

Desenvolvimento de Metodologia para Indução de Escoliose em Ratos

Autores

Gabriel Borges Delfino

Orientador

Carlos Alberto da Silva

Apoio Financeiro

Pibic

1. Introdução

As deformidades vertebrais na escoliose estão intimamente relacionadas com sua patogênese, que permanece desconhecida, especialmente na escoliose idiopática, o que representa mais de 80% de todas as escolioses. Conseqüentemente, muitas hipóteses têm sido apresentadas, focalizando sobre fatores genéticos, esqueléticos, miogênicos, tóxicos, químicos, mecânicos ou biomecânicos, neurohormonais e neurogênicos. A escoliose envolve uma modificação estrutural das vértebras e costelas com rotação vertebral no plano transversal, desvio lateral no plano frontal e lordose no plano sagital, o que esteticamente gera transtornos, principalmente em crianças e adolescentes por seu caráter evolutivo (Bird *et al.*, 1988).

Estudos da biomecânica funcional da coluna, relataram que a coluna vertebral, sob condições de escoliose, é um sistema inerentemente instável, requerendo suporte muscular ativo para manter sua postura. A progressão da curvatura escoliótica pode ser vista como uma deformação planejada em escalas combinadas por alterações devido ao crescimento. A presença de rotação axial combinada com inclinação lateral pode contribuir para o agravamento da curva escoliótica exagerada. A deformidade do corpo vertebral que acompanha a escoliose contribui para alterar qualquer simetria adicionando-se assim o estado de desequilíbrio.

Por ser um tema tão abrangente, a escoliose tem conduzido inúmeras pesquisas, relacionadas principalmente à correlação da deformidade produzida na superfície corpórea com a alteração anatômica estrutural pela rotação dos corpos vertebrais, e também com a magnitude da angulação na curva escoliótica. Os resultados obtidos com esses trabalhos sugerem que esses métodos não invasivos, de diagnóstico, sejam indicadores razoáveis das condições escolióticas da coluna, caracterizando assim a análise radiológica como um método de maior confiabilidade para o diagnóstico clínico preciso do estado escoliótico.

Após revisão da literatura objetivando métodos experimentais aplicados à indução de escoliose em ratos, observou-se o predomínio do caráter invasivo nas metodologias aplicadas como, a pinealectomia, sutura dos músculos paravertebrais limitando a movimentação, eletroestimulação na musculatura contralateral para causar desequilíbrio, separação mecânica das vértebras alterando a simetria, trauma na coluna dos ratos, osteolatrismo com a utilização de fármacos (Dabney *et al.*, 1988; Joe *et al.*, 1990; Kasuga *et al.*, 1994;

2. Objetivos

Desenvolver metodologia experimental não invasiva de indução de escoliose em ratos.

3. Desenvolvimento

Utilizou-se ratos albinos *Wistar*, na fase pós desmame (21dias), sendo condicionados ao biotério de manutenção da UNIMEP, onde foram alimentados com ração (Purina para roedores) e água "*ad libitum*" e submetidos a ciclo fotoperiódico de 12hs claro/escuro com temperatura controlada de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais (n=6) sendo um grupo controle e outro submetido à imobilização com órtese. O período de imobilização com a órtese foi de 12 semanas.

Para as imobilizações com as órteses e realização das análises radiológicas, anestesiou-se os animais os com pentobarbital sódico, (HYPNOL, CRISTÁLIA,SP), na concentração de 40 mg/Kg de peso corporal.

4. Resultados

Ressalta-se inicialmente que o projeto trata da proposta de desenvolvimento de metodologia de criação de uma órtese que visa a indução de escoliose em ratos, assim, optamos por descrever os resultados associado a discussão utilizando citações de apoio centradas no desenvolvimento das etapas experimentais, não sendo nosso objetivo comparar o modelo experimental proposto, com os demais modelos descritos na literatura, tendo em vista as particularidades inerentes a cada um, com destaque ao caráter invasivo.

A princípio, o material escolhido para o desenvolvimento da órtese foi o metacrilato de etila, pelo domínio da técnica na elaboração do material apresentado pelo grupo de pesquisa, e também pelo fato desse ser facilmente moldado, o que permite o ajuste de acordo com a anatomia e desenvolvimento do animal. Além dessas características, outra que condizia para escolha do material era justamente o baixo peso e custo, por ele apresentado, o que viria contribuir para a não restrição funcional do animal. A partir de então desenvolveu-se e testou-se a órtese de acrílico que foram adaptadas aos animais restritos às gaiolas contendo 2 animais permanecendo 2 dias sob observação. Na sequência, avaliou-se a eficiência deste modelo de órtese e verificou-se que não apresentou o resultado esperado, devido à rigidez do material que limitou a deambulação do animal, sobrecarga de peso ao animal recém desmamado, além do que os cintos não se adaptaram corretamente aos membros superiores e inferiores promovendo desconforto e ferimentos aos animais.

Com esse resultado surgiu a necessidade de investigar novos materiais que apresentassem melhores respostas adaptativas além de semelhanças com relação às características do metacrilato, como fácil moldagem e baixo peso, e chegou-se a dois materiais: etileno-acetato de vinila (EVA) e placa de PolíCloreto de Vinila (PVC) com espessura de 0,050mm.

Iniciou-se à partir de então o período de experimentação com os novos materiais adotados. A princípio, a aplicação dos cintos com o material EVA possibilitou a indução da curvatura escoliótica, entretanto não

verificou-se a sua eficácia na manutenção dessa, e outro fato foi a deterioração dos cintos pelos animais. Assim observou-se que sua utilização não atenderia aos requisitos iniciais do projeto

Na sequência, foram iniciados os experimentos de confecção dos cintos com placa de PolíCloreto de Vinila (PVC), com espessura de 0,050mm. Esta opção de material utilizado na órtese trouxe inúmeros benefícios no desenvolvimento do projeto uma vez que o material possui baixo peso e custo, permitindo ainda o ajuste preciso aos membros dos animais, e não restringindo a deambulação. Com auxílio de um limitador plástico que foi colocado lateralmente conseguiu-se manter uma homogeneidade no ângulo da coluna observado pelas radiografias. Destacando-se ainda, que a órtese, adaptada ao animal, não interferia na deambulação do mesmo.

Através da experimentação e do decorrer do projeto chegou-se a confecção de nove modelos de cintos que possuíam a necessidade de alteração de suas medidas de acordo com o desenvolvimento do animal visando à sua melhor adaptação. Uma sequência combinatória desses cintos foi o que possibilitou o resultado final das órteses. Sendo assim o modelo estabelecido e adotado para o projeto, constitui-se de dois cintos, sendo um escapular e o outro pélvico confeccionados em PVC e interligados à direita por limitador plástico no qual oferecia a aproximação dos cintos pelo seu tracionamento, possibilitando a indução de uma escoliose tóraco-lombar à esquerda.

Na sequência dos experimentos e após as adaptações necessárias para o aprimoramento da órtese, estas foram adaptadas aos animais no período de 12 semanas, período proposto pelo projeto, realizando a primeira radiografia 24hs após a imobilização, e as seguintes a cada quinze dias. Com relação aos ajustes necessários, verificou-se à partir da sexta semana, a necessidade da adaptação de uma película de borracha industrial na região do cinto que circunda a coxa do animal, pois observou-se nesse período o desenvolvimento, ainda que inicial, de pequenas soluções de continuidade.

Após 24hs de imobilização, os animais foram encaminhados para análise radiológica no intuito de avaliar imaginologicamente o estado anatômico-estrutural no qual a coluna vertebral se encontrava após a imobilização. Posteriormente, a cada quinze dias foram captadas novas imagens radiológicas, também com o propósito de verificar a atuação da órtese na indução da escoliose. Adicionalmente, foram captadas novas imagens referentes ao período de remobilização, que consiste na fase pós retirada da órtese, sendo as imagens captadas semanalmente até a quarta semana de remobilização.

Durante revisão bibliográfica realizadas nos bancos de dados PubMed e Scielo, encontramos diversos métodos experimentais de indução e estudo da escoliose em animais, porém verificamos a predominância de metodologias que apresentavam como principal característica a invasividade de suas técnicas. (Stokes *et al.*, 2002; Stokes *et al.*, 2002b; Stokes *et al.*, 2002c). Assim, nossa proposta não permite comparação com os demais modelos tendo em vista que os estudos divergem em suas metodologias do proposto pelo presente estudo cuja maior preocupação é o desenvolvimento de metodologia sem o caráter invasivo, destacando assim a originalidade do método apresentado pelo projeto.

Destaca-se ainda, que uma grande variedade de modelos tem sido criados para compreender a deformidade tri-dimensional gerada pela escoliose. Alguns desses modelos usam de métodos mecânicos para alterar a simetria e curvaturas da coluna. Estes incluem secção óssea e de tecidos moles, imobilização da coluna através da utilização de fixador externo, alongamento do gradil costal, danificação do crescimento vertebral via emissão de radiação, sutura óssea ou de tecidos moles do lado contralateral da coluna, eletroestimulação da musculatura posterior e outras como implantações magnéticas (Poussa 1991, Joe,

1990, Piggott, 1971 e Nachlas, 1950). Há ainda, modelos que alteram o estatus bioquímico e endócrino, pela administração de substâncias metagênicas em animais na fase de desenvolvimento, induzindo tanto pelo osteolatirismo como pinealectomia (Machida, 1995, Ponseti, 1954).

Diversos são os modelos animais utilizados no estudo experimental da escoliose, cada um contendo suas particularidades e limitações metodológicas. Dentre os modelos utilizados estão galinhas, cabras, coelhos e ratos, esse último no banco de dados consultado, é o que possui o menor número de estudos publicados, fato esse que causou dificuldade no presente trabalho em se obter informações para se estabelecer comparações entre os modelos de indução no mesmo modelo animal (Braun, 2006, Machida, 1993, Joe, 1990).

Para verificar a eficiência do modelo proposto, avaliamos o período que consiste da fase de pós-retirada da órtese denominando-se esse período de remobilização, portanto manteve-se a análise radiológica por até quatro semanas da remobilização. O resultado obtido pela observação das imagens foi o da manutenção da alteração na coluna vertebral. Um respaldo científico para esses resultados baseia-se no estudo de Sarwark *et al.* (1988), em que os autores sugerem a consolidação da curvatura escoliótica após 6 semanas de imobilização. Nosso trabalho considera o fato da metodologia desse estudo ser diferente e principalmente invasiva, porém considere-se que nossa metodologia é realizada/mantida nos animais exatamente pelo dobro do tempo de imobilização, quando comparado ao dos autores, podendo afirmar assim a eficácia do modelo na indução da escoliose.

5. Considerações Finais

A imobilização com órtese de PVC foi eficaz na indução da escoliose, abrindo assim, novas perspectivas de estudos de fundo histofisiológicos bem como análise da aplicabilidade e eficácia de métodos fisioterapêuticos no tratamento da escoliose.

Referências Bibliográficas

BIRD, J.A. Current theories on the etiology of idiopathic scoliosis. *Clinical Orthopaedics and related Research* v.229, p.114-119, 1988.

BRAUN JT, AKYUZ E, OGILVIE JW. The use of animals models in fusionless scoliosis investigations. *Spine*. v.30, n. 17S, p. 35-45, 2005.

DABNEY, K.W.; SALZMAN, S.K. & WAKABAYAYASHI, T. Experimental scoliosis in the rat. *Spine* v.13, p.472-477, 1988.

JOE, T. Studies of experimental scoliosis produced by electric stimulation. *Nippon Zasshi*. v.57, p. 416-426,1990.

KASUGA, K. Experimental scoliosis in the rat spine induced by binding the spinous process. *Nippon*

Seikeigeka Gakkai Zasshi v.68, p. 789-807, 1994.

MACHIDA, M.; DUBOUSSET, J.; IMAMURA, Y.; et al. role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomized chickens. *J Bone Joint Surg Br.* v.77, p.134-8, 1995.

MACHIDA, M.; DUBOUSSET, J.; IMAMURA, Y.; IWAYA, T.; YAMADA, T.; KIMURA, J. An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis.

Spine. v.15, n.18, p.1609-15, 1993.

MACHIDA, M.; MURAI, I.; MIYASHIDA, I.; DUBOUSSET, J.; YAMADA, T.; KIMURA, J. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine* v.1, n.24, p. 1985-1989, 1999.

Machida, M.; Dubousset J.; Yamada, T.; Kimura, J.; Saito, M.; Shiraishi T.; Amagishi, M. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy. *J. Pineal Res.* v.41, n.1, p. 1-7, 2006.

NACHLAS, I.; BORDEN, J.N. Experimental scoliosis: the role of the epiphysis. *Surg Gynecol Obstet.* n.90, p. 672-80, 1950.

PEARSALL, D.J.; REID, J.G.; HEDDEN, D.M. Comparison of three invasive methods for measuring scoliosis. *Physical Therapy* v.72, n.9, p.648 –635, 1992.

PIGGOTT, H. Posterior rib resection in scoliosis. *J Bone Joint Surg Br.* v. 53, p. 663-71, 1971.

PONSETI, I. Lesions of the skeleton and other mesodermal tissues in rats fed sweet-pea (*Lathyrus-odoratus*) seeds. *J Bone Joint Surg Am.* v. 36, p. 1031-58, 1954.

POUSSA M. Scoliosis in growing rabbits induced with an extension splint. *Acta Orthop Scand.* v.62, 136-8, 1991.

SARWARK, J.F.; DABNEY, K.W.; SALZMAN, S.K. Scoliosis in the rat. Methodology, anatomic features. *Spine*, v.13, n.5, p. 466-471, 1998.

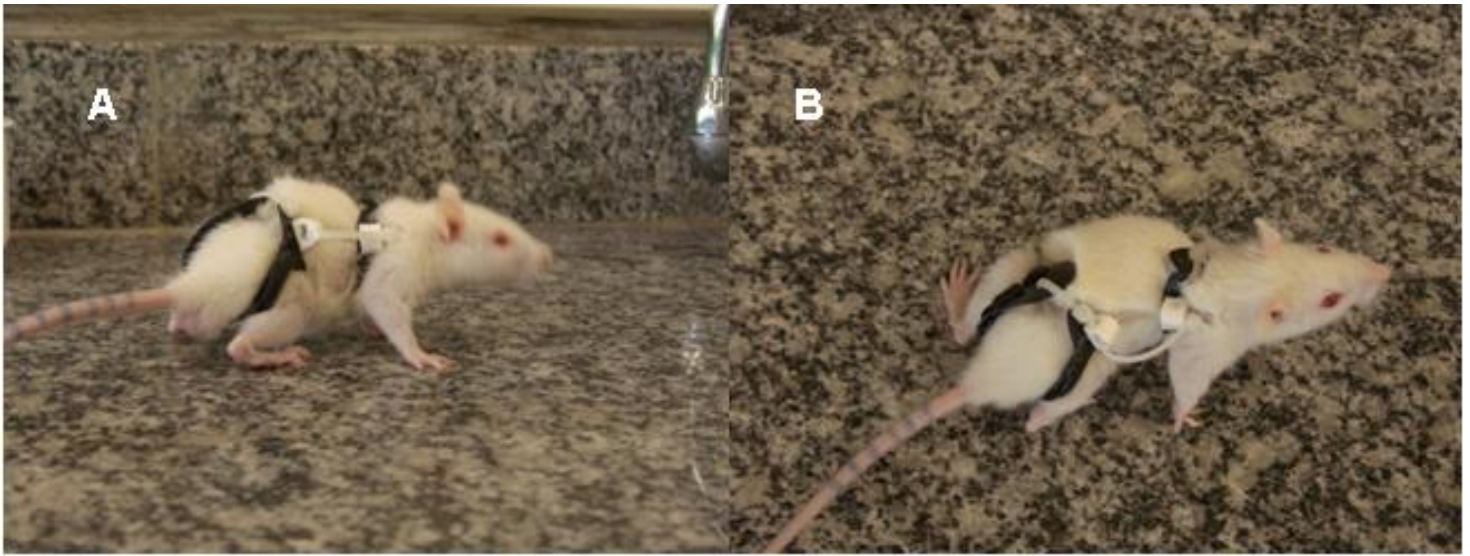
SKINNER, R.W. *Introdução aos materiais dentários*, 7ª edição, Guanabara Koogan, 2002.

STOKES, I.A.; GWADERA, J.; DIMOCK, A.; ARONSSON, D.D. Mechanical modulation of vertebral and tibial growth: diurnal versus full-time loading. *Stud Health Technol Inform.* v.91, p. 97-100, 2002a.

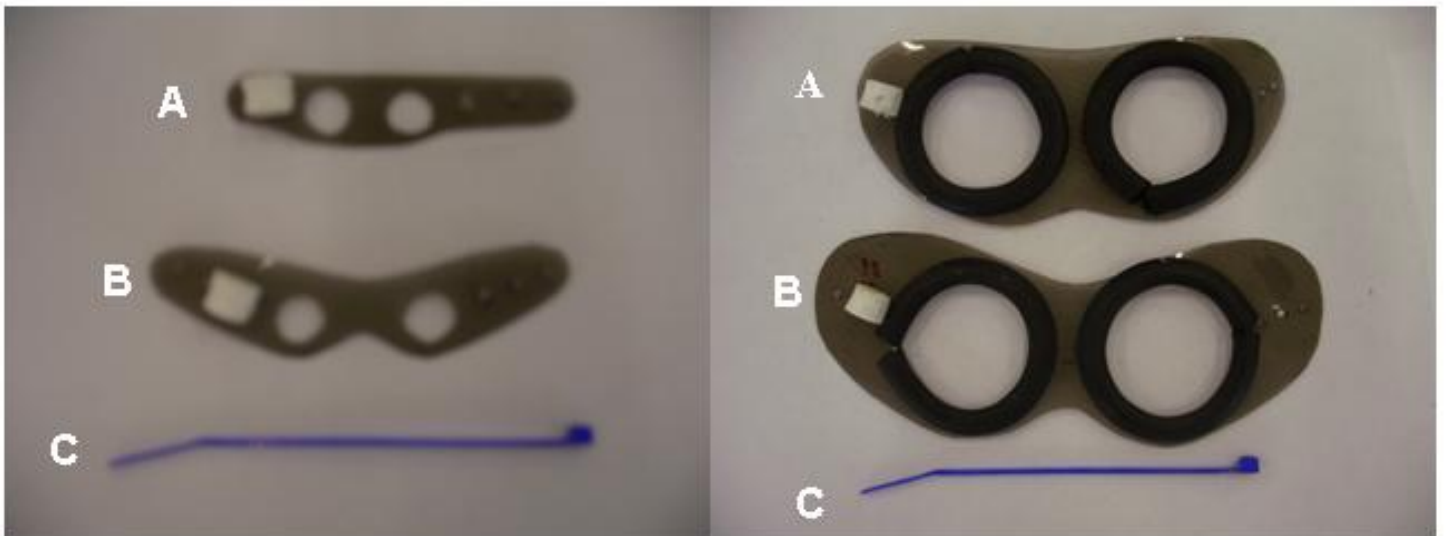
STOKES, I.A.; MENTE, P.L.; IATRIDIS, J.C.; FARNUM, C.E.; ARONSSON, D.D. Growth plate chondrocyte enlargement modulated by mechanical loading. *Stud Health Technol Inform.* v. 88, p.378-81, 2002b.

STOKES, I.A.; MENTE, P.L.; IATRIDIS, J.C.; FARNUM, C.E.; ARONSSON, D.D. Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading. J Bone Joint Surg Am. v. 84-A, n.10, p. 1842-8, 2002c.

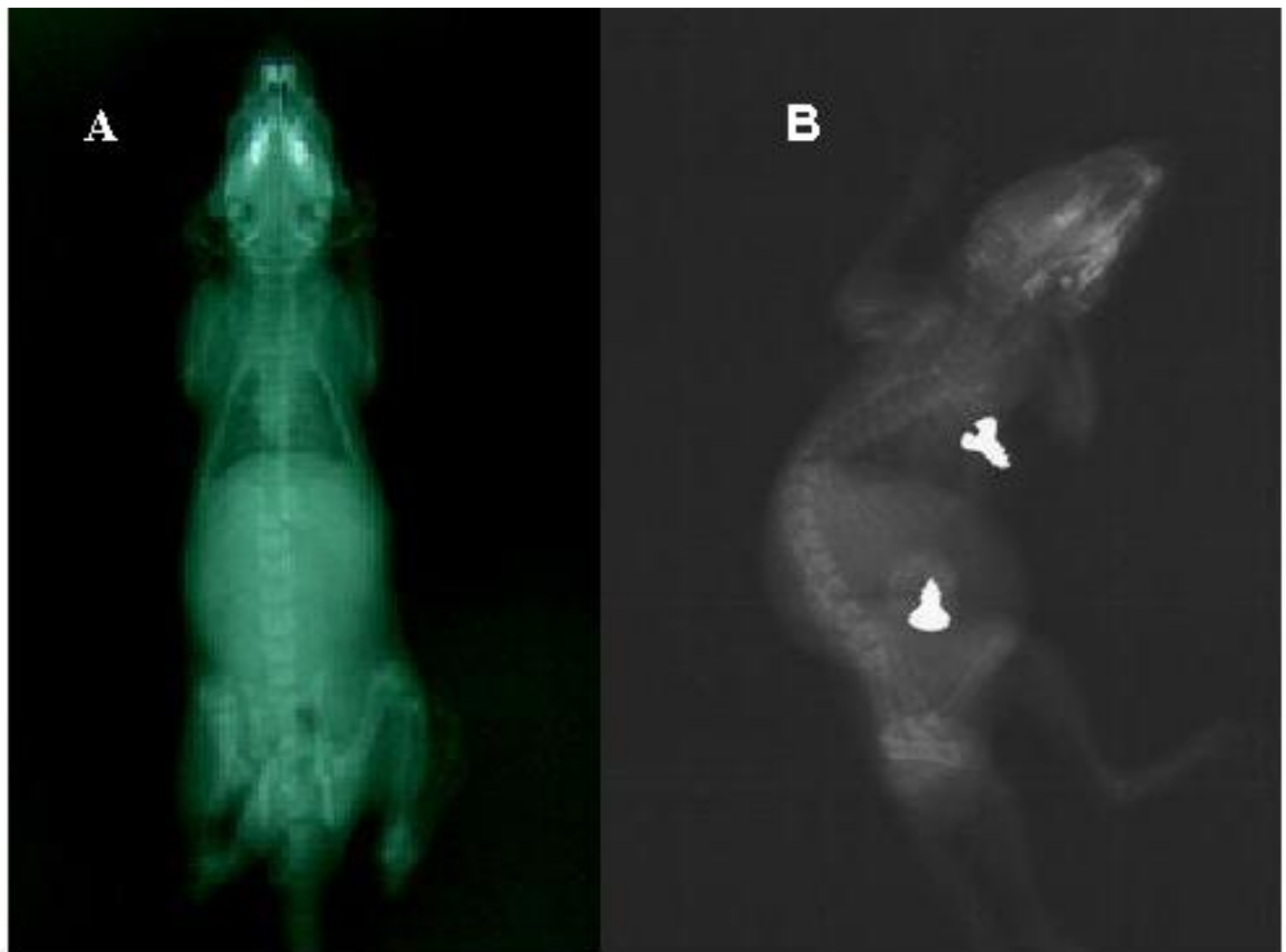
Anexos



A figura mostra a órtese adaptada ao rato na fase pós-demame: A- Vista lateral e B- Vista superior.



A figura mostra as órteses referentes: 1- Primeira semana e 2-última semana. Sendo para ambas: A- Cinto anterior, B- Cinto posterior e C- Limitador plástico.



Radiografia dos animais, sendo (A) grupo controle e (B) imobilizado com a órtese de PVC. A imagem foi obtida dos animais na fase pós desmame 24hs após a imobilização.

