY, I. Effects of tramadol on nerve action potentials in rat: comparisons with benzocaine and lidocaine. **International Journal of Neuroscience**, v. 115, n.3, p. 339–349, 2005.

HAINS, B.C.; WAXMAN, S.G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 4308-4317, 2006.

HALL, E.D.; SPRINGER, J.E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. **NeuroRx**, v. 1, n.1, p. 80-100, 2004.

HARA, K.; MINAMI, K.; SATA, T. The effects of tramadol and its metabolite on glycine, gamma-aminobutyric acidA, and N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Anesthesia and analgesia**. v. 100, n. 5, p. 1400–5, 2005.

HE, J. et. al. Molecular Mechanism of MiR-136-5p Targeting NF-kappaB/ A20 in the IL-17-Mediated Inflammatory Response after Spinal Cord Injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 1224-1241, 2017

HEADLEY, P. M.; GRILLNER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 11, n. 5, p. 205-211, 1990.

HESTEHAVE, S.; MUNRO, G.; CHRISTENSEN, R.; PEDERSEN, T.B.; ARVASTSON, L.; HOUGAARD, P.; ABELSON, K.S.P. Is there a reasonable excuse for not providing post-operative analgesia when using animal models of peripheral neuropathic pain for research purposes? **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.

HOLDEN, E. CALVO, G.; COLLINS, M.; BELL, A.; REID, J.; SCOTT, E.M.; NOLAN, A.M. Evaluation of facial expression in acute pain in cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, n. 12, p. 615–621, 2014.

HOLTZ, A.; NYSTROM, B.; GERDIN, B. Effect of methylprednisolone on motor function and spinal cord blood flow after spinal cord compression in rats. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 82, n. 1, p. 68-73, 1990.

HU, R.; ZHOU, J.; LOU, C. *et al.* Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. **J. Neurosurg. Spine**, v.13, p.169-180, 2010.

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. Pathophysiology of spinal cord injury. In: _____. **Handbook of small animal spinal surgery**. London: Saunders, Cap.5, p.64-71, 1995.

JEON, Y.R.; KIM, M.J.; KIM, Y.O.; ROH, T.S.; LEE, W.J.; KANG, E.H.; YUN, I.S. Scaffold Free Bone Regeneration Using Platelet-Rich Fibrin in Calvarial Defect Model. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 29, n.1, 2018.

JOHNSON, R. T.; LIVERMAN, C.T.; ALTEVOGT, B.M.; JOY, J.E. **Spinal cord injury: progress, promise, and priorities**. National Academies Press, 2005.

KALSO, E.; EDWARDS, J.E.; MOORE, R.A.; MCQUAY, H.J. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 372–380, 2004.

KANEKO, K.; UMEHARA, M.; HOMAN, T.; OKAMOTO, K.; OKA, M.; OYAMA, T. The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. **Neuroscience letters**, v. 562, p. 28–33, 2014.

KATSUKI, R.; FUJITA, T.; KOGA, A.; LIU, T.; NAKATSUKA, T.; NAKASHIMA, M.; KUMAMOTO, E. Tramadol, but not its major metabolite (mono-O-demethyl tramadol) depresses compound action potentials in frog sciatic nerves. **British journal of pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 319–27, 2006.

KAWANO, T.; TAKAHASHI, T.; IWATA, H.; MORIKAWA, A.; IMORI, S.; WAKI, S.; TAMURA, T.; YAMAZAKI, F.; EGUCHI, S.; KUMAGAI, N.; YOKOYAMA, M. Effects of ketoprofen for prevention of postoperative cognitive dysfunction in aged rats. **Journal of Anesthesia**, v. 28, n. 6, p. 932–936, 2014.

KHORSHIDI, H.; RAOOFI, S.; BAGHERI, R.; BANIHASHEMI, H. Comparison of the mechanical properties of early leukocyte- and platelet-rich fibrin versus PRGF/ endoret membranes. **International Journal of Dentistry**, v. 2016, 2016.

KIM, Y.H.; HA, K.Y.; KIM, S.I. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. **Clinics in Orthopedic Surgery**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2017.

KIM, Y.T.; CALDWELL, J. M.; BELLAMKONDA, R.V. Nanoparticle-mediated local delivery of methylprednisolone after spinal cord injury. **Biomaterials**. v. 30, n. 13, p. 2582–2590, 2009.

KIMURA, M.; OBATA, M.; SAITO, S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. **Anesthesia and analgesia**, v. 115, n. 2, p. 443–9, 2012.

KLINCK, M.P.; MOGIL, J.S.; MOREAU, M.; LASCELLES, B.D.X.; FLECKNELL, P.A.; POITTE, T.; TRONCY, E. Translational pain assessment: could natural animal models be the missing link? **Pain**, v. 158, n. 9, p.1633-46, 2017.

KOBAYASHI, E.; FLÜCKIGER, L.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; SAWADA, K.; SCULEAN, A.; SCHALLER, B.; MIRON, R.J. Comparative release of growth factors from

PRP, PRF, and advanced-PRF. **Journal Clinical Oral Investigations** , v. 20, n. 9, p.2353-2360, 2016 doi:10.1007/s00784-016-1719-1

KOU, D. LI, T.; LIU, H.; LIU, C.; YIN, Y.; WU, X.; YU, T. Transplantation of rat-derived microglial cells promotes functional recovery in a rat model of spinal cord injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 10, 2018.

KRAUS, K.H. Medical management of acute spinal cord disease. In: Kirk, R.W. (Org.). Current veterinary therapy XIII: **Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders; p. 186-90, 2000.

KUMAR, K. R.; GENMORGAN, K.; ABDUL RAHMAN, S.M.; RAJAN, M.A.; KUMAR, T.A.; PRASAD, V.S. Prasad VS. Role of plasma-rich fibrin in oral surgery. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 8, (Suppl 1), S36-8, 2016.

KWON, B.K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J.N.; BEINER, J.; VACCARO, A.R. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. **Spine Journal**, v. 4, n. 4, p. 451-464, 2004.

LANGFORD, D.J.; BAILEY, A.L.; CHANDA, M.L.; CLARKE, S.E.; DRUMMOND, T.E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M.L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R.E.; SOTOCINAL, S.G.; TABAKA, J.M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.M.; FERRARI, M.D.; CRAIG, K.D.; MOGIL, J.S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447-9, 2010.

LEACH, M.C.; KLAUS, K.; MILLER, A.L.; SCOTTO DI PERROTOLO, M.; SOTOCINAL, S.G.; FLECKNELL, P.A. The assessment of postvasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. **PLoS One**, v. 7, n. 4, 2012.

LEE, B. H.; LEE, K.H.; KIM, U.J.; YOON, D.H.; SOHN, J.H.; CHOI, S.S.; YI, I.G.; PARK, Y.G. Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain. **Brain Research**, v. 1020, n. 1-2, p. 37-44, 2004.

LI, G. L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M.; FUNA, K.; HOLTZ, A.; WANG, W.L.; OLSSON, Y. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 55, n. 3, p. 280-289, 1996.

LI, H.; HAM, T.R.; NEILL, N.; FARRAG, M.; MOHRMAN, A.E.; KOENIG, A.M.; LEIPZIG, N.D. A hydrogel bridge incorporating immobilized growth factors and neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury. **Advanced healthcare materials**, v. 5, n. 7, p. 802-812, 2016.

LI, X.; LIU, S.; ZHAO, Y.; LI, J.; DING, W.; HAN, S.; CHEN, B.; XIAO, Z.; DAI, J. Training neural stem cells on functional collagen scaffolds for severe spinal cord injury repair. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 32, p. 5835-5847, 2016.

LI, Y.; HU, H.; LIU, J.; ZHU, Q.; GU, R. Effects of aquaporin 4 and inward rectifier potassium channel 4.1 on medullospinal edema after methylprednisolone treatment to suppress acute spinal cord injury in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.33, n.2, p.175-184, 2018.

LIAO, B.; ZHANG, Y.; SUN, H.; MA, B.; QIAN, J. Ryanodine receptor 2 plays a critical role in spinal cord injury via induction of oxidative stress. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 1129-1137, 2016.

LIU, D.; JIANG, T.; CAI, WEIHUA.; CHEN, J.; ZHANG, H.; HIETALA, S.; SANTOS, H.A.; YIN, G.; FAN, J. An in situ gelling drug delivery system for improved recovery after spinal cord injury. **Advanced healthcare materials**, v. 5, n. 12, p. 1513-1521, 2016.

MARQUES, S.A.; GARCEZ, V.F.; DEL BEL, E.A.; MARTINEZ, A.M. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. **Journal of neuroscience methods**, v. 177, n. 1, p. 183-193, 2009.

MARQUI, A.C.; MIGUEL, D.F.; MAGALHÃES, J.C.A. Comparação Entre a Técnica Plasma Rico em Plaquetas e Plasma Rico em Fibrina e sua Utilização em Odontologia. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 13, n. 2 p. 268-276., 2017.

MARTINI, A. C. **Lipoxina A4 na dor neuropática após a lesão medular: modulação da neuroinflamação e ativação microglial**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEORGEFF, K.R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MATSUMIYA, L. C.; SORGE, R.E.; SOTOCINAL, S.G.; TABAKA, J.M.; WIESKOPF, J.S.; ZALOUM, A.; KING, O.D.; MOGIL, J.S. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. **Journal of the american association for laboratory animal science**, v. 51, n. 1, p. 42-49, 2012.

MATUTE, C.; ALBERDI, E.; DOMERCQ, M.; PÉREZ-CERDÁ, F.; PÉREZ-SAMARTÍN, A.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 224-230, 2001.

MCDONALD, J. W.; SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. **Lancet**, v. 359, n. 9304, p. 417-25, Feb 2, 2002.

MCTIGUE, D. M. Potential Therapeutic Targets for PPAR γ after Spinal Cord Injury. **PPAR research**, v. 2008, 2008.

MELO, F. R. **Avaliação do potencial neural de células-tronco mesenquimais dermais humanas: estudo in vitro e in vivo em modelo de lesão medular traumática em ratos**.

2014. 97 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MINAMI, K.; SUDO, Y.; MIYANO, K.; MURPHY, R.S.; UEZONO, Y. μ -Opioid receptor activation by tramadol and O-desmethyltramadol (M1). **Journal of anesthesia**, v. 29, n. 3, p. 475-479, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas e Departamento de Atenção Especializada. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 68 p.

MIRON, R. J.; ZUCHELLI, G.; PIKOS, M.A.; SALAMA, M.; LEE, S.; GUILLEMETTE, V.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; BISHARA, M.; ZHANG, Y.; WANG, H.L.; CHANDAD, F.; NACOPOULOS, C.; SIMONPIERI, A.; AALAM, A.A.; FELICE, P.; SAMMARTINO, G.; GHANAATI, S.; HERNANDEZ, M.A.; CHOUKROUN, J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 6, p. 1913-1927, 2017.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 4, p. 283, 2009.

MOGIL, J. S.; DAVIS, K. D.; DERBYSHIRE, S. W. The necessity of animal models in pain research. **Pain**, v. 151, n. 1, p. 12-17, 2010.

MOSESSON, M. W.; SIEBENLIST, K. R.; MEH, D. A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, n. 1, p. 11-30, 2001.

MUNRO, G.; JANSEN-OLESEN, I.; OLESEN, J. Animal models of pain and migraine in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 22, n. 7, p. 1103-1111, 2017.

NAGAKANNAN, P.; SHIVASHARAN, B.D.; THIPPESWAMY, B.S.; VEERAPUR, V.P. Effect of tramadol on behavioral alterations and lipid peroxidation after transient forebrain ischemia in rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n.9, p. 674–678, 2012.

NAGOSHI, N.; NAKASHIMA, H.; FEHLINGS, M. Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: from bench to bedside. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7775-7789, 2015.

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

NASIRINEZHAD, F.; GAJAVELLI, S.; PRIDDY, B.; JERGOVA, S.; ZADINA, J.; SAGEN, J. Viral vectors encoding endomorphins and serine histogranin attenuate neuropathic pain symptoms after spinal cord injury in rats. **Molecular pain**, v. 11, n. 1, p. 2, 2015.

NEOGI, T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 9, p. 1145-1153, 2013.

NORENBERG, M. D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n.4, p.429-40, 2004.

NOUT, Y. S.; ROSENZWEIG, E.S.; BROCK, J.H.; STRAND, S.C.; MOSEANKO, R.; HAWBECKER, S.; ZDUNOWSKI, S.; NIELSON, J.L.; ROY, R.R.; COURTINE, G.; FERGUSON, A.R.; EDGERTON, V.R.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C.; TUSZYNSKI, M.H. Animal models of neurologic disorders: a nonhuman primate model of spinal cord injury. **Neurotherapeutics**, v. 9, n. 2, p. 380-392, 2012.

NUNES, D.; MORAIS, C. R.; FERREIRA, C. G. Fisiopatologia da lesão medular: uma revisão sobre os aspectos evolutivos da doença. **Revista GeTeC**, v. 6, n. 13, 2017.

OLBY, N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 13, n. 5, p. 399-407, 1999.

OLIVEIRA, D. M. M. C. Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do tramadol nos modelos de osteoartrite e artrite reativa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 105 f., 2017.

ÖNCÜ, E.; BAYRAM, B.; KANTARCI, A.; GÜLSEVER, S.; ALAADDINOĞLU, E.E. Positive effect of platelet rich fibrin on osseointegration. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal** v. 21, n. 5, p.601-607, 2016.

PAN, J. Y.; CAI, R.X.; CHEN, Y.; LI, Y.; LIN, W.W.; WU, J.; WANG, X.D. Analysis the effect of hyperbaric oxygen preconditioning on neuronal apoptosis, Ca²⁺ concentration and caspases expression after spinal cord injury in rats. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 11, p. 3467-3473, 2018.

PEHRSON, R.; STENMAN, E.; ANDERSSON, K. Effects of tramadol on rat detrusor overactivity induced by experimental cerebral infarction. **European urology**, v. 44, n. 4, p. 495-499, 2003.

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

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

PENHA, N.E.A. **Efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato de gergelim (Sesamum indicum L.) em um modelo experimental de lesão aguda da medula**

espinhal de ratos. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. Universidade Federal do Pará, Belém, 93 f., 2016.

PHILIPS, B. H.; WEISSHAAR, C. L.; WINKELSTEIN, B. A. Use of the rat grimace scale to evaluate neuropathic pain in a model of cervical radiculopathy. **Comparative medicine**, v. 67, n. 1, p. 34-42, 2017.

PLESH, O.; CURTIS, D.; LEVINE, J.; MCCALL, W.D.JR. Amitriptyline treatment of chronic pain in patients with temporomandibular disorders. **Journal of oral rehabilitation**, v. 27, n. 10, p. 834-841, 2000.

PRATT, E. S.; GREEN, DANIEL A.; SPENGLER, D. M. Herniated intervertebral discs associated with unstable spinal injuries. **Spine**, v. 15, n. 7, p. 662-666, 1990.

RAFFA, R. B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W.; SHANK, R.P.; CODD, E.E.; VAUGHT, J.L. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 260, n. 1, p. 275-285, 1992.

RAMER, L. M.; RAMER, M. S.; BRADBURY, E. J. Restoring function after spinal cord injury: towards clinical translation of experimental strategies. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 12, p. 1241-1256, 2014.

RODEO, S. A. Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. **Journal of shoulder and elbow surgery**, v. 16, n. 5, p. S191-S197, 2007.

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

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

ROMAN, J.A.; REUCROFT, I.; MARTIN, R.A.; HURTADO, A.; MAO, H.Q. Local release of paclitaxel from aligned, electrospun microfibers promotes axonal extension. **Advanced healthcare materials**, v. 5, n. 20, p. 2628-2635, 2016.

ROPPER, A.E.; THAKOR, D.K.; HAN, I.; YU, D.; ZENG, X.; ANDERSON, J.E.; ALJUBOORI, Z.; KIM, S.W.; WANG, H.; SIDMAN, R.L.; ZAFONTE, R.D.; TENG, Y.D. Defining recovery neurobiology of injured spinal cord by synthetic matrix-assisted hMSC implantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 5, p. E820-E829, 2017.

ROSA-BALLABEN, N. M. **Trauma raquimedular: avaliação do potencial neuroregenerador e neuroprotetor da fração proteica extraída do látex.** Tese de

Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, SP, 2018.

ROUGHAN, J.V.; COULTER, C.A.; FLECKNELL, P.A.; THOMAS, H.D.; SUFKA, K.J. The conditioned place preference test for assessing welfare consequences and potential refinements in a mouse bladder cancer model. **PloS one**, v. 9, n. 8, 2014.

ROWLAND, J.W.; GREGORY, W.J.; HAWRYLUK, M.D.; BRIAN KWON, M.D.; MICHAEL G. F. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. **Neurosurgical focus**, v. 25, n. 5, p. E2, 2008.

SAKAI, K.; YAMAMOTO, A.; MATSUBARA, K.; NAKAMURA, S.; NARUSE, M.; YAMAGATA, M.; SAKAMOTO, K.; TAUCHI, R.; WAKAO, N.; IMAGAMA, S.; HIBI, H.; KADOMATSU, K.; ISHIGURO; SÁMANO, C.; KAUR, J.; NISTRİ, A. A study of methylprednisolone neuroprotection against acute injury to the rat spinal cord in vitro. **Neuroscience**. 2016;315:136-49, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.003>.

SÁMANO, C.; KAUR, J.; NISTRİ, A. A study of methylprednisolone neuroprotection against acute injury to the rat spinal cord in vitro. **Neuroscience**, v. 315, p. 136-149, 2016.

SANTOS, A.C.M.; AKKARI, A.C.S.; FERREIRA, I.R.S.; MARUYAMA, C.R.; PASCOLI, M.; GUILHERME, V.A.; DE PAULA, E.; FRACETO, L.F.; DE LIMA, R.; MELO, P.S.; DE ARAUJO, D.R. Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in vitro toxicity, and pharmacological evaluation. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 2391, 2015.

SCHENCK, E. G.; AREND, I. The effect of tramadol in an open clinical trial (author's transl). **Arzneimittel-Forschung**, v. 28, n. 1a, p. 209-212, 1978.

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M. E.; PERRY, V. H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 3648-3658, 1999.

SCHWAB, M. E.; BARTHOLDI, D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. **Physiological Reviews**, v. 76, n. 2, p. 319-370, 1996.

SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M. G. Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole. **Progress in Brain Research**, v. 137, p. 177-90, 2002.

SHINOZAKIA, M.; IWANAMIB, A.; FUJIYOSHIB, K.; TASHIRO, S.; KITAMURA, K.; SHIBATA, S.; FUJITA, H.; NAKAMURA, M.; OKANO, H. Combined treatment with chondroitinase ABC and treadmill rehabilitation for chronic severe spinal cord injury in adult rats. **Neuroscience Research**, v.113, p.37- 47, 2016.

SHIRAIISHI, M.; MINAMI, K.; UEZONO, Y.; YANAGIHARA, N.; SHIGEMATSU, A.; SHIBUYA I. Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in adrenal chromaffin cells and in *Xenopus* oocytes expressing $\alpha 7$ receptors. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 207-216, 2002.

SHORT, D.J.; EL MASRY, W.S.; JONES, P.W. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury—a systematic review from a clinical perspective. **Spinal cord**, v. 38, n. 5, p. 273, 2000.

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

SILVA, G. S.; VALIENTE, R. A. Spinal cord infarct as the primary presentation of aortic dissection. **Spine Journal**, v. 14, n. 11, p. 2787-2788, 2014.

SLATTER, D. H. (Ed.). Pathogenesis Pathogenesis of diseases of the central nervous system. **Textbook of small animal surgery**. Elsevier health sciences, 2003.

SMITH, K. J.; McDONALD, W. I. The pathophysiology of multiple sclerosis: The mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v.354, p.1649-1658, 1999.

SNEDECOR, S.J.; SUDHARSHAN, L.; CAPPELLERI, J.C.; SADOSKY, A.; DESAI, P.; JALUNDHWALA, Y.J.; BOTTEMAN, M. Systematic review and comparison of pharmacologic therapies for neuropathic pain associated with spinal cord injury. **Journal of pain research**, v. 6, p. 539, 2013.

SOTOCINAL, S.G.; SORGE, R.E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A.H.; MARTIN, L.J.; WIESKOPF, J.S.; MAPPLEBECK, J.C.; WEI, P.; ZHAN, S.; ZHANG, S.; MCDUGALL, J.J.; KING, O.D.; MOGIL, J.S. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular pain*, v. 7, n. 1, p. 55, 2011.

SOUZA, C.C. **Efeitos do transplante autólogo de células monocelulares da medula óssea após lesão incompleta da medula espinhal de ratos adultos**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular. Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 73 f., 2017.

SRINIVAS, B.; DAS, P.; RANA, M.M.; QURESHI, A.Q.; VAIDYA, K.C.; AHMED RAZIUDDIN, S.J. Wound healing and bone regeneration in postextraction sockets with and without platelet-rich fibrin. **Annals of Maxillofacial Surgery**, v.8, p.28-34, 2018.

STASIAK, K.L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P.W.; VANDEWOUDE, S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 13-20, 2003.

STOKES, E. L.; FLECKNELL, P. A.; RICHARDSON, C. A. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. **Laboratory animals**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2009.

SU, Y. F.; LIN, C. L.; LEE, K. S.; TSAI, T. H.; WU, S. C.; HWANG, S. L.; CHEN, S. C. e KWAN, A. L. A modified compression model of spinal cord injury in rats: functional

assessment and the expression of nitric oxide synthases. **Spinal Cord**, v. 53, n. 6, p. 432-435, 2015.

SZKUTNIK-FIEDLER, D; BALCERKIEWICZ, M.; SAWICKI, W.; GRABOWSKI, T.Z.; GRZEÅKOWIAK, MAZGALSKI, J.E.; URJASZ, H. In vitro—in vivo evaluation of a new oral dosage form of tramadol hydrochloride—controlled-release capsules filled with coated pellets. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, vol. 71, n. 3, p. 469–475, 2014.

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

TANAKA, H.; NAITO, T.; MINO, Y; KAWAKAMI, J. Validated determination method of tramadol and its desmethylates in human plasma using an isocratic LC-MS/MS and its clinical application to patients with cancer pain or non-cancer pain. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences**, vol. 2, no. 1, 2016.

TAPPE-THEODOR, A; KUNER, R. Studying ongoing and spontaneous pain in rodents—challenges and opportunities. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 11, p. 1881-1890, 2014.

THAKUR, M.; DICKENSON, A. H.; BARON, R. Osteoarthritis pain: nociceptive or neuropathic? **Nature reviews rheumatology**, v. 10, n. 6, p. 374, 2014.

TOFFLER, M.; TOSCANO, N.; HOLTZCLAW, D.; CORSO, M.; DOHAN, D. Introducing Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu. **Journal of Implant and Advanced Clinical Dentistry**, v. 1, n. 6, p. 21-30, 2009.

TSAY, R.C.; VO, J.; BURKE, A.; EISIG, S.B.; LU, H.H.; LANDESBERG, R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 63, n. 4, p. 521-528, 2005.

VARMA, A.K.; DAS, A.; WALLACE, G.; BARRY, J.; VERTEGEL, A.A.; RAY, S.K.; BANIK, N.L. Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers. **Neurochemical research**, v. 38, n. 5, p. 895-905, 2013.

VAWDA, R.; FEHLINGS, M. G. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 25-38, Jan 2013.

VITELLARO-ZUCCARELLO, L.; MAZZETTI, S.; MADASCHI, L.; BOSISIO, P.; GORIO, A.; DE BIASI, S. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 865-877, 2007.

WAITE, M. E.; TOMKOVICH, A.; QUINN, T.L.; SCHUMANN, A.P.; DEWBERRY, L.S.; TOTSCH, S.K.; SORGE, R.E. Efficacy of common analgesics for postsurgical pain in rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 420-425, 2015.

- WILEMS, T. S.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. Sustained dual drug delivery of anti-inhibitory molecules for treatment of spinal cord injury. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p. 103-111, 2015.
- WILLIAMS, A. C. C. Facial expression of pain: an evolutionary account. **Behavioral and brain sciences**, v. 25, n. 4, p. 439-455, 2002.
- WILLIAMSON, A.; HOGGART, B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. **Journal of clinical nursing**, v. 14, n. 7, p. 798-804, 2005.
- WILSON, J. R.; FEHLINGS, M. G. Riluzole for acute traumatic spinal cord injury: a promising neuroprotective treatment strategy. **World neurosurgery**, v. 81, n. 5-6, p. 825-829, 2014.
- WONG, C.C.; KUO, T.F.; YANG, T.L.; TSUANG, Y.H.; LIN, M.F.; CHANG, C.H.; LIN, Y.H.; CHAN, W. P. Platelet-Rich Fibrin Facilitates Rabbit Meniscal Repair by Promoting Meniscocytes Proliferation, Migration, and Extracellular Matrix Synthesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.1722, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-sixth report. n. 991, p. 1-50, back cover, 2015.
- XIAN-HUI, D.; XIAO-PING, H.; WEI-JUAN, G. Neuroprotective effects of the Buyang Huanwu decoction on functional recovery in rats following spinal cord injury. **The journal of spinal cord medicine**, v. 39, n. 1, p. 85-92, 2016.
- XIONG, Y.; RABCHEVSKY, A. G.; HALL, E. D. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. **Journal of neurochemistry**, v. 100, n. 3, p. 639-649, 2007.
- XU, G.Y.; HUGHES, M.G.; ZHANG, L.; CAIN, L.; MCADOO, D.J. Administration of glutamate into the spinal cord at extracellular concentrations reached post-injury causes functional impairments. **Neuroscience letters**, v. 384, n. 3, p. 271-276, 2005.
- XU, J.; QU, Z.X.; HOGAN, E.L.; PEROT, P.L., JR. Protective effect of methylprednisolone on vascular injury in rat spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 9, n. 3, p. 245-253, 1992.
- XU, X.; LI, N.; ZHU, L.; ZHOU, Y.; CHENG, H. Beneficial effects of local profound hypothermia and the possible mechanism after experimental spinal cord injury in rats. **The journal of spinal cord medicine**, v. 39, n. 2, p. 220-228, 2016.
- YAMASAKI, H.; FUNAI, Y.; FUNAO, T.; MORI, T.; NISHIKAWA, K. Effects of tramadol on substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord: an in vivo patch-clamp analysis. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0125147, 2015.
- YANG, H.; LIU, C.C.; WANG, C.Y.; ZHANG, Q.; AN, J.; ZHANG, L.; HAO, D.J. Therapeutical strategies for spinal cord injury and a promising autologous astrocyte-based therapy using efficient reprogramming techniques. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 5, p. 2826-2842, 2016.

ZHANG, D.; MA, G.; HOU, M.; ZHANG, T.; CHEN, L.; ZHAO, C. The neuroprotective effect of puerarin in acute spinal cord injury rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 1152-1164, 2016.

ZHANG, S.; ANDERSON, M.A.; AO, Y.; KHAKH, B.S.; FAN, J.; DEMING, T.J.; SOFRONIEW, M.V. Tunable diblock copolypeptide hydrogel depots for local delivery of hydrophobic molecules in healthy and injured central nervous system. **Biomaterials**, v. 35, n. 6, p. 1989-2000, 2014.

ZHOU, X.; HE, X.; REN, Y. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. **Neural regeneration research**, v. 9, n. 20, p. 1787, 2014.

ANEXO 1

Acta Cir Bras. 2018;33(12):1087-1094

Influence of tramadol on functional recovery of acute spinal cord injury in rats¹

Rosa Helena de Figueiredo Chaves^I, Celice Cordeiro de Souza^{II}, Ismari Perini Furlaneto^{III}, Renan Kleber Costa Teixeira^{IV}, Carolina Pinheiro de Oliveira^V, Emanuelle de Matos Rodrigues^V, Daniel Arthur Santos dos Santos^V, Renata Cunha Silva^{VI}, Nelson Elias Abrahão da Penha^{VII}, Ana Rita de Lima^{VIII}

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Health and Animal Production in Amazon, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belem-PA, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; interpretation of data; manuscript writing.

^{II}PhD, Professor Associate, School of Medicine, Centro Universitário do Estado do Pará (CESUPA), Belem-PA, Brazil. Acquisition and interpretation data, manuscript writing.

^{III}Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Parasitic Biology at Amazon, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belem-PA, Brazil. Interpretation of data.

^{IV}MD, MS, Department of Experimental Surgery, School of Medicine, Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belem-PA, Brazil. Interpretation of data, statistical analysis, manuscript writing.

^VGraduate student, School of Medicine, CESUPA, Belem-PA, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^{VI}Graduate student, School of Occupational Therapy, UEPA, Belem-PA, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^{VII}PhD, Professor Associate, School of Medicine, CESUPA, Belem-PA, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; critical revision; final approval.

^{VIII}PhD, Full Professor, Institute of Health and Animal Production, UFRA, Belem-PA, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; critical revision, final approval.

Abstract

Purpose: To evaluate the influence tramadol on functional recovery of acute spinal cord injury in rats.

Methods: Ten rats were divided into two groups (n = 5). All animals were submitted by a laminectomy and spinal cord injury at eighth thoracic vertebra. In control group, the rats didn't receive any analgesic. In tramadol group, the rats received tramadol 4mg/Kg at 12/12h until 5 days by subcutaneous. Animals were following by fourteen days. Was evaluated the Basso, Beattie, Bresnahan scale (locomotor evaluation) and Rat Grimace Scale (pain evaluation) at four periods.

Results: There no difference between the groups in locomotor evaluation in all periods evaluated ($p>0.05$) and in both groups there was a partial recover of function. The tramadol group show a lower pain levels at the first, third and seventh postoperatively days when comparing to the control group.

Conclusion: The tramadol as an analgesic agent don't influence on functional recovery of acute spinal cord injury in rats

Key words: Neuralgia. Pain. Analgesics. Rats.

Introduction

Medullar injury is a dramatic event that interference on normal brain function, such as sensory, motor and autonomic functions, and subsequently affects the patient's physical, psychological and social well-being^{1,2}. Traumatic spinal cord injury leads not only to motor impairment but also to central chronic pain, making this lesion difficult to treat^{3,4}. Chronic compression caused by trauma and subsequent fibrosis may result in loss of motor neurons in the anterior horn⁵, but the detailed mechanism of this type of neuronal loss is not fully understood⁶.

Despite the surgical and pharmacological resources available, it is not possible to totally reverse the neurological damage after trauma⁷. Surgical therapy is restricted to spinal cord decompression, fragments removal, and spinal stabilization⁸. In drug therapy, studies indicate that medullary lesions can be minimized by drugs, provided they are administered in a short time after the trauma⁹.

The use of experimental models has improved the knowledge of the pathophysiology of these lesions, providing new opportunities for therapeutic strategies *in vivo*¹⁰, using methods of reproduction of acute and chronic spinal cord injury in small rodents, mainly rats¹¹.

Studies involving neurological injury have become increasingly widespread and frequent in the scientific field, but the precaution and care with the analgesia of the experimental models have not followed the development of the projects, not being noted the adequate application of postoperative analgesic protocol level to the intensity of pain and discomfort caused^{12,13}.

Tramadol hydrochloride is a clinically effective analgesic widely used in acute and chronic pain conditions, such as neuropathic pain, cancer and postoperative. It acts as a μ -opioid agonist, but also has a variety of other properties that may contribute to its analgesic effect, including inhibition of serotonin and norepinephrine^{14,15}.

Some studies mention the use of opioids for pain control after the neuropathic injury procedure¹². However, there is resistance in the use due to the possibility that these medications may influence the results of the study. Thus, this study proposes to evaluate the effect of tramadol on the functional recovery after injury of the acute spinal cord in rats.

Methods

This research followed the rules of the Brazilian Law for Animal Care (Law: 11.794/08) and ARRIVE guideline; and it was approved by the Animal Use and Care Committee at the Centro Universitário do Pará, Protocol N° 06/17.

Ten Wistar male rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 250-350 grams and aging between 90-120 days provided from the Animal Colony of the Instituto Evandro Chagas were used. The animals were kept in a vivarium of the Experimental Surgery Laboratory at the Pará State University (Brazil) with a controlled environment with a 12h light and 12h dark cycle. Water and food were provided *ad libitum*. They were randomly divided into two groups (n = 5):

Control Group: Animals' submitted to laminectomy, without analgesic protocol.

Tramadol Group: Animals' submitted to laminectomy, treat with tramadol as analgesic.

All surgical procedures were performed in anesthesia (ketamine 60mg/Kg, xylazine 8 mg/kg and fentanyl 0.03mg/Kg, intraperitoneal). Fentanyl was repeat for each 30 minutes until the end of the surgery. All animals underwent the same surgical procedure, with the two groups

differing only in the analgesic protocol used, the surgical procedures were performed by the same researcher. The rats were placed in a horizontal ventral position, then was shaved the thoracic region. Antisepsis was performed with Povidone-iodine.

Microsurgical procedures were performed under a DFVasconcelos[®] microscope with 40× magnification. A 3-cm incision was performed in the thoraco-lumbar region above the column. The paravertebral muscles were dissected and then the eighth thoracic vertebra was identified. The spinal cord was exposed through a laminectomy of the eighth thoracic vertebra with a precision surgical pliers. The spinal cord injury was performed with a Scalpel blade N°12. Was performed a complete right hemisection, based on posterior spinal vein, with total depth. The procedure ended with the suture of muscles with 5-0 nylon and skin using 4-0 nylon.

The animals were followed up by 14 days postoperatively. In both groups, enrofloxacin was administrated by subcutaneous at 10mg/Kg once a day until 7 days and lidocaine topical was used in the incision at 12/12h until 5 days. On Tramadol group, the animals received tramadol hydrochloride 4mg/Kg at 12/12h until 5 days by subcutaneous. It was not necessary to perform the bladder massage. The animals were housed in isolated cages after the procedure to avoid injuries and pressure ulcers.

The parameters analyzed were Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale¹⁶ and Rat Grimace Scale¹⁷. Both scales were performed at first, third, seventh and fourth quarter postoperatively days. The BBB scale¹⁶ is a locomotor evaluation performed by the filming of the motricity of each rat during five minutes, three times at least. This test was performed along a 50×20 cm open field cage, lined with ethylene vinyl acetate to avoid slip action, by only a trained researcher. The BBB scale ranging from 0 – No observable movement of the hindlimbs to 21 - Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent movement of the toes; paw position is predominantly parallel to the body during the whole support stage; consistent trunk stability; consistent tail elevation.

The rat grimace scale¹⁷ consists of four facial "action units" (orbital tightening; nose/cheek flattening; ear changes; and whisker change) scored on a 0-2 scale for their prominence in still photographs taken from digital video of mice in either a baseline or pain condition. For the time-course study, 120 images were collected from 10 rats at each of the 4 time points (24 hour, 3, 7 and 14 days) and were analyzed by an experienced blinded observer.

The software BioEstat[®] 5.3 was used. All data were expressed as means ±standard deviation. Student's t test was used to compare two groups in both scales (intergroup comparisons). The Kruskal-Wallis test, followed by Dunn post hoc test correction when

necessary, was used to comparing the intragroup evolution. The Pearson's correlation test was used to determine the association between BBB scale and rat grimace scale. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$.

Results

All animals survived during the study period. Table 1 presents the mean and standard error of mean BBB and rat grimace scales. Regarding the BBB scale (Figure 1), in the control group at the 14th postoperatively days the animals have a better score than the first and third postoperatively days ($p < 0.05$). The same result was identified on tramadol group. There were no significant differences between the groups at the four analyzed periods ($p > 0.05$).

Table 1 – Mean scores of BBB and rat grimace scales according groups.

Parameter	Postoperatively day			
	First	Third	Seventh	Fourth quarter
<i>BBB scale</i>				
Control group	2.00 ±1.87	5.20 ±2.77	7.40 ±5.32	12.20 ±3.70
Tramadol group	1.80 ±3.03	6.00 ±4.47	10.00 ±6.16	13.00 ±3.39
<i>Rat grimace scale</i>				
Control group	1.13 ±0.08	1.06 ±0.10	0.60 ±0.10	0.25 ±0.11
Tramadol group	0.37 ±0.32	0.20 ±0.21	0.16 ±0.13	0.14 ±0.12

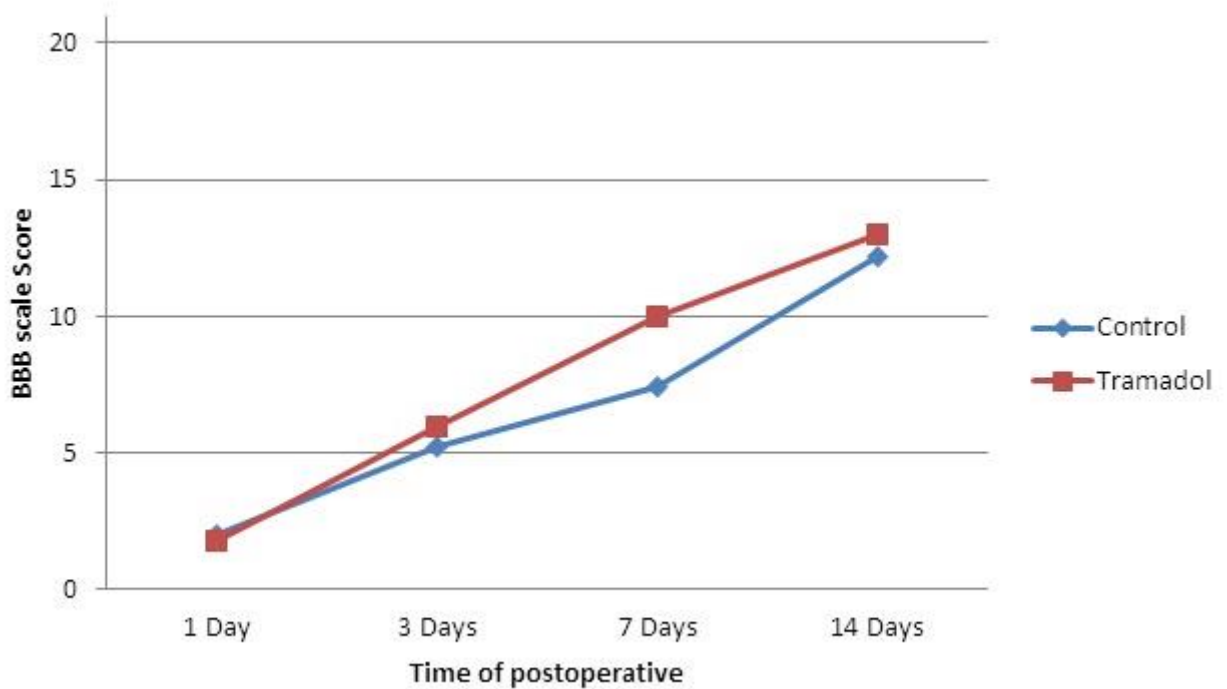


Figure 1 – Evolution of score of Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale according each group.

Regarding the rat grimace scale (Figure 2), there were no significant differences in the tramadol group at the four analyzed periods ($p > 0.05$). In control group, in the first and third postoperatively days have a higher pain level than the 14th postoperatively days ($p < 0.0001$). There were no significant differences between the groups at the 14th postoperatively days ($p > 0.05$), however at the first, third and seventh postoperatively days the tramadol group show a lower score the control group ($p < 0.0001$).

Correlation analysis showed intense negative correlation between the BBB scale and rat grimace scale in control group [$r(\text{Pearson})$: -0,78 IC (95%) -0,53 – -0,91; $p < 0.0001$] and a great negative correlation between the BBB scale and rat grimace scale in tramadol group [$r(\text{Pearson})$: -0,51 IC (95%) -0,02 – -0,80; $p = 0.04$]

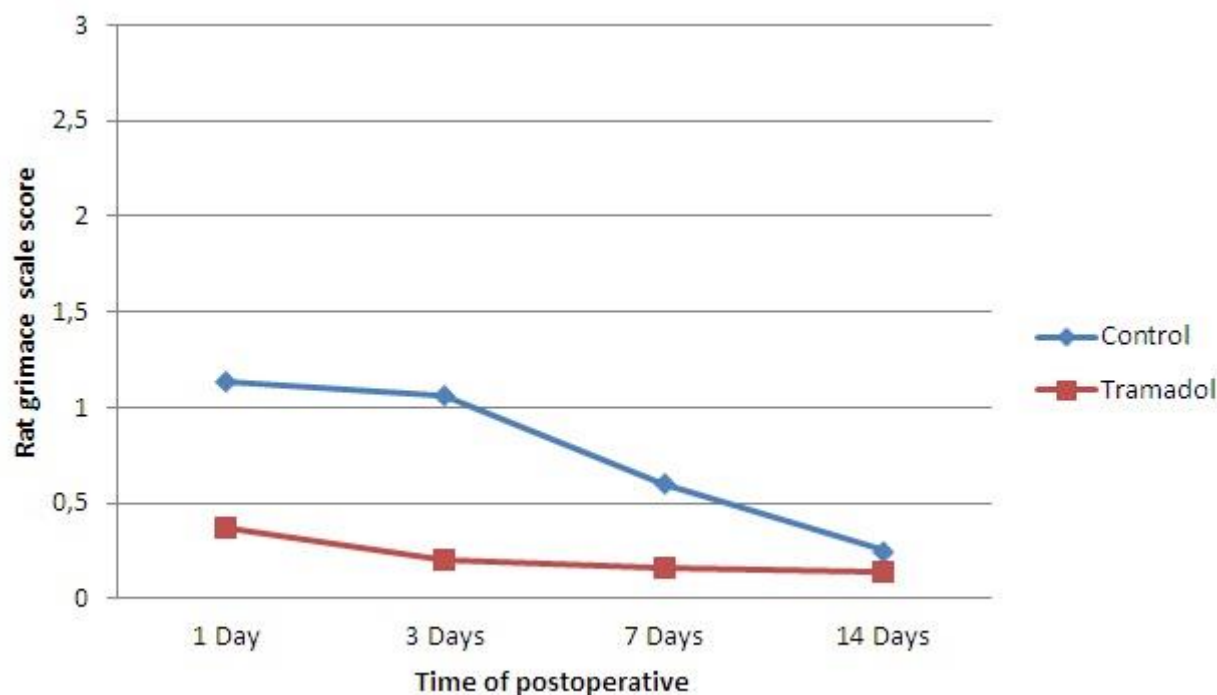


Figure 2 – Evolution of score of rat grimace scale according each group.

Discussion

Models of nerve damage in animals have been developed over the last 25 years to mimic the clinical manifestation of neuropathic pain. Normally, they have focused on damaging nerves that innervate the hind paw, as this is likely to show changes in sensory function via measurement of withdrawal reflexes in response to mechanical, thermal or chemical stimulation^{12,18}. Regardless of the method applied, trauma-induced neuropathic models are typically invasive and give rise to perioperative nociceptive signaling of surrounding tissue. Despite this, the use of appropriate post-operative analgesics is not performed as rigorously as it should be, despite being an irrefutable example from an animal welfare perspective and minimizing experimental variance due to stress induced by pain^{12,13,19}. In this study, no difference statistically significant was identified, considering the functional outcome of the BBB scale in any of the evaluated time, showing no influence of tramadol in this injury protocol.

The pain, in the short term, serves to protect an individual from harm, but in the long term can become a debilitating condition. The purpose of pain is to alert an individual to withdraw from immediate tissue damaging stimuli and to prevent further damage to the site of injury during the healing process²⁰. This fact was observed in this study, whereas, both GC and

GT groups showed inversely proportional relationships between the rat Grimace score (the pain scale) and the BBB scale (functional scale), suggesting that the lower the pain, the greater the function of the affected member.

Philips *et al.*²¹ evaluated the neuropathic pain in a cervical radiculopathy model in rats and verified the persistence of pain after injury on days 1 and 7, which confirms the verified data in this study, where the GC presented higher score in the rat grimace scale compared to the GT until the 7th postoperative day, not being identified between the groups on the 14th day. Although rat grimace scale most sensitively detects pain at acute time points^{17,22-24}, the disappearance of facial grimace is not necessarily indicative of the resolution of spontaneous pain¹⁷, whereas natural adaptations have led prey species, like rodents, to inhibit facial grimace as soon as possible so that they do not become the target of predators²⁵. By hiding painful expressions, pain may persist for longer than is detectable by rat grimace scale. This hypothesis has been already suggested previously for visceral, inflammatory, and neuropathic conditions^{17,24}. Other tests of spontaneous behaviors, like conditioned place preference and activity monitoring, also fail to capture robust pain behaviors after acute time points²⁶.

In the GT, tramadol was administered postoperatively in order to avoid the pain felt by the animal during anesthetic awakening. Previous work showed that inflammatory cytokine levels increase in the spinal cord after injury as early as 1 h after nerve root compression^{27,28} being indicated preemptive, postoperative analgesics or even early after injury, and this was verified in the GT group, which presented lower values in the Grimace score in the first 24 hours, in relation to the control group.

Despite the apparent lack of applicability of the rat grimace scale for animal care staff in evaluating pain levels on a day-to-day basis, the use of facial coding to detect pain has clinical utility in refining our understanding of acute pain²⁹⁻³⁴. This study confirms the importance of applying a pain scale in spinal cord injury procedures reaffirming that cited by Sperry *et al.*³³, as a useful modality to predict long periods in clinical pain models. Although the non-invasive collection of rat grimace scale data is simple to execute, its scoring can be a labor-intensive process¹⁷. Recent advances in real-time rat grimace scale³² and convolutional neural networks for automated facial grimace scoring³⁴ provide methods to streamline its use in both clinical and pre-clinical research applications.

Some limits of this study must be highlight, we don't evaluated the effect of tramadol on chronic stage of spinal cord injury, and was not performed inflammatory markets, however it don't invalidated this study because we proved that tramadol don't affect the functional

recovery, so new studies could evaluate the effect of tramadol or others opioids' drugs on chronic spinal cord injury.

Conclusion

The tramadol attenuates pain in a model of spinal cord injury without altering the functional evaluation of the injured member.

References

- 1- Yang H, Liu CC, Wang CY, Zhang Q, An J, Zhang L, Hao DJ. Therapeutical strategies for spinal cord injury and a promising autologous astrocyte-based therapy using efficient reprogramming techniques. *Mol Neurobiol.* 2016 Jul;53(5):2826-42. doi: 10.1007/s12035-015-9157-7.
- 2- He J, Zhao J, Peng X, Shi X, Zong S, Zeng G. Molecular mechanism of MiR-136-5p targeting NF- κ B/A20 in the IL-17-mediated inflammatory response after spinal cord injury. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(3):1224-41. doi: 10.1159/000485452.
- 3- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006 Apr 19;26(16):4308-17. PMID: 16624951.
- 4- Zhang D, Ma G, Hou M, Zhang T, Chen L, Zhao C. The neuroprotective effect of puerarin in acute spinal cord injury rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(3):1152-64. doi: 10.1159/000447822.
- 5- Liao B, Zhang Y, Sun H, Ma B, Qian J. Ryanodine receptor 2 plays a critical role in spinal cord injury via induction of oxidative stress. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(3):1129-37. doi: 10.1159/000443063.
- 6- Kasahara K, Nakagawa T, Kubota T. Neuronal loss and expression of neurotrophic factors in a model of rat chronic compressive spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006 Aug 15;31(18):2059-66. doi: 10.1097/01.brs.0000231893.21964.f2.
- 7- Gebrin AS, Cunha A dos S, Da Silva CF, Barros Filho TEP de, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. *Rev Bras Ortop.* 1997;32(2):103-8.
- 8- Pratt ES, Green DA, Spengler DM. Herniated intervertebral discs associated with unstable spinal injuries. *Spine (Phila Pa 1976).* 1990 Jul;15(7):662-6. PMID: 2218712.
- 9- Gerbrin AS, Cristante AF, Marcon RM, Da-Silva CF. Pharmacological interventions in spinal cord trauma: a therapeutic approach. *Acta Ortop Bras.* 1997;5(3):123-36.

- 10- Su YF, Lin CL, Lee KS, Tsai TH, Wu SC, Hwang SL, Chen SC, Kwan AL. A modified compression model of spinal cord injury in rats: functional assessment and the expression of nitric oxide synthases. *Spinal Cord*. 2015 Jun;53(6):432-5. doi: 10.1038/sc.2014.245.
- 11- Marques SA, Garcez VF, Del Bel EA, Martinez AM. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. *J Neurosci Methods*. 2009 Feb 15;177(1):183-93. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.10.015.
- 12- Hestehave S, Munro G, Christensen R, Brønnum Pedersen T, Arvastson L, Hougaard P, Abelson KSP. Is there a reasonable excuse for not providing post-operative analgesia when using animal models of peripheral neuropathic pain for research purposes? *PLoS One*. 2017 Nov 22;12(11):e0188113. doi: 10.1371/journal.pone.0188113.
- 13- Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim*. 2009;43(2):149–54. PMID: 19116297.
- 14- Kaneko K, Umehara M, Homan T, Okamoto K, Oka M, Oyama T. The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. *Neurosci Lett*. 2014 Mar 6;562:28-33. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.007.
- 15- Kimura M, Obata H, Saito S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. *Anesth Analg*. 2012 Aug;115(2):443-9. doi: 10.1213/ANE.0b013e31825683c3.
- 16- Barros Filho TEP, Molina AEIS. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008 Feb;63(1):103-8. PMID: 18305873.
- 17- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011 Jul 29;7:55. doi: 10.1186/1744-8069-7-55.
- 18- Jurga AM, Rojewska E, Piotrowska A, Makuch W, Pilat D, Przewlocka B, Mika J. Blockade of Toll-Like Receptors (TLR2, TLR4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model. *Neural Plast*. 2016;2016:5238730. doi: 10.1155/2016/5238730.
- 19- Nagakannan P1, Shivasharan BD, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Effect of tramadol on behavioral alterations and lipid peroxidation after transient forebrain ischemia in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2012 Nov;22(9):674-8. doi: 10.3109/15376516.2012.716092.
- 20- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):894-8. PMID: 17167479.
- 21- Philips BH, Weisshaar CL, Winkelstein BA. Use of the rat grimace scale to evaluate neuropathic pain in a model of cervical radiculopathy. *Comp Med*. 2017 Feb 1;67(1):34-42. PMID: 28222837.

- 22- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 2010 Jun;7(6):447-9. doi: 10.1038/nmeth.1455.
- 23- De Rantere D, Schuster CJ, Reimer JN, Pang DS. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models. *Eur J Pain*. 2016 Mar;20(3):417-26. doi: 10.1002/ejp.742.
- 24- Philips BH, Weisshaar CL, Winkelstein BA. Use of the rat grimace scale to evaluate neuropathic pain in a model of cervical radiculopathy. *Comp Med*. 2017 Feb 1;67(1):34-42. PMID: 28222837.
- 25- Stasiak KL, Maul D, French E, Hellyer PW, VandeWoude S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2003 Jul;42(4):13-20. PMID: 12906396.
- 26- Klinck MP, Mogil JS, Moreau M, Lascelles BDX, Flecknell PA, Poitte T, Troncy E. Translational pain assessment: could natural animal models be the missing link? *Pain*. 2017 Sep;158(9):1633-46. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000978.
- 27- Rothman SM, Huang Z, Lee KE, Weisshaar CL, Winkelstein BA. Cytokine mRNA expression in painful radiculopathy. *J Pain*. 2009 Jan;10(1):90-9. doi: 10.1016/j.jpain.2008.07.008.
- 28- Rothman SM, Winkelstein BA. Cytokine antagonism reduces pain and modulates spinal astrocytic reactivity after cervical nerve root compression. *Ann Biomed Eng*. 2010 Aug;38(8):2563-76. doi: 10.1007/s10439-010-0012-8.
- 29- Fairbanks CA, Goracke-Postle CJ. Neurobiological studies of chronic pain and analgesia: rationale and refinements. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jul 15;759:169-81. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.049.
- 30- Faller KM, McAndrew DJ, Schneider JE, Lygate CA. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. *Exp Physiol*. 2015 Feb 1;100(2):164-72. doi: 10.1113/expphysiol.2014.083139.
- 31- Préfontaine L, Hélie P, Vachon P. Postoperative pain in Sprague Dawley rats after liver biopsy by laparotomy versus laparoscopy. *Lab Anim (NY)*. 2015 May;44(5):174-8. doi: 10.1038/labam.731.
- 32- Leung V, Zhang E, Pang DS. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. *Sci Rep*. 2016 Aug 17;6:31667. doi: 10.1038/srep31667.
- 33- Sperry MM, Yu YH, Welch RL, Granquist EJ, Winkelstein BA. Grading facial expression is a sensitive means to detect grimace differences in orofacial pain in a rat model. *Sci Rep*. 2018 Sep 17;8(1):13894. doi: 10.1038/s41598-018-32297-2.

34- Tuttle AH, Molinaro MJ, Jethwa JF, Sotocinal SG, Prieto JC, Styner MA, Mogil JS, Zylka MJ. A deep neural network to assess spontaneous pain from mouse facial expressions. *Mol Pain*. 2018 Jan-Dec;14:1744806918763658.

Correspondence:

Rosa Helena de Figueiredo Chaves
Travessa do Chaco, 729/802
66083-180 Belém – PA Brasil
Tel.: (55 91)98896-1978
rosahelenedvet@gmail.com

Received: Aug 25, 2018

Review: Oct 21, 2018

Accepted: Nov 23, 2018

Conflict of interest: none

Financial source: none

¹Research performed at Biotery, Centro Universitário do Estado do Pará (CESUPA), Belem-PA, Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Health and Animal Production in Amazon, UFRA. Tutor: Ana Rita de Lima.

**ANEXO 2: TRADUÇÃO DA DESCRIÇÃO DAS PONTUAÇÕES REFERENTES À
ESCALA BBB**

Pontuação	Características
0.	Sem movimentos nas patas posteriores.
1.	Movimento discreto de uma ou duas articulações, usualmente o quadril e/ou o joelho.
2.	Movimento extenso de uma articulação ou; Movimento extenso de uma articulação e movimento discreto de outra articulação.
3.	Movimento extenso de duas articulações.
4.	Movimento discreto das três articulações da pata 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 da pata posterior.
8.	Pedalada sem suporte de peso ou; Fixação plantar da pata sem suporte de peso.
9.	Fixação plantar da pata com suporte de peso apenas na fase de apoio da marcha ou; Passos com apoio dorsal ocasionais, frequentes ou consistentes, sem passos com apoio plantar.
10.	Passos com suporte plantar ocasionais, sem coordenação com as patas anteriores.
11.	Passos com suporte plantar de frequentes a consistentes, sem coordenação com as patas anteriores.
12.	Passos com suporte plantar de frequentes a consistentes, com coordenação ocasional com as patas anteriores.
13.	Passos com suporte plantar de frequentes a consistentes, com coordenação frequente com patas anteriores.
14.	Passos com suporte plantar consistente, coordenação com patas anteriores consistente e pata posicionada predominantemente de forma rodada ou; Passos com suporte plantar frequentes, coordenação com patas anteriores consistente e passos com suporte dorsal ocasionais.
15.	Passos com suporte plantar consistente e coordenação com patas anteriores consistente; sem movimento de cauda ou movimento ocasional; pata predominantemente paralela ao corpo no contato inicial.
16.	Passo plantar consistente e coordenação com pata anterior consistente durante a marcha; a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço da pata anterior. A pata está predominantemente posicionada paralelamente no contato inicial e rodada no início da fase de balanço.
17.	Passo plantar consistente e coordenação com a pata anterior consistente durante a marcha; liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço da pata; pata predominantemente paralela tanto no contato inicial quando no início da fase de balanço.

18.	Passo plantar consistente e coordenação com pata anterior consistente durante a marcha; liberação dos dedos ocorre de forma consistente durante o avanço da pata; pata predominantemente paralela no contato inicial e rodada no início da fase de balanço.
19.	Passo plantar consistente e coordenação consistente com pata anterior durante a marcha; liberação dos dedos de forma consistente durante o avanço da pata; pata predominantemente paralela no contato inicial e durante o início da fase de balanço; cauda no solo na maior parte do tempo.
20.	Passo plantar consistente e marcha consistentemente coordenada; liberação dos dedos consistente; pata predominantemente paralela no contato inicial e no início da fase de balanço; cauda consistentemente elevada; tronco instável.
21.	Passo plantar consistente e marcha coordenada, liberação dos dedos consistente; pata predominantemente paralela durante o balanço, tronco estável de forma consistente; cauda consistentemente elevada.

Fonte: SOUZA, 2017.

APÊNDICE A: PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO

Data: ____/____/____.

Grupo: _____

Identificação do Animal: _____

Peso: ____ g

PROTOCOLO ANESTÉSICO

Fármaco	Dose
Cetamina	
Xilazin	
Fentanil	

OBS: _____

Início: ____:____

Término ____:____

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Início: ____:____

Lesão: ____:____

Término ____:____

Esvaziamento vesical pós-cirúrgico () SIM () NÃO

OBS: _____

TERAPÊUTICA

Agente: _____

OBS: _____

Dose: _____

Volume: _____

Via: _____

Hora: ____:____

CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIO

	1º Dia ____/____	2º Dia ____/____	3º Dia ____/____	4º Dia ____/____	5º Dia ____/____	6º Dia ____/____	7º Dia ____/____
Ceftriaxona							
Tramadol (Manhã)							
Tramadol (Noite)							

APÊNDICE B – TRADUÇÃO DA ESCALA GRIMACE PARA RATOS

II. PROCEDIMENTOS DE CODIFICAÇÃO:

Ocultar as identificações de fotos (por exemplo, colocando-as no painel Anotações no PowerPoint) durante a codificação para garantir que a codificação seja executada sem visibilidade. Os codificadores devem sempre usar o computador durante a codificação, pois as fotografias podem perder resolução com a impressão. Antes de iniciar o processo de codificação, o codificador deve visualizar e se familiarizar com as fotos da linha de base fornecidas para determinar as características específicas do rato presentes. Todas as faces devem ser codificadas para a presença e intensidade das seguintes Unidades de Ação (UA) faciais específicas, relativas ao status da região do protótipo da linha de base.

A. CLASSIFICAÇÕES DE INTENSIDADE:

As classificações de intensidade são codificadas para cada UA.

UA não está presente = 0

UA moderadamente visível = 1

UA pronunciada = 2

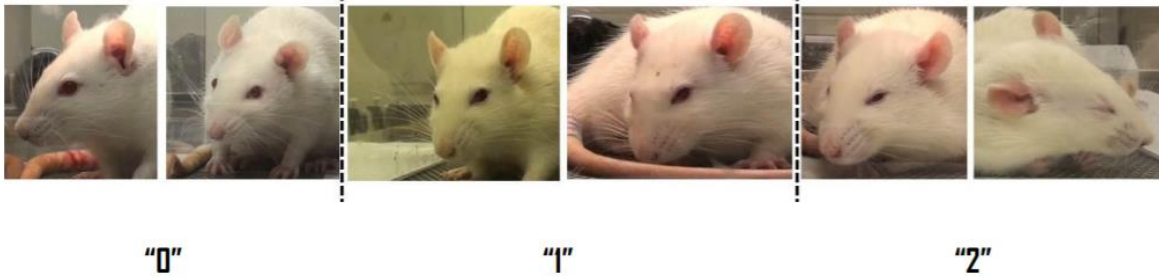
Uma pontuação RGS para cada fotografia é calculada pela média das classificações de intensidade para cada UA. Uma pontuação de diferença de RGS (relativa à linha de base / "sem dor") pode ser calculada para cada sujeito e calculada em média em um grupo. Esses cálculos são descritos detalhadamente no final do documento.

NOTA: Se uma unidade de ação não estiver presente na foto, uma pontuação de "NA" (Não Aplicável) deve ser usada.

B. UNIDADES DE AÇÃO:

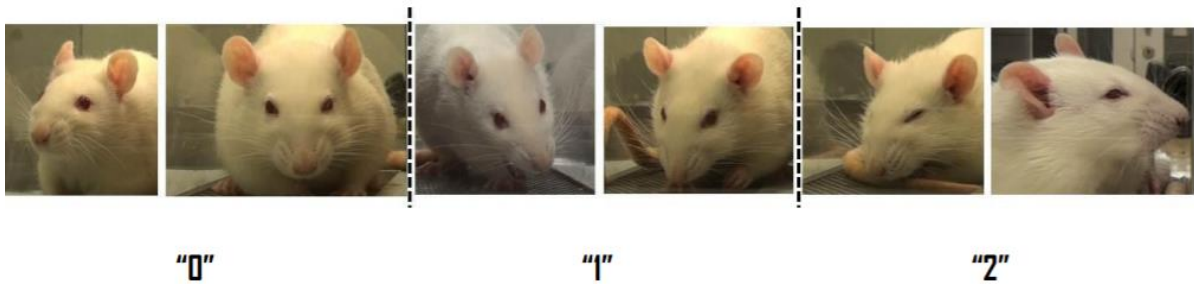
1. Pressão Orbital

Os ratos com dor exibem um estreitamento da área orbital, uma pálpebra firmemente fechada ou uma pressão nos olhos. Essa pressão nos olhos é definida como a contração dos músculos orbitais ao redor dos olhos. A membrana nictitante pode ser visível ao redor do olho e se torna mais pronunciada à medida que a dor se intensifica. Como orientação, qualquer fechamento ocular que reduza o tamanho do olho em mais da metade deve ser pontuado como "2". * Observe que ratos dormindo exibem olhos fechados, mas de natureza relaxada, enquanto um rato com dor pode exibir um olho fechado com músculos orbitais tensos. Fotografias de ratos dormindo não devem ser tomadas e / ou codificadas.



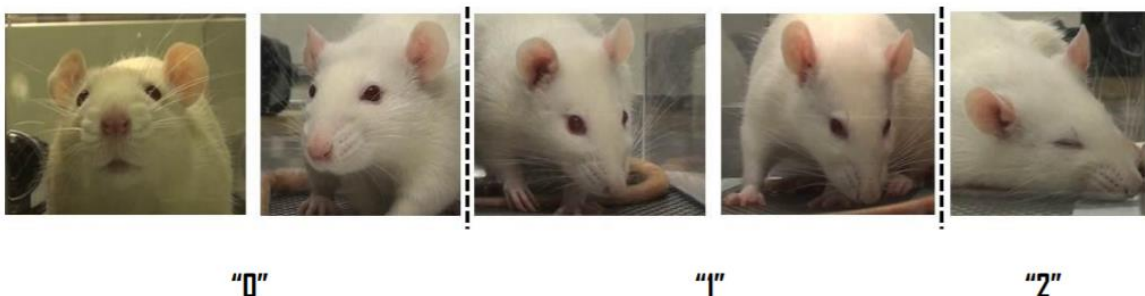
2. Nivelamento /Achatamento / aplainamento do nariz / bochecha

Os ratos com dor exibem uma falta de protuberância no topo do nariz (isto é, um achatamento do nariz). Na condição “sem dor”, uma protuberância clara está presente na ponte do nariz. As almofadas das vibríças também são arredondadas e ligeiramente estufadas, deixando um vinco claro entre as almofadas e a bochecha. Quando na dor, a ponte do nariz achata e se alonga, fazendo com que as almofadas do bigode achatem. Neste momento, o vinco entre as almofadas e a bochecha não está mais presente. Na visão frontal, o nariz pode parecer mais estreito e mais longo.



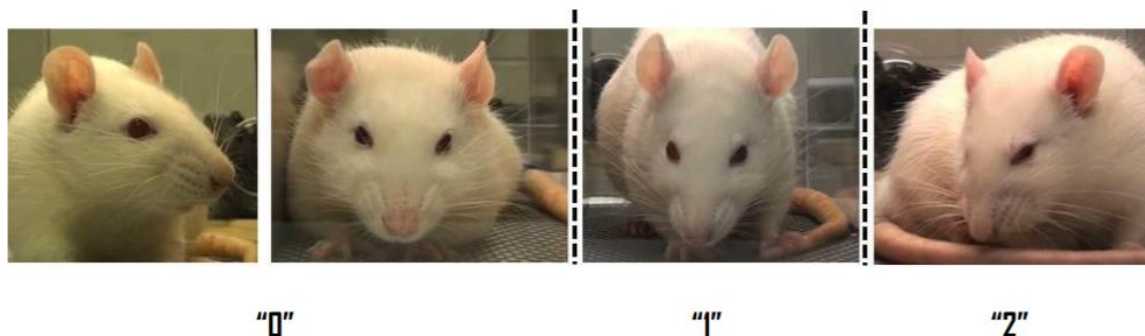
3. Modificações na orelha (posição, orientação, forma)

As orelhas dos ratos com dor podem estar onduladas e apontadas mais que o normal. Na posição fisiológica, as orelhas são aproximadamente perpendiculares à cabeça, quando olhadas de frente e anguladas ligeiramente para trás. É importante ressaltar que as orelhas também têm uma forma arredondada. Na dor, as orelhas tendem a dobrar, enrolar para dentro e são inclinadas para a frente. Essa ondulação das orelhas tende a resultar em uma forma pontiaguda das orelhas. Em estados de dor acentuados, as orelhas são inclinadas para fora e são mantidas perto de 45 ° tanto do eixo perpendicular quanto do nariz. Como resultado, o espaço entre as orelhas pode parecer mais amplo em relação à linha de base.



4. Alterações das vibrissas

Os ratos com dor têm vibrissas que se movem a partir da posição e orientação da linha de base. As vibrissas começam relaxadas e se inclinam ligeiramente para baixo e, à medida que a dor progride, a tensão nas almofadas aumenta e elas se tornam anguladas para trás ao longo da cabeça. Na dor, a vibrissa é contraída, fazendo com que os pelos se agrupem e sejam direcionados para fora do rosto. Isso dá a aparência de vibrissas “em pé”. Conforme os folículos se tornam tensos, as vibrissas ficam mais próximas e são menos distintas.



III. CALCULANDO AS PONTUAÇÕES RGS

	A	B	C	D	E	F
1	ID Foto	Órbita	Nariz/Bochecha	Orelhas	Vibrissas	RGS
2	1	2	1	1	2	1,5
3	2	0	0	1	0	0,25
4	3	2	2	2	2	1,75

1. Média de todas as UAs para cada fotografia para dar pontuação no RGS. A maioria desses cálculos preliminares é facilmente executada usando o Excel (veja o exemplo abaixo):
2. Depois de desbloquear, classifique os dados por assunto (por exemplo, "Rato") por condição. Note que fotografias “sem dor” são quase sempre fotografias de base tiradas antes da estimulação nociva:
3. Calcule a pontuação média do RGS para todas as fotografias de “sem dor” e de “dor” para cada sujeito e subtraia a média das fotografias de “sem dor” da média para as fotografias de “dor” para obter uma pontuação de diferença de RGS para cada sujeito
4. Os escores de diferença podem, então, ser medidos em média entre os indivíduos para fornecer um escore de diferença média, que pode ser analisado quanto à significância usando um teste t de Student de uma amostra, em comparação com 0.

Fonte: Sotocinal, *et al.*, 2011.

Adaptado pela autora para este protocolo de Pesquisa.

**APÊNDICE C: ACEITE DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
(CEUA – CESUPA)**



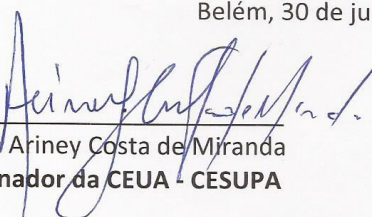
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Uso do plasma rico em fibrina associado ao cloridrato de tramadol na lesão medular aguda em ratos**”, protocolo nº **06/2017** sob a responsabilidade de **Rosa Helena de Figueiredo Chaves** – que envolve a produção manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO CESUPA, em **27/06/2017**.

Vigência do Projeto	01/08/17 à 30/12/2018.
Espécie/linhagem	Ratos
Nº de animais	23
Peso/idade	120 – 150 gramas/ 90 dias
Sexo	M
Origem	Biotério de Reprodução do Instituto Evandro Chagas

Belém, 30 de junho de 2017.


Prof. Dr. Ariney Costa de Miranda
Coordenador da CEUA - CESUPA

Av. Almirante Barroso, 3775 -
Sousa - Belém - PA
Tel.: 3205-9000 - Fax: 3205-9015