Fabiano Inácio de Souza

**Estudo dos efeitos do monossialogangliosídeo (GM1)
administrado pela via transdérmica por laser a baixa
temperatura, após lesão medular experimental em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Fabiano Inácio de

Estudo dos efeitos do monossialogangliosídeo (GM1) administrado pela via transdérmica por laser a baixa temperatura, após lesão medular experimental em ratos / Fabiano Inácio de Souza. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Alexandre Fogaça Cristante.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal 2.Ratos Wistar 3.Laser
4.Gangliosídeo G(M1)

USP/FM/DBD-334/11

*“Contudo, seja qual for o grau a que chegamos,
o que importa é prosseguir decididamente.”*

Fil. 3,16

*“É Deus quem me cinge de coragem e aplanar o
meu caminho.”*

Sal. 17,33

DEDICATÓRIA

Ao meu filho, João Gabriel, luz da minha vida.

À minha esposa Cláudia, pelo amor, carinho e compreensão.

Às minhas irmãs Tatiana, Talita e Thammy pelas orações.

*À minha mãe, Darci, alicerce da família, sempre irradiando amor,
carinho, alegria e esperança.*

*Ao meu pai, José Antônio, pelo amor, pelo exemplo e apoio
incondicional em todas as fases da minha vida.*

*Aos meus padrinhos Elita e Osvaldo,
pelos ensinamentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Alexandre Fogaça Cristante, pelo exemplo de dedicação acadêmica e assistencial, pela orientação, perseverança e competência em tudo que faz.

Ao Professor Doutor Olavo Pires de Camargo, grande incentivador da formação acadêmica e sua disseminação pelo Brasil, que herdou o dom do ensino, da pesquisa e da assistência.

Ao Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, pela dedicação acadêmica e a oportunidade do desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Doutor Ciro Ferreira da Silva, por apresentar-me os caminhos da pesquisa científica, por meio da sua integridade moral, idoneidade e paciência.

Ao Diretor Técnico do LETRAN - IOT, Gustavo Bispo dos Santos, pela amizade, cooperação e perseverança.

Aos Doutores Raphael Marcon, Ricardo Ferreira, Marcelo Rosa, Mateus Saito, Fábio Imoto, Luciano Torres, grandes amigos, pesquisadores e incentivadores.

Aos funcionários do IOT Jane Donini, Veroneide de Andrade, Luciana Cristina, Julietti de Andrade e Tânia Borges, profissionais dedicados e competentes.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está em concordância com:

- a) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de Apresentação de Dissertações, Teses e Monografias, elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP, 2005.
- b) Terminologia anatômica em Português conforme a Terminologia anatômica internacional da *Federative Committe on Anatomical Terminology*– FCAT (Comissão Federativa de Terminologia Anatômica – CFTA), aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. São Paulo: Editora Manole, 2001. 248p.
- c) Terminologia e definições estatísticas conforme o Guia para expressão da incerteza de medição (*Guide to the expression of uncertainty in measurement*). 2ª ed. rev. – Rio de Janeiro: ABNT, Inmetro, SBM, 1998.
- d) Referências: Normas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver, 2005).

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO.....	9
3	REVISÃO DA LITERATURA	11
4	MÉTODOS	46
4.1	Modelo experimental de lesão medular	47
4.2	Tratamento medicamentoso e aplicação do <i>Laser Ice</i>	59
4.3	Protocolo de avaliação funcional pela escala BBB	62
4.4	Avaliação pelo potencial evocado motor	63
4.5	Eutanásia	66
4.6	Exame necroscópico e anatomopatológico.....	66
4.7	Análise estatística	69
5	RESULTADOS	71
5.1	Avaliação funcional	72
5.2	Potencial evocado.....	76
5.3	Dados histológicos	79
5.4	Avaliação dos óbitos	82
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÃO.....	103
8	ANEXOS	105
9	REFERÊNCIAS.....	119

Lista de Abreviaturas

GM1: monossialogangliosídeo

BBB: Basso, Baettie e Bresnahan

C: vértebra cervical

T: vértebra torácica

L: vértebra lombar

mm: milímetro

cm: centímetro

μm: micrômetro

g: grama

mg: miligrama

%: porcentagem

cm²: centímetro quadrado

°C: graus Celsius

h: hora

Kg: quilograma

μg: micrograma

im.: intramuscular

ms: milissegundo

mV: milivolt

mmHg: milímetros de mercúrio

J: Joule

O₂ : oxigênio

MASCIS: Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study

LETRAN-IOT-HC-FMUSP: Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

ICB-USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IOT-USP: Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Exposição dos processos espinhos das vértebras T-8, T-9, T-10 e T-11	51
Figura 2 -	Demonstração da medula espinal, ao centro.....	51
Figura 3 -	Esquematisação do Sistema NYU Impactor	53
Figura 4 -	Sistema NYC Impactor	53
Figura 5 -	Posicionamento do animal para a realização da contusão medular	54
Figura 6 -	Graduação da altura da haste.....	54
Figura 7 -	Lesão realizada após queda da haste, captada por potenciômetro óptico.....	55
Figura 8 -	Esquematisação dos dados do impacto	56
Figura 9 -	Formação gráfica dos dados do impacto	57
Figura 10 -	Hemorragia pós-traumática.....	57
Figura 11 -	Equipamento Laser Ice	60
Figura 12 -	Demonstração do raio laser	60
Figura 13 -	Aplicação do Laser Ice. Observe a solução congelada em contato com o rato	61
Figura 14 -	Implantação dos <i>corkscrew</i> e dos eletrodos	65
Figura 15 -	Posicionamento para a realização do estímulo	65
Figura 16 -	Ratos excluídos por autofagia ou canibalismo.....	66
Figura 17 -	Valores médios da função locomotora (Escala BBB).....	74
Figura 18 -	Boxplot para as medidas da amplitude, segundo grupos	77
Figura 19 -	Boxplot para as medida da latência, segundo grupos	77
Figura 20 -	Esquema ilustrando os grupos homogêneos entre si, com coeficiente de confiança global de 95%. Cada cor indica quais são os grupos homogêneos em relação à média. (Modelos A e C.)	79

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Medidas descritivas para o escore BBB, segundo grupo e semana de avaliação	73
Tabela 2 - Valores de p correspondentes a comparação das semanas dentro de cada grupo e dos grupos dentro de cada semana.....	74
Tabela 3 - Valores de p correspondentes a comparação entre duas semanas consecutivas, dentro de cada grupo.....	75
Tabela 4 - Medidas descritivas da amplitude e da latência, segundo grupos	76
Tabela 5 - Valores de p referentes ao teste de comparação das médias das amplitudes nos quatro grupos de estudo	78
Tabela 6 - Valores de p referentes ao teste de comparação das médias das latências nos quatro grupos de estudo	78
Tabela 7 - Distribuição dos escores de necrose, segundo grupos e região da medula	80
Tabela 8 - Distribuição dos escores de hiperemia, segundo grupos e região da medula	80
Tabela 9 - Distribuição dos escores de hemorragia, segundo grupos e região da medula	81
Tabela 10 - Distribuição dos escores de degeneração de substância neural, segundo grupos e região da medula.....	81
Tabela 11 - Distribuição dos escores de infiltrado celular, segundo grupos e região da medula	82
Tabela 12 - Distribuição dos grupos de acordo com a frequência de óbitos dos animais dos grupos 1 e 2.....	83
Tabela 13 - Distribuição dos grupos de acordo com a frequência de óbitos dos animais dos grupos 1 e 3.....	83
Tabela 14 - Distribuição dos grupos de acordo com a frequência de óbitos dos animais dos grupos 1 e 4.....	83

Resumo

Souza FI. *Estudo dos efeitos do monossialogangliosídeo (GM1) administrado pela via transdérmica por laser a baixa temperatura, na lesão medular experimental em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 134p.

Objetivo: avaliar os efeitos do monossialogangliosídeo (GM1) administrado pela via de transdérmica por laser a baixa temperatura, após lesão medular experimental em ratos. **Métodos:** o estudo incluiu 40 ratos Wistar, machos, com idade entre 20 e 21 semanas, submetidos à lesão medular contusa pelo equipamento NYU Impactor, a altura de 25 mm, de acordo com o protocolo MASCIS. Foram formados 4 grupos de 10 animais. No grupo 1, os ratos receberam diariamente 0,2 ml de soro fisiológico, via intraperitoneal; no grupo 2, GM1 via intraperitoneal, na concentração 30 mg/kg por dia; no grupo 3, sessão diária de laser a baixa temperatura na topografia da lesão; no grupo 4 sessão diária de laser contendo GM1 na concentração de 30 mg/kg pela via transcutânea por Laser Ice. Todos os animais foram tratados por 42 dias. Foram avaliados por meio da escala de avaliação funcional Basso, Baettie e Bresnahan (BBB) em 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a lesão, pelo exame histopatológico e por potencial evocado motor após 42 dias da lesão. **Resultados:** os animais do grupo 4 apresentaram os escores da escala BBB superiores aos demais grupos até a quarta semana, sendo equiparado aos demais na sexta semana. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e as semanas. A avaliação histológica não demonstrou resultados com significância estatística. Os exames de potencial evocado motor demonstraram maior latência média no grupo 1, sem significância estatística. **Conclusão:** o emprego de GM1 associado a laser em baixa temperatura demonstra resultados funcionais superiores nas primeiras semanas, mas sem evidenciar diferença estatisticamente significativa.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal 2.Ratos Wistar 3.GM1 gangliosídeo 4.Lasers

Summary

Souza FI. *Study the effects of monossialoganglioside (GM1) administered by transdermal laser at low temperature, the spinal cord injuries in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 134p.

Objective: To evaluate the effects of monossialoganglioside (GM1) administered transdermally, and laser at low temperature, in the functional and histological recovery of spinal cord injury in rats. **Methods:** Forty male Wistar rats, aged between 20 and 21 weeks, underwent spinal cord contusion at NYU Impactor, according to the MASCIS protocol. They were divided into four groups: in Group 1, rats received 0.2 ml of saline intraperitoneally daily; in Group 2, GM1 was administered intraperitoneally at a concentration 30 mg/kg per day; in Group 3, rats were treated with laser at low temperature on the skin, daily and in Group 4, the daily laser session also contained GM1. All the groups were treated for 42 days. The animals were evaluated by the Basso, Baettie and Bresnahan (BBB) functional scale on days 7, 14, 21, 28, 35 and 42 after injury, and by histopathology and motor evoked potentials after 42 days of injury. **Results:** The animals in Group 4 had higher BBB scores compared to the other groups, until the 4th week. There were no statistically significant differences between the groups, or in the comparisons over time, i.e. from one week to the next. Histological evaluation showed no statistically significant results, and no significant differences were found in the motor evoked potential tests either. **Conclusion:** GM1 associated with the use of low-temperature laser shows no superior functional, neurological or histological results in the treatment of spinal cord lesions in rats.

Descriptors: 1.Spinal cord injuries 2.Rats, Wistar 3.GM1 ganglioside 4.Lasers

1 INTRODUÇÃO

A regeneração medular é impossível após uma lesão traumática completa, havendo pouca evolução do conhecimento científico nos últimos anos, afirma Bolton (1899).

Fouad et al. (2011) em revisão da literatura, enfatizam a ausência de métodos terapêuticos eficientes para o tratamento dos pacientes portadores de lesão medular.

A descrição mais antiga de lesão na coluna vertebral remete aos papiros de Edwin Smith, datado de 1700 a. C., o qual afirma que tal “enfermidade não deve ser tratada” (aput Hughes, 1988). Hipócrates propõe o método de redução, objetivando o alinhamento da coluna vertebral por meio de tração axial, aplicando-se a força corretiva na convexidade da deformidade. O advento da radiologia transformou-se em um marco, pois proporciona maior compreensão das características e da fisiopatologia das fraturas na coluna vertebral. Nas últimas décadas, o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas e dos implantes especiais para a coluna vertebral possibilitaram grande avanço no tratamento das instabilidades pós-traumáticas. Em contrapartida, não houve evolução na terapêutica para proporcionar regeneração medular efetiva (Dietz, 2010).

A incidência anual de lesões medulares varia de 11,5 a 53,4 por milhão de habitantes a cada ano, com taxa de mortalidade estimada, entre o

trauma e o atendimento hospitalar, de 48 e 79%. A prevalência média gira em torno de 583 pacientes com lesão medular por milhão de habitante (Sekhon e Fehlings, 2001; Noonam et al., 2008).

Da Paz et al. (1992) apresentam estudo epidemiológico, multicêntrico, realizado em 36 hospitais públicos, de sete capitais brasileiras, demonstrando que a incidência de pacientes do sexo masculino é de 81%, geralmente em idade produtiva, e as causas mais frequentes de lesão medular são os acidentes de trânsito (42%), lesões por arma de fogo (27%) e quedas (15%).

O impacto pessoal, social e econômico da lesão medular é imensurável. O indivíduo vitimado pelo trauma espinal passa a ter uma nova percepção do mundo, das pessoas, do trabalho, das limitações físicas.

A prevalência de dor crônica é muito alta (98,4%), sobretudo nos ombros (61,4%) e na região lombar (57,5%) (Raichle et al. 2007). Apresentam também distúrbios do sono (43%) (Brito, 2007), disfunção sexual em mais de 90% (Sodré, 2007), espasticidade em 60% (Singh et al., 2008), osteoporose (Dionyssiotis et al., 2011), possíveis alterações gastrointestinais (Kabatás et al., 2008). A expectativa de vida é reduzida, especialmente no primeiro ano, e as principais causas de morte são a presença de úlceras de pressão, infecções respiratórias e urinárias, internações em UTI, amputações, fraturas e depressão maior (Krause et al., 2008).

Na fase crônica, os pacientes portadores de lesão medular estão propensos a desenvolver doenças psíquicas e físicas. O distúrbio psiquiátrico mais comum é a depressão, embora se possa caracterizar o isolamento social,

a perda da auto estima e a sensação de inferioridade, como alterações comportamentais não necessariamente patológicas (Banerjea et al., 2008).

Priebe et al. (2007) estimam os custos referentes ao tratamento de portadores de lesão medular traumática. Demonstram que os custos do primeiro ano e anos subsequentes nos pacientes tetraplégicos altos são de 740 mil e 130 mil dólares, respectivamente, ao passo que os valores nos paraplégicos, se situam entre 270 mil e 27 mil dólares. As despesas com as modificações das residências (21 mil dólares), do carro (de 1 a 65 mil), cuidados diários (21mil/ano) e trabalhistas (57 mil dólares/ano) completam o montante de gastos permanentes.

O progressivo avanço tecnológico pode proporcionar aumento da expectativa de vida dessas pessoas.

É imperativo o tratamento contínuo por equipes multidisciplinar e multiprofissional, buscando atenuar ao máximo o devastador impacto na qualidade de vida desses indivíduos (Singh et al., 2008).

Em casos com boa evolução, Lidal et al. (2007a), em revisão da literatura, apontam índices de retorno ao trabalho que variam de 11,5 a 74%. Citam como principais obstáculos as dificuldades de transporte, limitações físicas, falta de experiência, de educação ou treinamento, obstáculos arquitetônicos, discriminação e perda de benefícios.

O tratamento cirúrgico para a estabilização mecânica e a descompressão medular são os procedimentos que podem ser realizados nos casos de fraturas instáveis associadas à compressão medular.

O emprego de drogas para o tratamento das lesões medulares tem sido muito estudado. Os experimentos com uso de substâncias químicas são conduzidos, em sua maioria, na promoção da regeneração neural e na busca da inativação ou da redução da cascata secundária do trauma espinal. As principais pesquisas avaliam os efeitos do monossialogangliosídeo (GM1), metilprednisolona, dexametasona, tirilazade, naloxona, nimodipina, eritropoietina, tirotropina, gaciclida, estrógeno, antagonistas do N-metil-D-aspartato, 4-aminopiridina, SJA6017, neurotropinas 3, 4 e 5, anticorpos bloqueadores dos fatores inibidores da regeneração, antioxidantes, fatores de crescimento (cerebral, fibroblasto, neural, glial), células progenitoras indiferenciadas e vitaminas C e E (De La Torre et al., 1975; Nockels e Young, 1992; Coombs et al., 1993; Amar e Levy, 1999; Barros Filho, 2000; Hall e Springer, 2004; Sribnick et al., 2005; Thuret et al., 2006; Ledeen e Wu, 2007; Cristante, 2007; Hita, 2008; Qiao et al., 2008; Duchemin et al., 2008; Akdemir et al., 2008; Cristante et al., 2009a).

Apenas duas dessas drogas podem ser empregadas clinicamente: o GM1 e a metilprednisolona (Taoka e Okajima, 1998; Taoka et al., 2001), embora não haja consenso sobre os benefícios das suas indicações (Hall e Springer, 2004).

O GM1 é um glicolípido presente nas membranas celulares de tecidos neurais e se caracteriza pela capacidade de modulação e diferenciação celular às respostas adaptativas locais. Trata-se de um neuroprotetor, antineurotóxico, anti-inflamatório, indispensável para a excitabilidade neuronal de fibras

mielínicas e amielínicas. O GM1 atua no desenvolvimento, crescimento, diferenciação e maturação neuronal, além de diminuir a intensidade da degeneração waleriana (Roisen et al., 1981; Geisler et al., 1991; Karpiak et al., 1991; Walker e Harris, 1993; Coombs et al., 1993; Constantini e Young, 1994; Schneider et al., 1995; Vogelsberg et al., 1997; Taoka e Okajima, 1998; Hadjiconstantinou e Neff, 1998; Oliveira e Langone, 2000; Fang et al., 2000; Silva et al., 2000; Weber et al., 2000; Geisler et al., 2001; Goettl et al., 2003; Barros Filho e Silva Filho, 2003; Fighera et al., 2006; Thuret et al., 2006; Furian et al., 2007; Ledeen e Wu, 2007; Ilyas e Chen, 2007; Sokolova et al., 2007; Qiao et al., 2008; Duchemin et al., 2008; Chinnock e Roberts, 2009).

Diversos pesquisadores defendem o emprego de meios físicos, na tentativa de obtenção de melhores resultados. Dentre estas possibilidades, destaca-se a câmara hiperbárica e a hipotermia (Martinez-Arizala e Green 1992; Dimar et al., 2000; Ha e Kim, 2008; Marcon, 2009).

A via de administração transdérmica de substâncias pode ser utilizada em diversas situações. Caracteriza-se pela possibilidade de administração de proteínas e peptídeos, por meio de quatro grupos: formulações otimizadas (modificação molecular ou conjugação, nanopartículas ou vesículas encapsuladas e os potencializadores químicos da absorção); aplicação direta de energia (iontoforese, eletroporação, sonoforese, ondas fotomecânicas); penetração direta no estrato córneo (microagulhas, propulsão); ablação do estrato córneo (laser, radiofrequência, poração térmica). A alta energia emitida pelo laser diretamente na superfície da pele possui a capacidade de remover

o estrato córneo, aumentando a permeabilidade dérmica e, conseqüentemente, a absorção de drogas. Essa técnica permite a aplicação de pequenas e grandes moléculas, embora o seu uso clínico necessite de maior embasamento científico (Nelson et. al., 1991; Benson e Namjoshi, 2008; Bachhav et al., 2010; Bachhav et al., 2011; Kalluri e Banga, 2011).

Uma nova modalidade de laser para administração de medicamentos foi desenvolvida recentemente na Itália (*LaserIce Med®*), cuja principal característica é a possibilidade de penetração transcutânea de partículas misturadas em gel, sob baixa temperatura, por meio de feixes de raios paralelos com comprimento de onda de 635 nm, com 50 mW de potência. Santos et al. (2010) apresentaram no Congresso Europeu de Neurociências, estudo realizado no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LETRAN-IOT-USP), em parceria com o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), no qual pesquisam os efeitos do *Laser Ice Med®* associado ao GM1 no trauma espinal e nas lesões de nervos periféricos de ratos Wistar. Eles administraram GM1, diariamente, pela via transdérmica por 30 dias, e afirmam que as avaliações funcionais e histológicas dos nervos ciáticos e das medulas espinais demonstram sinais de regeneração superiores aos do grupo controle. Enfatizam que a via de administração transdérmica é atraumática, indolor e não invasiva.

A necessidade de novas pesquisas referentes ao tema da regeneração medular (Rossignol et al., 2007; Dietz, 2010; Santos et al., 2010), a busca de melhores resultados no trauma espinal e a possibilidade de sinergismo entre as várias modalidades terapêuticas formam a base de sustentação desse inédito projeto.

Avaliar os efeitos do monossialogangliosídeo (GM1) administrado pela via transdérmica, por laser a baixa temperatura, na lesão medular experimental em ratos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Bolton (1899) descreve a dificuldade do tratamento de pacientes com lesão medular traumática. Argumenta que a regeneração da medula espinal é impossível após o trauma completo, havendo pouca evolução do conhecimento científico nos últimos anos.

Allen (1911), apud Rodrigues et al. (2010), demonstra a técnica de lesão medular experimental por meio de trauma contuso. Atenta para a existência de fatores nocivos ao sistema nervoso, que pode surgir após o trauma.

Holdsworth (1953) sugere a classificação das fraturas da coluna vertebral em estáveis e instáveis, subdividindo-as em completas, que não apresentam função neurológica abaixo da lesão, e incompletas, podendo ser reversíveis ou irreversíveis.

Ducker e Hamit (1969) apontam os resultados do tratamento de lesões medulares realizadas em cães, produzidas por queda de peso de 25 g de altura de 15 cm. Formaram-se os grupos: grupo 1, controle; grupo 2, cães submetidos à irrigação com solução salina resfriada a 0° C; grupo 3, cães submetidos à infusão intramuscular de dexametasona após 3 horas da lesão, na concentração de 0,5 mg/kg/24h no dia do trauma e, 0,24 mg/kg/24h, no 1º pós-operatório, seguido por doses diárias de metilprednisolona por uma semana (1,3 mg/kg/24h); grupo 4: dose intratecal única de

metilprednisolona (8 mg/kg). Concluem que houve melhora na recuperação funcional estatisticamente significativa nos grupos submetidos à dexametasona e hipotermia local.

Holdsworth (1970) apresenta importante estudo sobre as lesões traumáticas da coluna vertebral em que investiga mais de mil pacientes tetraplégicos ou paraplégicos. Afirma que a presença de sensibilidade sacral, associada à presença de função motora distal a lesão, é indício de lesão medular incompleta. Descreve a anatomia e cita os principais tipos de fraturas da coluna vertebral. Sugere tratamento cirúrgico para estabilizar e restaurar o alinhamento da coluna, precavendo-se com a realização de laminectomia, em virtude da possibilidade de desenvolvimento de deformidade.

Ducker et al. (1971) publicam importante estudo prospectivo, randomizado, utilizando 32 macacos *Rhesus*, os quais são divididos em 4 grupos distintos, em que há variações na intensidade da contusão medular (10, 15, 20, 25 g), em uma altura fixa de 20 cm. Os grupos foram subdivididos em dois subgrupos, com a eutanásia do primeiro 6 horas após a lesão, ao passo que, no outro grupo, os macacos foram sacrificados após 5 ou 6 dias da lesão. As avaliações do primeiro subgrupo baseiam-se na graduação da hemorragia petequial, da hemorragia em chama, do hematoma globular, no edema e na diapedese, categorizados em leve, moderado e grave. No subgrupo remanescente, analisou-se a necrose, a hemorragia, o edema, a desmielinização, as alterações vasculares e a evolução motora. Concluem não existir correlação direta entre as alterações histológicas e o

comportamento clínico. Ressaltam que, nos traumas leves, houve alterações medulares centrais e recuperação funcional; nos moderados ocorreu comprometimento da substância branca, ao passo que a lesão grave envolveu toda a medula.

De La Torre et al. (1975), em revisão das possibilidades técnicas das pesquisas experimentais de lesão medular, sugerem a possibilidade de transplante neural de células fetais para o sítio da lesão e o emprego de fatores neurotróficos.

Balentine (1985) elabora estudo histológico da medula espinal de ratos, submetidos a trauma contuso. Observou-se alterações nos seguintes períodos: 3 a 5 minutos, após a lesão, e ainda, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas e 7 dias. Descreve a sequência das alterações medulares, onde há primeiramente o comprometimento da substância cinzenta seguida pela substância branca.

Merton e Morton (1980)¹, apud Alisauskiene et al. (2005), demonstram, pela primeira vez em humanos, que a descarga elétrica transcraniana pode ativar no córtex motor potenciais elétricos em músculos-alvo.

Roisen et al. (1981) utilizam cérebros bovinos para pesquisar o papel do GM1 no desenvolvimento neuronal *in vitro*. Defendem que o GM1 tem a função de promover o crescimento e a diferenciação de células neurais.

¹ Merton PA, Morton HB. Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature*. 1980;285:227.

Young e Flamm (1982) propõem avaliar o fluxo sanguíneo, a concentração de cálcio extracelular e o potencial evocado de gatos submetidos à lesão medular, tratados com altas doses de metilprednisolona. Formam-se três grupos: grupo 1, controle; grupo 2, administrados 15 mg/Kg de metilprednisolona; grupo 3, 30 mg/kg de metilprednisolona, 45 minutos após a lesão. Enfatizam que o grupo 3 possui fluxo sanguíneo mais efetivo, mensurado pela depuração de hidrogênio, melhora do potencial evocado e da concentração de cálcio extracelular.

Albin e White (1987) advogam que, após o trauma mecânico da lesão medular, ocorre hemorragia, hipóxia, edema, hipoperfusão e necrose neural.

Hughes (1988) descreve o primeiro relato de caso de lesão medular traumática, contido nos papiros de Edwin Smith.

Barros Filho et al. (1990) publicam estudo epidemiológico retrospectivo, em que foram incluídos 428 pacientes portadores de traumatismo na coluna vertebral. Noventa e quatro por cento eram do sexo masculino, predominantemente na terceira década de vida. As causas mais frequentes foram os acidentes de trânsito e os ferimentos por arma de fogo, seguido por mergulho em águas rasas e prática esportiva. A taxa de mortalidade foi de 21%, sobretudo em razão de complicações respiratórias.

Geisler et al. (1991) publicam estudo clínico prospectivo, randomizado, duplo-cego, analisando 37 pacientes portadores de lesão medular pós-traumática. Os pacientes do grupo GM1 receberam 100 mg de GM1 endovenosamente por dia, por 18 a 32 dias, com a dose inicial dentro

das primeiras 72 horas do trauma. Relatam que houve diferença significativa entre os grupos controle e GM1, ao se comparar a evolução da recuperação motora pela escalas de Frankel e ASIA (*American Spine Injury Association*), após um ano de seguimento. Preconizam que há necessidade de novos estudos clínicos antes da indicação habitual.

Karpiak et al. (1991) estudam os efeitos do GM1 na isquemia cerebral e concluem que este gangliosídeo possui a capacidade de reduzir os efeitos tóxicos da alta concentração de cálcio e sódio associados ao edema, podendo determinar efeitos benéficos em situações traumáticas do sistema nervoso central.

Nelson et al. (1991) publicam, pela primeira vez, estudo que demonstra a capacidade do laser de realizar ablação do estrato córneo da pele, determinando aumento da capacidade de absorção de hidrocortisona e interferon. Enfatiza a necessidade de novas pesquisas buscando-se determinar os efeitos biológicos da técnica.

Tator e Fehlings (1991) realizam extensa revisão da literatura sobre os fenômenos vasculares que ocorrem após a lesão medular. Defendem que a isquemia pós-traumática é um importante mecanismo de lesão secundária, devendo ser o foco de futuras pesquisas.

Nockels e Young (1992) discorrem sobre as possibilidades terapêuticas de diversos fármacos no tratamento da lesão medular experimental. Sustentam que, na fase crônica, a mielina possui fatores de

inibição da regeneração axonal. A interrupção desses fatores poderia regenerar a medula espinal.

Da Paz et al. (1992) apresentam estudo epidemiológico multicêntrico das lesões medulares. Participam do projeto 36 hospitais públicos, de sete capitais brasileiras. Demonstram a prevalência de pacientes do sexo masculino (81%), cujas causas mais frequentes são acidentes de trânsito (42%), lesões por arma de fogo (27%) e quedas (15%). Relatam que as principais complicações são úlceras de pressão (54%) e infecções urinárias (32%).

Martinez-Arizala e Green (1992) defendem que a hipotermia reduz o metabolismo e o consumo de energia nos traumas do sistema nervoso central, reduzindo as lesões secundárias da hipóxia e da isquemia. Relatam a dificuldade de embasamento científico consistente e a necessidade de realização de novos estudos experimentais.

Walker e Harris (1993) elaboram estudo randomizado, duplo-cego, com o objetivo de avaliar o efeito do GM1 administrado, pela via endovenosa, por 2 meses, em indivíduos com lesão medular crônica. A dose empregada foi de 100mg, seis dias por semana. Afirmam que há melhora no escore motor no grupo tratado com GM1, com significância estatística ($p < 0.05$).

Coombs et al. (1993) testam a administração intratecal lombar de GM1 em ovelhas. Utilizam 12 animais, submetidos à infusão diária de 100 µg ou 1mg de GM1. O grupo controle recebeu administração de solução salina. O estudo histopatológico da medula espinhal dos animais que receberam GM1 não demonstra morfologia distinta dos indivíduos controle. Ressaltam que a

ausência de déficit neurológico focal ou generalizado, alteração funcional ou vascular, conferem segurança à administração do GM1.

Constantini e Young (1994) testam a associação entre a metilprednisolona e o GM1 nas lesões medulares experimentais em ratos. Relatam que a metilprednisolona administrada em dose única de 30mg/kg, cinco minutos após a lesão, possui efeito benéfico, pois impede a hiponatremia. O GM1 aplicado isoladamente nas dosagens de 10 a 30 mg/kg não demonstra efeito satisfatório. Ressaltam que, na associação dos fármacos, o GM1 antagoniza os efeitos da metilprednisolona, portanto, eles não devem ser usados simultaneamente.

Gerhart et al. (1995) comparam os resultados do emprego de altas doses de metilprednisolona em portadores de lesão medular aguda. Selecionam 363 pacientes, divididos em 2 grupos, com ou sem administração de metilprednisolona. Os resultados não foram estatisticamente significantes entre os grupos, ao analisar a escala de Frankel.

Kameyama et al. (1995) investigam a correlação entre o exame clínico e o potencial evocado motor, em pacientes portadores de espondilose e estenose cervicais. Realizam testes em músculos alvo, submetendo-os a situações de relaxamento e contração máxima. Provam que os achados do potencial evocado motor possuem associação direta com o padrão fisiológico dos músculos avaliados.

Schneider et al. (1995) testam a segurança do emprego de GM1 ao avaliar 10 pacientes portadores de doença de Parkinson. A administração

subcutânea de 200 mg/dia foi efetuada pelos próprios pacientes, demonstrando boa tolerabilidade de segurança no tratamento. Ressaltam a importância da realização de novos ensaios clínicos.

Basso et al. (1995) recomendam a necessidade de desenvolvimento de novo modelo de avaliação locomotora de ratos, buscando facilitar a comparação dos resultados em centros de pesquisas distintos. Utilizam 85 ratos adultos, submetidos à contusão ao nível T7-T9, extraíndo o escore no pré-operatório e diariamente até a décima semana. Os escores do desenvolvimento locomotor são identificados, ranqueados e arquivados para a obtenção do padrão evolutivo. Afirmam que a escala Basso, Beattie e Bresnahan é efetiva para a avaliação da evolução após lesão medular.

Vogelsberg et al. (1997) defendem que há diminuição das funções colinérgicas dos neurônios da medula espinal durante o processo de envelhecimento. Essas funções são relacionadas às modalidades sensoriais, motoras e autonômicas. Propõem estudo experimental com o objetivo de avaliar os efeitos do GM1 em ratos senis, com idade entre 22 e 24 meses. Observam que o tratamento com GM1 melhora a atividade colinérgica nestes animais.

Wyss-Coray et al. (1997) provam que, após a lesão medular, os macrófagos produzem e secretam várias citocinas que mantêm o processo inflamatório, contribuindo direta e indiretamente para a permanência da morte celular.

Taoka e Okajima (1998) afirmam que as únicas drogas de uso clínico nos traumatismos da medula espinal são a metilprednisolona e o GM1. Sugerem que novas drogas devem ser testadas, bem como a associação da metilprednisolona com o GM1.

Curt et al. (1998) realizam estudo sobre a função da mão e membros inferiores em pacientes tetraplégicos, utilizando o protocolo ASIA e o potencial evocado motor. Advogam que o potencial somato-sensitivo pode ser utilizado, embora possua baixa precisão ao avaliar as lesões medulares que apresenta a síndrome da medula anterior. Esta limitação não se aplica ao potencial evocado motor, pois este método de avaliação emite dados precisos ao analisar músculos-alvo específicos e graduando a severidade da lesão do trato córtico-espinal. Alegam que a combinação do potencial evocado-motor e o exame clínico reproduz com alta confiabilidade, a evolução do quadro medular dos traumas espinais.

Hadjiconstantinou e Neff (1998), em revisão da literatura, sugerem evidência das propriedades neurotrópicas do GM1 *in vivo* e *in vitro*. Defendem que as ações do GM1 se assemelham às de muitos fatores neurotróficos, e que vários estudos sugerem que este gangliosídeo possui efeitos antineurotóxico, neuroprotetor e neurorestaurador.

Schnell et al. (1999) comparam a reação inflamatória pós-traumática no cérebro e na medula espinal, mediante análise tecidual quantitativa do número de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, ativação de astrócitos e

adesões moleculares. Determinam que a reação inflamatória pós-traumática medular é mais abundante que a cerebral.

Vialle et al. (1999) descrevem as alterações histológicas medulares decorrentes de lesão contusa provocada pelo sistema NYU Impactor ao nível de T9-T10 de ratos Long-Evan. Comparam as imagens da medula íntegra e pós-traumática, evidenciando nelas a presença de vacuolização, áreas de atrofia e degeneração neural. Ressaltam a possibilidade da reprodução do método em centros de pesquisas distintos.

Jeffery et al. (1999) preconizam que o transplante de células gliais em ratos tem a capacidade de reverter déficits funcionais determinados pela desmielinização.

Amar e Levy (1999) publicam importante revisão sobre a patogênese da lesão medular e as estratégias farmacológicas correntes. A divisão entre lesão primária e dano secundário está bem definida. No que tange aos agentes terapêuticos, ainda não é possível a padronização de conduta. Citam os principais agentes farmacológicos: agentes antioxidantes, radicais livres, glicocorticóides, laseróides, gangliosídeos, antagonistas dos opióides e dos receptores de glutamato e bloqueadores dos canais de cálcio. Acreditam que a associação destes fármacos pode gerar sinergismo e melhorar a resposta terapêutica no futuro.

Rodrigues (1999) padroniza modelo experimental de lesão medular contusa em ratos Wistar, obedecendo as normas padronizadas pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* – MASCIS. Prova a existência

de correlação estatisticamente significativa entre o volume da lesão e parâmetros mecânicos. Afirma que essa padronização confere credibilidade e reprodutibilidade ao método.

Barros Filho (2000) discorre sobre o tratamento medicamentoso no traumatismo raquimedular, citando as principais drogas pesquisadas: metilprednisolona, GM1, tirilazade, naloxona, nimodipina, antagonistas do N-metil-D-aspartato, 4-aminopiridina, fatores neurotróficos, anticorpos bloqueadores dos fatores inibitórios da regeneração, antioxidantes e bloqueadores de radicais livres. Enfatiza que as únicas indicadas para vítimas de lesão medular são a metilprednisolona e o GM1.

Oliveira e Langone (2000) afirmam que há grande quantidade de morte neuronal após avulsão de raízes na medula espinal. Propõem testar experimentalmente os efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios do GM1 nesta situação. Demonstram resultados estatisticamente significantes referentes ao aumento da sobrevivência dos motoneurônios. Declaram que o GM1, administrado diariamente por duas semanas após o trauma, confere proteção às células neurais, com diminuição da intensidade do processo inflamatório.

Fang et al. (2000) ressaltam a importância do GM1 na fase de diferenciação neuronal, em que o GM1 se correlaciona com as concentrações e o fluxo de cálcio no núcleo e na membrana plasmática. Concluem que as características desta inter-relação deverá ser determinada.

Silva et al. (2000) estudam os efeitos da administração neonatal de GM1 buscando avaliar o seu efeito na memória de ratos adultos e idosos. Após o nascimento, o grupo estudo recebeu injeções subcutâneas, na concentração de 10 mg/kg, 3 e 15 dias após o nascimento. Simulam diversas situações para avaliar a resposta dos animais e sugerem que o GM1 apresenta efeito na maturação do sistema nervoso central, cujos benefícios são persistentes ao longo da vida.

Pointillart et al. (2000) investigam os efeitos da nimodipina e da metilprednisolona na fase aguda do trauma raquimedular, por meio de um estudo prospectivo e randomizado. Cento e seis pacientes foram randomizados em quatro grupos: grupo metilprednisolona (30 mg/kg na primeira hora, seguido de 5,4 mg/kg por hora nas próximas 23 horas), grupo nimodipina (0,015 mg/kg por hora por 2 horas, seguido de 0,03 mg/kg por hora por 7 dias), grupo com associação das duas drogas e um grupo controle. As avaliações blindadas foram realizadas por um neurologista experiente, com seguimento de 1 ano. Afirmam que não há diferença estatisticamente significativa na evolução neurológica entre os grupos. Ressaltam que o grupo metilprednisolona apresenta maior ocorrência de infecções. Desta forma, advogam que não há benefícios do emprego de metilprednisolona e nimodipina no trauma medular agudo.

Weber et al. (2000) propõem que os anticorpos anti-GM1 podem bloquear os canais de sódio dos neurônios, diminuindo a sua excitabilidade, demonstrando a importância do GM1 na fisiologia do sistema nervoso.

Dimar et al. (2000) pesquisam os efeitos da hipotermia após a compressão e a lesão severa da medula de ratos Sprague-Dawley. Expõem resultados estatisticamente significantes nos casos de compressão leve, ao passo que nas lesões graves, a hipotermia demonstra pequeno efeito benéfico.

Geisler et al. (2001), em estudo sobre a eficácia e a segurança do GM1 na lesão medular aguda, por meio de estudo multicêntrico, incluem 760 pacientes na investigação. Quarenta e três pacientes faleceram antes da conclusão, com distribuição uniforme entre os grupos. Relatam que houve um aparente benefício do GM1 nos casos não operados, melhora da função vesical, intestinal, sensação sacral e contração anal voluntária. Enfatizam também a segurança do tratamento e a ineficácia do GM1 nas lesões completas.

Sekhon e Fehlings (2001) publicam extensa revisão sobre a epidemiologia da lesão medular aguda. Ressaltam que a incidência anual varia de 11,5 a 53,4 por milhão de habitantes, com taxa de mortalidade de 48,3 a 79% entre o acidente e o atendimento hospitalar. A prevalência média é de 583 lesados medulares por milhão de habitantes. As causas mais comuns são acidentes de trânsito (veículos, bicicletas e pedestres – 40-50%) e acidentes de trabalho (10-25%), seguidos de lesões por práticas esportivas ou recreativas (10-25%), quedas (20%) e violência (10-25%). Afirmam que o nível de lesão mais comum é o cervical (55%), seguido pelo torácico (15%), toracolumbar (15%) e lombosacral (15%). As lesões mais altas possuem

maiores taxas de mortalidade, quando comparadas às paraplegias: C1-C3 (6,6 vezes maior), C4-C5 (2,5 vezes) e C6-C8 (1,5 vez), e que 45% das lesões medulares são completas. O período médio de internação é de 171 dias nos primeiros dois anos. Os custos podem ultrapassar 2 milhões de dólares nos casos de tetraplegia. Ressaltam que, após a lesão primária, os mecanismos secundários envolvem aminoácidos, mediadores vasculares, cálcio, sódio, radicais livres, mediadores inflamatórios e apoptose.

Taoka et al. (2001) destacam a importância da cascata secundária após o trauma medular, que determina eventos sucessivos de alterações vasculares e lesões neurais. Preconizam que poucos agentes são utilizados nessas situações, devendo haver aumento da intensidade de pesquisas experimentais e clínicas, visto que somente a metilprednisolona e o GM1 são as drogas que podem ser administradas clinicamente.

Hall (2001) declara que a maioria das lesões medulares são incompletas com preservação parcial da substância branca. Assinala que o objetivo das drogas é a diminuição dos efeitos secundários, especialmente a peroxidação lipídica, buscando-se a preservação das estruturas não afetadas pelo trauma.

Hurlbert (2001) organiza revisão da literatura empregando os métodos de medicina baseada em evidências objetivando avaliar os efeitos da metilprednisolona na lesão medular aguda. Demonstra que essa droga não deve ser administrada rotineiramente nos pacientes acometidos de trauma medular contuso não penetrante, cujo uso prolongado pode ocasionar várias

complicações clínicas. Enfatiza que a metilprednisolona é uma droga sob investigação.

Young (2002) publica a padronização do NYU Impactor afirmando que é um modelo de contusão medular de ratos confiável, seguro e reprodutível. Afirma que a padronização das lesões é realizada mediante acompanhamento por software específico com conexão ao computador, que mensura a velocidade de impacto, trajetória de recuo, tempo de queda, força de impacto, dentre outras. Caso ocorra alguma discrepância entre estes parâmetros, pode-se descartar a amostra.

Goettl et al. (2003) provam que o emprego de GM1 (30 mg/kg) promove o brotamento axonal de nervos periféricos lesados em ratos Sprague-Dawley.

Tebet et al. (2003) analisam histológica e funcionalmente a atuação da metilprednisolona na lesão medular experimental em ratos. O trauma foi realizado por meio do sistema NYU Impactor, em que 12 animais receberam a droga imediatamente após a contusão. Avaliam os animais funcionalmente pela escala BBB no 2º, 7º e 14º dias de lesão. O estudo histológico foi conduzido através da descrição dos seguintes parâmetros: presença de edema, congestão, infiltrado celular, cavidades e necrose, graduando-se de 0 a 3. Concluem que os animais que receberam metilprednisolona apresentam melhora na recuperação funcional, embora não haja correlação com os achados histológicos.

Barros Filho e Silva Filho (2003) selecionam 150 portadores de lesão medular crônica a serem submetidos ao tratamento com GM1 (100 mg/dia, im.).

Previamente ao início do tratamento, analisam as concentrações de anticorpos anti-gangliosídeos, visando observar a ocorrência de efeitos colaterais durante o tratamento. Apenas 2,7% apresentam sorologia positiva para os anticorpos anti-gangliosídeo, mas sem a incidência de efeitos colaterais. Concluem enfatizando a segurança no tratamento clínico com GM1.

Hall e Springer (2004) analisam os efeitos fisiopatológicos envolvidos no trauma medular agudo. Citam a cascata de eventos moleculares associados à necrose e apoptose e as principais drogas empregadas em pesquisas clínicas (metilprednisolona, GM1, naloxeno), não havendo consenso sobre os benefícios da sua utilização

Cardenas et al. (2004) encontram taxas de 30% de rehospitalização, entre 1995 e 2002, em pacientes portadores de lesão medular, cujas principais causas são as infecções respiratórias, urinárias e as escaras.

Park et al. (2004) defendem que o acúmulo de aminoácidos induzidos pelo trauma medular, como o glutamato e o aspartado, contribuem para a morte celular secundária, propagando a degeneração da substância branca.

Ferreira et al. (2005) publicam a padronização da técnica para captação do potencial evocado motor em ratos Wistar mediante da estimulação elétrica transcraniana. Avaliaram-se 50 animais. Os registros foram obtidos por meio da estimulação elétrica transcraniana realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha, um na região frontal (ânodo) do couro cabeludo, outro na região distal (cátodo), na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea. O resultado é obtido a partir da

estimulação elétrica transcraniana, por meio de estímulo único de 0,2 ms de duração, e na captação das respostas musculares (músculos-alvos específicos) das patas dianteiras e traseiras. A latência mínima média das respostas das patas dianteiras foi de 2,5 ms e das traseiras de 6,5 ms. A amplitude média das respostas das patas dianteiras foi de 3,0mV e das traseiras 2,5mV. Provam que o método é seguro, confiável e reprodutível.

Sribnick et al. (2005) apontam a capacidade do estrógeno em reduzir infiltrado inflamatório, diminuir o nível de citocinas e reduzir a perda mielínica nas lesões medulares experimentais em ratos.

Amador e Guest (2005) enfatizam a importância do rigor científico nas pesquisas que envolvem as lesões medulares, por tratar-se de um campo ainda obscuro. Discorrem sobre as diversas modalidades terapêuticas experimentais, encorajando a realização de novos projetos de pesquisa, que foquem as suas associações.

Alisauskiene et al. (2005) propõem revisão sobre as técnicas de estimulação elétrica. O potencial evocado motor age estimulando o córtex com captação e arquivamento dos dados nos músculos-alvo contralaterais. Sugerem que a estimulação elétrica transcranial possui amplas aplicações na neurologia, na neuroreabilitação e na psiquiatria.

Hagg e Oudega (2006) discorrem sobre os eventos degenerativos e os processos espontâneos de regeneração que ocorrem após a lesão medular traumática. Enumeram como os mais importantes as respostas vasculares, a isquemia, o edema, a toxicidade, a inflamação, a desmielinização,

a degeneração axonal e a formação de tecido cicatricial. Citam como eventos regenerativos o crescimento axonal, a remielinização e a plasticidade. Indicam haver estreita correlação entre as contusões medulares experimentais e os traumas medulares humanos.

Marcon (2006) pesquisa os efeitos da administração de metilprednisolona previamente à lesão medular em ratos Wistar. Utiliza 32 animais, divididos em quatro grupos, com administração da droga imediatamente após a lesão ou quatro horas antes. As lesões são padronizadas pelo sistema NYU Impactor. Após 28 dias não se observa diferenças significativas quanto aos índices motores. Enfatiza que houve maior número de óbitos nos grupos de animais que receberam metilprednisolona previamente à lesão.

Basso et al. (2006) estudam a eficiência da escala de avaliação motora BBB em cinco espécies de ratos geneticamente modificados (C57BL/6, C57BL/10, B10.PL, BALB/c e C57BL/6x129S6 F1). Setenta e cinco animais foram submetidos a diferentes tipos de lesão medular: contusão leve, moderada, grave e transecção completa da medula. Concluem que a escala BBB para avaliação funcional é um método sensível, válido e confiável.

Fighera et al. (2006) ressaltam o efeito neuroprotetor do GM1 nas convulsões e isquemias, preconizando que a sua administração pode prevenir crises convulsivas devido à sua atuação nos receptores GABA e na bomba de sódio e potássio.

Tator (2006) elabora revisão da literatura, enfatizando o importante papel do potencial evocado somato-sensitivo na avaliação neurofisiológica de pacientes portadores de lesão medular. Assinala que o potencial evocado será indispensável como critério de inclusão, seguimento e avaliação final das pesquisas clínicas.

Thuret et al. (2006) revisam as possibilidades de intervenções terapêuticas após o trauma medular, descrevendo os transplantes de nervos periféricos, de células de Schwann, de células olfatórias, de células embrionárias do sistema nervoso central, células progenitoras neurais, terapias neuroprotetoras (eritropoietina, metilprednisolona, GM1, nimodipina, tirotropina, gaciclide), fatores de crescimento (fator neurotrófico cerebral, fator de crescimento fibroblasto, fator de crescimento neural, fator neurotrófico glial, neurotropinas 3, 4 e 5) e modificadores de matriz extracelular. Enfatizam que ainda não há consenso no emprego destas drogas, havendo necessidade de novos estudos com associações entre elas.

Trivedi et al. (2006) discorrem acerca da contradição do papel dos leucócitos nos traumas medulares. A reação inflamatória é um mecanismo de defesa do organismo, mas pode determinar aumento da gravidade das lesões medulares após o trauma. As principais células que agem nesta situação são os neutrófilos: células bem diferenciadas, com meia-vida intravascular de nove horas, atingem o primeiro pico de concentração em três dias e o segundo com várias semanas, agem fagocitando debris celulares e

recrutando macrófagos. Ativam reações inflamatórias (citocinas, proteases), responsáveis pelo dano secundário; monócitos e macrófagos: concentram-se no sítio da lesão entre sete e quatorze dias, e são responsáveis pela fagocitose. Liberam citocinas pró-inflamatórias e neurotoxinas também responsáveis pela lesão secundária; células dendríticas: exacerbam o dano secundário pela ativação de citocinas e possuem efeito benéfico ao produzirem fatores de crescimento e promotores da angiogênese. Após o trauma espinal, há diminuição da concentração de linfócitos B no baço e no sistema linfático em virtude da rápida migração para a medula. Pode promover a desmielinização. Os linfócitos T agem na progressão da lesão secundária e no processo reparador. Concluem enfatizando a complexidade dos mecanismos envolvidos nas lesões medulares, pois as células e os mediadores inflamatórios possuem funções divergentes.

Furian et al. (2007) ressaltam que a neuroproteção conferida pelo GM1 não é completamente conhecida. Empregam ratos Wistar machos (270 a 300 g). Os animais receberam solução salina ou GM1 (50 mg/Kg). Há aumento da vasolidatação cerebral, sem aumento da atividade da catalase. Em concentrações elevadas, esta peroxidase ocasiona toxicidade tecidual.

Ledeen e Wu (2007) enfatizam o papel do GM1 na regulação das trocas sódio-cálcio na membrana plasmática, conferindo efeito neuroprotetor à célula.

Ilyas e Chen (2007) administram GM1 em 11 ratos Lewis, acompanhando-os por seis meses. Apesar de serem detectados

anticorpos anti-GM1 em todos os animais, mesmo em altas dosagens, não há sinais de neuropatia.

Sokolova et al. (2007) discorrem sobre as propriedades neuroprotetoras do GM1, cuja administração nas lesões centrais pode diminuir o dano definitivo. Propõem estudar o efeito do GM1 na viabilidade das células PC12 expostas a estresse oxidativo. Estas células são utilizadas em pesquisas que envolvem a diferenciação neuronal. Afirmam que a ação protetora do GM1 é conferida pela diminuição ou abolição do efeito oxidativo através da mediação dos receptores tirosina quinase.

Priebe et al. (2007) realizam levantamento do impacto econômico das consequências geradas pelas lesões medulares. Os custos variaram de acordo com a idade, lesões associadas, comorbidades clínicas, assistência profissional, necessidade de reformas domiciliares e, sobretudo, o nível de lesão. Demonstram que os custos do primeiro ano e dos anos subsequentes nas tetraplegias altas é de 740 mil e 130 mil dólares, respectivamente, ao passo que os custos dos paraplégicos são 270 mil e 27 mil dólares.

Rabeh (2007) publica pesquisa sobre os cuidados domiciliares dos lesados medulares. Afirma que 50% apresentam dependência mínima, 27,3% dependência máxima e 22,7% dependência completa. O tempo total de cuidado variou de 4 a 15 horas diárias, com média de 9,63 horas para os lesados cervicais, 7,8 horas para os torácicos e 4 horas para os lesados lombares.

Raichle et al. (2007) discorrem sobre a prevalência da dor crônica após lesão medular, bem como as suas implicações nas atividades diárias. Foram enviados 341 questionários para pacientes com sequela de lesão medular, sendo incluídos no estudo 127 indivíduos. O padrão algico mais comum são as dores nos ombros (61,4%), seguido pela lombalgia (57,5%), com alta prevalência (98,4%) cujas intensidades foram uniformemente distribuídas: leve (36,2%), moderada (30,7%) e severa (31,5%). Afirmam que há relação direta entre a alta intensidade da dor com déficit de saúde mental. Enfatizam a necessidade de tratamentos específicos para o controle da dor, especialmente nos casos mais severos.

Rossignol et al. (2007) publicam resumo de um simpósio que debateu os principais tópicos que envolvem a lesão medular traumática: fisiologia dos danos primário e secundário, administração de medicamentos ou elementos celulares e reabilitação. Discutem as possíveis ações inibitórias e excitatórias promovidas pelo sistema imunológico, as drogas e terapias celulares, a plasticidade do controle locomotor. Declaram que ainda não há bases científicas sólidas para a elucidação dos eventos fisiopatológicos e seu tratamento farmacológico ou por terapias celulares nessas situações. Enfatizam a necessidade de novos estudos experimentais.

Sodré (2007) discorre sobre a disfunção sexual em mulheres com lesão medular, investigando 51 casos. Relata que a disfunção sexual possui alta prevalência (90%), constituída pelas disfunções do orgasmo (90%), do desejo / frequência (76%), do interesse sexual (72%) e da excitabilidade (92%).

Afirma que houve relatos das alterações de sensibilidade, da vida conjugal, da libido, da lubrificação vaginal, da percepção da autoimagem, da presença de dor neuropática, homossexualismo, expectativa de vida e religiosidade. Conclui enfatizando a complexidade do tema.

Brito (2007) apresenta estudo no qual afirma que 43% dos indivíduos com lesão medular apresentam distúrbio do sono.

Cristante (2007) propõe avaliar o efeito da infusão de células progenitoras indiferenciadas autógenas no tratamento de 39 pacientes com lesão medular crônica. Após dois anos e meio de seguimento, demonstra melhora no potencial evocado somato-sensitivo ou da latência para a resposta cortical a partir de estímulo periférico.

Ho et al. (2007) investigam os dados epidemiológicos dos indivíduos acometidos de lesão medular. Demonstram que os acidentes com veículos motorizados são responsáveis por 50,4% dos casos, seguido pelas quedas (23,8%), violência (11,2%) e prática esportiva (9%).

Lidal et al. (2007b) publicam estudo retrospectivo sobre as causas de mortalidade após a lesão medular. Analisam 387 pacientes, advindo 142 óbitos no período da avaliação (1961-2002). Enfatizam que as principais causas de morte são as doenças respiratórias, como pneumonia e influenza (16%), doenças cardiovasculares isquêmicas (13%) e doenças urogenitais (13%). Citam os principais fatores de risco: idade avançada, tetraplegia, lesão medular completa, doença cardiovascular prévia, dependência de álcool e/ou drogas e doença psiquiátrica.

Lidal et al. (2007a) publicam revisão da literatura a cerca do retorno ao trabalho de pessoas que sofreram lesão medular traumática. Os artigos demonstram taxas de retorno variando de 21 a 67%, entre os indivíduos que trabalhavam à época do acidente. Afirmam que 11,5% a 74% dos pacientes com lesão medular exercem atividades laborativas. Os principais obstáculos referentes ao emprego foram as dificuldades de transporte, limitações físicas, falta de experiência, educação ou treinamento e obstáculos arquitetônicos.

Souza (2007) apresenta estudo demonstrando a capacidade das neuregulinas 1-alfa e 1-beta de potencializar a regeneração de nervos periféricos. Sugere que essas drogas devem ser testadas nas lesões do sistema nervoso central e em associação com outros fatores neurotróficos.

Carvalho et al. (2008) testam experimentalmente a metilprednisolona (MP) e o GM1 na lesão medular em ratos. Formam os grupos MP, GM1, MP associado ao GM1 e controle. A dose empregada de GM1 foi de 30 mg/kg de peso. Afirmam que a administração somente de GM1 ou MP não determina melhora da função motora, ao passo que a associação de ambas confere melhor resultado funcional.

Banerjea et al. (2008) discorrem sobre as complicações macrovasculares, geralmente associadas à diabetes que elevam a morbidade e a mortalidade. Afirmam também que na fase crônica, os pacientes portadores de lesão medular estão propensos a desenvolver doenças psíquicas. O distúrbio psiquiátrico mais comum é a depressão, embora pode-se caracterizar o isolamento social, a perda da auto-estima e a

sensação de inferioridade, como alterações comportamentais não necessariamente patológicas.

Singh et al. (2008) publicam estudo prospectivo sobre a qualidade de vida de pacientes portadores de seqüela de lesão medular. Afirmam que os problemas mais comuns que acometem esta população são a espasticidade (60%), alterações gastrointestinais (56%), vesicais (44%), dor neuropática (42%) e escaras (36%). Sugerem a necessidade de melhoria nos programas de reabilitação.

Maikos et al. (2008) apresentam novo equipamento capaz de realizar lesões espinais traumáticas experimentais em ratos, empregando-se como base o modelo BBB. Enfatizam a possibilidade de obtenção de imagens 3D da medula e de provocar lesões mais efetivas nas substâncias branca ou cinzenta.

Krause et al. (2008) ressaltam a redução da expectativa de vida em pacientes portadores de lesão medular, cuja maior probabilidade de óbito se encontra no primeiro ano após a lesão. Concluem que as principais causas de morte são presença de úlceras de pressão, infecções, internações em UTI, amputações, fraturas e depressão maior.

Tuono (2008) apresenta importante estudo sobre o perfil das internações hospitalares por trauma de coluna vertebral em hospitais públicos no Brasil. Realiza avaliação retrospectiva, de 2000 a 2005, mediante coleta de dados contidos no banco do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde. Demonstra que as internações por trauma de coluna correspondem

a 0,2% do total de internações, cerca de 2,7% das internações por causas externas e 3,5% das lesões traumáticas. Há predominância do sexo masculino, com idade entre 20 e 29 anos. Ressalta que o nível lombo-sacral responde por 60% do total de internações por trauma de coluna, seguido pelo cervical (28%). Nesse nível, ocorre a maior proporção de lesões medulares (45,8%). O comprometimento medular ocorre em 16% das fraturas vertebrais. As quedas foram responsáveis por 40% das internações, seguidas pelos acidentes de trânsito (30%), outros acidentes (19%) e tentativas de homicídio (7%). O tempo médio de permanência é de 8,6 dias, com diferenças significativas relacionadas ao nível de lesão e ao comprometimento medular. Os custos das internações por trauma de coluna são maiores que a média das outras internações. As taxas de internações foram crescentes: de 15% em 2000 para 22,9% em 2005 por 100.000 habitantes, perfazendo um aumento de 52,7%.

Noonam et al. (2008) apresentam estudo retrospectivo formado por 70 pacientes com lesão medular tratados entre 1994 e 2002, com os seguintes critérios de inclusão: idade acima de 18 anos, admissão nas primeiras 72 horas do trauma, pacientes com arquivo contendo exame inicial detalhado, acesso a centro de reabilitação, seguimento mínimo de dois anos e ausência de comorbidade maior. Discutem a prevalência de dor neuropática (39%), espasticidade (59%), alterações vesicais (25%), intestinais (17%) e disfunção sexual (27%). Concluem sugerindo realização de estudos com maior seguimento.

Hanley et al. (2008) conduzem pesquisa sobre as modificações do padrão da dor crônica em indivíduos com lesão medular. Incluem no estudo os pacientes que apresentam dor crônica e que completaram o seguimento de 6 meses. Demonstram que, em 28% dos pacientes, há aumento da intensidade da dor em 30% ou mais nos últimos seis meses, ao passo que em 20% dos casos há redução de 30% ou mais da intensidade da dor. Não observam diferença estatisticamente significativa. Sugerem que, nos casos álgicos mais intensos, há correlação direta com aumento das enfermidades psicológicas.

Hita (2008) testa os efeitos da neurotropina-4 na lesão medular em ratos. Ressalta que essa proteína participa da maturação e do desenvolvimento do sistema nervoso. Conclui que os animais tratados com neurotropina-4 apresentam melhora da função motora, com diminuição dos efeitos secundários do trauma medular.

Qiao et al. (2008) apontam o importante papel do GM1 na função dos nódulos de Ranvier das fibras mielinizadas. Enfatizam que GM1 é fundamental na modulação elétrica e na excitabilidade neuronal.

Barros Filho e Molina (2008) propõem estudo da sensibilidade e da reprodutibilidade da escala funcional Basso, Beattie, Bresnahan (BBB). Empregam 30 ratos Wistar, divididos em três grupos e submetidos à lesão medular leve, moderada ou grave. Realizam gravações em vídeos durante o seguimento de 28 dias, onde seis observadores preenchem a escala BBB. Afirmam que a escala BBB possui melhor reprodutibilidade e sensibilidade nos traumas mais leves.

Duchemin et al. (2008) ressaltam a importante ação do GM1 na promoção do crescimento neuronal, na diferenciação, na sobrevivência, na expressão fenotípica e na restauração funcional pós-traumática. Utilizam ratos Sprague-Dawley para demonstrar que o GM1 induz a ativação da PI3-quinase, que leva à proteção do tecido neural.

Benson e Namjoshi (2008) publicam extensa revisão da literatura, propondo o estado da arte da via transcutânea de administração de proteínas e peptídeos. Classificam os diversos métodos em quatro grandes grupos: formulações otimizadas (modificação molecular ou conjugação, nanopartículas ou vesículas encapsuladas e os potencializadores químicos da absorção); aplicação direta de energia (iontoforese, eletroporação, sonoforese, ondas fotomecânicas); penetração direta no estrato córneo (microagulhas, propulsão); ablação do estrato córneo (laser, radiofrequência, poração térmica). Ressaltam que a alta energia emitida pelo laser diretamente na superfície da pele possui a capacidade de remover o estrato córneo, aumentando a permeabilidade dérmica e consequentemente a absorção de drogas. Afirmam que essa técnica possibilita a administração de pequenas e grandes moléculas, embora o seu uso clínico necessite de maior embasamento científico. Concluem exaltando a possibilidade de combinações dos diferentes métodos terapêuticos.

Akdemir et al. (2008) elaboram estudo para testar os efeitos neuroprotetores da SJA6017, um inibidor da calpain. Esta protease juntamente com a caspase são responsáveis pela apoptose após a lesão

medular aguda. Testam a SJA6017 em ratos Wistar, um minuto após o trauma medular. Demonstraram que o grupo de animais tratados apresenta melhora da avaliação funcional e redução das alterações histológicas.

Ha e Kim (2008) apresentam estudo que demonstra os efeitos positivos do emprego da hipotermia em ratos submetidos a lesão medular, determinado pela significativa redução da apoptose dos neurônios e células gliais.

Kabatas et al. (2008) pesquisam a presença de anormalidades gastrointestinais resultantes de lesão medular. Trinta e cinco ratas Sprague-Dawley foram submetidas a contusão medular ao nível de T10, divididas em dois grupos e submetidas a avaliação em 48 horas ou 4 semanas. Antes da eutanásia administrou-se por via oral solução de fenol vermelho e procedeu-se ao estudo do sistema gastrointestinal. Observa-se diminuição da espessura da mucosa do estômago em 17,17% e 28,16% nos grupos 48 horas e 4 semanas, respectivamente, em relação ao grupo controle, bem como redução espessura do jejuno em 28,56% e 33,45%, do íleo em 18,14% e 21,16%. Finalizam sugerindo novas pesquisas sobre o tema.

Campos et al. (2008) elaboram estudo epidemiológico demonstrando que o sexo masculino apresenta incidência de 86% dos traumatismos da coluna vertebral. As causas mais comuns nos homens são as quedas (40%), acidentes automobilísticos (25%) e ferimento por arma de fogo. Enfatizam que 50% das lesões em mulheres são ocasionadas por acidentes automobilísticos. A idade mais acometida situa-se entre 20 e 40 anos.

Marcon (2009) testa os efeitos do GM1 e da câmara hiperbárica nas lesões medulares experimentais em ratos Wistar. Os animais foram submetidos a lesão seguindo o protocolo MASCIS, a altura de 12,5 mm. Os grupos 1 e 3 receberam GM1, na concentração de 30 mg/kg durante 7 dias, com início 24 horas após o trauma. Demonstram que houve melhora dos índices motores com a utilização do GM1, mas sem diferença estatisticamente significativa, e que o efeito positivo GM1 é antecipado com o emprego da câmara hiperbárica.

Chinnock e Roberts (2009) revisam a literatura na busca de evidência para o emprego clínico do GM1. Afirmam que existem poucos ensaios randomizados publicados passíveis de análise mais completa. Assinalam que ainda não há evidência de que o tratamento de pacientes com lesão medular com GM1 reduz a taxa de mortalidade ou melhoram a qualidade de vida e a recuperação das funções motoras.

Cristante et al. (2009a) estudam os efeitos das vitaminas C e E após trauma medular em 40 ratos Wistar. Afirmam que essas vitaminas possuem efeito antioxidativo, com possível capacidade de neutralizar a cascata secundária pós-traumática. A lesão medular foi realizada pelo sistema NYU Impactor. Os animais foram submetidos a elevadas concentrações de vitaminas C e E individualizadas e associadas, não demonstrando resultados estatisticamente significativos na escala funcional Basso, Beattie e Bresnahan, apesar do estudo histológico sugerir menor reação inflamatória.

Cristante et al. (2009b) avaliam, através de potencial evocado somatosensitivo, o efeito da infusão de células tronco autógenas indiferenciadas no tratamento de pacientes portadores de lesão medular crônica. Incluem 39 pacientes com, no mínimo, dois anos de lesão medular completa cervical ou torácica, realizando-se injeção das células criopreservadas no sítio da lesão por meio de arteriografia. Afirmam que, após dois anos e meio de seguimento, 66,7% dos pacientes apresentaram recuperação da resposta somatosentiva periférica.

Cristante et al. (2010) investigam prospectivamente a viabilidade do transplante de células do sistema nervoso fetal para o sítio de lesão medular em ratos. Após 48 horas, são realizados os estudos histológicos. Enfatizam que, em 60% dos casos, as células fetais transplantadas permanecem viáveis, com presença de maior reação inflamatória circunvizinha.

Rodrigues et al. (2010) publicam a padronização da lesão medular em ratos Wistar, analisando as contusões produzidas em 30 animais desta espécie, por meio do sistema NYU Impactor. A graduação das lesões foi obtida pela divisão dos animais em três grupos de 10, com queda do peso das alturas de 12,5, 25 e 50 mm. Realizou-se a eutanásia após 48 horas da lesão. Afirmam que nos seguintes parâmetros, não houve significância estatística entre os 3 tipos de lesão: na distribuição de frequência do sexo, idade, peso, do pH, da pO_2 (mmHg), da pCO_2 (mmHg), da saturação de O_2 (%) e da pressão sanguínea média (mmHg). Demonstram significância estatística na análise descritiva do volume de lesão plasmático por litro, do

volume de lesão intracelular por litro, do volume de lesão tecidual por litro, da velocidade do impacto, da deformação máxima e da taxa de média de compressão. Enfatizam que houve padronização da lesão medular em ratos Wistar, de acordo com os parâmetros determinados pelo MASCIS.

Bachhav et al. (2010) publicam estudo com o objetivo de avaliar a efetividade do emprego do laser, previamente à administração de lidocaína na pele. Utilizam pele da orelha de suínos submetidos a diferentes intensidades de raios (4,53, 13,59, 22,65, 45,3, 90,6 e 135,9 J/cm²). As lâminas foram preparadas com hematoxilina-eosina, com cortes histológicos de 5µm. Observam a formação de poros profundos, que facilitam a absorção da lidocaína. Enfatizam a necessidade de realização de novos estudos.

Dietz (2010) discorre sobre as escassas modalidades terapêuticas nas lesões medulares, preconizando a realização de novas pesquisas sobre esse tema desafiador.

Santos et al. (2010) apresentam, no Congresso Europeu de Neurociências, estudo no qual pesquisam os efeitos do *Laser Ice Med*[®] associado ao GM1 no trauma espinal e nas lesões de nervos periféricos de ratos Wistar. Administraram GM1, diariamente, pela via transdérmica por 30 dias. Afirmam que as avaliações funcionais e histológicas dos nervos ciáticos e das medulas espinais demonstram sinais de regeneração superiores ao grupo controle. Ressaltam a necessidade de realização de novas pesquisas.

Freund et al. (2011) estudam as mudanças estruturais e funcionais do cérebro e medula cervical após lesão medular. As mudanças no córtex demonstradas nas imagens de ressonância nuclear magnética funcional indicam correlação com a gravidade do acometimento medular, demonstrada pela alteração da área de substância cinzenta do córtex motor correspondente aos membros inferiores (até 30%). Consideram que os parâmetros de imagem serão progressivamente mais utilizados nos ensaios clínicos.

Galvão et al. (2011) avaliam os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica após lesão medular em ratos. A oxigenoterapia hiperbárica é uma modalidade terapêutica fundamentada na obtenção de pressões parciais elevadas de oxigênio tecidual, buscando a inalação de oxigênio puro em uma câmara com pressão maior que a atmosférica. Utilizam 17 ratos Wistar machos em que o grupo estudo recebeu oxigenoterapia hiperbárica por uma hora diária, por um período de 30 dias. Realizou-se o estudo motor pela escala BBB, nos dias 2, 9, 16, 23 e 30 após a lesão. Demonstram diferença significativa, a favor do grupo estudo, apenas nas fases iniciais da avaliação funcional. O exame histopatológico não revela diferença entre os grupos estudo e controle.

Santos et al. (2011) publicam artigo no qual analisam o modelo experimental de lesão medular, preconizada pelo protocolo internacional MASCIS, e sua correlação com a escala Basso, Beattie e Bresnahan. Concluem que o modelo proposto é reproduzível, e sua padronização contribui para o avanço da pesquisa experimental multicêntrica.

Bachhav et al. (2011) pesquisam sobre o emprego do laser na administração transdérmica de diclofenaco. Testam a sua absorção em pele suína e humana, em solução aquosa e de gel a base de propilenoglicol. Após 24 horas, demonstram efeito cumulativo de diclofenado, estatisticamente superior ao grupo controle. Enfatizam o grande potencial terapêutico desse método.

Kalluri e Banga (2011), após revisão da literatura, discorrem sobre as diversas modalidades de administração transdérmica de proteínas. Citam a iontoforese, microagulhas, ablação térmica, ablação por radiofrequência, laser, sonoforese e sistemas em jato. A técnica laser assistida caracteriza-se pela abrasão do estrato córneo, cujo feixe aquece a superfície da pele, causando rápida evaporação das moléculas de água criando microcanais na epiderme. Descrevem ensaio clínico em que 12 voluntários foram submetidos à laserterapia, em que mais de 90% não reportaram mínimo desconforto. Ressaltam a segurança e a baixa morbidade da técnica.

Fouad et al. (2011) descrevem os aspectos envolvidos na plasticidade neuronal, essencial para a melhora funcional dos lesados medulares, visto que não há tratamento efetivo nos casos de lesões completas.

4 MÉTODOS

O protocolo desta pesquisa (IOT – 695) foi avaliado e aprovado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.1 Modelo experimental de lesão medular

4.1.1 Animais de experimentação

Foram selecionados 40 ratos da raça Wistar, machos, adultos jovens, com idade de 20 a 21 semanas, com peso de 300 a 340 g, oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram avaliados, no momento da recepção, observando-se o estado clínico geral e a motricidade. Foram distribuídos até 5 ratos por gaiola (40 x 60 cm). Os animais foram mantidos em condições padronizadas de higiene, ciclo claro-escuro, hidratação e alimentação, conforme rotina do Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos – LETRAN – do Instituto de Ortopedia e

Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.1.2 Critérios de inclusão

- a) ratos da raça Wistar;
- b) machos;
- c) adultos jovens (idade entre 20 e 21 semanas de vida);
- d) peso entre 300 e 340 gramas;
- e) motricidade normal (movimentos da cabeça, pescoço, patas dianteiras e traseiras e rabo);
- f) bom estado geral (pelagem, coloração, nutrição).

4.1.3 Critérios de exclusão

- a) autofagia ou mutilação de patas;
- b) anomalias macroscópicas da medula, observadas na necrópsia;
- c) alteração do padrão gráfico pós-lesão gerado pelo NYU Impactor;
- d) ausência de paraplegia na primeira avaliação locomotora.

4.1.4 Formação dos grupos experimentais

Os animais foram separados por sorteio em quatro grupos com 10 animais cada:

- Grupo 1: foi formado por ratos submetidos à lesão medular moderada, através de contusão provocada por queda de haste do sistema *NYU Impactor®* (*New York University Spinal Cord Contusion System – Impactor*), a 25 mm de altura, submetidos diariamente a 0,2 ml de soro fisiológico pela via intraperitoneal, por 42 dias;
- Grupo 2: os ratos foram submetidos à mesma lesão, com administração diária de 30 mg/kg de GM1, diluído em 0,2 ml de soro fisiológico, via intraperitoneal, por 42 dias;
- Grupo 3: os ratos foram submetidos à mesma lesão, com aplicação diária de Laser Ice sem GM1, sobre a pele por 3 minutos, por 42 dias;
- Grupo 4: os ratos foram submetidos à mesma lesão, com aplicação diária de Laser Ice com GM1 na concentração de 30 mg/kg por dia, sobre a pele por 3 minutos, por 42 dias.

A dose de GM1 administrada nos animais do grupo 4 foi calculada de acordo com o tempo de duração de dissolução do gel aquoso contido no tubo do Laser Ice e o número de animais tratados por cada tubo. Definiu-se a concentração de 30 mg/kg ao dia.

O GM1 utilizado foi doado pela empresa TRB Pharma.

4.1.5 Protocolo de Anestesia

Foram anestesiados os ratos com 55 a 75 mg/kg com pentobarbital intraperitoneal. O efeito da anestesia foi obtido em 5 minutos após a aplicação, com duração mínima de 60 minutos. Confirmou-se o efeito da anestesia observando-se a ausência dos reflexos da córnea e de reação à compressão da cauda.

4.1.6 Procedimento cirúrgico

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região dorsal, seguida por antissepsia com clorexidine. Realizou-se incisão longitudinal paramediana na região dorsal, ao nível de T7 a T12, aproximadamente a 10 mm da linha média, seguindo-se a dissecação do subcutâneo correspondente, abordando a coluna vertebral. Os processos espinhosos de T8 e T11 foram dissecados para a colocação das pinças de preensão do NYU Impactor (Figura 1). Procedeu-se à ressecção dos processos espinhosos de T9 e T10 seguida pela laminectomia e exposição da medula espinal (Figura 2).

Figura 1 - Exatificação dos processos espinhos das vértebras T-8, T-9, T-10 e T-11

Figura 2 - Demonstração da medula espinhal, ao centro

4.1.7 Lesão medular

Adotou-se o modelo multicêntrico de lesão medular *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS) padronizado para ratos Wistar (Rodrigues, 1999).

O equipamento NYC Impactor é formado por:

- a) base de posicionamento acoplada à torre contendo a haste;
- b) dispositivos de instrumentação;
- c) interface com saída paralela e temporizador;
- d) microcomputador PC compatível;
- e) vídeo monitor;
- f) software específico (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Esquematização do Sistema NYU Impactor

Figura 4 - Sistema NYC Impactor

Seguiu-se o protocolo de lesão medular moderada, realizada pelo equipamento computadorizado NYU Impactor. Essa lesão foi provocada pelo trauma contuso proveniente do impacto da queda livre de uma haste de 10 g, a altura de 25 mm, diretamente sobre a medula espinal do animal (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5 - Posicionamento do animal para a realização da contusão medular

Figura 6 - Graduação da altura da haste

Figura 7 - Lesão realizada após queda da haste, captada por potenciômetro óptico

A lesão medular foi realizada seguindo as orientações, procedimentos, controles, monitorização, cuidados, limpeza e esterilização da haste, conforme consta no seu manual, e recomendados por Rodrigues (1999).

Após cada lesão, observou na tela do computador o gráfico gerado pelo procedimento, avaliando:

- a) a curva de posição da haste de impacto;
- b) a curva de velocidade da haste de impacto;
- c) a curva tangente da velocidade de impacto;
- d) o ponto do impacto;
- e) a altura máxima;
- f) a inflexão;

- g) a linha base;
- h) a curva de posição vertebral;
- i) a curva de posição do impacto vertebral (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Esquematização dos dados do impacto

Figura 9 - Formação gráfica dos dados do impacto

Um dos critérios de exclusão adotados refere-se à formação gráfica fora dos padrões esperados. Esta conduta proporciona garantia de uniformidade das lesões.

A Figura 10 demonstra o sítio da lesão após o trauma.

Figura 10 - Hemorragia pós-traumática

4.1.8 Procedimento após a lesão

Após serem retirados do equipamento, os animais foram colocados sobre uma superfície levemente aquecida, procedendo-se à inspeção do sítio da lesão e da ferida operatória, hemostasia, quando necessária, lavagem com soro fisiológico à temperatura ambiente, aproximação dos planos musculares e sutura da pele com nylon monofilamentado 3.0.

Em seguida, os animais foram transferidos para câmaras de recuperação com temperatura de 25 a 28° C, durante 30 minutos.

Realizou-se massagem abdominal para esvaziamento da bexiga.

4.1.9 Antibioticoterapia

Todos os animais foram submetidos à administração subcutânea de 25 mg/kg de cefalotina (Keflin Neutro[®], Ely Lilly) imediatamente após a lesão, e diariamente, por 7 dias, com o objetivo de reduzir a possibilidade de infecção na ferida cirúrgica e nas vias urinárias.

4.1.10 Manutenção

Os animais foram mantidos em gaiolas (40 x 60 cm), em grupos de até 5 ratos, nas mesmas condições, de acordo com a padronização do

LETRAN (ração e água *ad libitum*, trocas periódicas de maravalha, limpeza e higienização das gaiolas).

Quando submetidos a avaliações funcionais pela escala BBB, os ratos eram avaliados quanto à presença de infecções, mutilações ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações).

4.2 Tratamento medicamentoso e aplicação do Laser Ice

Administraram-se diariamente 0,2 ml de soro fisiológico, por via intraperitoneal, nos animais do grupo 1.

Os ratos do grupo 2 receberam, também por via intraperitoneal, GM1 na concentração de 30 mg/kg, diluído em 0,2 ml de soro fisiológico, por 42 dias.

Os ratos dos grupos 3 e 4 foram submetidos a sessões diárias de laser, com duração de 3 minutos.

O equipamento utilizado era formado por um gerador interligado ao dispositivo de aplicação por um cabo transmissor de fonte emissora dos raios laser (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Equipamento Laser Ice

Figura 12 - Demonstração do raio laser

Nesse dispositivo, acoplam-se um tubo preenchido por gel de base aquosa, congelado. A aplicação do laser foi realizada por um período de 3 minutos por animal (Figura 13).

Figura 13 - Aplicação do Laser Ice. Observe a solução congelada em contato com o rato

No grupo 4, o GM1 foi misturado ao gel no dia anterior à aplicação. A quantidade de GM1 aplicada por animal foi calculada baseando-se em dois quesitos: concentração de 30 mg/kg e tempo de aplicação do laser. Desta forma, pode-se obter a administração da posologia desejada.

4.3 Protocolo de avaliação funcional pela escala BBB

Todos os animais foram submetidos à avaliação locomotora nos seguintes dias pós-operatórios: 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º.

A recuperação locomotora após o trauma medular foi avaliada pela escala Basso, Baettie, Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995), adotada pelos centros de pesquisas que integram o MASCIS e pelo LETRAN.

Esta escala permite avaliar o aparelho locomotor de forma objetiva, simples, rápida e precisa, mediante critérios observacionais.

Esse procedimento foi realizado colocando-se o rato do interior de uma caixa de observação de 80 x 80 cm, com paredes de 17 cm de altura, forrada com campo cirúrgico azul.

Os dados foram analisados e anotados em formulário próprio. Avaliaram-se os movimentos da pata traseira (quadril, joelho e tornozelo), as posições do tronco e do abdome, o balanço (deslocamento da pata), o modo de contato da pata com o solo e a liberação, os dedos, a coordenação, posição da cauda dos lados direito e esquerdo.

Os seguintes dados eram anexados ao formulário: identidade (tipo e coloração das marcas na cauda), número de dias pós-operatórios, comentários (Anexo I).

A avaliação de cada animal foi conduzida por dois observadores, simultaneamente, adequadamente treinados, neutros, sem conhecimento do grupo de origem do animal, para que não houvesse interferência nos resultados. A pontuação da escala BBB varia de 0 a 21 para cada lado (direito e esquerdo). A duração média da avaliação era de 4 a 5 minutos por animal (Anexos II e III). Foi registrado o menor valor observado, desprezando-se o maior, na ausência de consenso. As pontuações estão apresentadas no ANEXO IV.

4.4 Avaliação pelo potencial evocado motor

Os animais foram submetidos novamente ao procedimento anestésico com a dose de 55 a 75 mg/kg de pentobarbital, via intraperitoneal. Esta avaliação segue o protocolo padronizado por Ferreira et al. (2005).

Os equipamentos necessários para a realização desse exame consistem em:

- a) um 1 aparelho de eletromiografia de 4 canais;
- b) dois eletrodos de agulhas monopolares do tipo *corkscrew*, para estimulação transcraniana;

- c) um eletrodo de agulha monopolar para ser utilizado como terra;
- d) quatro pares de eletrodos de agulhas monopolares utilizados na captação das respostas motoras nos músculos-alvo das patas dianteiras e traseiras.

A captação das respostas musculares foi efetuada com a colocação de pares de eletrodos de agulha monopolar (captador e referência), das patas dianteiras e traseiras. O eletrodo terra foi colocado na região lombar através de um eletrodo de agulha monopolar.

A estimulação elétrica transcraniana foi realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha tipo *corkscrew*, na pele da cabeça, nas regiões frontal (ânodo) e occipital (cátodo), na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea. Após o estímulo, as respostas foram captadas das patas dianteiras e traseiras (Figuras 14 e 15). Ver anexos V, VI, VII, VIII.

Figura 14 - Implantação dos *corkscrew* e dos eletrodos

Figura 15 - Posicionamento para a realização do estímulo

4.5 Eutanásia

Os animais do experimento foram submetidos à eutanásia conforme legislação vigente e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA (1999).

A dose letal de pentobarbital empregada foi de 140 mg/Kg, via intraperitoneal.

4.6 Exame necroscópico e anatomopatológico

Foram realizados os exames necroscópicos observando-se a possibilidade de alterações macroscópicas, fora dos padrões normais. Esses exames foram efetuados após a eutanásia ou a morte dos animais durante o período da pesquisa, como por exemplo, por autofagia (Figura 16).

Figura 16 - Ratos excluídos por autofagia ou canibalismo

A coluna vertebral dos ratos submetidos à eutanásia na sexta semana foi abordada por incisão longitudinal, sendo removida entre os segmentos T8 e T12. Foram retiradas as estruturas ósseas e de partes moles, com auxílio de saca-bocado, até a exposição completa da medula espinal.

Procedeu-se à avaliação macroscópica da medula, observando-se a presença de possível anomalia (critério de exclusão).

Em seguida, foi feita incisão longitudinal ventral, com toracotomia e laparotomia, inspecionando-se os pulmões (infecções, derrames) e o abdômen, à procura de alterações, visceromegalias, tumorações ou outras alterações.

A medula extraída foi identificada, acondicionada individualmente em frasco contendo formaldeído a 10%, e encaminhada para o Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O estudo anatomopatológico foi realizado por meio de avaliação microscópica das lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE).

Foram feitos cortes histológicos no plano axial do segmento medular, com espessura de 2,0 mm, um centímetro proximal e um distal ao centro da lesão. Os segmentos foram processados e desidratados em sequência de álcoois, seguindo-se a diafanização em xilol, e incluídos em parafina. Foram realizados cortes histológicos de cinco micra de espessura em micrótomo, de

5,0 mm proximal a 5,0 mm distal ao centro da lesão. Esse material então foi fixado em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina-eosina.

Desta forma, foram preparadas três lâminas de cada medula, nomeando-as da seguinte maneira: A: região proximal à lesão; B: centro da lesão; C: região distal à lesão.

Esse material foi avaliado separadamente pelo Serviço de Patologia do IOT, com documentação da graduação de cada lâmina, e com a seguinte classificação : 0 – ausente; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 – acentuado, seguindo os parâmetros que se seguem:

- a) necrose;
- b) hemorragia;
- c) hiperemia;
- d) degeneração da substância nervosa (cística);
- e) infiltrado celular.

Os avaliadores não foram informados quanto ao grupo de origem dos animais (avaliação cega) (ANEXO IX).

4.7 Análise estatística

4.7.1 Avaliação funcional

Os valores médios dos escores BBB foram comparados com uso de um modelo de efeitos mistos com dois fatores: **grupo** (1, 2, 3, 4) e **semana de avaliação** (1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a), considerando medidas repetidas ao longo das semanas. A existência de um possível efeito de interação entre esses fatores também foi avaliada. O modelo de efeitos mistos foi ajustado considerando matrizes de covariâncias iguais nos diferentes grupos e com forma não estruturada.

4.7.2 Potencial evocado

Inicialmente, as distribuições das medidas da amplitude e da latência nos quatro grupos de estudo foram comparadas com uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em seguida, um modelo de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as médias das amplitudes e das latências nos diferentes grupos.

Nota-se que as medidas analisadas correspondem às médias dos valores observados nas patas traseiras esquerda (PTE) e direita (PTD) de cada animal.

4.7.3 Dados histológicos

Os dados histológicos correspondem às variáveis: necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância e infiltrado celular.

Para cada uma destas variáveis e cada uma das três regiões da coluna (nomeadas por A, B e C), foram calculadas os índices de escores ausentes, discretos, moderados e intensos segundo os grupos de estudo. A associação entre o nível de escore e os grupos foi avaliada por meio do teste exato de Fisher.

Neste estudo, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

No grupo 1 ocorreram dois óbitos (um na primeira e um na última semana); no grupo 2 verificaram-se três óbitos (um na primeira, um na segunda e um na terceira semana); no grupo 3 também houve três óbitos (dois na segunda e um na quinta semana); no grupo 4 ocorreu apenas 1 óbito na penúltima semana.

Foram avaliados 31 animais, com peso médio de 347 g, variando de 311 g a 402 g, distribuídos da seguinte forma:

- a) Grupo 1: oito animais;
- b) Grupo 2: sete animais;
- c) Grupo 3: sete animais;
- d) Grupo 4: nove animais.

5.1 Avaliação funcional

A Tabela 1 apresenta medidas descritivas do escore BBB para cada grupo de estudo e semana de avaliação.

Os valores médios estão demonstrados na Figura 17.

O ajuste do modelo indicou efeito significativo de interação² entre grupo e semana, com $p < 0,001$.

Tabela 1 - Medidas descritivas para o escore BBB, segundo grupo e semana de avaliação

Grupo		Semana de avaliação					
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Grupo 1 (N=8)	Média	1,3	1,8	5,8	7,5	9,8	14,8
	Desvio padrão	1,6	1,7	2,3	2,4	3,2	4,2
	Mediana	0,5	2,0	5,0	7,0	9,5	15,0
	Mínimo	0	1	4	7	8	7
	Máximo	4	4	11	13	15	20
Grupo 2 (N=7)	Média	0,7	2,3	5,4	7,4	9,0	12,3
	Desvio padrão	1,5	2,3	1,9	3,3	4,4	4,2
	Mediana	0,0	3,0	6,0	7,0	9,0	13,0
	Mínimo	0	0	3	3	4	5
	Máximo	4	5	8	13	15	17
Grupo 3 (N=7)	Média	0,6	2,7	5,1	7,3	7,7	11,4
	Desvio padrão	1,5	2,0	2,6	3,3	4,5	4,9
	Mediana	0,0	3,0	6,0	6,0	6,0	13,0
	Mínimo	0	0	0	3	2	4
	Máximo	4	5	8	11	14	18
Grupo 4 (N=9)	Média	0,9	4,1	7,7	9,6	10,8	12,1
	Desvio padrão	1,4	3,1	3,4	3,9	4,4	4,6
	Mediana	0,0	3,0	7,0	9,0	11,0	12,0
	Mínimo	0	0	3	5	6	7
	Máximo	3	9	13	16	19	19
Total (N=31)	Média	0,9	2,8	6,1	8,0	9,4	12,7
	Desvio padrão	1,4	2,4	2,7	3,3	4,1	4,4
	Mediana	0,0	3,0	6,0	7,0	9,0	13,0
	Mínimo	0	0	0	3	2	4
	Máximo	4	9	13	16	19	20

²O efeito de interação ocorre quando a diferença entre os grupos não é a mesma para todos os momentos de avaliação ou, de forma equivalente, quando as diferenças entre os momentos de avaliação não são as mesmas para os diferentes grupos.

Figura 17 - Valores médios da função locomotora (Escala BBB)

A Tabela 2 demonstra os valores de p na comparação das semanas dentro de cada grupo e dos grupos dentro de cada semana.

Tabela 2 - Valores de p correspondentes a comparação das semanas dentro de cada grupo e dos grupos dentro de cada semana

		Valor de p
Comparação entre os grupos	Na 1ª semana de avaliação	0,829
	Na 2ª semana de avaliação	0,215
	Na 3ª semana de avaliação	0,448
	Na 4ª semana de avaliação	0,448
	Na 5ª semana de avaliação	0,530
	Na 6ª semana de avaliação	0,492
Comparação entre as semanas	No grupo 1	<0,001
	No grupo 2	<0,001
	No grupo 3	<0,001
	No grupo 4	<0,001

Valores de p obtidos do modelo de efeitos mistos.

A tabela 3 retrata o crescimento da média semanal dentro de cada grupo

Tabela 3 - Valores de p correspondentes a comparação entre duas semanas consecutivas, dentro de cada grupo

Grupo	Comparação entre duas semanas consecutivas	Diferença média	Valor de p
Grupo 1	2ª Semana - 1ª Semana	0,5	0,492
	3ª Semana - 2ª Semana	4,0	<0,001
	4ª Semana - 3ª Semana	1,8	<0,001
	5ª Semana - 4ª Semana	2,3	<0,001
	6ª Semana - 5ª Semana	5,0	<0,001
Grupo 2	2ª Semana - 1ª Semana	1,6	0,043
	3ª Semana - 2ª Semana	3,1	<0,001
	4ª Semana - 3ª Semana	2,0	<0,001
	5ª Semana - 4ª Semana	1,6	0,025
	6ª Semana - 5ª Semana	3,3	<0,001
Grupo 3	2ª Semana - 1ª Semana	2,1	0,006
	3ª Semana - 2ª Semana	2,4	<0,001
	4ª Semana - 3ª Semana	2,1	<0,001
	5ª Semana - 4ª Semana	0,4	0,540
	6ª Semana - 5ª Semana	3,7	<0,001
Grupo 4	2ª Semana - 1ª Semana	3,2	<0,001
	3ª Semana - 2ª Semana	3,6	<0,001
	4ª Semana - 3ª Semana	1,9	<0,001
	5ª Semana - 4ª Semana	1,2	0,048
	6ª Semana - 5ª Semana	1,3	0,086

Valores de p obtidos do modelo de efeitos mistos.

5.2 Potencial evocado

A Tabela 4 apresenta medidas descritivas para os dados das variáveis amplitude e latência, segundo os grupos de estudo.

Tabela 4 - Medidas descritivas da amplitude e da latência, segundo grupos

Potencial evocado	Grupos	N	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo
Amplitude p=0,921	Grupo 1	8	544,6	596,2	243,5	81,0	1840,0
	Grupo 2	7	392,9	442,5	270,5	120,0	1384,5
	Grupo 3	7	684,4	1085,0	270,0	187,5	3140,5
	Grupo 4	9	563,3	869,5	262,5	150,0	2848,0
	Total	31	547,3	754,4	262,5	81,0	3140,5
Latência p=0,335	Grupo 1	8	6,7	2,2	6,2	3,30	10,95
	Grupo 2	7	6,0	0,4	6,1	5,30	6,35
	Grupo 3	7	6,1	0,3	6,1	5,50	6,50
	Grupo 4	9	5,6	0,6	5,4	4,85	6,85
	Total	31	6,1	1,2	6,0	3,30	10,95

Valor de p obtido da ANOVA.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significantes entre as distribuições dos quatro grupos, tanto para as medidas de amplitude (p=0,884, Figura 18), quanto para as medidas de latência (p=0,118, Figura 19).

Figura 18 - Boxplot para as medidas da amplitude, segundo grupos

Figura 19 - Boxplot para as medida da latência, segundo grupos

O modelo ANOVA para os dados da amplitude não indicou diferenças significantes entre as médias dos 4 grupos, com $p=0,921$.

A Tabela 5 apresenta os valores das médias das amplitudes nos quatro grupos. A Tabela 6 demonstra as médias das latências nos grupos de estudo.

Tabela 5 - Valores de p referentes ao teste de comparação das médias das amplitudes nos quatro grupos de estudo

Modelo	Total de casos considerados	Valor de p
sem caso #1 do Grupo 3	30	0,791
sem caso #7 do Grupo 4	30	0,647
sem os dois casos acima	29	0,509

Valor de p obtido da ANOVA.

Tabela 6 - Valores de p referentes ao teste de comparação das médias das latências nos quatro grupos de estudo

Modelo	Total de casos considerados	Valor de p
(A) sem caso #1 do Grupo 1.	30	0,034
(B) sem caso #2 do Grupo 1	30	0,530
(C) sem os dois casos acima	29	0,044

Valor de p obtido da ANOVA.

A Figura 20 ilustra os grupos homogêneos do estudo.

Figura 20 - Esquema ilustrando os grupos homogêneos entre si, com coeficiente de confiança global de 95%. Cada cor indica quais são os grupos homogêneos em relação à média. (Modelos A e C.)

5.3 Dados histológicos

As Tabelas 7 a 11 apresentam os índices de escores ausentes, discretos, moderados e intensos, segundo grupos de estudo e região da medula, respectivamente, para as variáveis: necrose, hiperemia, hemorragia, degeneração de substância e infiltrado celular.

Associações estatisticamente significantes entre os níveis de escore e os grupos foram observadas apenas para a variável necrose obtida na região B ($p < 0,001$, Tabela 7) e hiperemia, também obtida na região B ($p = 0,015$, Tabela 8).

Tabela 7 - Distribuição dos escores de necrose, segundo grupos e região da medula

Escore de necrose		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Região A p=0,186	Ausente	6	75,0	4	57,1	2	28,6	6	66,7
	Discreto	2	25,0	3	42,9	2	28,6	3	33,3
	Moderado	0	0,0	0	0,0	3	42,9	0	0,0
Região B p<0,001	Ausente	3	37,5	0	0,0	1	14,3	0	0,0
	Discreto	5	62,5	2	28,6	0	0,0	6	66,7
	Moderado	0	0,0	5	71,4	6	85,7	3	33,3
Região C p=0,282	Ausente	5	62,5	1	14,3	3	42,9	3	33,3
	Discreto	3	37,5	2	28,6	3	42,9	3	33,3
	Moderado	0	0,0	4	57,1	1	14,3	3	33,3
Total		8	100%	7	100%	7	100%	9	100%

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

Tabela 8 - Distribuição dos escores de hiperemia, segundo grupos e região da medula

Escore de hiperemia		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Região A p=0,132	Ausente	2	25,0	0	0,0	0	0,0	2	22,2
	Discreto	4	50,0	7	100,0	5	71,4	3	33,3
	Moderado	2	25,0	0	0,0	2	28,6	4	44,4
Região B p=0,015	Ausente	1	12,5	0	0,0	1	14,3	0	0,0
	Discreto	7	87,5	2	28,6	1	14,3	4	44,4
	Moderado	0	0,0	4	57,1	5	71,4	5	55,6
	Intenso	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0
Região C p=0,390	Ausente	1	12,5	0	0,0	0	0,0	1	11,1
	Discreto	6	75,0	3	42,9	6	85,7	5	55,6
	Moderado	1	12,5	4	57,1	1	14,3	3	33,3
Total		8	100%	7	100%	7	100%	9	100%

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

Tabela 9 - Distribuição dos escores de hemorragia, segundo grupos e região da medula

Escore de hemorragia		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Região A p=0,763	Ausente	4	50,0	5	71,4	3	42,9	4	44,4
	Discreto	4	50,0	2	28,6	3	42,9	5	55,6
	Moderado	0	0,0	0	0,0	1	14,3	0	0,0
Região B p=0,450	Ausente	2	25,0	0	0,0	1	14,3	1	11,1
	Discreto	6	75,0	5	71,4	3	42,9	6	66,7
	Moderado	0	0,0	2	28,6	3	42,9	2	22,2
Região C p=0,209	Ausente	4	50,0	1	14,3	4	57,1	2	22,2
	Discreto	4	50,0	4	57,1	1	14,3	6	66,7
	Moderado	0	0,0	2	28,6	2	28,6	1	11,1
Total		8	100%	7	100%	7	100%	9	100%

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

Tabela 10 - Distribuição dos escores de degeneração de substância neural, segundo grupos e região da medula

Escore de deg. subst.		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Região A p=0,755	Ausente	1	12,5	0	0,0	0	0,0	1	11,1
	Discreto	2	25,0	5	71,4	4	57,1	5	55,6
	Moderado	4	50,0	2	28,6	3	42,9	3	33,3
	Intenso	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Região B p=0,896	Ausente	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Discreto	1	12,5	1	14,3	1	14,3	3	33,3
	Moderado	5	62,5	4	57,1	3	42,9	4	44,4
	Intenso	1	12,5	2	28,6	3	42,9	2	22,2
Região C p=0,666	Discreto	5	62,5	2	28,6	3	42,9	4	44,4
	Moderado	3	37,5	5	71,4	4	57,1	5	55,6
Total		8	100%	7	100%	7	100%	9	100%

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

Tabela 11 - Distribuição dos escores de infiltrado celular, segundo grupos e região da medula

Escore de infiltr. cel.		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Região A p=0,229	Ausente	4	50,0	3	42,9	1	14,3	4	44,4
	Discreto	1	12,5	4	57,1	5	71,4	4	44,4
	Moderado	3	37,5	0	0,0	1	14,3	1	11,1
Região B p=0,249	Ausente	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Discreto	4	50,0	2	28,6	1	14,3	5	55,6
	Moderado	2	25,0	5	71,4	3	42,9	2	22,2
	Intenso	1	12,5	0	0,0	3	42,9	2	22,2
Região C p=0,119	Ausente	3	37,5	0	0,0	1	14,3	3	33,3
	Discreto	4	50,0	2	28,6	5	71,4	5	55,6
	Moderado	1	12,5	5	71,4	1	14,3	1	11,1
Total		8	100%	7	100%	7	100%	9	100%

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

5.4 Avaliação dos óbitos

As causas de mortalidade dos 9 animais foram: autofagia em 6 casos e causas indeterminadas em 3, distribuídos nos grupos da seguinte forma:

- a) Grupo 1: dois 2 óbitos;
- b) Grupo 2: três óbitos;
- c) Grupo 3: três óbitos;
- D) Grupo 4: um óbito.

Avaliou-se a influência dos grupos no surgimento dos casos de óbitos dos animais. Foi utilizado o teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Tabela 12 - Distribuição dos grupos de acordo com a frequência de óbitos dos animais dos grupos 1 e 2

Grupo	Grupo 1	%	Grupo 2	%	Total	p
Óbito						
Não	8	80,0	7	70,0	15	
Sim	2	20,0	3	30,0	5	
Total	10	100,0	10	100,0	20	1,000

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

Tabela 13 - Distribuição dos grupos de acordo com a frequência de óbitos dos animais dos grupos 1 e 3

Grupo	Grupo 1	%	Grupo 3	%	Total	p
Óbito						
Não	8	80,0	7	70,0	15	
Sim	2	20,0	3	30,0	5	
Total	10	100,0	10	100,0	20	1,000

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

Tabela 14 - Distribuição dos grupos de acordo com a frequência de óbitos dos animais dos grupos 1 e 4

Grupo	Grupo 1	%	Grupo 4	%	Total	p
Óbito						
Não	8	80,0	9	90,0	17	
Sim	2	20,0	1	10,0	3	
Total	10	100,0	10	100,0	20	1,000

Valor de p referente ao teste exato de Fisher.

Pela revisão da literatura e os experimentos realizados, pode-se verificar que a ciência possui conhecimento apenas de pequena parcela dos eventos que ocorrem durante e após a lesão medular traumática. O controle dos mecanismos celulares e imunológicos que desencadeiam os processos inflamatório, degenerativo e regenerativo não é satisfatoriamente conhecido, o que provoca grande expectativa da comunidade científica, das vítimas e de suas famílias.

Uma vez instalada a lesão medular, o indivíduo passa por uma drástica mudança do estilo de vida, pois, além das limitações físicas, são desencadeadas alterações psíquicas, sociais e trabalhistas.

A incidência anual de lesões espinais traumáticas varia de 11,5 a 53,4 por milhão de habitantes, com prevalência de 583 por milhão. As causas mais comuns são os acidentes automobilísticos (40 a 50%), as quedas (20%) e os acidentes de trabalho, as práticas esportivas e a violência, que varia de 10 a 25% (Sekhon e Fehlings, 2001; Ho et al., 2007). No Brasil, estudos demonstram que os indivíduos do sexo masculino foram vitimados em mais de 90% dos casos, e causas mais frequentes foram os acidentes automobilísticos, seguidos pelos ferimentos por arma de fogo (Barros Filho et al., 1990; Tuono, 2008; Campos et al., 2008).

A lesão medular determina a propensão para o desenvolvimento de inúmeras doenças, como a depressão, os distúrbios do sono, a espasticidade, as alterações vesicais e as gastrointestinais, as escaras, a disfunção sexual, os movimentos involuntários, a obesidade, as doenças vasculares e as respiratórias (Da Paz et al., 1992; Brito, 2007; Sodré, 2007; Kabatas et al., 2008; Singh et al., 2008; Noonam et al., 2008; Dionyssiotis et al., 2011).

A dor crônica é muito prevalente nestas situações (98,4%), sendo mais comuns as queixas de dores nos ombros (61%) e as lombalgias (57%). São subdivididas uniformemente entre as intensidades de dor severa, moderada e leve (Raichle et al., 2007; Hanley et al., 2008).

Após o evento traumático, os pacientes lesados necessitam de cuidados especiais e de acompanhamento multiprofissional e multidisciplinar em centros de referência por longos períodos.

Rabeh (2007) afirma que 50% dos pacientes apresentam dependência mínima, ao passo que 27% necessitam de cuidados constantes (cervicais altos).

O impacto econômico após uma lesão medular é muito significativo, variando do atendimento inicial (740 mil dólares) até as modificações domésticas, sucessivas internações, dentre outros (Cardenas et al., 2004; Priebe et al., 2007; Lidal et al., 2007a).

Em muitos casos, os pacientes com lesão medular possuem diminuição da auto-estima, não praticam atividades físicas, tornando-se alvos potenciais de acometimento ou agravamento de diversas doenças graves, que podem ser fatais. Dentre as mais comuns, destacam-se as doenças respiratórias, como a pneumonia e a influenza, as doenças cardiovasculares isquêmicas e as doenças urogenitais (Lidal et al., 2007b; Krause et al., 2008).

As fraturas da coluna vertebral que provocam lesão medular geralmente são instáveis, e a descompressão com estabilização cirúrgica tornam-se imperativas. Esta conduta proporciona a diminuição do risco de novas lesões, confere a possibilidade de mobilização precoce, facilita o transporte e a reabilitação, cujos principais objetivos são a fisioterapia motora e respiratória, reeducação dos esfínteres, e acompanhamento psicológico (Holdsworth, 1953; Holdsworth, 1970; Cristante, 2007).

A lesão medular é um dos grandes desafios da medicina. O desejo de desvendar o mistério do trauma secundário e o ausente potencial de regeneração nas lesões completas levam a comunidade científica a desenvolver inúmeros protocolos de pesquisa, testar novas drogas, associações de drogas e de meios físicos e químicos. É desapontador, entretanto, que não haja medicamentos efetivos aceitos por consenso (Bolton, 1899; Allen, 1911; Nockels e Young, 1992; Hall e Springer, 2004; Trivedi et al., 2006; Cristante, 2007).

A grande maioria das lesões são incompletas, de forma que o principal objetivo da terapêutica nas lesões medulares é a inibição da cascata de eventos que ocorre no trauma secundário (Tator e Fehlings, 1991; Nockels e Young, 1992; Hall, 2001).

Atualmente é do conhecimento médico que, após o trauma mecânico da medula espinal, ocorre hemorragia, hipóxia, edema, inflamação, necrose, acúmulo de glutamato, aspartato, migração celular, respostas imunológicas divergentes e morte de células neurais (Ducker et al., 1971; Balentine, 1985; Albin e White, 1987; Schnell et al., 1999; Amar e Levy, 1999; Taoka et al., 2001; Freund et al., 2011).

Inúmeras drogas tem sido pesquisadas. Estudou-se a dexametasona, o transplante de células fetais e as células-tronco, o GM1, a metilprednisolona, a eritropoetina, as neurotropinas, as vitaminas, dentre outras (Ducker e Hamit, 1969; De La Torre, et al., 1975; Roisen et al., 1981; Young e Flamm, 1982; Karpiak et al., 1991; Wyss-Coray et al., 1997; Jeffery et al., 1999; Barros Filho, 2000; Sribnick et al., 2005; Thuret et al., 2006; Ilyas e Chen, 2007; Akdemir et al., 2008; Cristante et al., 2009a).

Há necessidade de novas pesquisas científicas rigorosas, pois não existem bases sólidas para a elucidação do complexo sistema de reações que ocorrem após a lesão espinal (Amador e Guest, 2005; Rossignol et al., 2007).

Os estudos de novas drogas ou métodos terapêuticos devem ser embasados, primeiramente, em pesquisas experimentais, utilizando animais da mesma linhagem genética. Com base nos resultados de vários testes

favoráveis e com morbidade controlada é que se pode-se empregar o projeto na prática clínica.

Estes foram os fundamentos utilizados para o desenvolvimento do presente projeto.

A homogeneização da amostra é importante para que haja aumento da confiabilidade e da reprodutibilidade do método. Os ratos Wistar empregados no estudo foram oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, obedecendo à padronização adotada pelo Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina na Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) (Rodrigues, 1999).

O sistema de lesão medular adotado seguiu o protocolo conferido para o *New York University Impactor System* (NYU Impactor), padronizado pela publicação de Constantini e Young (1994) e reproduzido por Basso et al. (1995). Este equipamento é formado por uma torre que libera uma haste com peso de 10g para a contusão medular. A altura da queda é padronizada de acordo com o projeto de pesquisa. As possibilidades são de 6,25 mm, 12,5 mm, 25 mm e 50 mm. Estas alturas crescentes são diretamente proporcionais à gravidade da lesão. O equipamento é interligado ao computador, que analisa e grava todas as informações do procedimento.

O NYU Impactor encontra-se disponível no LETRAN. Todo o processo foi conduzido de acordo com o padrão internacional adotado pelos centros

de pesquisas que integram o *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS) (Rodrigues, 1999; Vialle et al., 1999; Young, 2002; Tebet et al., 2003; Marcon, 2006, 2009; Rodrigues et al., 2010; Galvão et al., 2011; Santos et al., 2011).

O número de animais (n) para a formação dos grupos baseou-se em pesquisas anteriores, que adotaram modelo experimental semelhante (Marcon, 2006; Cristante et al., 2009b).

Utilizaram-se ratos da raça Wistar, machos, entre 20 e 21 semanas, com peso variando de 300 a 340 gramas, com bom estado geral, boa mobilidade e sem alterações na pelagem (Rodrigues, 1999; Barros Filho e Molina, 2008).

As avaliações pela escala locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (Basso et al., 1995) foram realizadas no 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º dias após a lesão espinal. Em grande parte dos estudos realizados no LETRAN, as avaliações foram efetuadas no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias. Optou-se em estender a avaliação para duas semanas, em virtude do aumento da intensidade da lesão adotada (25 mm). Tal padronização pode permitir que a evolução locomotora seja mais fidedigna.

A opção pelo nível de lesão em T9-T10 está de acordo com o protocolo de Rodrigues (1999).

Seguindo o mesmo protocolo, admitiu-se a realização da lesão com queda da haste a uma altura de 25 mm, produzindo contusão medular

moderada, incompleta. Ratos com lesões graves, com altura de 50 mm, apresentam alta mortalidade na primeira semana. Já nas lesões provocadas pela queda da haste com altura de 6,25 mm, verifica-se a recuperação completa em poucos dias, independentemente de meios adjuvantes (Basso et al., 2006; Barros Filho e Molina, 2008; Marcon, 2009).

O estudo histológico foi realizado com 3 cortes em cada segmento medular: proximal, na topografia da lesão e distal. Das lâminas, coradas com hematoxilina e eosina, foram graduados os parâmetros: necrose, hiperemia, hemorragia, degeneração de substâncias (formação cística) e infiltrado celular, conforme padronização do LETRAN (Cristante et al., 2009b; Marcon, 2009; Galvão et al., 2011).

O potencial evocado motor por meio de estimulação elétrica transcraniana é um método de avaliação da propagação dos impulsos elétricos medulares, com a captação nos músculos-alvo das patas dianteiras e traseiras. Na prática, determinam-se dois valores importantes: a latência, que significa velocidade, tempo para aparecer o sinal e a amplitude, mais importante, que expressa a recuperação, ou ganho de fibras, e quanto mais elevada, melhor (Ferreira et al., 2005).

O potencial somatosensitivo pode ser utilizado nas avaliações medulares, mas possui grande limitação quando há predominância da síndrome da medula anterior. O potencial evocado motor não demonstra esta limitação (Curt et al., 1998).

Dentre as inúmeras drogas pesquisadas com possibilidade de atuação na lesão medular, apenas o GM1 e a metilprednisolona podem ser prescritas em humanos (Taoka e Okajima, 1998; Taoka et al., 2001).

A metilprednisolona é recomendada por alguns cirurgiões na fase aguda do trauma, até oito horas da lesão, mas encontra-se cada vez mais distante do consenso da comunidade científica. Algumas questões referem-se desde à ineficácia até ao aumento de complicações, como as infecções (Gerhart et al., 1995; Pointillart et al., 2000; Hurlbert, 2001; Marcon, 2006).

Também distante do consenso da comunidade científica, o GM1 pode ser uma nova opção terapêutica, sobretudo se a sua ação for potencializada por outros meios, como agentes físicos, químicos ou biológicos.

O GM1 é uma glicoproteína contida nas membranas celulares e nos núcleos, em alta concentração nas células de linhagem neural. Ele é responsável por diversas funções no metabolismo, no desenvolvimento, na maturação e na regeneração celular, e um importante neuroprotetor com funções anti-inflamatórias. O GM1 é fundamental para a modulação elétrica e na excitabilidade neuronal, na redução dos efeitos tóxicos da alta concentração de cálcio e sódio e na melhora da atividade colinérgica (Karpiak et al., 1991; Coombs et al., 1993; Vogelsberg et al., 1997; Hadjiconstantinou e Neff, 1998; Oliveira e Langone, 2000; Fang et al., 2000; Silva et al., 2000; Weber et al., 2000; Fighera et al., 2006; Furian et al., 2007; Ledeen e Wu, 2007; Sokolova et al., 2007; Qiao et al., 2008; Duchemin et al., 2008).

O GM1 foi utilizado em diversos estudos clínicos em portadores de lesão medular. Foi confirmada a sua segurança, com poucas complicações, e com alguns resultados demonstrando melhora na recuperação motora (Geisler et al., 1991; Walker e Harris, 1993; Barros Filho e Silva Filho, 2003; Chinnock e Roberts, 2009).

Geisler et al. (2001) reafirmam, em estudo multicêntrico, em que foram avaliados 760 pacientes portadores de lesões medulares traumáticas agudas, a segurança do uso do GM1 e a sua ineficácia nas lesões completas.

A dose de GM1 adotada neste estudo (30 mg/kg) está condizente com outros estudos experimentais (Goettl et al., 2003; Carvalho et al., 2008).

Nelson et al. (1991) publicam, pela primeira vez, estudo que comprova a capacidade do laser de realizar ablação do estrato córneo da pele, possibilitando a absorção mais eficiente de substâncias químicas.

O laser pode promover a absorção transdérmica de proteínas, peptídeos, e outras moléculas, transformando-se em uma grande alternativa de via de administração de medicamentos (Benson e Namjoshi, 2008; Bachhav et al., 2010; Bachhav et al., 2011).

O emprego do laser é um procedimento seguro, não invasivo e com baixa morbidade (Kalluri e Banga, 2011).

Santos et al. (2010) apresentaram, no Congresso Europeu de Neurociências, os resultados preliminares da utilização do laser de baixa

temperatura associado a GM1 nas lesões medulares e dos nervos periféricos. Afrimam que os resultados foram favoráveis e que há a necessidade de novos estudos.

A metodologia da pesquisa de Santos et al. (2010) difere deste estudo pois eles não utilizaram avaliação por potencial evocado, a contusão medular foi de menor energia, com a altura da haste de impacto de 12,5 mm (e não 25 mm), e o tempo de evolução for menor, de quatro semanas apenas, e não de seis semanas como nesta pesquisa.

Os resultados histológicos realizados na presente pesquisa, após seis semanas da contusão medular, não demonstraram associações estatisticamente significantes entre os níveis de escore e os grupos, exceto em duas situações: necrose da região B (Tabela 7) e hiperemia da região B (Tabela 8).

Em relação à necrose, na região B, os grupos 2 e 3 tiveram maiores concentrações de resultados moderados (71,4% e 85,7%, respectivamente), ao passo que o grupo 1 e 4 tiveram os resultados concentrados em níveis discretos (62,5% e 66,7%).

Pôde-se verificar que, na sexta semana, houve semelhança dos achados de intensidade discreta de necrose B, entre os grupos 1 e 4 (62,5% e 66,7%, respectivamente).

No caso da hiperemia, na região B, a grande maioria das observações do grupo 1 teve resultados discretos (87,5%). Os demais

grupos apresentaram porcentagens de resultados discretos menores, sendo 44,4% (grupo 4), 28,6% (grupo 2) e 14,3% (grupo 3). Por outro lado, o grupo 1 não apresentou nenhum caso moderado/intenso, ao passo que os demais grupos tiveram seus dados concentrados nesses níveis, 55,6% no grupo 4, e 71,4%, tanto no grupo 2 quanto no grupo 3. Novamente evidencia-se maior correlação entre os grupos 1 e 4.

Os quesitos analisados foram necrose, hiperemia, hemorragia, degeneração de substância e infiltrado celular. Cada um deles foi avaliado em três situações: segmento proximal à lesão (A), sítio da lesão (B) e porção distal à lesão (C), totalizando quinze avaliações. Deste total, houve significância estatística em apenas dois segmentos, que correspondem a 13,33% do total de lâminas analisadas.

Marcon (2009) afirma que esta técnica de avaliação histológica possui baixa sensibilidade para aferir alterações entre os grupos.

Este método de avaliação histológica é empregado nos projetos de pesquisas realizados no LETRAN, determinando experiência aos avaliadores. Atualmente há novos métodos de avaliação histológica, como a contagem de células por microscopia eletrônica e a coloração de células neurais viáveis.

Na avaliação por potencial evocado motor, analisaram-se a amplitude e a latência. Os valores medianos da amplitude, que são os dados mais importantes, variaram de 243,5 (grupo 1) a 270,5 (grupo 2). Não se observaram resultados estatisticamente significantes entre os grupos.

No entanto, encontraram-se dois valores extremos: 3140,5 no grupo 3 e 2848, no grupo 4 (Figura 18).

Em ambos os casos, foi empregado o Laser Ice (grupos 3 e 4). Não foi possível estabelecer uma relação entre os achados extremos e a histologia ou a avaliação funcional.

Nas medidas de latência, os menores valores médio (5,6) e mediano (5,4) foram observados no grupo 4, ao passo que a maior média (6,7) e mediana (6,2), no grupo 1.

No caso das medidas da latência, o menor valor médio (5,6) e mediano (5,4) foram registrados no grupo 4, e o maior valor médio (6,7) e mediano (6,2), no grupo 1. Destaca-se uma maior variabilidade dos dados nesse último grupo, sobretudo, em virtude de um valor extremo alto, igual a 10,95, conforme mostra a Figura 19.

Vale notar que o valor extremo alto de latência (10,95) observado no grupo 1 (caso #2, cujos valores originais para os lados esquerdo e direito são, respectivamente, 11,8 e 10,1), corresponde ao mesmo caso que apresentou valor extremo baixo para a amplitude, igual a 81,0 (valores originais para os lados esquerdo e direito, respectivamente, iguais a 89,0 e 73,0).

Uma análise dos resíduos do modelo foi feita para avaliar a adequação dos dados e, de uma forma geral, não indicou fugas importantes das suposições necessárias para a aplicação do modelo. Além disso, esta análise detectou dois pontos a serem investigados com cuidado, que

correspondem aos valores extremos dos grupo 3 (caso #1, amplitude 3140,5) e 4 (caso #7, amplitude 2848,0), conforme ressaltado anteriormente.

Assim, novos ajustes do modelo ANOVA foram feitos, e se desconsideraram cada um desses pontos e, também, os dois pontos simultaneamente. Desconsiderando o caso #1, a média e o desvio padrão para o grupo 3 foi reduzida para 275,0 e 70,6. No grupo 4, sem o caso #7, os valores caíram para 277,7 e 158,2. Em todas essas análises, não houve indicação de diferenças significantes entre os grupos (Ver Tabela 5).

Também em relação à latência, a análise também não indicou diferenças significantes entre as médias dos quatro grupos ($p=0,335$). No entanto, a análise dos resíduos indicou ajuste pouco razoável dos dados, com variâncias desiguais entre os grupos (isto é, fuga da suposição de homocedasticidade), devida, sobretudo, à grande variabilidade do grupo 1, quando comparada aos demais grupos. O problema manteve-se mesmo após tentativas de transformação dos dados. A análise dos resíduos apontou dois casos a serem investigados com cautela, correspondentes aos dois valores extremos do grupo 1: caso #1 (3,30) e #2 (10,95).

A média (e desvio padrão) do grupo 1 mudaram para: 7,1 (1,9) sem o valor extremo baixo; 6,0 (1,5) sem o valor extremo alto; e 6,5 (0,9) sem esses dois valores.

Os resultados das análises, desconsiderando esses pontos são apresentados na Tabela 6. Nota-se que a retirada do valor extremo alto (Modelo B) não muda as conclusões, uma vez que não indica diferenças

significantes entre os grupos ($p=0,530$). Já a retirada do valor mínimo (Modelos A e C) resulta em modelos que indicam diferenças significantes entre os grupos. Investigando quais grupos seriam diferentes entre si, os dois modelos indicaram, com coeficiente de confiança global de 95%, que as médias das latências dos grupos 1 e 4 são diferentes entre si, no entanto, ambos não são diferentes dos demais grupos considerados, conforme esquematizado na Figura 17. Vale ressaltar que os resultados apresentados devem ser encarados como indicativos, e não conclusivos. Outros modelos estatísticos devem ser estudados a fim de obter um melhor ajuste dos dados (por exemplo, considerando um conjunto maior de observações), além de conclusões menos suscetíveis à retirada de valores da amostra.

Os exames observacionais das avaliações motoras foram realizados semanalmente, da primeira à sexta. Tais avaliações expressaram melhora crescente da função motora em todos os grupos, com demonstrado na Figura 17.

Em relação aos resultados histológicos, de uma forma geral, tanto os valores médios e medianos quanto a variabilidade dos dados aumentaram com o decorrer das semanas. Este padrão foi observado em todos os grupos, e, no total, o valor médio (e desvio padrão) aumentou de 0,9 (1,4), na primeira semana, para 12,7 (4,4), na sexta semana de observação.

A Figura 17 demonstra que, em todos os grupos, havia uma tendência de aumento ao longo das avaliações. No entanto, o grupo 4 destaca-se dos demais grupos por ter apresentado valores médios mais elevados da

segunda até a quinta semanas, e, nos extremos (isto é, primeira e sexta semanas), esses valores eram próximos aos observados nos demais grupos. Além disso, na sexta semana, o grupo 1 destacou-se dos demais, apresentando a maior média observada no estudo (14,8).

O efeito significativo de interação entre grupos e semanas determina que a comparação entre os grupos deve ser feita em cada semana, e a comparação ao longo das semanas, em cada grupo. Os resultados dessas comparações são mostrados na Tabela 2. Conclui-se, portanto, que:

- a) para todas as semanas de avaliação, não existem evidências de diferenças significantes entre as médias dos grupos (todas as comparações com $p \geq 0,215$);
- b) para todos os grupos, as médias nas semanas não são todas iguais entre si (todas as comparações com $p < 0,001$).

Com base nesses resultados, a continuidade da análise foi feita com o objetivo de comparar o crescimento da média semanal em cada grupo, conforme apresenta a Tabela 3. Em relação ao grupo 1, o aumento médio passou a ser estatisticamente significativo a partir da segunda semana. No grupo 2, todas as semanas apresentaram aumentos consecutivos significantes. No caso do grupo 3, observou-se um aumento semanal significativo da primeira até a quarta semana, seguido de um pequeno platô na quinta semana, voltando a apresentar aumento da quinta para a sexta

semana. Finalmente, o grupo 4 apresentou aumentos significantes até a quinta semana, e as duas últimas (quinta e sexta semanas) não apresentaram diferenças em relação aos escores médios.

Observou-se que entre a primeira e a segunda semanas, na fase sub-aguda, o grupo 1 obteve a pior evolução, ao passo que a evolução do grupo 4 foi superior aos demais.

Entre a segunda e a quarta semanas, os grupos 1, 2 e 3 apresentaram evolução similar.

Obervou-se a tendência de superioridade do escore funcional do grupo 4 em relação aos demais, até a quarta semana. A partir deste momento, ocorreu uma diminuição da intensidade de melhora clínica. Na quinta semana, o escore de grupo 1 ultrapassou o grupo 4. Na sexta semana, o grupo 4 encontrava-se no mesmo patamar da função locomotora dos grupos 2 e 3.

Pode-se interpretar estes resultados sugerindo em que o Laser Ice com GM1 melhoram a função locomotora nas primeiras semanas, diminuindo a intensidade de recuperação a partir da quarta semana.

Com as bases científicas atuais, é impossível compreender claramente o comportamento da evolução da função locomotora destes animais. Pode-se supor que na fase aguda e subaguda da lesão medular, ocorreria um sinergismo entre o laser e o GM1. E, após um determinado período, esta combinação surtiria efeito contrário.

A administração de GM1 e do Laser Ice separadamente não apresentou diferença na evolução, quando comparado ao grupo controle, também até a quarta semana. A partir de então o grupo Laser Ice sem GM1 se estabilizou até a quinta semana, finalizando na sexta semana com pouca melhora.

Não há publicações referentes à associação entre o Laser Ice e o GM1, exceto a apresentação, em congresso, de resultados preliminares do tratamento de lesão de nervos periféricos e contusão medular (Santos et al., 2010).

Neste contexto, pode-se afirmar que a evolução do grupo 4 foi superior aos demais até a quarta semana, assemelhando-se aos grupos 2 e 3 na sexta semana. A evolução motora do grupo 1 foi inferior às demais na primeira semana e superior aos demais grupos no final do experimento.

A variabilidade dos dados obtidos é relativamente grande (Tabela1). Este fato, somado ao número reduzido de amostras, podem explicar a não detecção de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Nesse sentido, os resultados não significantes devem ser encarados como indicativos, sendo interessante reavaliá-los com base em uma amostragem maior.

O potencial evocado motor demonstrou correlação com essas afirmações, visto que o melhor escore de latência foi obtido pelo grupo 1.

Vários autores afirmam que o potencial evocado motor possui alta correlação com os resultados do exame clínico (Kameyama et al., 1995; Curt et al., 1998; Alisauskiene et al., 2005; Ferreira et al., 2005; Tator, 2006).

Na avaliação do número de óbitos, o grupo 1 foi comparado aos demais, não se observando diferença estatisticamente significativa.

Em todas as avaliações empregadas nesta pesquisa (histológica, potencial evocado motor e BBB), não se demonstravam resultados estatisticamente significantes entre os grupos na sexta semana.

Com base nessa análise, reitera-se que devem ser realizadas novas pesquisas, na busca de maior conhecimento dos fatores promotores e inibidores da regeneração neuronal. A descoberta de novas drogas, a evolução terapêutica entre associação de medicamentos e meios físicos devem direcionar o desenvolvimento de novos estudos.

7 CONCLUSÃO

O emprego de GM1 associado ao laser em baixa temperatura demonstra resultados funcionais superiores nas primeiras semanas, mas sem evidenciar diferença estatisticamente significativa.

Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, nas avaliações funcional, histológica e por potencial evocado motor.

ANEXO I

Escala BBB

ESCALA BBB DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL
“BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S. E BRESNAHAN, J.C., 1995”

Rato: _____ Data: ____/____/200__ Dias Pós-Operatório: _____ Pontuação: _____ Esquerdo: _____ Direito: _____

Movimento do Membro Posterior						Posição do Tronco		Abdome	Movimento da Pata Dianteira				Pisada		C o o r d e n a ç ã o	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata		I n s t a b i l i d a d e	Cauda									
Quadril		Joelho		Tornozelo					Apoio da Pata		Dorsal	Plantar	Contato Inicial	Elevação																
E	D	E	D	E	D	Lado	Apoio	Balanço	Sem Suporte de Peso	Com Suporte de Peso	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D										
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	E	D	E	D	E	D	0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I	Para Cima (elevada)				
S	S	S	S	S	S	Central	E								D	Paralelo	O	O	O	O	O	O	O	O	E		E	E	E	Para Baixo (abaixada)
E	E	E	E	E	E												C	C	C	C	F	F	F*	F*	F		F**	F**	P	
																						C	C	C	C					

Comentários: _____

Movimento	+	Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior	0	Nunca (0%)		I	Rotação Interna	
0		Nenhum	*	Liberação < 50%	O		Ocasional (< 50%)	
S		Suave (discreto)	**	Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior	F		Frequente (51-94%)	
E		Extenso			C		Consistente (95-100%)	
							P	Paralelo

ANEXO II

Escala BBB de avaliação funcional, com 21 pontos (Basso et al., 1995)

Pontuação	Definições operacionais e categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
12	Passo plantar com suporte de piso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.

ANEXO III

Definições da escala BBB

DEFINIÇÕES	
- Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação
- Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação
- Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior
- Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa
- Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou elevação da coxa
- Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para a frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso
- Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo
- Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam
- Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, $\leq 50\%$
- Frequente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51- 94%
- Consistente	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%
- Instabilidade do tronco	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco

ANEXO IV

Escore da escala BBB

GRUPO 1

ANIMAL	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem
1	0	3	4	6	9	15
2	0	0	5	5	7	13
3	2	4	5	7	11	17
4	3	0	6	8	13	19
5	0	0	5	6	5	12
6	4	3	11	13	15	20
7	0	1	4	7	8	7
8	1	3	6	8	10	15

GRUPO 2

ANIMAL	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem
1	0	3	6	7	11	13
2	0	0	5	6	9	12
3	0	5	7	10	13	16
4	1	5	6	8	8	14
5	0	0	3	5	3	9
6	0	0	3	3	4	5
7	4	3	8	13	15	17

GRUPO 3

ANIMAL	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem
1	4	5	8	11	13	18
2	0	4	6	6	4	14
3	0	4	7	11	9	13
4	0	3	5	5	6	8
5	0	0	0	3	2	4
6	0	3	6	10	14	15
7	0	0	4	5	6	8

GRUPO 4

ANIMAL	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem
1	0	2	5	5	8	7
2	0	3	3	6	6	8
3	3	5	10	13	14	15
4	3	9	11	13	13	18
5	0	3	5	6	6	8
6	0	3	7	7	7	8
7	2	9	13	16	19	19
8	0	0	5	9	11	12
9	0	3	10	11	13	14

ANEXO V

GRUPO 1

Potencial evocado motor

	PDE		PTE		PDD		PTD	
	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP
Rato 1	2.1	2.180	3.2	2.180	1.9	2.600	3.4	1.500
Rato 2	2.8	676	11.8	89	1.7	924	10.1	72.6
Rato 3	2.8	4.039	5.7	855	3.3	1.561	5.9	930
Rato 4	2.6	2.878	5.9	734	2.9	1739	10.3	659
Rato 5	3.2	1.739	7.5	329	3.3	4.167	6.2	180
Rato 6	2.9	2.443	7.1	135	2.6	4.507	4.7	330
Rato 7	4.3	4.812	6.4	270	3.1	1.500	6.6	180
Rato 8	2.9	2.443	5.5	120	2.6	1.005	6.1	150

PDE: pata dianteira esquerda

PTE: pata traseira esquerda

PDD: pata dianteira direita

PTD: pata traseira direita

LAT: latência

AMP: amplitude

ANEXO VI

GRUPO 2

Potencial evocado motor

	PDE		PTE		PDD		PTD	
	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP
Rato 1	3.5	2.459	5.9	330	3.6	2.743	6.8	271
Rato 2	2.8	3.178	6.1	149	2.9	2.983	6.1	91
Rato 3	3.1	4.393	5.7	361	3.8	4.767	6.4	180
Rato 4	2.6	2.593	5.7	209	2.6	1.304	6.2	2.560
Rato 5	3.6	839	5.7	120	2.4	2.938	6.1	195
Rato 6	3.3	4.123	6.1	405	2.4	3.809	6.6	179
Rato 7	2.4	2.383	5.7	180	2.6	3.089	4.9	270

PDE: pata dianteira esquerda

PTE: pata traseira esquerda

PDD: pata dianteira direita

PTD: pata traseira direita

LAT: latência

AMP: amplitude

ANEXO VII

GRUPO 3

Potencial evocado motor

	PDE		PTE		PDD		PTD	
	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP
Rato 1	3.1	4.392	6.2	1.994	3.8	2.023	6.8	4.287
Rato 2	2.8	3.883	5.4	315	2.8	4.887	5.6	225
Rato 3	2.9	3.733	5.5	300	2.6	1.604	6.4	75
Rato 4	2.8	5.007	6.9	480	3.6	4.722	5.7	315
Rato 5	2.9	3.373	6.9	255	2.6	4.902	5.9	255
Rato 6	3.5	1.064	6.4	180	2.8	4.362	5.7	420
Rato 7	2.9	1.994	5.9	195	2.8	1.560	6.1	285

PDE: pata dianteira esquerda

PTE: pata traseira esquerda

PDD: pata dianteira direita

PTD: pata traseira direita

LAT: latência

AMP: amplitude

ANEXO VIII

GRUPO 4

Potencial evocado motor

	PDE		PTE		PDD		PTD	
	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP	LAT	AMP
Rato 1	2.32	2.893	5.0	300	2.4	1.512	5.2	105
Rato 2	2.8	4.228	5.4	285	3.1	3.463	5.4	195
Rato 3	2.8	2.638	4.9	195	2.6	4.468	5.2	105
Rato 4	2.9	1.890	6.4	288	2.4	4.872	5.0	255
Rato 5	2.6	2.384	5.9	210	2.6	3.238	5.0	135
Rato 6	2.6	1.244	4.9	270	2.6	1.394	5.9	270
Rato 7	2.6	2.863	6.9	3.463	2.4	2.743	6.8	2.233
Rato 8	2.8	4.078	6.4	435	2.9	3.793	6.1	870
Rato 9	2.9	2.144	5.0	375	2.1	900	4.7	150

PDE: pata dianteira esquerda

PTE: pata traseira esquerda

PDD: pata dianteira direita

PTD: pata traseira direita

LAT: latência

AMP: amplitude

ANEXO IX

A- proximal B- central C-distal

Variáveis	N-Necrose	Escore	0-ausente
	He-Hemorragia		1-discreto
	Hi-Hiperemia		2-moderado
	D-Deg Subst		3-intenso
	I-Infiltr celul		

GRUPO 1

1	A	B	C
N	0	0	0
He	0	0	0
Hi	1	0	1
D	0	0	1
I	0	0	0
2			
N	0	1	0
He	0	0	0
Hi	0	1	1
D	1	2	1
I	0	2	0
3			
N	0	0	0
He	0	1	1
Hi	2	1	0
D	2	2	2
I	2	3	2
4			
N	0	0	0
He	1	1	1
Hi	1	1	1
D	2	2	2
I	0	1	1
5			
N	0	1	1
He	1	1	0
Hi	1	1	1
D	2	1	1
I	1	1	1
6			
N	1	1	0
He	1	1	0
Hi	2	1	2
D	2	2	1
I	2	1	0
7			
N	0	1	1
He	0	1	1
Hi	0	1	1
D	1	2	2
I	0	1	1
8			
N	1	1	1
He	1	1	1
Hi	1	1	1
D	3	3	1
I	2	2	1

GRUPO 2

1				
	N	0	1	2
	He	0	1	1
	Hi	1	2	2
	D	1	2	2
	I	0	2	2
2				
	N	0	1	1
	He	0	1	1
	Hi	1	1	1
	D	2	2	2
	I	1	2	1
3				
	N	0	2	0
	He	0	2	0
	Hi	1	3	1
	D	1	3	1
	I	0	1	2
4				
	N	1	2	2
	He	1	2	2
	Hi	1	1	1
	D	1	1	2
	I	1	1	2
5				
	N	1	2	1
	He	0	1	1
	Hi	1	2	2
	D	1	3	1
	I	0	2	1
6				
	N	1	2	2
	He	1	1	2
	Hi	1	2	2
	D	2	2	2
	I	1	2	2
7				
	N	0	2	2
	He	0	1	1
	Hi	1	2	2
	D	1	2	2
	I	1	2	2

GRUPO 3

1				
	N	0	0	1
	He	0	0	2
	Hi	1	0	1
	D	1	1	2
	I	1	1	1
2				
	N	1	2	0
	He	1	1	0
	Hi	1	2	2
	D	1	2	2
	I	1	2	1
3				
	N	2	2	1
	He	2	2	1
	Hi	2	2	1
	D	2	3	1
	I	2	3	1
4				
	N	1	2	2
	He	0	2	2
	Hi	1	2	1
	D	2	3	2
	I	1	3	2
5				
	N	0	2	0
	He	0	1	0
	Hi	1	1	1
	D	1	2	1
	I	0	2	0
6				
	N	2	2	1
	He	1	2	0
	Hi	1	2	1
	D	1	2	1
	I	1	2	1
7				
	N	2	2	0
	He	1	1	0
	Hi	2	2	1
	D	2	3	2
	I	1	3	1

GRUPO 4

1				
	N	0	2	2
	He	0	2	2
	Hi	2	2	2
	D	0	2	2
	I	0	2	2
2				
	N	0	1	0
	He	0	1	0
	Hi	2	2	1
	D	1	1	1
	I	1	1	1
3				
	N	0	1	1
	He	0	1	1
	Hi	1	2	2
	D	1	2	2
	I	0	1	0
4				
	N	1	2	2
	He	1	2	1
	Hi	0	2	1
	D	1	3	2
	I	1	3	0
5				
	N	1	1	1
	He	1	1	1
	Hi	2	1	2
	D	2	2	2
	I	1	2	1
6				
	N	1	2	2
	He	1	1	1
	Hi	2	2	1
	D	2	3	1
	I	2	3	1
7				
	N	0	1	0
	He	1	0	0
	Hi	1	1	1
	D	2	1	1
	I	1	1	0
8				
	N	0	1	0
	He	1	1	1
	Hi	0	1	0
	D	1	2	1
	I	0	1	1
9				
	N	0	1	1
	He	0	1	1
	Hi	1	1	1
	D	1	1	2
	I	0	1	1

9 REFERÊNCIAS

Akdemir O, Uçankale M, Karaoglan A, Barut S, Sagmanligil A, Bilguvar K, et al. Therapeutic efficacy of SJA6017, a calpain inhibitor, in rat spinal cord injury. *J Clin Neurosci*. 2008;15(10):1130-6.

Albin MS, White RJ. Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *Crit Care Clin*. 1987;3(3):441-52.

Alisauskiene M, Truffert A, Vaiciene N, Magistris MR. Transcranial magnetic stimulation in clinical practice. *Medicina (Kaunas)*. 2005;41(10):813-24.

Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column a preliminary report. *JAMA*. 1911;57(11):878-80.

Amador MJ, Guest JD. An appraisal of ongoing experimental procedures in human spinal cord injury. *Journal of Neurol Phys Ther*. 2005;29(2):70-86.

Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999;44(5):1027-39.

Balentine JD. Hypotheses in spinal cord trauma research. In: Becker DP, Povlishock JT, editors. *Central nervous system trauma status report*. Bethesda: National Institutes of Health;1985. p. 455-61.

Banerjea R, Sambamoorthi U, Weaver F, Maney M, Pogach LM, Findley T. Risk of stroke, heart attack, and diabetes complications among veterans with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89(8):1448-53.

Barros Filho TEP. Tratamento medicamentoso no traumatismo raquimedular. *Rev Bras Ortop*. 2000;35(5):143-6.

Barros Filho TEP, Molina AE. Analysis of the sensitivity and reproducibility of Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats. *Clinics*. 2008;63(1):103-8.

Barro Filho TEPB, Silva Filho C. Titulação de anticorpos anti-gangliosídeo no soro de pacientes com lesão medular crônica e precedendo tratamento com gangliosídeo GM1. *Acta Ortop Bras*. 2003;11(2):69-71.

Barros Filho TEP, Taricco MA, Oliveira RP, Greve JMD, Santos LCR, Napoli MMM. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo de coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*. 1990;45(3):123-6.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.

Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, Mctigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006;23(5):635-59.

Bachhav YG, Heinrich A, Kalia YN. Using laser microporation to improve transdermal delivery of diclofenac: increasing bioavailability and the range of therapeutic applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(3):408-14.

Bachhav YG, Summer S, Heinrich A, Bragagna T, Böhler C, Kalia YN. Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin. *J Control Release.* 2010;146(1):31-6.

Benson HA, Namjoshi S. Proteins and peptides: strategies for delivery to and across the skin. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3591-610.

Bolton PR. The Treatment of injuries of the spinal cord. *Ann Surg.* 1899;30(2):171-7.

Brito, MAGM. *Diagnóstico de enfermagem da NANDA identificados em pessoas com lesão medular mediante abordagem baseada na teoria do déficit de auto-cuidado* [dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2007.

Campos MF, Ribeiro AT, Listik S, Pereira CAB, Sobrinho JA, Rapoport A. epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(2):88-93.

Cardenas DD, Hoffman JM, Kirshblum S, McKinley W. Etiology and incidence of rehospitalization after traumatic spinal cord injury: a multicenter analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004;85(11):1757-63.

Carvalho MOP, Barros Filho TEP, Tebet MA. Effects of methylprednisolone and ganglioside GM1 on a spinal lesion: a functional analysis. *Clinics.* 2008;63(3):375-80.

Chinnock P, Roberts I. Gangliosides for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;18(2):CD004444. Disponível em: <http://info.onlinelibrary.wiley.com/userfiles/ccoch/file/CD004444.pdf>

Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97-111.

Coombs DW, Colburn RW, McCarthy LE, DeLeo JA, Hoopes PJ, Twitchell BB. Neurotoxicology of chronic infusion of the ganglioside GM1 in the ewe: phase I. intrathecal administration. *Anesth Analg.* 1993;77(3):507-15.

Cristante AF. *Emprego das células progenitoras no tratamento da lesão medular crônica em humanos: análise do potencial evocado somato-sensitivo em 39 pacientes* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Cristante AF, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR, et al. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2009a;47(6):458-63.

Cristante AF, Barros Filho TEP, Tetsui N, Mendroni A, Caldas JG, Camargo AJS, et al. Stem cells in the treatment of chronic spinal Cord injury: evaluation of somatosensitiv evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord.* 2009b;47(10):733-8.

Cristante AF, Damasceno ML, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TE. Viabilidade de células dos sistema nervoso central fetal no tratamento da lesão medular em ratos. *Acta Ortop. Bras.* 2010; 18(5):284-90

Curt A, Keck ME, Dietz V. Functional outcome following spinal cord injury: significance of motor-evoked potentials and ASIA scores. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998;79(1):81-6.

Da Paz AC, Beraldo OS, Almeida MC, Neves EG, Alves CM, Khan P. Traumatic injury to the spinal cord: prevalence in Brazilian Hospitals. *Paraplegia.* 1992;30(9):636-40.

De La Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evaluation of permanent experimental spinal cord trauma. *Neurology.* 1975;25(6):508-14.

Dietz V. Recent advances in spinal cord neurology. *J Neurol.* 2010;257(10):1770-3.

Dimar JR 2nd, Shields CB, Zhang YP, Burke DA, Raque GH, Glassman SD. The role of directly applied hypothermia in spinal cord injury. *Spine.* 2000;25(18):2294-2302.

Dionyssiotis Y, Lyritis GP, Mavrogenis AF, Paragelopoulos PJ. Factors influencing bone loss in paraplegia. *Hippokratia.* 2011;15(1):54-9.

Duchemin AM, Ren Q, Neff NH, Hadjionstantinou M. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *J Neurochem.* 2008;104(6):1466-77.

Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1969;30(6):693-7.

Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental cord trauma. *J Neurosurg.* 1971;35(6):700-8.

Fang Y, Wu G, Xie X, Lu ZH, Ledeen RW. Endogenous GM1 ganglioside of the plasma membrane promotes neurogenesis by two mechanisms. *Neurochem Res.* 2000;25(7):931-40.

Ferreira R, Oliveira AR, Barros Filho, TEP. Padronização da técnica para captação do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(3):112-4.

Figuera MR, Royes LFR, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Fussa Filho R, et al. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. *Neurobiol Dis.* 2006;22(3):611-23.

Fouad K, Krajacic A, Telzlaff W. Spinal cord injury and plasticity: opportunities and challenges. *Brain Res Bull.* 2011;84(4-5):337-42.

Freund P, Weiskopf N, Ward NS, Hutton C, Gall A, Ciccarelli O, et al. Disability, atrophy and cortical reorganization following spinal cord injury. *Brain.* 2011;134(Pt6):1610-22.

Furian AF, Oliveira MS, Royes LFF, Fiorenza NG, Figuera MR, Myskiw JC, et al. GM1 ganglioside induces vasodilation and increases catalase content in the brain. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(6):924-32.

Galvão PEC, Cristante AF, Jorge HMH, Damasceno ML, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Avaliação funcional e histológica da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular. *Acta Ortop Bras*. 2011;19(1):10-6.

Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D. The syngen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine*. 2001;26(24Suppl):S87-98.

Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal cord injury: a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med*. 1991;324(26):1829-38.

Gerhart KA, Johnson RL, Menconi J, Hoffman RE, Lammertse DP. Utilization and effectiveness of methylprednisolone in a population-based sample of spinal cord injured persons. *Paraplegia*. 1995;33(6):316-21.

Goettl VM, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Sciatic nerve axotomy in aged rats: response of motoneurons and the effect of GM1 ganglioside treatment. *Brain Res*. 2003;968(1):44-53.

Ha KY, Kim YH. Neuroprotective effect of moderate epidural hypothermia after spinal cord injury in rats. *Spine*. 2008;33(19):2059-65.

Hadjiconstantinou M, Neff NH. GM1 ganglioside: *in vivo* and *in vitro* trophic actions on central neurotransmitter systems. *J Neurochem*. 1998;70(4):1335-45.

Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(3-4):264-80.

Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *J Spinal Cord Med.* 2001;24(3):142-6.

Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx.* 2004;1(1):80-100.

Hanley MA, Raichle K, Jensen M, Cardenas DD. Pain catastrophizing and beliefs predict changes in pain interference and psychological functioning in person with spinal cord injury. *J Pain.* 2008;9(9):863-71.

Hita RM. *Análise funcional e histológica da ação da neurotropina-4 sobre a lesão medular em ratos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Ho CH, Wuermser LA, Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC. Spinal cord injury medicine. 1.Epidemiology and Classification. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88(3 Suppl 1):S49-54.

Holdsworth F. Fracture, dislocations, and fracture-dislocations of the spine. *J Bone Joint Surg Am.* 1970;52(8):1534-51.

Holdsworth FW, Hardy A. Early treatment of paraplegia from fractures of the thorao-lumbar spine. *J Bone Joint Surg Br.* 1953;35-B(4):540-50.

Hughes JT. The Edwin Smith Surgical Papyrus: an analysis of the first case reports of spinal cord injuries. *Paraplegia.* 1988;26(2):71-82.

Hurlbert RJ. The role steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine.* 2001;26(24 Suppl):S39-46.

Ilyas AA, Chen ZW. Lewis rats immunized with GM1 ganglioside do not develop peripheral neuropathy. *J Neuroimmunol.* 2007;188(1-2):34-8.

Jeffery ND, Crang AJ, O'Leary MT, Hodge SJ, Blakemore WF. Behavioral consequences of oligodendrocyte progenitor cell transplantation into experimental demyelinating lesions in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1999;11(5):1508-14.

Kabatas S, Yu D, He DX, Thatte HS, Benedict D, Hepgul KT, et al. Neural and anatomical abnormalities of the gastrointestinal system resulting from contusion spinal cord injury. *Neuroscience.* 2008;154(4):1627-38.

Karpiak SE, Wakade CG, Taglivia A, Mahadik SP. Temporal changes in edema, Na⁺, K⁺, and Ca⁺⁺ in focal cortical stroke: GM1 ganglioside reduces ischemic injury. *J Neurosci Res.* 1991;30(3):512-20.

Kalluri H, Banga AK. Transdermal delivery of proteins. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(1):431-41.

Kameyama O, Shibano K, Kawakita H, Ogawa R. Transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in cervical spondylosis and spinal canal stenosis. *Spine.* 1995;20(9):1004-10.

Krause JS, Carter RE, Pickelsimer EE, Wilson D. A prospective study of health and risk of mortality after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2008;89(8):1482-91.

Ledeen R, Wu G. GM1 in the nuclear envelope regulates nuclear calcium through association with a nuclear sodium-calcium exchanger. *J Neurochem.* 2007;130(Suppl.1):126-34.

Lidal IB, Hynh TK, Biering-Sorensen F. Return to work following spinal cord injury: a review. *Disabil Rehabil.* 2007a;29(17):1341-75.

Lidal IB, Snekkevik H, Geir A, Nheltnes N, Stanghelle J, Beiring-Sorensen F. Mortality after spinal cord injury in Norway. *J Rehabil Med.* 2007b;39(2):145-51.

Marcon RM. *Estudo dos efeitos do monossialogangliosídeo (GM1) e da câmara de oxigenoterapia hiperbárica na lesão medular aguda em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Marcon RM. *Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Maikos JT, Qian Z, Metaxas D, Shreiber DI. Finite element analysis of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma.* 2008;25(7):795-816.

Martinez-Arizala A, Green BA. Hypothermia in spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1992;9(Suppl 2):S497-505.

Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma.* 2004;21(6):754-74.

Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassié P, Thicoipé M, Dabadie P. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord.* 2000;38(2):71-6.

Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC, Wuermsler LA, Ho CH. Spinal cord injury medicine. 6.Economic and Societal Issues in Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007;88(3 Suppl 1):S84-8.

Nelson JS, McCullough JL, Glenn TC, Wright WH, Liaw LH, Jacques SL. Mid-infrared laser ablation of stratum corneum enhances in vitro percutaneous transport of drugs. *J Invest Dermatol*. 1991;97(5):874–9.

Nockels R, Young W. Pharmacologic strategies in the treatment of experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1992;9(Suppl 1):S211-7.

Noonam VK, Kopec JA, Zhang H, Dvorak MF. Impact of associated conditions resulting from spinal cord injury on health status and quality of life in people with traumatic central cord syndrome. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89(6):1074-82.

Oliveira AL, Langone F. GM-1 ganglioside treatment reduces motoneuron death after ventral root avulsion in adult rats. *Neurosci Lett*. 2000;293(2):131-4.

Qiao GF, Cheng ZF, Huo R, Sui XH, Lu YJ, Li BY. GM1 ganglioside contributes to retain the neuronal conduction and neuronal excitability in visceral and barorreceptor afferents. *Journal of Neuroch*. 2008;106(4):1637-45.

Rabeh, SAN. *Condições de saúde e cuidado domiciliar de indivíduos com lesão de medula espinhal* [tese]. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007.

Raichle KA, Hanley M, Jensen MP, Cardenas DD. Cognitions, coping and social environment predict adjustment to pain in spinal cord injury. *J Pain*. 2007;8(9):718-29.

Rodrigues NR. *Padronização da lesão medular espinal em ratos Wistar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;1999.

Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar. *Acta ortop. bras.* 2010;18(4):182-86.

Roisen FJ, Bartfeld H, Nagele R, Yorke G. Ganglioside stimulation of axonal sprouting *in vitro*. *Science*. 1981;214(4520):577-8.

Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, Fehlings MG. Spinal Cord Injury: time to move? *J Neurosci*. 2007;27(44):11782-92.

Santos GB, Barros Filho TE, Cristante AF, Silva CF, Marcon RM, Souza FI, Mattar Jr R. Local application of Ganglioside GM1 with lasermed by the criopass therapy method improves peripheral nerve and spinal cord regeneration in rats. *FENS (Annals)*. 2010;5:040.19. (Presented at 7th Forum of European Neuroscience; 2010 July 3-7; Amsterdam, Holanda. Abstracts).

Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87-91.

Schneider JS, Roeltgen DP, Rothblat DS, Chapas-Crilly J, Seraydarian L, Rao J. GM1 ganglioside treatment of Parkinson's disease. *Neurology*.1995;45(6):1149-54.

Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1999;11(10):3648-58.

Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine.* 2001;26(24Suppl):S2-12.

Silva RH, Bergamo M, Frussa Filho R. Effects of neonatal ganglioside GM1 administration on memory in adult and old rats. *Pharmacol Toxicol.* 2000;87(3):120-5.

Singh R, Dhankar SS, Rohilla R. Quality of life of people with spinal cord injury in Northern India. *Int J Rehabil Res.* 2008;31(3):247-51.

Sodré, PC. *Estudo sobre a disfunção sexual de mulheres com lesão medular* [dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2007.

Sokolova TV, Zakharova IO, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF. Neuroprotectives effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. *Neurochem Res.* 2007;32(8):1302-13.

Souza FI. *Estudo da ação das neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração nervosa: estudo experimental em camundongos isogênicos (C57BL/6J)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Sribnick EA, Wingrave JM, Matzelle DD, Wilford GG, Ray SK, Banik NL. Estrogen attenuated markers of inflammation and decreased lesion volume in acute spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res*. 2005; 82(2):283-93.

Taoka Y, Okajima K. Spinal cord in the rat. *Prog Neurobiol*. 1998;56(3):341-58.

Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, John M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma*. 2001;18(5):533-43.

Tator CH. Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery*. 2006;59(5):957-82.

Tator CH, Fehlings G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991;75(1):15-26.

Tebet MA, Barros Filho TEP, Machado IR, Carvalho MOP, Hanania FR, Daci K. Efeito da metilprednisolona na lesão medular em ratos: análise funcional e histológica. *Acta Ortop Bras*. 2003;11(2):80-7.

Thuret S, Monn LDF, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(8):628-43.

Trivedi A, Olivas AD, Noble-Haeusslein LJ. Inflammation and spinal cord injury: infiltrating leukocytes as determinants of injury and repair processes. *Clin Neurosci Res*. 2006;6(5):283-92.

Tuono, VL. *Traumas de coluna no Brasil: análise das internações hospitalares* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2008.

Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop.* 1999;34(2):85-9.

Vogelsberg V, Fong TG, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Cholinergic deficits in aged rat spinal cord: restoration by GM1 ganglioside. *Brain Res.* 1997;761(2):250-6.

Walker JB, Harris M. GM1-ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. *Neurosc Lett.* 1993;161(2):174-8.

Weber F, Rudel R, Aulkemeyer P, Brinkmeier H. Anti-GM1 antibodies can block neuronal voltage-gated sodium channels. *Muscle Nerve.* 2000;23(9):1414-20.

Wyss-Coray T, Borrow P, Brooker MJ, Mucke L. Astroglial overproduction of TGF-beta1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol.* 1997;77:45-50.

Young W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res.* 2002;137:231-55.

Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg.* 1982;57(5):667-73.