

Márcio Oliveira Penna de Carvalho

**Estudo da recuperação da função locomotora e
histomorfométrico da lesão medular em ratos:
efeitos da metilprednisolona e do gangliosídeo G(M1)**

**Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho

São Paulo

2007

Márcio Oliveira Penna de Carvalho

**Estudo da recuperação da função locomotora e
histomorfométrico da lesão medular em ratos:
efeitos da metilprednisolona e do gangliosídeo G(M1)**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho

**São Paulo
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Márcio Oliveira Penna de

Estudo da recuperação da função locomotora e histomorfométrico da lesão medular em ratos : efeitos da metilprednisolona e do gangliosídeo G(M1) / Márcio Oliveira Penna de Carvalho. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Tarcisio Eloy Pessoa de Barros Filho.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Traumatismos da medula espinal 3.Medula espinal/anatomia & histologia 4.Atividade motora 5.Metilprednisolona 6.Gangliosídeo G(M1)

USP/FM/SBD-447/07

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos e Márcia Penna de Carvalho, pelo amor, apoio e estrutura que me deram para realizar tudo em minha vida, a eles devo tudo o que sou e conquistei até hoje.

À Carla Penna de Carvalho, irmã querida, que mesmo distante me apoiou e incentivou em todos os momentos de minha vida.

À minha filha, Maria Eduarda Penna de Carvalho, que mesmo com a distância me dá forças para continuar sempre..., e pelas tantas vezes que deixei de brincar e de compartilhar momentos de alegria.

Ao meu avô, Agenor Porto Penna de Carvalho, que ensinou seus filhos e netos a viverem com dignidade, respeito e honestidade, e por toda a influência direta ou indireta em minha formação como pessoa e como profissional.

À Carolina Fonseca Marques, companheira de sempre e de todas as horas, dedicação, amor e carinho.

Ao amigo eterno em meu coração, Vinícius Estrela Leão, que juntos galgamos e trilhamos os primeiros passos no mundo da Ortopedia... para sempre em minhas lembranças...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela confiança e pelo incentivo no desenvolvimento do conhecimento científico.

Ao amigo, Professor e sócio Doutor Marcos Antônio Tebet, maior incentivador na realização deste trabalho, pela paciência e sapiência com que me trilhou em todos os caminhos profissionais, desde a formação ortopédica, à cirurgia da coluna e à esse momento.

Ao amigo, Professor e sócio Doutor Wagner Pasqualini, pelo apoio e estímulo no aprimoramento contínuo na cirurgia da coluna vertebral.

Ao Doutor Itibagi Rocha Machado, chefe da Residência Médica do Instituto Jundiaense de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí, competência na formação profissional, agradeço pelos ensinamentos e minha formação Ortopédica.

Aos doutores Marcelo de Azevedo e Souza Munhoz, Sidnei Satoshi Murayama, Renato de Moraes, Cleber Ferreira Moreira, Eduardo Gomes Machado, Helton Hiroshi Hirata, Ricardo Ezidio de Andrade Bandeira, Lincoln Hiroiti Kamimura, Luciana de Fatima Miquelin e Carlos Alberto Moreira Kopke, preceptores da Residência Médica do Instituto Jundiaense de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí.

Aos residentes do Instituto Jundiaense de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí, Rubens Massaru Kanno, Luiz Henrique Silveira Rodrigues, Maria Fernanda Reis Ribeiro, Juliano Paulo Fratezi, Paulo Pereira Fontes Martins Filho, tânia mara da silva Gomes, Raul Hernandez Juliato, Luis Henrique Penteado Gullo, Leandro Nani Pires, Gustavo Martins Fontes, Vinicius Pontes do Nascimento, Adriano Cachulo Neto, Luis Eduardo Pedigoni Bulisani, Daniel Giner Roselis, Eder Ferreira Moreira, Ivan Henrique Wahlbrink, Bruno Barbosa Oliveira e Silva e Daniel Machado, maior incentivo acadêmico.

Ao Professor Doutor Idércio Luiz Sinhorini, professor da pós-graduação do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela imensa ajuda e pelo carinho com que me recebeu em seu Departamento.

Ao Aluno Heidge Fukumasu, pós-graduando do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e ao técnico Cláudio Arroyo do mesmo Departamento, pelo apoio na realização e avaliação das lâminas histológicas.

À Rosana Moreno Costa e Maria Helena Nunes, secretárias da pós-graduação do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da USP, pela paciência nestes anos e pela dedicação que realizam seus trabalhos.

Ao amigo e Professor Edson Berbary, que com carinho e satisfação contribuiu com seus conhecimentos na língua portuguesa.

À secretária doméstica Maria Cacilda Esteves (Brisa do mar), que suportou minha bagunça nestes anos, sem poder arrumá-la.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as normas em vigor no momento desta publicação:

Terminologia Anatômica em Português conforme a terminologia anatômica internacional da *FEDERATIVE COMMITTEE 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. 1. Ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole Ltda 2001. 248p.

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.

Utilizaram-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o GUIA PARA EXPRESSÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO, Segunda Edição Brasileira do *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements* (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS (1992) e na LILACS – LITERATURA LATINO-AMERICANA E DO CARIBE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (1995).

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	11
4. MÉTODOS	39
4.1 Modelo de lesão medular	40
4.1.1 Animais de experimentação	41
4.1.2 Procedimento anestésico e cirúrgico	42
4.1.3 Contusão medular	43
4.2 Formação dos grupos e tratamento medicamentoso	45
4.3 Avaliação da função locomotora	46
4.4 Eutanásia e amostras de tecido	46
4.5 Análise histológica e morfométrica	47
4.6 Análise estatística	50
5. RESULTADOS	52
5.1 Função locomotora	53
5.2 Histológicos e morfométricos	57
5.3 Correlação função locomotora e histomorfometria	80
6. DISCUSSÃO	81
7. CONCLUSÕES	94
8. ANEXOS	96
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
AMP	adenosinamonofosfato
ATP	adenosinatrifosfato
ATPase	adenosinatrifosfatase
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
C	celsius
Ca ⁺²	cálcio
cm	centímetro
ECC	escore combinado comportamental
Ed.	edição
EPO	eritropoetina humana recombinante
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América do Norte
g	gramas
g/cm	gramas por centímetro
GM-1	monosialotetraeosilgangliosídeo
GM1	grupo que recebeu GM-1
h	hora (s)
HE	hematoxilina-eosina
IL-10	interleucina 10
K ⁺	potássio

kg	quilograma
L	vértebra lombar
MASCIS	<i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i>
mg	miligramas
mg/kg	miligramas por quilogramas
min.	minutos
mm	milímetros
mm ²	milímetros quadrados
MP	metilprednisolona ou grupo que recebeu metilprednisolona
MP+GM1	grupo que recebeu metilprednisolona associado ao GM-1
NASCIS	<i>National Acute Spinal Cord Injury Study</i>
NYU	<i>New York University</i>
p.	página
Prof.	Professor
®	marca registrada
rev.	revista
RNA	ácido ribonucléico
SNC	sistema nervoso central
T	vértebra torácica
x	vezes

RESUMO

Penna de Carvalho MO. Estudo da recuperação da função locomotora e histomorfométrico da lesão medular em ratos: efeitos da metilprednisolona e do gangliosídeo G(M1) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 123p.

A metilprednisolona (MP) e o gangliosídeo GM-1 são drogas de uso clínico estabelecido para o tratamento da lesão medular em humanos, embora sua eficácia e seus mecanismos de ação ainda não sejam totalmente entendidos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os resultados da recuperação da função locomotora e comparar com as alterações histomorfométricas da medula de ratos com lesão medular medicados com MP; GM-1 e sua associação. A lesão medular foi produzida pelo sistema New York University[®] em 24 ratos *Wistar*, divididos em quatro grupos: controle (n=6), MP (n=6), GM1 (n=6) e MP+GM1 (n=6). A avaliação da recuperação da função locomotora dos ratos foi realizada utilizando-se a escala de BBB no 2º, 7º e 14º dias após lesão medular e sacrificados no 14º dia para análise histológica e morfométrica de área total, área preservada e percentual de área preservada. Concluímos que a MP e sua associação com o GM-1 mostraram-se eficazes na recuperação da função locomotora e que todos os ratos medicados demonstraram melhora no percentual de área preservada superior ao grupo controle. Os Grupos MP e GM1 foram superiores na preservação de substância branca e o GM-1 demonstrou efeitos benéficos na preservação de substância cinzenta no centro da lesão. A substância cinzenta demonstrou ser mais suscetível à lesão que a substância branca e não houve correlação entre os achados histológicos e a recuperação da função locomotora.

DESCRITORES: 1.Ratos Wistar 2.Traumatismos da medula espinal 3.Medula espinal/anatomia & histologia 4.Atividade motora 5.Metilprednisolona 6.Gangliosídeo G(M1)

SUMMARY

Penna de Carvalho MO. Locomotor function recovering and histomorphometric study of spinal cord injury in the rat: effects of methylprednisolone and ganglioside G(M1) [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 123p.

The methylprednisolone and the GM-1 ganglioside are drugs with established clinical usage for the treatment of spinal cord injury in human; however its efficiency and its active mechanisms are not completely understood yet. The objective of the present paper has been to evaluate the results from the neurological function recovering and to compare these with the histomorphometric alterations in rats with spinal cord injury, prescribed with methylprednisolone; GM-1 and its association. The spinal cord injury has been done by the New York University system[®] in 24 *Wistar* rats which were assigned to one of four groups: control (n=6), MP (n=6), GM1 (n=6) and MP+GM1 (n=6). The evaluation of the neurological function outcome has been carried out using BBB locomotor rating scale on the second, seventh and fourteenth days after the injury and sacrificed on the fourteenth day for histological and morphometric analyses of total cross-sectional area, spared area and percentage of spared area. We concluded that the methylprednisolone and its association with the GM-1 revealed themselves effective concerning to the locomotor function recover and that every medicated rat demonstrated an improvement in the preserved area percentage superior to the control group. The MP and GM1 Groups were superior in the white matter preservation and the GM-1 demonstrated beneficial effects regarding the gray matter preservation at the injury epicenter. The gray matter has been more sensitive for damaged than the white matter and there has not been correlation between the histological findings and the locomotor function recovering.

DESCRIPTORS: 1.Rats Wistar 2.Spinal cord injuries 3.Spinal cord/anatomy & histology 4.Motor activity 5.Methylprednisolone
6.Ganglioside G(M1)

1. INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A lesão medular é um problema devastador que acomete principalmente jovens do sexo masculino em idade produtiva. Atinge entre 15 e 40 pessoas por milhão de habitantes a cada ano e acarreta impacto econômico anual de mais de quatro bilhões de dólares nos Estados Unidos da América (**Burney et al. 1993; Ducker e Zeidman 1994**). No Brasil, a incidência de trauma raquimedular (TRM) estimada é de 40 novos casos ano/milhão de habitantes, aproximadamente 6 a 8 mil casos novos por ano e a causa mais freqüente são os ferimentos por arma de fogo (**Barros Filho et al., 1990; Greve, 1997**). Causa limitações funcionais físicas e psicológicas tanto para o paciente e abala a estrutura de toda a família (**Young, 1993**).

A lesão ao tecido medular ocorre em dois eventos distintos: primário ou mecânico, decorrente da lesão traumática mecânica aguda que lesa e comprime os elementos neurais e independe de mecanismos celulares, e secundário ou isquêmico em função de lesões adicionais, devido a uma cascata de eventos que envolvem edema, alteração da perfusão e do fluxo sanguíneo, fatores de crescimento, influxo celular de cálcio, peroxidação lipídica e, por fim, necrose tecidual, que são eventos biológicos desencadeados em decorrência ao trauma inicial (**Ducker et al., 1971**;

Sandler e Tator, 1976; Anderson et al., 1982; Hall et al., 1984; Faden et al., 1987; Noble e Wrathall, 1985, 1989; Tator e Fehlings, 1991; Young, 1993).

O primeiro a estudar e assim postular o conceito de lesão medular secundária foi **Allen**, em 1911, que desenvolveu a teoria de que agentes nocivos encontrados na necrose hemorrágica são os agentes bioquímicos responsáveis pelos danos posteriores. Entretanto esses estudos só foram retomados após cinco décadas para melhor avaliar os mecanismos fisiopatológicos e biológicos que são atribuídos à destruição pós-traumática do tecido medular (**Balentine, 1978, Tator e Rowed, 1979; Lohse et al., 1980; Young e Flamm, 1982; Blight, 1983; Tator e Fehlings, 1991; Braughler e Hall, 1992; Young, 1993).**

O tratamento dos pacientes com lesão da medula espinhal aguda iniciou-se no período da Segunda Guerra Mundial, na Inglaterra, onde seu sucesso incentivou a criação de centros de emergência e protocolos para promover prevenção e tratamento das seqüelas. Com o intuito de melhorar a assistência a esses pacientes, estudos têm sido realizados (**Geisler et al., 1991).**

Do ponto de vista médico, existem diferentes tipos de abordagens para o tratamento desses pacientes: a abordagem cirúrgica, que consiste na descompressão e estabilização das fraturas associadas (**Tator et al. 1999; Legos et al., 2002; La Rosa et al., 2004**); por métodos físicos, como a hipotermia e a terapia com oxigênio

hiperbárico (Albin e White, 1987; Galvão, 2003); abordagem por terapia biológica, que consiste na utilização de células embrionárias progenitoras (células-tronco), fatores genéticos e estimuladores de proliferação celular, como a eritropoetina recombinante humana e o fator de crescimento insulina-like (Akesson et al., 2001; McDonald e Howard, 2002; Kaptanoglu et al., 2004; Kimura et al., 2005; Lee et al., 2005b; Urdzíkova et al., 2006; Cízková et al., 2006; Cristante, 2007; Vitellaro-Zuccarello et al., 2007); e com o uso de agentes farmacológicos, como o monosialotetraesossilgangliosídeo g(m1) (GM-1), a metilprednisolona (MP), a naloxona, o tilirazade e a nimodipina (Hall e Braugler, 1982; Cuello et al., 1989; Geisler et al., 1991; 1993, 2001; Geisler, 1993; Walker e Harris, 1993; Constantini e Young, 1994; Nash et al., 2002; Lee et al., 2005a; Hung et al., 2007; Tarasenko et al., 2007).

A metilprednisolona, em altas doses, tem sido utilizada nos estudos experimentais realizados em ratos e gatos, com melhora na perfusão microvascular, no metabolismo medular e em medidas histomorfométricas (Anderson et al., 1982; Constantini e Young, 1994). Postula-se que seus mecanismos de ação sejam a inibição da peroxidação lipídica, a diminuição da degeneração do axônio, a prevenção de isquemia e a reversão do acúmulo de cálcio intracelular (Young e Flamm, 1982; Hall et al., 1984, 2001; Anderson et al., 1982; Constantini e Young, 1994; Bracken e Holford, 1993). Apesar da maioria dos estudos experimentais demonstrarem efeito benéfico com a utilização de esteróides, os mecanismos de ação da MP na medula lesionada ainda não são totalmente compreendidos (Ducker e Zeidman, 1994).

Ensaio clínico multicêntrico e controlado, como o *National Acute Spinal Cord Injury Study* (NASCIS) I, II e III, realizados a partir de 1979, defendem o uso da MP dentro das primeiras oito horas após lesão medular traumática na prática clínica, sendo o primeiro agente farmacológico a demonstrar melhora na recuperação funcional do trauma medular em humanos (**Bracken et al., 1990; Ducker e Zeidman, 1994; Bracken et al., 1997; Gebrin, 1997b; Gerndt et al., 1997; Vaccaro e Singh, 1999; Bracken, 2002; Bracken e Holford, 2002; Tsutsumi et al., 2006**). Entretanto, mesmo o uso da MP sendo adotado clinicamente em diversos centros de tratamento, ainda não é um consenso usado por todos (**Lammertse 2004**).

Os gangliosídeos são glicolípídeos endógenos derivados do ácido siálico, presentes na camada externa das membranas do sistema nervoso central (SNC). Estudos clínicos mostram ação terapêutica significativa do gangliosídeo GM-1 na recuperação neurológica de pacientes vítimas de trauma raquimedular, tanto na fase aguda como na fase crônica (**Gorio, 1988; Geisler et al., 1991, 2001; Walker e Harris, 1993; Gebrin et al., 1997a**).

O GM-1 tem como propriedades farmacológicas a redução do edema neuronal através do aumento da atividade das bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+$ e Mg^{++} ATPases; homeostase das células nervosas pelo restabelecimento do equilíbrio de membrana (**Mahadik et al., 1989; Karpiak et al., 1991**) e, principalmente, o aumento de fatores neurotróficos endógenos (**Cuello et al., 1989**), que diminuem a perda de

neurônios após o trauma, aumentando os mecanismos de plasticidade dos circuitos medulares lesados, potencializando a recuperação de conexões funcionais (**Young, 1995**).

Os gangliosídeos foram inicialmente utilizados no tratamento de pacientes com trauma crânio-encefálico e lesões diversas do sistema nervoso central. Nos últimos anos, têm sido utilizados no tratamento do trauma medular agudo, sendo estudado por diversos autores, porém sua eficácia na recuperação de função neurológica ainda é controversa (**Gebrin et al., 1997a, 1997b; Geisler et al. 1991, 1993a, 1993b, 2001**)

Modelos experimentais de lesão medular aguda são fundamentais para o estudo de drogas utilizadas na prática clínica (**Means et al., 1981; Constantini e Young, 1994; Basso et al., 1996**). Um modelo experimental deve produzir uma lesão no sistema nervoso central consistente e com pouca variabilidade (**Bresnahan et al., 1987; Gruner, 1992**). No entanto esta lesão deve apresentar resultados anatômicos e de recuperação motora e funcional reproduzível (**Basso et al., 1996**).

Rodrigues (1999) reproduz e padroniza a lesão medular utilizando o New York University (NYU) Spinal Cord Contusion System[®], que reproduz lesão medular por compressão em animais de pequeno porte no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade

de São Paulo. Isto nos possibilita estudar em laboratório, de maneira padronizada, a lesão medular sempre com resultados idênticos, o que permite a análise controlada do uso de fármacos neuroprotetores.

O conhecimento das alterações histológicas e fisiopatológicas da lesão medular secundária através de estudos experimentais permite o desenvolvimento e o estudo de drogas que atuem diretamente impedindo a cascata bioquímica, que culmina com o aumento da lesão inicial. Várias drogas são estudadas no âmbito experimental e na prática clínica, em que as duas drogas de uso estabelecido e reconhecido em humanos são a MP e o GM-1. Entretanto o mecanismo de ação e a eficácia dessas drogas ainda não são totalmente entendidos e ainda não formam consenso na prática clínica (**Taoka e Okajima, 1998, 2000**).

Na última década, estudos de análise morfométrica da lesão medular com coloração específica para tecido nervoso têm sido realizados com o objetivo de avaliar o efeito de drogas sobre a medula e sobre a função neurológica, entretanto com resultados divergentes, deixando dúvidas, tanto do efeito das drogas, quanto da correlação das alterações histomorfométrica com a função neurológica (**Blight, 1983; Behrmann et al., 1992; Delamarter et al., 1995; Basso et al., 1996; Rabchevsky et al., 2002; Takami et al., 2002**).

Tebet e colaboradores têm estudado em nosso meio os efeitos da MP, do GM-1 e sua associação na recuperação da função locomotora e nas alterações histológicas da lesão medular em ratos, utilizando-se da coloração com hematoxilina-eosina (HE) (**Tebet, 2002; Tebet et al., 2003**). Obtêm resultados, do ponto de vista histológico, divergentes ao encontrado na literatura (**Constantini e Young, 1994**) e constataam que a metodologia de seu estudo histológico foi insuficiente, sugerindo a realização de outros estudos com metodologia histológica mais adequada.

Esses estudos têm observado também que os resultados histológicos não são comparáveis aos da recuperação funcional, suscitando a questão se, com o estudo histológico adequado, essa comparação não seria positiva. Dessa forma, faz-se necessário dar continuidade aos estudos de **Tebet** e seus colaboradores e de realizar estudo histológico com coloração específica para tecido nervoso, onde os métodos de coloração de azul rápido de luxol e violeta de cresyl têm sido utilizados com êxito na literatura (**Noble e Wrathall, 1985; Bresnahan et al., 1987; Behrmann et al., 1992; Basso et al., 1995; Delamarter et al., 1995**)

2. OBJETIVO

2 - OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados da recuperação da função locomotora e comparar com as alterações histomorfométricas da medula de ratos com lesão medular medicados com metilprednisolona, GM-1 e sua associação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3 - REVISÃO DA LITERATURA

Allen (1911) desenvolve um modelo experimental para produzir lesão medular. Utiliza cães com lesão medular causada por queda de peso sobre a medula, mantendo a dura-máter íntegra. Qualifica a gravidade da lesão como o produto em gramas pela altura em centímetros, sendo o resultado expresso em g/cm.

Ducker et al. (1971) realizam estudo experimental em 32 macacos *Rhesius*. Fazem laminectomia da transição torácica e lombar (T12 - L1) e produzem lesão medular por queda livre de um êmbolo colocado a 20 cm de altura. Os grupos são divididos de acordo com a massa do êmbolo: 10, 15, 20 e 25 g.

Analisa os achados histopatológicos e observam que quanto maior a carga aplicada, maior a gravidade da lesão medular, sendo a área de necrose também proporcionalmente maior. Observam haver melhora da função neurológica apesar de alterações histológicas significativas.

Sandler e Tator (1976) avaliam o fluxo sanguíneo da medula de macacos com lesão medular provocada pela técnica experimental de compressão com balão inflável na região extradural, 24 horas após o trauma inicial. Demonstram que ocorre intensa diminuição do fluxo localizada tanto na substância branca, quanto na substância cinzenta, e que é observado tanto em posição proximal quanto em posição

distal em relação ao centro da lesão. Concluem que uma compressão aguda da medula está associada a longos períodos de isquemia, mesmo após a retirada do fator compressivo.

Balentine (1978) estuda lesão necrótica da medula de ratos com lesão medular provocada por queda de peso. Avalia as alterações histológicas, pela coloração com hematoxilina-eosina, dos vasos sanguíneos e da necrose tecidual da medula em períodos de tempo de 30 minutos a 1 semana após a lesão. Confirma a evolução temporal de que a necrose ocorre primeiro na substância cinzenta principalmente nas primeiras quatro horas e posteriormente na substância branca. Observa que a necrose isquêmica é resultante da ruptura dos grandes vasos sanguíneos que ocorrem no momento do impacto.

Tator e Rowed (1979) salientam a importância da lesão medular secundária após o trauma inicial. Afirmam que raramente uma lesão medular causa transecção anatômica na medula, embora frequentemente cause paralisia completa ou incompleta da função medular.

Descrevem que, inicialmente, pelo exame histológico da medula, são observados pontos hemorrágicos na substância cinzenta e edema na substância branca. Semanas após a lesão inicial, é observada a substituição do tecido medular necrótico por cavidades. Acreditam na hipótese de que o tratamento deve ser direcionado a fim de impedir o infarto secundário, melhorar a recuperação e citam os corticosteróides como drogas a serem utilizadas para impedir essa cascata secundária de lesões após o trauma inicial.

Lohse et al. (1980) realizam estudo experimental em gatos submetidos à lesão medular aplicando-se forças de 100 g/cm ou 260 g/cm para avaliar o fluxo sanguíneo na medula medido pelo método de *clearance* de hidrogênio antes e após a lesão.

Observam, após o trauma, aumento da pressão sanguínea (137%) e arritmia cardíaca em todos os grupos. Demonstram que, no grupo com trauma de 100 g/cm, não foi observada diferença significativa quanto ao fluxo sanguíneo, enquanto, no grupo com trauma de 260 g/cm, houve aumento do fluxo sanguíneo nas seis horas posteriores ao trauma.

Anderson et al. (1982) utilizam 76 gatos submetidos à lesão medular produzida por compressão contínua com peso de 170 g durante 5 minutos com o objetivo de avaliar o efeito do uso da MP na perfusão microvascular e no metabolismo da medula lesionada através do uso de carbono coloidal. Observam que o grupo tratado com dose 15 mg/kg/24h de MP apresenta preservação da microcirculação e afirmam também que essa dosagem propicia ao tecido o substrato e o oxigênio necessários para manter um estado energético suficiente.

Hall e Braugher (1982) examinam a habilidade de altas doses de MP, administradas em dose única intravascular, em diminuir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade da bomba sódio, potássio e ATPase. Realizam estudo experimental em ratos e avaliam os efeitos dessa droga em diversas doses. Concluem

que, em doses únicas de 15 a 30 mg/kg, a MP é eficaz na prevenção destes efeitos e que doses suplementares apresentam efeito contrário.

Young e Flamm (1982) realizam estudo experimental em gatos com lesão medular contusa. Avaliam o efeito da metilprednisolona em altas doses quanto à melhora do fluxo sanguíneo, da concentração de cálcio extracelular e do potencial evocado somato-sensitivo. Concluem que altas doses de MP promove dilatação dos vasos e melhora do fluxo sanguíneo, explicando seus efeitos benéficos na recuperação funcional.

Blight (1983) descreve método sistemático para mapeamento e contagem de axônios mielinizados em estudo neuropatológico. Documenta as alterações morfológicas crônicas da medula de gatos lesionada por método de queda de peso. Observa, nestas lesões, a redução intensa do número de axônios, eliminação seletiva de fibras nervosas e a desmielinização. Salienta que um desses achados ou a sua combinação pode ser responsável pela paralisia crônica nos animais e demonstra correlação entre os achados morfológicos e a função neurológica.

Hall et al. (1984) estudam o fluxo sanguíneo medular em 25 gatos adultos submetidos à contusão medular, padronizada ao nível de L3. Após a lesão, realizam estudo do fluxo sanguíneo em todos os gatos com o tempo de 10 minutos, 30 minutos, uma, duas, três e quatro horas após a lesão. Dividem os animais em quatro grupos: o grupo controle e os que receberam metilprednisolona em doses diferentes 15, 30 e 60 mg/kg. Concluem que o corticóide diminui a isquemia medular pós-

traumática, quando administrado na dose de 30 mg/kg, dentro das primeiras horas após do trauma, mas não reverte a isquemia, quando esta já ocorreu.

Noble e Wrathall (1985) avaliam as alterações histopatológicas e funcionais de lesão medular em ratos provocada pela queda livre de peso de 10g sobre a medula da altura de 2,5 cm, 5,0 cm, 7,5 cm, 10,0 cm e 17,5 cm ao nível do oitavo segmento medular torácico. Sugerem, baseados na análise dos resultados, existir uma correlação significativa dos parâmetros morfométricos no centro da lesão (volume da lesão, extensão da lesão e a área de substância branca e cinzenta lesionada) com a altura de queda do peso e déficit funcional após 4 semanas de lesão.

Albin e White (1987) analisam os fatores epidemiológicos e as alterações biológicas do fluxo sanguíneo medular e ressaltam modalidades terapêuticas clínicas e experimentais desde hipotermia, antagonistas opióides e bloqueadores adrenérgicos.

Bresnahan et al. (1987) desenvolvem um dispositivo de lesão medular experimental através de impacto controlado e direcionado eletromecanicamente, que provoca graus variados de lesão tecidual, para avaliar as alterações anatômicas, comportamentais e determinar a capacidade do dispositivo de produzir graus de intensidade de lesão medular consistentes.

A análise dos resultados demonstra correlação significativa das alterações comportamentais com a intensidade da lesão e com as alterações teciduais.

Concluem que é possível produzir lesão medular intermediária em ratos de forma consistente e reprodutível.

Faden et al. (1987) demonstram, em estudo experimental de lesão medular em ratos, que o trauma leva a hidrólise da membrana de fosfolípidos precocemente, o que resulta na liberação de ácidos graxos livres. Salientam que essas alterações contribuem para a lesão medular secundária a reduzir o fluxo sanguíneo medular através de resposta inflamatória ao trauma.

Cuello et al. (1989) avaliam os efeitos do fator beta de crescimento neural e gangliosídeo GM-1 sobre o SNC de ratos submetidos à lesão no córtex cerebral.

Sugerem que o gangliosídeo exógeno pode desencadear respostas tróficas em neurônios colinérgicos do SNC.

Noble e Wrathall (1989) promovem lesão medular contusa e graduada em ratos e examinam a relação entre a substância branca residual e o déficit funcional através do Escore Motor, que é uma modificação do teste de Tarlov e do Escore Combinado Comportamental (ECC), que varia de zero por cento para o rato normal até 100% para o rato com paralisia total das patas traseiras, aplicado após cada sessão de teste.

Observam interrupção na substância cinzenta com o aspecto de cavidades uma semana após a lesão inicial. A hemorragia é mais evidente entre 15 minutos e 24 horas após a lesão. A presença de áreas contendo cavidades ocorre em todos os grupos que sofreram lesão após 24 horas.

Demonstram que há substancial correlação entre a substância branca residual e o déficit funcional medido pelo ECC e que isto é observado após quatro semanas, quando a lesão está totalmente desenvolvida.

Barros Filho et al. (1990) analisam, em estudo epidemiológico retrospectivo, 428 pacientes com traumatismo da coluna vertebral atendidos no período de 1982 a 1987. Atestam que a região cervical é a mais freqüentemente acometida. Citam, como fatores causais mais comuns, os ferimentos por projéteis de armas de fogo (36,7%), seguidos dos acidentes de trânsito e mergulho em água rasa. Chamam a atenção para o dado que mais de 50% dos pacientes foram atendidos em até 24 horas após o trauma.

Bracken et al. (1990) realizam ensaio clínico duplo-cego, placebo-controlado, randomizado com o objetivo de avaliar a eficácia e a segurança do uso da MP e da naloxone em pacientes com trauma medular agudo. Concluem que o uso da MP em altas doses promove recuperação neurológica quando administrada dentro das oito primeiras horas do trauma, não sendo observado o mesmo com o uso da naloxone.

Geisler et al. (1991) apresentam estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, placebo controlado do gangliosídeo GM-1 em 37 pacientes com trauma medular agudo comparados com grupo controle. Evidenciam a existência da melhora da recuperação da função motora após um ano nos pacientes que receberam GM-1.

Tator e Fehlings (1991) revisam os conceitos das principais causas de lesão medular secundária com ênfase especial no mecanismo vascular.

Apresentam evidências da teoria de que a lesão secundária é causada pelo mecanismo-chave de isquemia pós-traumática e infarto, através de diferentes métodos angiográficos para avaliar a microcirculação e para medir o fluxo sanguíneo medular.

Descrevem as alterações histológicas na medula lesionada incluindo hemorragia, edema, necrose axonal e neuronal, desmielinização, formação cística e o infarto. Documentam que a hemorragia observada imediatamente após o trauma agudo está associada a zonas isquêmicas na substância branca. Discutem os vários métodos de tratamento sobre os efeitos vasculares da lesão medular aguda como os bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas opióides e os esteróides. Apresentam evidências de que a isquemia pós-traumática é um mecanismo secundário importante da lesão medular e que pode ser contido com o uso de corticóides.

Behrmann et al. (1992) apresentam um novo método para produzir lesão medular em ratos através de deslocamento breve da superfície dural com vários graus de deslocamento até a secção completa. Realizam análise histomorfométrica e da função locomotora pela modificação da escala de Tarlov, observando a marcha dos animais em campo aberto, em plano inclinado e em grade.

Demonstram haver recuperação funcional nos animais que sofreram contusão medular com lesão parcial quando comparados com os do grupo que foi submetido à secção. Concluem que a área de lesão e a área de substância branca residual íntegra

são os melhores indicadores morfológicos da recuperação funcional, tendo relação direta com a intensidade do trauma.

Gruner (1992) apresenta um novo modelo de aparelho monitorado para realizar lesão contusa na medula de ratos em estudo experimental, o sistema New York University® (NYU). Salienta que esse aparelho é uma alternativa melhor aos modelos anteriormente descritos na literatura, pois permite obter medidas da velocidade de impacto e da quantidade de contusão medular, produzindo lesão controlada e reproduzível.

Hall (1992) revisa o conhecimento a respeito da ação neuroprotetora da MP na lesão medular, incluindo o mecanismo de ação, dose requerida e tempo de ação. Relata que um regime intensivo de MP em altas doses tem melhorado a recuperação funcional de pacientes e de animais de laboratório. Ressalta que a ação neuroprotetora da MP envolve a capacidade de inibir os radicais livres de oxigênio induzidos pela peroxidação lipídica e aponta questões não resolvidas incluindo a janela terapêutica, a duração do tratamento e a combinação racional com novos agentes neuroprotetores a fim de diminuir os efeitos colaterais do seu uso em altas doses.

Bracken e Holford (1993) publicam artigo com os resultados observados no *National Acute Spinal Cord Injury Study* (NASCIS). Relatam que o NASCIS 1 (1977) conduziu estudo randomizado e controlado das terapias que podem melhorar a lesão medular e o NASCIS 2 comparou o uso de altas doses de MP ou nalaxone ao

placebo e reportou que pacientes que iniciaram tratamento dentro das primeiras oito horas tiveram melhora significativa da função motora com seis semanas, seis meses e um ano após a lesão.

Afirmam que a MP, aplicada precocemente após lesão medular, melhora a função motora de pacientes diagnosticados inicialmente com lesão completa e incompleta, e que o tratamento tardio com a MP está associado à diminuição da recuperação neurológica e que essa análise suporta seu uso em altas doses para o tratamento das lesões medulares no trauma raquimedular agudo.

Burney et al. (1993) salientam a importância de programas de prevenção dos acidentes e de atendimento local primário às vítimas com lesão medular aguda ao apresentarem os resultados de estudo epidemiológico de pacientes que deram entrada nos maiores centros de trauma dos EUA. Reportam que as causas mais comuns de lesão medular são acidentes com veículos motorizados, quedas de altura e ferimentos por projéteis de arma de fogo. Constatam que 80% dos pacientes são politraumatizados, sendo o local anatômico mais freqüente de lesão a coluna cervical (65% dos casos).

Geisler (1993) acredita que o tratamento com drogas melhore a restauração da função motora em pacientes que sofrem lesão medular. Relata que estudos recentes com o uso do GM-1 demonstram melhora da recuperação da função neurológica um ano após o início do tratamento. Salienta que os pacientes que receberam dose em bolo do GM-1 e de MP apresentaram melhora funcional, quando avaliados pela escala de FRANKEL, e que a recuperação da função do membro

inferior é melhor do que com o uso de placebo, o que não ocorre nos membros superiores. Sugere que esse estudo estimule a realização de trabalhos mais amplos com GM-1 em lesados medulares.

Geisler et al. (1993) resumem os estudos prospectivos, randomizados, duplo-cego e placebo controlado da associação de MP e do GM-1 no tratamento da lesão medular aguda e evidenciam os benefícios de seu uso em pacientes com essa lesão.

Walker e Harris (1993) publicam estudo transversal, randomizado duplo-cego em humanos com lesão medular crônica que receberam GM-1 ou placebo. Observam que aqueles tratados com o gangliosídeo mostraram melhor resultado funcional em relação àqueles que receberam placebo. Afirmam que o GM-1 é uma opção terapêutica no tratamento desses pacientes

Young (1993) revisa a literatura sobre a lesão medular secundária, citando tanto estudos experimentais, quanto estudos clínicos como o NASCIS 2. Critica e discute também a utilização de novas drogas, além da MP, assim como dosagem, janela terapêutica e duração do tratamento. Conclui que são necessários mais estudos com modelos animais reprodutíveis e ressalta que, em modelos animais, a preservação de números relativamente pequenos de axônios pode suportar recuperação funcional.

Constantini e Young (1994) comparam os efeitos da MP, do GM-1 e da associação dessas drogas em lesão medular aguda produzida em ratos. Realizam

análise iônica tecidual para estimar o volume da lesão e avaliação histológica com hematoxilina-eosina. Administram a MP e o GM-1 em várias dosagens 5 minutos e 3 horas após o trauma medular por meio intravenoso.

Estudos clínicos mostram que a MP melhora a recuperação da função neurológica, quando aplicada em altas doses nas primeiras oito horas após a lesão inicial, e que o gangliosídeo GM-1 melhora a recuperação da função motora, quando iniciado 48 a 72 horas após a lesão medular e após o tratamento com baixas doses de MP. No entanto os efeitos da combinação de MP e GM-1 não têm sido estudados em modelos animais.

Concluem que o GM-1 antagoniza os efeitos benéficos da MP em ratos com lesão medular e recomendam que essa associação não deve ser usada para tratar lesão medular aguda em humanos até que sejam mais estudados.

Ducker e Zeidman (1994) revisam baseados em evidência o papel do uso de corticosteróide na lesão medular. Criticam os estudos publicados, fornecem recomendação ao seu uso e suas complicações e avaliam objetivamente os resultados do NASCIS 1 e 2. Apesar das controvérsias, defendem o uso do corticóide o mais cedo possível após trauma raquimedular agudo e determinam não haver benefícios após oito horas do trauma.

Basso et al. (1995) afirmam que a avaliação da função locomotora após lesão medular experimental é importante para avaliar a eficácia terapêutica de drogas. Apresentam escala de índice de recuperação locomotora em ratos que sofreram lesão

medular produzida em laboratório e a denominam escala de BBB (**Basso, Beattie e Bresnahan**). Demonstram que essa escala é eficiente, ampla e não ambígua.

Concluem que é uma medida válida e previsível da recuperação funcional, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais em diferentes tipos de lesões e prever alterações anatômicas, como a preservação de substância branca no centro da lesão.

Delamarter et al. (1995) realizam estudo em modelo animal com a utilização de lesão medular com compressão de 50% do diâmetro da medula. Avaliam a duração da compressão e o tempo de decompressão e a relação com a recuperação funcional.

Utilizam, para avaliação dos resultados, potencial evocado somato-sensitivo, exame neurológico e estudo histopatológico. Observam relação direta do tempo de compressão com os achados histológicos, neurofisiológicos e com a recuperação da função locomotora.

Basso et al. (1996) avaliam as alterações anatômicas e funcionais de ratos submetidos à lesão medular contusa produzida pelo dispositivo NYU. Realizam avaliação da função locomotora pela escala de BBB e estudo histológico do centro da lesão, avaliando o percentual de área de tecido preservado.

Afirmam que a escala de BBB é suficiente para discriminar diferenças locomotoras significativas entre os vários graus de lesão e confirmam que a maior quantidade de tecido poupado está diretamente relacionada com a melhora da função locomotora.

Gebrin et al. (1997a) revisam os avanços clínicos e científicos existentes sobre a manipulação farmacológica no tratamento em pacientes com déficit neurológico causado por lesão medular. Descrevem as principais substâncias endógenas que participam do dano medular secundário e as drogas em estudo para combater esse efeito. Indicam a MP como a primeira droga a demonstrar melhora funcional comprovada e citam as pesquisas promissoras com aminoesteróides e outras drogas como o tilirazade e o GM-1. Por fim, ressaltam a grande importância e contribuição dos estudos multicêntricos NASCIS 1, 2 e 3, desenvolvidos na América do Norte.

Gebrin et al. (1997b) publicam artigo de revisão da literatura discutindo as perspectivas de recuperação do paciente com lesão medular. Relatam os resultados do NASCIS, que apontam a MP como droga que melhora a função neurológica e citam o GM-1 como sendo uma substância eficiente na recuperação de pacientes com lesões crônicas do SNC.

Afirmam que trabalhos experimentais demonstram que axônios íntegros, mesmo que poucos, podem propiciar integridade de arco reflexos viscerais, como vesical, sexual e intestinal; e que 10% de axônios remanescentes podem oferecer condições de marcha para o paciente.

Gerndt et al. (1997) revisam retrospectivamente, com controle histórico, todos os pacientes com lesão medular aguda atendidos dentro de 8 horas do trauma e que receberam altas doses de corticosteróide segundo o protocolo NASCIS 2 de maio de 1990 a abril de 1994.

Comparam os resultados e os parâmetros demográficos com o grupo de pacientes admitidos de março de 1986 a dezembro de 1993, também com lesão medular aguda e que não receberam terapia com corticóide.

Afirmam que o uso do corticóide associa-se com o aumento de 2,6 vezes a incidência de pneumonia e o aumento dos dias de cuidados intensivos. Entretanto seu uso está associado com a diminuição do tempo de reabilitação e não tem nenhum impacto significativo em outros parâmetros, inclusive na mortalidade.

Kuhn e Wrathall (1998) afirmam que, em experimentos de lesão medular, modelos de ratos desenvolvidos em laboratórios por mutações de engenharia genética podem aumentar o conhecimento básico dos mecanismos envolvidos na lesão e na sua recuperação funcional. Investigam se os métodos utilizados para realizar lesão medular e para avaliar a recuperação funcional locomotora podem ser modificados pela utilização de ratos produzidos geneticamente em laboratório. Concluem que esse novo modelo de rato e de contusão do SNC pode ser um caminho para estudos *in vivo*.

Rodrigues (1999) padroniza modelo de lesão de medula espinhal em ratos Wistar e utiliza equipamento computadorizado para impacto por queda de peso, o sistema NYU, de acordo com parâmetros determinados pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* – MASCIS. Verifica a existência de correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Conclui que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas e reprodutíveis.

Tator et al. (1999) realizam estudo retrospectivo e multicêntrico em 36 centros de atendimento nos EUA para avaliar o uso do tratamento cirúrgico e o tempo em que a intervenção deve ser realizada em pacientes com lesão medular aguda. Os dados indicam que, apesar da cirurgia ser realizada comumente, um terço dos casos é conduzido de forma conservadora e que o momento adequado de sua utilização ainda não foi totalmente estabelecido.

Vaccaro e Singh (1999) realizam revisão da literatura com o objetivo de avaliar a eficácia do tratamento farmacológico e o momento ideal para a intervenção cirúrgica.

Ressaltam que o tratamento farmacológico visa diminuir os efeitos dos mediadores inflamatórios produzidos na lesão medular. Comprovam que há benefícios com o uso de MP nas primeiras oito horas após a lesão medular e que o corticóide aumenta a recuperação neurológica entre seis semanas e seis meses após o trauma. Documentam que sua administração após oito horas do trauma provoca piora neurológica, porque atrapalha as reações inflamatórias que são vitais para a regeneração da célula nervosa.

Yoon et al. (1999) determinam a janela terapêutica do tratamento com MP em ratos com lesão medular. Estudam a administração de dose predeterminada de 30 mg/kg em diferentes tempos após lesão provocada pelo sistema NYU (10, 30, 120, 150 e 240 min.) e comparam com medidas estimadas do volume da lesão através da bomba de Na⁺ e K⁺ 24 horas após.

A dose única de MP após 10 minutos reduz significativamente o volume da lesão e qualquer outro tratamento iniciado após 30 minutos não tem efeito no volume da lesão ao comparar com o grupo controle e até podem, em alguns casos, aumentar o volume da lesão. Sugerem que o sistema de lesão medular com o NYU tem janela terapêutica curta.

Metz et al. (2000) preocupam-se em verificar se os resultados de estudos de modelos em ratos com lesão medular são aplicáveis em humanos. Para isso, comparam parâmetros funcionais, eletrofisiológicos e morfológicos seguidos de lesão medular em ratos e em humanos e sugerem haver uma relação análoga entre eles. Concluem que as técnicas para avaliação da extensão e gravidade da lesão do SNC em ratos e humanos são de valores comparáveis e indicam que o rato pode servir como um animal adequado para pesquisa de alterações morfológicas e funcionais e para avaliação dos efeitos de novas estratégias terapêuticas.

Short et al. (2000) realizam revisão sistemática da literatura com o fim de avaliar o efeito do uso de altas doses de MP na melhora da função neurológica após lesão medular aguda. Evidenciam, nesta revisão, que não há suporte para seu uso com o intuito de recuperação neurológica e que seu efeito deletério, tanto na morbidade quanto na mortalidade precoce, não pode ser excluído.

Akesson et al. (2001) concluem que o transplante de células embrionárias de tecido medular humano para cavitação de medulas lesionadas de ratos resulta em efeitos morfológicos benéficos tanto em lesões crônicas como em agudas.

Geisler et al. (2001) publicam estudo clínico multicêntrico randomizado, duplo-cego e seqüencial para determinar a eficácia e a segurança do uso de duas doses de GM-1 em pacientes com lesão medular aguda e comparam com o grupo placebo. Ressaltam que, embora não ocorra eficácia primária do GM-1 nessa análise, parece haver benefícios em seu uso em pacientes com lesão medular grave.

Hall (2001) demonstra que a maioria das lesões medulares não são lesões completas e que parte da substância branca permanece íntegra. Salaria que a recuperação neurológica depende da preservação das estruturas que permaneceram íntegras após o trauma, principalmente axônios descendentes e ascendentes da substância branca e de sua mielinização normal.

Discute que as estratégias farmacológicas enfocam o controle do processo de lesão secundária, primariamente a peroxidação lipídica e a manutenção do máximo de substância branca remanescente possível e afirma que a MP é a única droga que em altas doses melhora a função neurológica em animais e que essas estratégias de neuroproteção vão ser eventualmente seguidas por agentes restauradores que estimulam a plasticidade dos tratos sobreviventes como transplantes celulares e técnicas de terapia genética.

Bracken (2002) revisa artigos randomizados sobre o uso de esteróides no trauma raquimedular agudo. Utiliza como critérios de seleção todos os estudos controlados randomizados publicados e não publicados sobre o tema em todas as línguas. Conclui que a terapia com MP em altas doses é o único tratamento

farmacológico que demonstra eficácia em estudos randomizados fase três, quando administrado dentro das oito primeiras horas do trauma. Um estudo indica benefício adicional por estender o tratamento por 24 a 48 horas, se o tratamento se inicia entre três e oito horas do trauma. Ressalta também a necessidade de novos estudos randomizados para avaliar outros protocolos diferentes do uso da MP.

Legos et al. (2002) realizam revisão da literatura sobre o tratamento não cirúrgico de pacientes com trauma medular. Enfatizam a importância do tratamento da lesão celular secundária e que o tratamento farmacológico sozinho é capaz de promover recuperação neurológica e facilitar regeneração futura.

Nash et al. (2002) avaliam a eficácia do uso de células embrionárias e da MP em promover recuperação neurológica e regeneração axonal em medulas lesionadas. Realizam estudo experimental em ratos com lesão medular após 6 semanas de trauma. Concluem que células embrionárias são capazes de promover regeneração axonal e que o uso da MP em conjunto potencializa seu efeito.

McDonald e Howard (2002) revisam os estudos de seu grupo sobre a capacidade de células-tronco embrionárias de promover a remielinização e restaurar as funções neurológicas primária em roedores. Afirmam que essas células são capazes de se diferenciar em oligodendrócitos e mielinizar os axônios do hospedeiro tanto *in vivo* quanto *in vitro*, assim como de melhorar a função neuronal de ratos.

Rabchevsky et al. (2002) realizam estudo experimental de lesão medular em ratos com o objetivo de avaliar a preservação de tecido, o volume da lesão, assim como a recuperação funcional a longo prazo.

Avaliam a função locomotora pelo teste de BBB e produzem lesão medular utilizando-se do sistema NYU. Utilizam 80 ratos divididos em dois grandes grupos, um administrado MP e outro apenas soro fisiológico por 24 horas, iniciando-se 5 minutos após a lesão.

Observaram que o volume da lesão é extremamente dinâmico, o qual após 6 semanas reduz a um terço do aferido na primeira semana. Afirmam que não há diferença entre os grupos ao se avaliar a área de preservação e percentual de preservação da substância branca e cinzenta e que a MP falhou em mostrar melhora na avaliação da recuperação funcional.

Takami et al. (2002) avaliam o efeito da MP e da interleucina-10 (IL-10) isoladamente e combinada na recuperação funcional, preservação axonal e lesão tecidual da medula de ratos com trauma medular. Demonstram preservação tecidual e diminuição do volume de lesão, principalmente na substância cinzenta, como uso da MP isolada e da sua combinação com IL-10, o que não ocorre com o uso isolado da IL-10. Concluem que nenhum dos tratamentos melhorou a preservação axonal ou a recuperação funcional.

Tebet (2002) realiza estudo experimental de lesão medular em ratos e avalia os efeitos farmacológicos da MP e do GM-1 e sua associação através de testes funcionais e análise histológica.

Produz lesão medular pelo sistema NYU, avalia a recuperação da função neurológica pelo teste de BBB e analisa os achados histológicos utilizando-se do método de coloração hematoxilina-eosina.

Conclui que não há correlação entre os achados histológicos e o resultado da recuperação locomotora. Os ratos que receberam MP isolada obtiveram os melhores resultados funcionais e o grupo que recebeu a associação das drogas teve o melhor resultado histológico.

Vialle et al. (2002) testam um modelo de escala de avaliação locomotora para a lesão medular experimental e propõem um protocolo. Utilizam dois grupos de 10 ratos. O primeiro é submetido à lesão medular após laminectomia ao nível de T9 a T10 pelo sistema NYU, estabelecendo peso de 10 g e altura de 25 mm. O segundo grupo, destinado a controle, sofreu apenas laminectomia preservando o saco dural. Realizam avaliação motora dos animais no sétimo, 14^o e 21^o dia após a lesão medular, realizando-se seis testes. Afirmam que o modelo de avaliação testado é eficaz e quantifica de maneira satisfatória a recuperação das funções motoras em três dos seis testes.

Tebet et al. (2003) realizam estudo experimental em ratos com lesão medular para avaliar os efeitos da metilprednisolona na recuperação da função locomotora e nas alterações histológicas.

Utilizam o método de coloração de HE para o estudo histológico e utilizam o teste de BBB para a avaliação da função locomotora. Observam que a

metilprednisolona apresentou-se eficaz na recuperação da função, não sendo possível compará-la aos achados histológicos.

Kaptanoglu et al. (2004) investigam a eficácia da eritropoetina humana recombinante (EPO) em atenuar a severidade do trauma medular experimental. Comparam o uso de diversas doses de EPO com 30 mg/kg de MP em dose única intraperitoneal. Demonstram que a EPO apresenta efeitos benéficos na avaliação bioquímica e ultra-estrutural da medula lesionada de ratos.

La Rosa et al. (2004) realizam revisão da literatura clínica em lesão medular com ênfase no papel da cirurgia de descompressão precoce e executam meta-análise dos resultados. Seus resultados demonstram que 89,7% dos pacientes com déficit neurológico incompleto obtiveram melhora funcional após descompressão medular precoce e que estatisticamente a descompressão precoce demonstrou melhores resultados comparando tanto com o tratamento conservador, como a intervenção cirúrgica tardia.

Lammertse (2004) revisa os maiores ensaios clínicos sobre o tratamento farmacológico no trauma medular agudo. Afirma que, apesar de os resultados continuarem controversos, a terapia com MP continua sendo adotada por muitos clínicos no mundo, e que, se não é um consenso, talvez seja o tratamento padrão.

McCutcheon et al. (2004) comparam o custo hospitalar e o tempo de hospitalização em pacientes que receberam MP para o tratamento de lesão medular

aguda e os que não receberam. Documentam que 48% dos 1.227 pacientes selecionados receberam MP e que o tempo de internação e o custo hospitalar desses pacientes são significativamente maiores.

Chinnock e Roberts (2005) revisam sistematicamente a literatura com ensaios clínicos randomizados controlados de pacientes com lesão medular aguda com grupo de pacientes que receberam gangliosídeo e com grupo controle. Avaliam a mortalidade, a recuperação da função motora, a melhora da função sensitiva, a atividade funcional geral, a infecção e outros eventos adversos. Concluem que a evidência existente não suporta o uso do gangliosídeo com o objetivo de reduzir a taxa de mortalidade, assim como o de melhora funcional e de qualidade de vida desses pacientes.

Kimura et al. (2005) realizam estudo experimental em ratos para avaliar a eficácia do uso de células-tronco embrionárias de tecido neuronal. Afirmam ocorrer a recuperação funcional com eficácia favorável a sua utilização no trauma medular em animais

Lee et al. (2005a) avaliam a eficácia da MP na recuperação funcional em ratos com lesão medular e comparam com os resultados de potencial evocado motor. Utilizam o teste de BBB para avaliação da função locomotora e afirmam resultados positivos na melhora funcional dos ratos tratados com a MP.

Lee et al. (2005b) realizam investigação do potencial terapêutico do transplante de células astrócitos oligodendrócitos-tipo 2 em ratos com lesão medular aguda. Os testes comportamentais, os estudos morfológicos e eletrofisiológicos demonstram resultados satisfatórios e afirmam que seu uso pode ter papel importante na recuperação funcional e na regeneração axonal.

Oliveira (2005) avalia os efeitos do tempo da descompressão medular em 50 ratos e cria modelo experimental de compressão medular com redução de 30% do diâmetro do canal medular. Realiza descompressão aos 5 minutos, às 24 horas, às 72 horas e sem descompressão até o fim do experimento com quatro semanas. Utiliza o potencial evocado motor, o teste de BBB e exame anatomopatológico para avaliar a recuperação neurológica. Observa haver relação entre o potencial da recuperação neurológica e o tempo de descompressão medular.

Cížková et al. (2006) investigam a capacidade de sobrevivência, migração e diferenciação de células-tronco humanas mesenquimais transplantadas em ratos não-imunosuprimidos com lesão medular e seu impacto na recuperação funcional após injeção endovenosa dessas células. Usam a escala de BBB para avaliação funcional locomotora semanalmente e análise imunocitoquímica. Confirmam a sobrevivência e a migração das células no local lesado e indicam que elas podem facilitar a recuperação funcional pela remielinização da substância branca preservada e/ou pelo aumento do crescimento axonal.

Marcon (2006) realiza estudo experimental com ratos com lesão medular para avaliar os efeitos da MP quando administrada previamente à lesão. Utilizam o teste de BBB para avaliação da função locomotora de 32 ratos por 28 dias divididos em quatro grupos: dois grupos receberam as drogas A (placebo) e B (metilprednisolona) imediatamente após a lesão e dois grupos receberam as mesmas drogas 4 horas antes da lesão. Conclui que não há diferença entre os grupos e que os ratos tratados com MP antes da lesão apresentaram número de óbitos significativamente maior quando comparados aos ratos tratados com a mesma droga após o trauma.

Molina (2006) produz lesão medular em 30 ratos *Wistar* por queda de peso pelo NYU *impactor*[®] para avaliar a sensibilidade e a reprodutibilidade da escala funcional de BBB. Conclui que a escala de BBB nas lesões medulares leves e moderadas tem reprodutibilidade satisfatória, porém nas lesões moderadas apresentam sensibilidade insatisfatória e nos traumas leves satisfatória. Nas lesões graves, tanto a sensibilidade quanto a reprodutibilidade demonstram-se reduzidas.

Tsutsumi et al. (2006) avaliam, ao realizar estudo retrospectivo, a recuperação da função motora e as complicações precoces em pacientes com lesão medular cervical aguda após receber altas doses de MP e afirmam que ela deve ser administrada em todos os pacientes com lesão medular cervical incompleta de acordo com o protocolo do segundo NASCIS.

Urdzíkova et al. (2006) em estudo experimental de lesão medular avaliam o uso de células-tronco mesenquimais de medula óssea. Avaliam a recuperação da função locomotora pelo teste de BBB e os parâmetros morfométricos com o uso de três diferentes populações de células de medula óssea. Demonstram efeito positivo nos resultados comportamentais e nos achados histopatológicos com o aumento da preservação de substância branca da medular.

Hung et al. (2007) investigam o papel da transferência do gene produtor de fator de crescimento insulina-“like” I no trauma medular em quarenta ratos. Demonstram que seu uso melhora significativamente as características bioquímicas e a disfunção neurológica e inibe a apoptose.

Tarassenko et al. (2007) estudam a resposta funcional e histológica de ratos com lesão medular tratados com células-tronco neurais humanas. Realizam o transplante das células no dia do trauma, três e nove dias após. Observam que as células sobreviveram três meses apenas nos ratos que receberam o enxerto nove dias após o trauma. Concluem, pela análise histológica, que ocorre crescimento e diferenciação de células neuronais e oligodendrócitos no sítio da lesão, além da melhora da função locomotora.

Vitellaro-Zuccarello et al. (2007) investigam o efeito da administração única de EPO na preservação de substância branca ventral em ratos com 4 semanas de lesão medular. Concluem que essa investigação confirma estudos prévios que demonstram o efeito neuroprotetor da eritropoetina na resposta degenerativa

secundária e seu potencial terapêutico para o tratamento de lesão medular aguda, assim como a preservação de substância branca ventral, a qual contém tratos motores descendentes, podendo ser crítico para a limitação do déficit funcional.



4. MÉTODOS



4 - MÉTODOS

O protocolo de pesquisa deste estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia e pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A produção das lesões e a eutanásia foram realizadas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP). O estudo histológico e a análise morfométrica foram realizados no Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 – Modelo de lesão medular

Como modelo de lesão medular, continuaram-se os estudos de **Tebet (2002)** e **Tebet et al. (2003)**, estudando-se os mesmos 24 ratos submetidos à lesão medular em 2002. Obtiveram-se os resultados funcionais da recuperação da função

locomotora e os comparou com novos estudos histomorfométricos realizados a partir do material de tecido medular contidos em blocos de parafina, que foram mantidos e armazenados no Departamento de Patologia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em condições adequadas com controle de temperatura e umidade.

4.1.1 – Animais de experimentação

Avaliaram-se 24 ratos machos e adultos jovens da raça Wistar, com peso entre 300 a 350 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Na admissão, todos os ratos foram avaliados quanto às condições gerais de saúde e à motricidade conforme rotina do LETRAN. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, em câmaras climatizadas (temperatura ambiente de 25 °C + ou – 1 °C) com controle de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), sob condições de alimentação *ad libitum* e higiene adequadas, uma semana antes do experimento para se climatizarem e se tornarem manuseáveis.

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Ratos da raça *Wistar*;
- Peso entre 300 e 350 gramas, inclusive;

- Machos adultos jovens (entre 19 e 21 semanas de vida inclusive);
- Boa condição clínica (pelagem e estado clínico geral);
- Motricidade normal.

Critérios de exclusão:

- Óbito durante qualquer etapa do experimento (indução anestésica um caso);
- Lesão da medula espinhal acidentalmente durante o procedimento cirúrgico de laminectomia;
- Infecção da ferida operatória;
- Infecção urinária (piúria);
- Lesão medular fora dos padrões estabelecidos pelo sistema NYU “*impactor*”[®].

4.1.2 – Procedimento anestésico e cirúrgico

Utilizou-se pentobarbital intraperitoneal na dose de 55-75 mg/kg (recomendam-se 65 mg/kg para machos) para o procedimento anestésico. O plano anestésico profundo foi analisado através da ausência do reflexo corneano e ausência de reação à compressão da cauda. Os ratos que se tornaram inaceitavelmente despertos durante a cirurgia foram descartados do experimento e substituídos.

A fim de reduzir a taxa de infecção das vias urinárias e infecções de ferida operatória, instituiu-se o regime de 25 mg/kg de cefalotina (Keflin Neutro ®) subcutaneamente após a indução anestésica e repetida 6 a 8 horas após e duas vezes ao dia, por 48 horas.

Cada rato foi preparado com tricotomia do dorso e uma abertura na pele da linha média dorsal de aproximadamente 5 cm realizada para expor a coluna espinal de T8 a T12. Os músculos paravertebrais foram descolados dos processos espinhosos e das lâminas, expondo-se as lâminas. Utilizou-se de cautério bipolar para hemostasia quando necessário. Realizaram-se laminectomias de T10 e a metade distal do processo espinhoso de T9 com micro sacabocados, sem provocar lesão do saco dural e sem danificar o processo espinhoso de T8, expondo-se a medula o suficiente para acomodar a cabeça do “*impactor*” com uma margem maior que 0,2 mm.

4.1.3 – Contusão medular

Adotou-se o modelo experimental de lesão medular do “*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*” (MASCIS) padronizado para ratos *Wistar* e implantado no Instituto de Ortopedia do HC-FMUSP por **Rodrigues** em 1999.

Para realizar a contusão medular, utilizou-se o sistema NYU “*impactor*” ®, desenvolvido por **Gruner** em 1992, em que o rato é posicionado no sistema acomodado sobre uma esponja, o segmento T8 e T11 então fixados com presilhas

nos processos espinhosos. Haste de 10 g a altura de 25 mm é solta sobre a medula em queda livre. O sistema analisa e registra os dados referentes à velocidade da haste, deformação relativa e absoluta da medula, carga e tempo de impacção, de forma a produzir impacto direto, padronizado e reprodutível.

Seguiram-se os procedimentos, os cuidados, as regulagens, os controles, a monitoração, a limpeza e a esterilização da haste de forma constante, conforme o manual e as recomendações de **Constantini e Young** (1994) e **Rodrigues** (1999).

Uma vez contusa a medula, foi realizada a revisão da hemostasia e a lavagem do sítio da contusão com soro fisiológico 0,9%. A ferida foi suturada por planos e a pele fechada com pontos simples utilizando-se fio de náilon monofilamentar número três zeros.

Após a lesão contusa da medula, procedimentos padrão de aferição de temperatura e esvaziamento de bexiga foram realizados em intervalos de tempo pré-estabelecidos (**Rodrigues, 1999**).

4.2 – Formação dos grupos e tratamento medicamentoso

Os ratos foram identificados um a um e divididos aleatoriamente em quatro grupos: o grupo MP (n=6) que recebeu metilprednisolona; o grupo GM1 (n=6) que recebeu o gangliosídeo GM-1, o grupo MP+GM1 (n=6) que recebeu

metilprednisolona associada ao GM-1, e o grupo controle (n=6) que recebeu placebo com aplicação de soro fisiológico a 0,9%.

As medicações foram administradas por via intraperitoneal, sendo utilizada a dosagem de 30 mg/kg de metilprednisolona nos grupos MP e MP+GM1 e 30 mg/kg de gangliosídeo GM-1 nos grupos GM1 e MP+GM1. Essa dosagem foi administrada 5 minutos após a contusão medular e repetida 3 horas após, seguindo a metodologia utilizada por **Constantini e Young (1994)**, **Tebet (2002)** e **Tebet et al. (2003)** (Tabela 1).

Tabela 1 - Protocolo das drogas e dosagens utilizadas em cada grupo

Grupos	Número de ratos	Resumo do tratamento
Controle	06	LM; 1 ml de SF 0,9% com 5 minutos
Experimental		
Grupo MP	06	LM; 30 mg/kg de MP com 5 minutos e repetido com 3 horas
Grupo GM1	06	LM; 30 mg/kg de GM-1 com 5 minutos e repetido com 3 horas
Grupo MP+GM1	06	LM; 30 mg/kg de MP + 30 mg/kg de GM-1 com 5 minutos e repetidos com 3 horas.

FONTE: Constantini e Young (1994)

LM = Lesão Medular; SF = Soro Fisiológico;

MP = Metilprednisolona; GM-1=Gangliosídeo g(m1).

4.3 – Avaliação da função locomotora

A avaliação locomotora foi realizada no segundo, sétimo e décimo quarto dias após a lesão medular contusa por quatro examinadores, utilizando-se a escala de **Basso; Beattie; Bresnahan (BBB)**, publicada em 1995. Baseando-se nos itens dessa

escala, foram observados os movimentos da articulação do quadril, joelho e tornozelo e a posição do tronco, rabo e patas traseiras de cada lado: direito e esquerdo. A partir dessas observações, foram atribuídos pontos de zero a 21, sendo o zero correspondente à ausência total de movimentos e o 21 à presença de movimentos normais. Os dados foram coletados através de uma ficha própria para a coleta de dados do teste de BBB e armazenados em banco de dados (Anexo A, B).

Utilizaram-se os resultados de **Tebet** (2002) e **Tebet et al.** (2003), cuja avaliação do teste foi realizada por quatro observadores treinados. Foi realizada a média dos valores atribuídos pelos quatro examinadores para cada rato e para cada lado.

4.4 – Eutanásia e amostras de tecido

Os animais foram sacrificados no 14^o dia após a lesão, aplicando-se 140 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal, conforme as regras legislação em vigor, seguindo-se a normatização do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (1999).

O segmento de T1 a L5, contendo todo estojo ósseo e os músculos paravertebrais foram removidos e realizadas laminectomias de T5 a L5 para remoção da medula espinhal. A medula fixada numa superfície de papel cartão e identificada a região onde se evidenciavam achados macroscópicos de contusão medular a qual foi

denominada “área da lesão” (zona B). A seguir, identificou-se a área cefálica (zona A) e caudal à lesão (zona C), dentro de 1 cm a partir do epicentro da contusão, 5 mm acima e 5 mm abaixo. Os conjuntos foram identificados e armazenados em frascos contendo formol a 10%.

4.5 – Análise histológica e morfométrica

Ao se seguir a linha de pesquisa iniciada por **Tebet (2002)**, os procedimentos até o momento foram os mesmos, diferenciando-se apenas no tratamento e análise histológica. Desta forma, os segmentos medulares foram submetidos a cortes histológicos seriados em seu plano axial com intervalos de 2 mm e o material processado e desidratado em bateria de alcoóis, depois submetida a processo de diafanização em xilol e inclusão em blocos de parafina.

Uma vez contidos em blocos de parafina, foram realizados cortes histológicos transversais ao plano axial da medula, seriados com espessura de cinco micrômetros. Esses cortes foram realizados em 1 cm de medula lesionada, 5 mm acima e cinco abaixo do centro da lesão. Cada quinto corte foi fixado e corado pelo método de violeta de cresyl (cresyl) e cada sexto, fixado e corado pelo método de azul rápido de luxol (luxol).

O procedimento de coloração com cresyl tem como objetivo demonstrar a substância de Nissl, que é perdida após lesão celular, principalmente se ocorre

degeneração axonal. Os neurônios contêm substância de nissl em seu citoplasma, que é primariamente composto pelo reticulo endoplasmático rugoso, que produz RNA, o qual é basofílico e bem identificado por corantes de características alcalinas. Como resultado, ocorre coloração que varia de azul-escuro a violeta.

As principais etapas da coloração de violeta de cresyl foram:

1. Desparafinização e hidratação com água destilada;
2. Solução de violeta de cresyl por dois minutos;
3. Enxágüe com água destilada;
4. Desidratação com álcool a 95%, limpeza com xilol, selagem e fixação em lâmina de vidro.

O método de coloração de azul rápido de luxol tem como objetivo a coloração de bainha de mielina que é uma capa de gordura protetora que envolve as fibras nervosas. Tem como princípio a utilização de reagente composto de solução equivalente de álcool e água solúvel em “*alcian blue*”. A coloração ocorre por reação ácido-base e formação de sal com afinidade pelas lipoproteínas. O resultado é a coloração das fibras mielínicas em azul-claro e células nervosas em azul-escuro.

O procedimento da coloração de luxol teve como principais etapas após os cortes:

1. Desparafinização e hidratação em álcool a 95%;
2. Colocação em solução de azul rápido de luxol toda a noite a temperatura de 60 °C;

3. Enxágüe em álcool a 95% e após em água destilada;
4. Solução em carbonato de lítio por 5 segundos e novo enxágüe com água destilada;
5. Eosina por 1 minuto, desidratação com álcool a 95 a 100%, seguida de limpeza com xilol, selagem e fixação em lâmina de vidro.

Após o preparo das colorações, foi realizado estudo morfométrico com obtenção de dados da área total (área seccional externa total da medula), área preservada (área contida dentro da área total composta apenas de tecido íntegro) e percentual de área preservada (relação da área preservada sobre a área total) em cada lâmina de cada coloração em separado.

As imagens das lâminas foram capturadas através do microscópio Nikon eclipse E800[®] acoplado a câmera Media Cybernetics[®] (fabricada por Roper Scientific) e digitalizadas com auxílio do programa IMAGE-PRO PLUS[®], onde os dados morfométricos foram obtidos e calibrados em milímetros quadrados.

As lesões foram caracterizadas por áreas de formação cística e cavitação, gliose e edema axonal. A substância branca foi julgada preservada se a coloração da mielina (azul claro), sua densidade e organização tecidual apresentavam-se normais ou próximas do normal, na ausência de gliose densa e edema axonal. A substância cinzenta foi julgada preservada se a coloração se apresentasse próxima do violeta com organização tecidual preservada e se os neurônios e a glia estivessem presentes em densidade normal.

4.6 – Análise estatística

Para avaliar o efeito das colorações (cresyl e luxol), dos grupos (Controle, MP, GM1 e MP+GM1) e das zonas da lesão (A, B e C) segundo as variáveis morfométricas de área total, área preservada e percentual da área preservada, foi realizada a análise de variância (ANOVA), onde foi medido o efeito de cada fator de variação e suas respectivas interações: tipo e droga, tipo e região, droga e região. Caso o efeito apresentasse significância estatística, foram testadas todas as combinações dois a dois, de cada fonte de variação, bem como suas respectivas interações, através do teste de Tukey.

Em relação às variáveis de área total e área preservada, foi realizada uma transformação logarítmica para que os dados pudessem ser trabalhados com um teste paramétrico, pois elas não apresentavam distribuição normal.

Para avaliar a recuperação da função locomotora através do teste de BBB nos momentos 2º, 7º e 14º dias pós-lesão medular (DPLM), em cada um dos grupos (Controle, MP, GM1 e MP+GM1), foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney, caso houvesse diferença significativa entre os grupos. Para comparar, dentro de um mesmo grupo, a diferença entre os momentos foi realizado o teste não paramétrico do sinal.

A correlação entre a área preservada, percentual da área preservada, área total e o teste de BBB em cada momento foi avaliada através do índice de correlação de Spearman.

Os testes de normalidade dos dados foram realizados através de “*normal plot*” e teste de Shapiro-Wilk. Para os cálculos, foi adotado nível de significância de 5% e utilizado o programa SAS versão 8.2[®].



5. RESULTADOS



5 - RESULTADOS

5.1 - Função locomotora

Os resultados da avaliação da função locomotora segundo a escala de BBB dos ratos no segundo, sétimo e décimo quarto dia após lesão medular distribuídos em cada grupo (Controle, GM1, MP e MP+GM1) estão apresentados com seus valores absolutos na Tabela 2 e com seus dados de média e desvio padrão na Tabela 3.

Ao avaliarmos os resultados funcionais comparativos totais em cada momento, constatamos ter havido diferença estatística entre os momentos, pelo teste do Sinal de Mann-Whitney ($p < 0,01$).

Através do teste de Kruskal-Wallis, observamos que não houve diferença entre os grupos (Controle, GM1, MP e MP+GM1) no segundo dia de lesão ($p > 0,05$). Entretanto, no sétimo ($p < 0,05$) e décimo quarto dias ($p < 0,01$), os valores apresentaram diferença entre os grupos em cada momento avaliado (Anexo C).

No sétimo dia de avaliação após a lesão medular, o grupo MP+GM1 demonstrou melhora da função locomotora superior ao grupo controle ($p < 0,05$), o que não foi observado nos demais grupos. Os grupos MP e MP+GM1, no décimo quarto dia de avaliação, apresentaram média de recuperação funcional acima ($p < 0,05$) da apresentada pelo grupo controle (Tabela 3, Gráfico 1, Anexo C).

Tabela 2 - Distribuição dos valores do teste de BBB dos 24 ratos divididos em cada grupo, controle, GM1, MP e MP+GM1 no 2º, 7º e 14º dias pós-lesão medular

Grupos	Rato	2º DPLM	7º DPLM	14º DPLM
Controle	1	1	2	2
	2	0	1	4
	3	0	3	3
	4	1	1	3
	5	0	4	4
	6	0	2	2
GM1	7	1	1	8
	8	0	1	1
	9	0	1	8
	10	2	7	12
	11	0	8	7
	12	0	1	8
MP	13	0	7	10
	14	3	7	12
	15	6	8	13
	16	3	1	5
	17	0	7	12
	18	0	6	13
MP+GM1	19	0	8	12
	20	1	7	13
	21	0	4	8
	22	0	6	10
	23	0	7	8
	24	0	8	10

DPLM: dia de pós-lesão medular

Tabela 3 - Distribuição da média e desvio padrão da avaliação funcional de BBB no 2º, 7º e 14º dias de pós-lesão medular em cada grupo: controle, GM1, MP e MP+GM1

Grupos	2º DPLM		7º DPLM		14º DPLM	
	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão
Total (n = 24)	0,75	1,45	4,50	2,89	7,83	3,97
Controle (n =6)	0,33	0,52	2,17	1,17	3,00	0,89
GM1 (n=6)	0,50	0,84	3,17	3,37	7,33	3,56
MP (n = 6)	2,00	2,45	6,00	2,53	10,83	3,06
MP + GM1 (n = 6)	0,17	0,41	6,67	1,51	10,17	2,04

Anova

p<0,01 para 2º DPLM < 7º DPLM < 14º DPLM

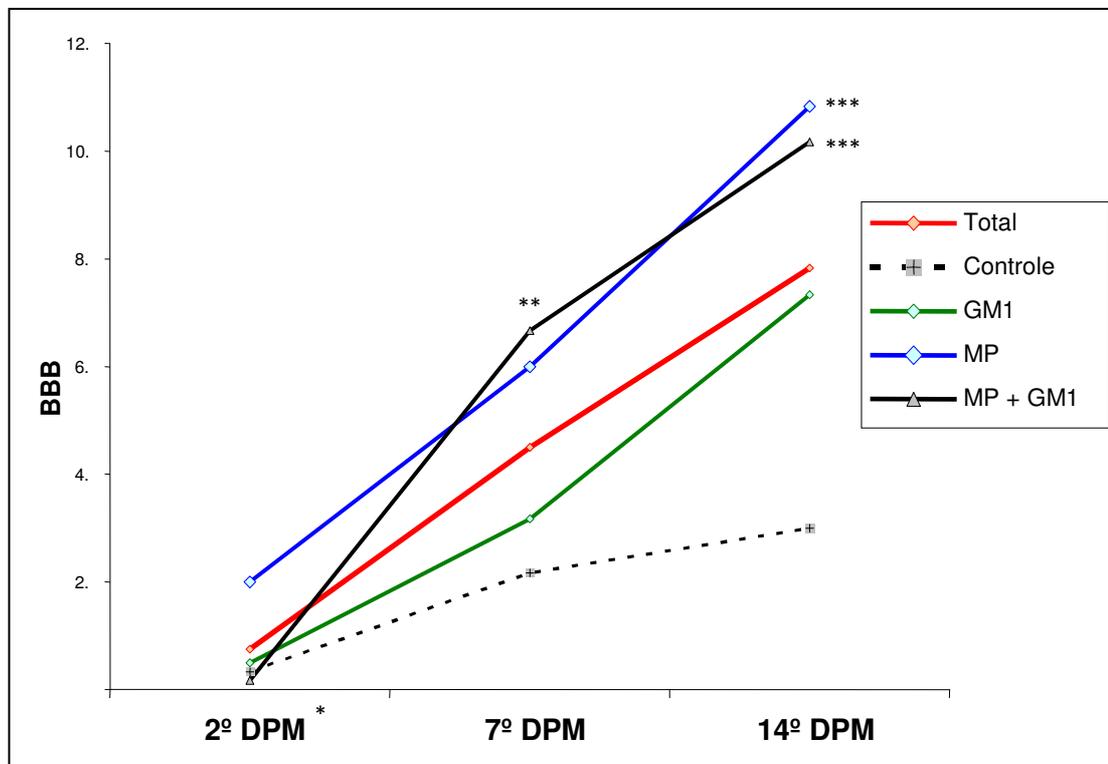
p>0,05 para 2º DPLM: Controle, MP+GM1, GM1e MP

p<0,05 para7º DPLM: MP+GM1 > Controle

p<0,05 para14º DPLM: MP+GM1 e MP > Controle

DPLM: dia de pós-lesão medular

Gráfico 1 - Evolução dos valores médios da avaliação funcional de BBB no 2º, 7º e 14º dias pós-lesão medular (DPLM)



* $p > 0,05$ para 2º DPLM: controle, MP+GM1, GM1 e MP

** $p < 0,05$ para 7º DPLM: MP+GM1 > controle

*** $p < 0,05$ para 14º DPLM: MP+GM1 e MP > controle

DPLM: dia de pós-lesão medular

5.2 - Histológicos e Morfométricos

Os achados histológicos na zona B demonstram que a lesão ocupou mais frequentemente a porção dorsal tanto do corno posterior como da coluna e funículos laterais (Figura 1). A demonstração das lâminas com suas características de coloração, área total e área preservada, distinguindo-a da área lesionada, está representada nas Figuras 2, 3, 4 e 5.

Os valores absolutos dos dados morfométricos de área total, área preservada e percentual de área preservada de cada rato, distribuídos em cada grupo (Controle, GM1, MP e MP+GM1) e em cada zona A, B e C, segundo a coloração de Luxol, estão demonstrados no Anexo D e segundo a coloração de Cresyl no Anexo E.

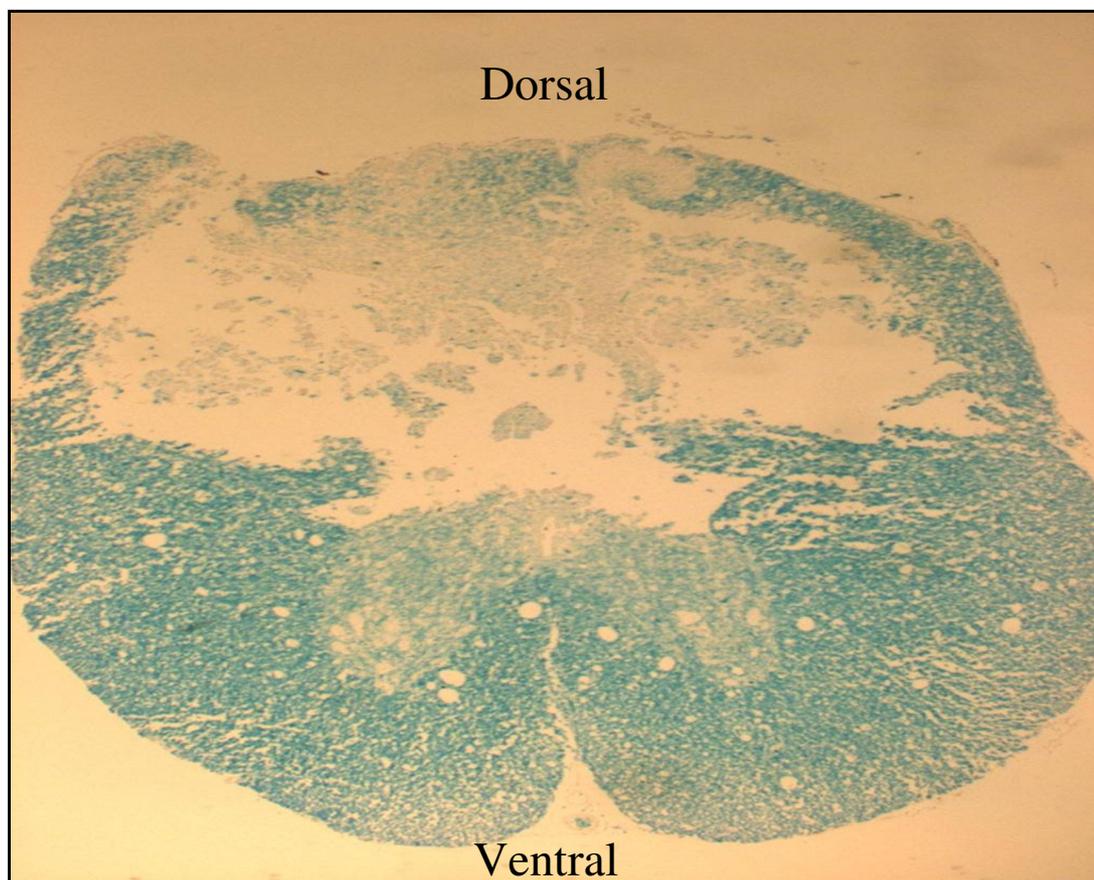


Figura 1 - Fotomicrografia com objetiva de 4x demonstrando corte histológico de medula de rato na zona B corado pelo método de azul rápido de luxol. Notar área de destruição na porção dorsal: corno posterior e funículos laterais.

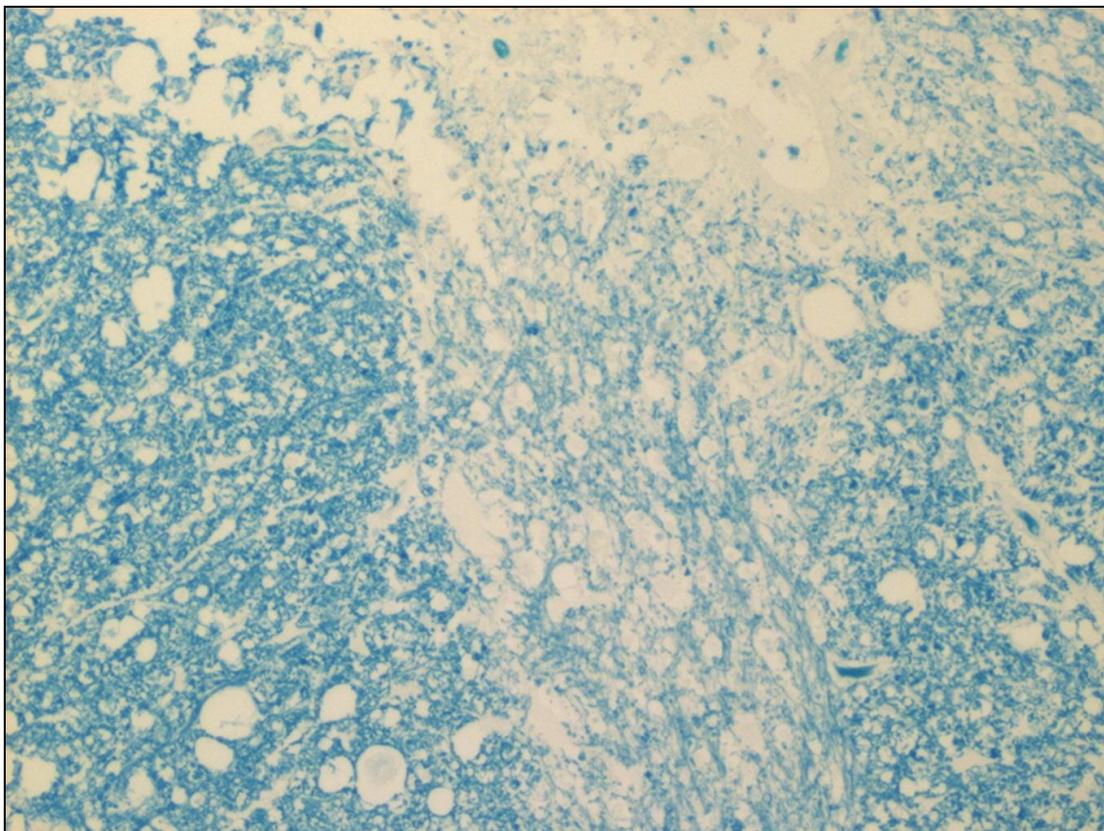


Figura 2 - Fotomicrografia com objetiva de 10x demonstrando corte histológico de medula de rato da zona B corado pelo método de azul rápido de luxol. Notar áreas de cavitação e necrose.

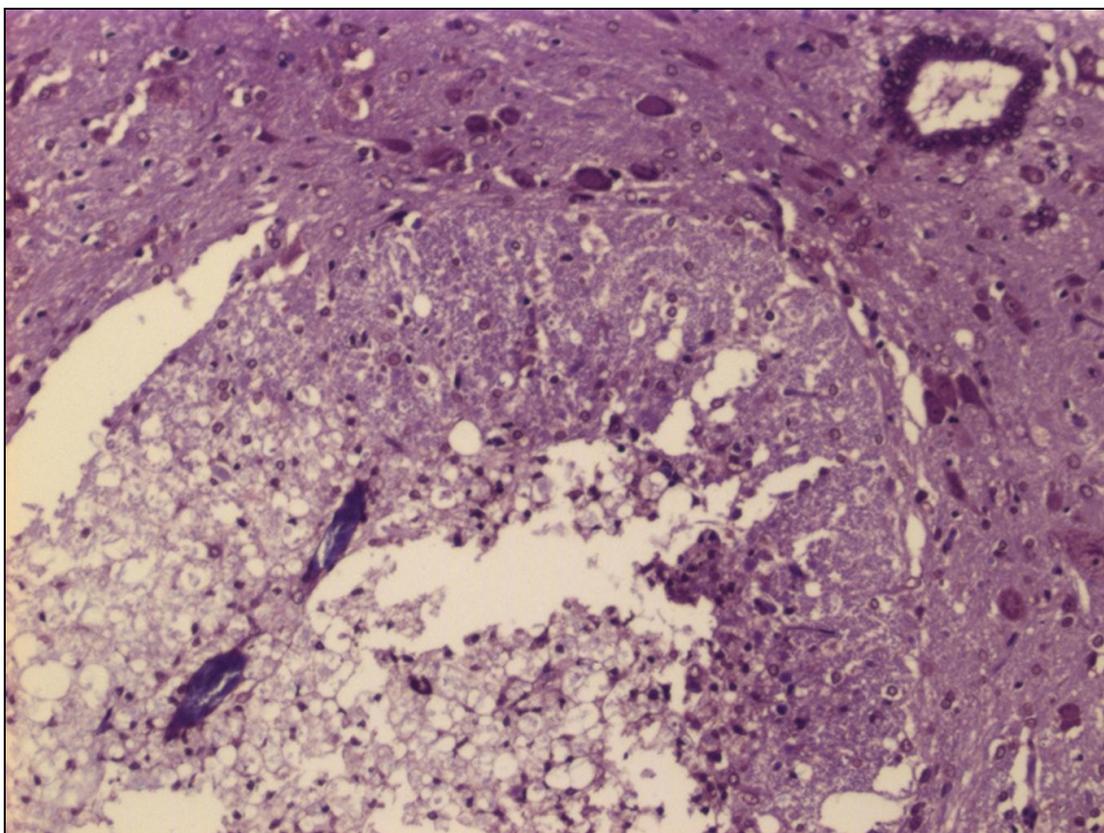


Figura 3 - Fotomicrografia com objetiva de 10x demonstrando corte histológico de medula de rato da zona B corado pelo método de violeta de cresyl. Notar áreas de cavitação e necrose tecidual.



Figura 3 - Fotomicrografia com objetiva de 4x demonstrando corte histológico de medula de rato da zona C corado pelo método de violeta de cresyl. Notar marcação histomorfométrica de área de secção total.

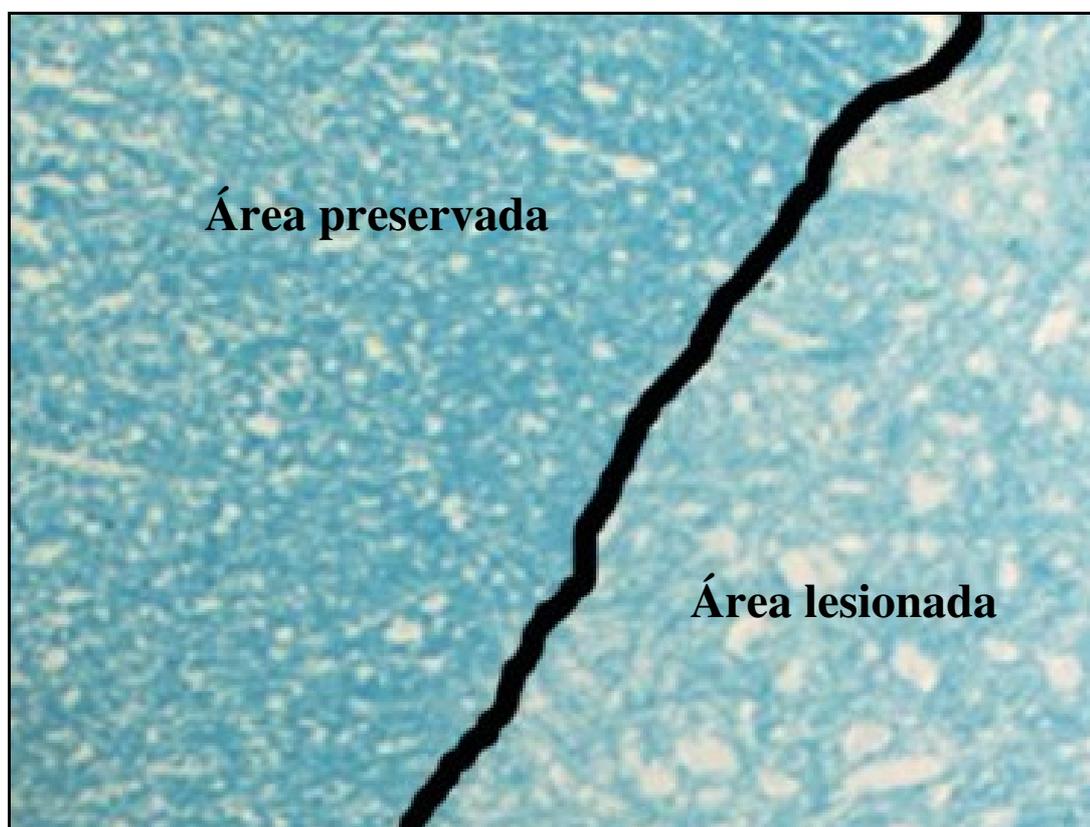


Figura 4 - Fotomicrografia com objetiva de 10x demonstrando corte histológico de medula de rato da zona C corado pelo método de azul rápido de luxol. Notar marcação histomorfométrica diferenciando-se área preservada da área lesionada.

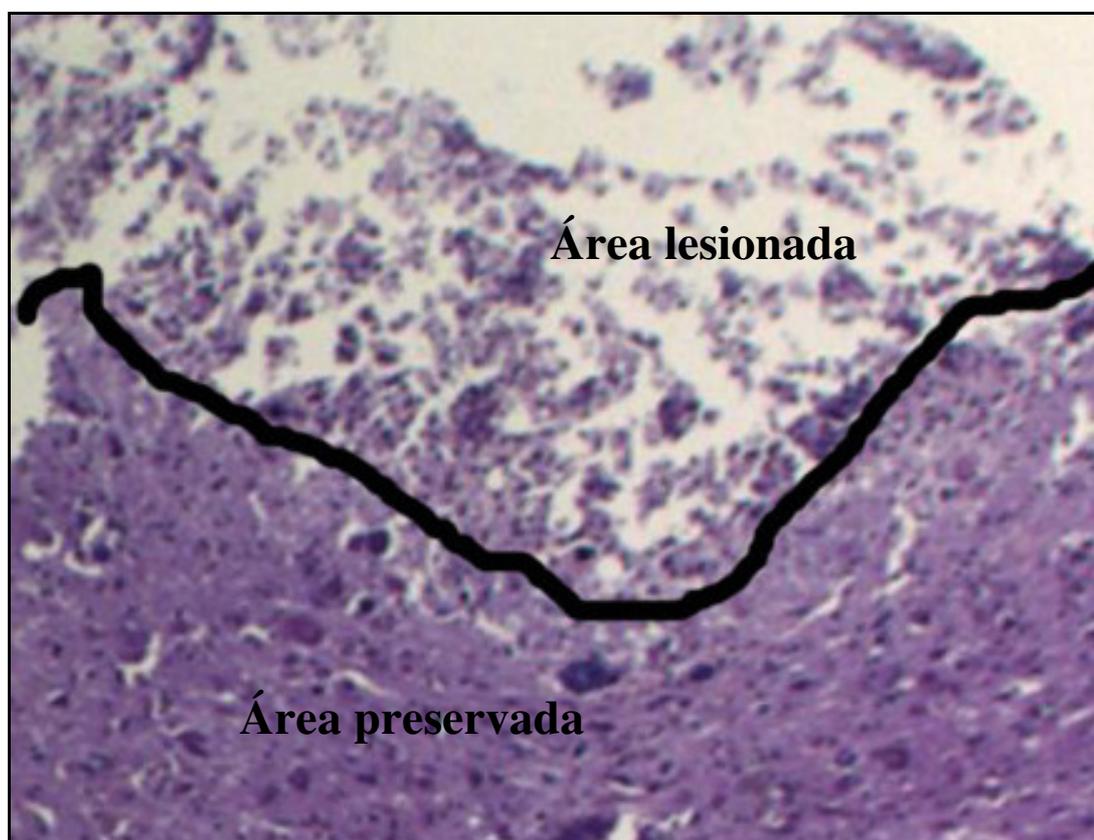


Figura 5 - Fotomicrografia com objetiva de 10x demonstrando corte histológico de medula de rato da zona B corado pelo método de violeta de cresyl. Notar marcação histomorfométrica diferenciando-se área preservada da área lesionada.

Ao se avaliar os dados morfométricos em cada zona, independente do grupo e da coloração, observou-se que a zona C teve a maior média de área total com diferença significativa em relação às outras zonas ($p < 0,001$). Em relação à área preservada, a zona C obteve a maior média que as outras zonas ($p < 0,01$). Comparando-se a zona B com as demais, esta foi a que menos ($p < 0,01$) preservou área (Tabela 4; Gráfico 2; Anexo F).

Comparando-se a média dos valores dos dados de percentual de área preservada da zona B com as demais, observamos que ela obteve as menores médias ($p < 0,05$) e a zona A foi a que mais preservou percentualmente ($p < 0,05$), Tabela 4, Gráfico 3 e Anexo F.

Tabela 4 - Distribuição da média e desvio padrão dos dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) em cada zona: A, B e C. Efeito isolado da zona, independente do grupo e da coloração

	Zona A		Zona B		Zona C		Valor-p
	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	
Área total (mm ²)	3,38	0,38	3,29	0,52	4,39	0,84	< 0,0001
Área Preservada (mm ²)	1,50	0,82	0,88	0,46	1,78	0,69	< 0,0001
Percentual de área preservada	44,23	23,38	27,30	14,41	40,55	14,02	< 0,0001

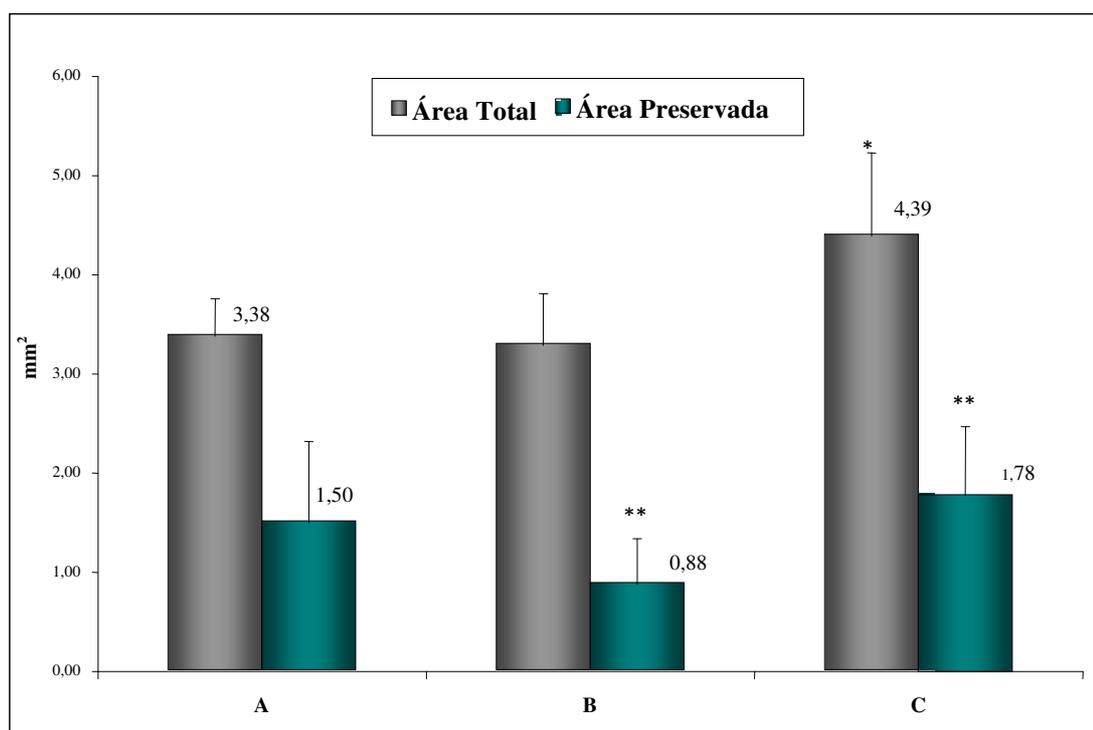
Anova

$p < 0,05$ para área total: C > A e C

$p < 0,05$ para área preservada: C > A e B; A e C > B

$p < 0,05$ para percentual de área preservada: A > B e C

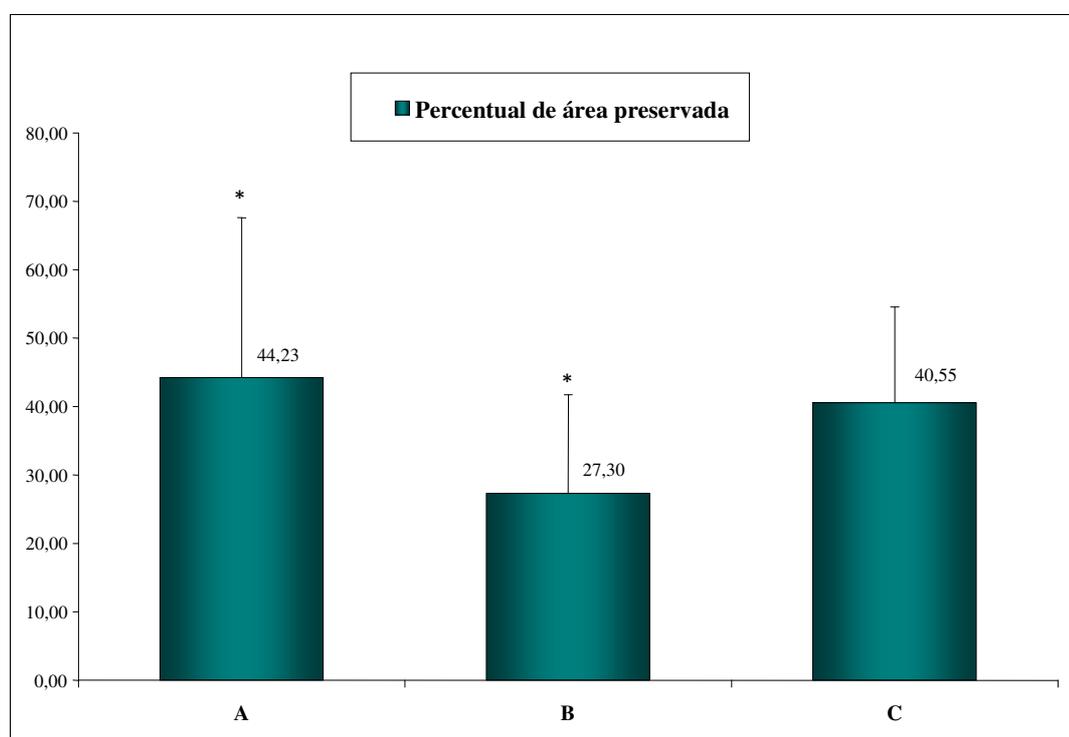
Gráfico 2 - Média e desvio padrão dos valores morfométricos da área total e área preservada em mm², em cada zona: A, B e C



* p<0,05 para área total: C > A e C

** p<0,05 para área preservada: C > A e B; A e C > B

Gráfico 3 - Média e desvio padrão dos valores do percentual de área preservada, em cada zona: A, B e C



* $p < 0,05$ para percentual de área preservada: $A > B$ e C

Avaliando-se os dados morfométricos de toda a amostra de acordo com os grupos controle, GM1, MP e MP+GM1, independente da zona e da coloração, observamos que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na área total entre os grupos (Tabela 5; Gráfico 4; Anexo G).

Todos os grupos que receberam medicação (GM1, MP e MP+GM1) foram superiores ao grupo controle ($p < 0,05$) na avaliação da área preservada e do percentual de área preservada, sendo que o grupo GM1 obteve média superior quanto ao percentual de preservação ($p < 0,05$) ao grupo MP+GM1 (Tabela 5; Gráficos 4 e 5; Anexo G).

Tabela 5 - Distribuição da média e desvio padrão dos dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) em cada grupo: controle, GM1, MP e MP+GM1. Efeito isolado dos grupos, independente da coloração e da zona

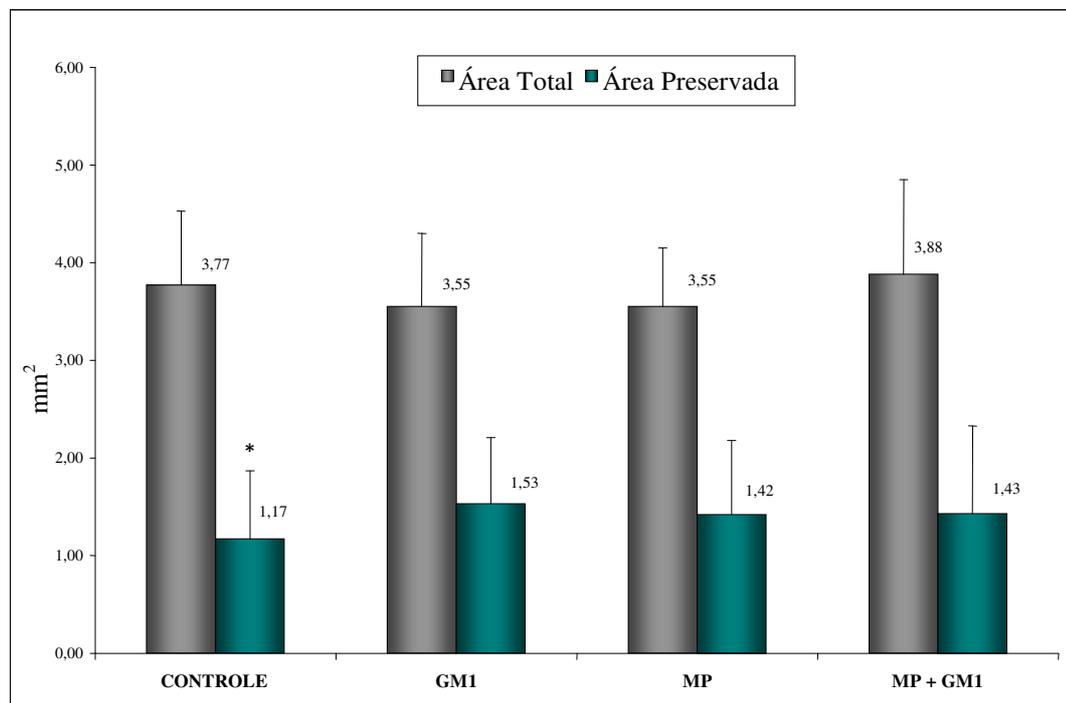
	CONTROLE		GM1		MP		MP+GM1		Valor-p
	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	
Área total (mm ²)	3,77	0,76	3,55	0,75	3,55	0,60	3,88	0,97	0,0515
Área Preservada (mm ²)	1,17	0,70	1,53	0,68	1,42	0,76	1,43	0,90	0,0003
Percentual de área preservada	30,66	18,29	43,25	17,21	39,36	19,36	36,17	20,04	< 0,001

Anova

$p < 0,05$ para área preservada: controle < GM1, MP e MP+GM1

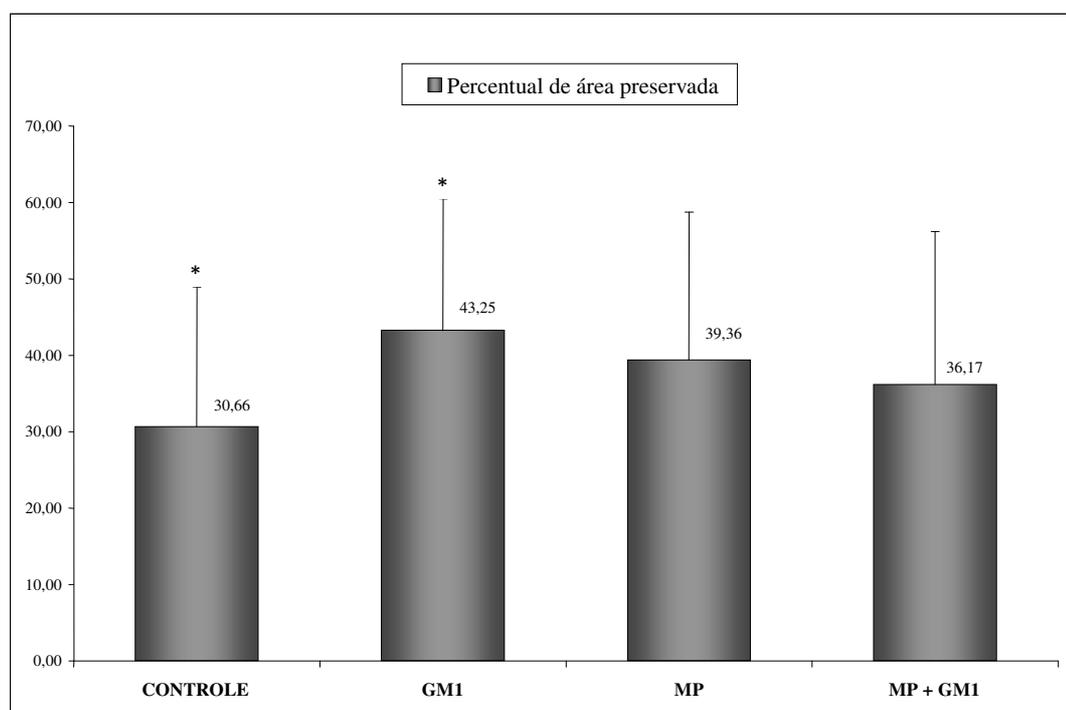
$p < 0,05$ para percentual de área preservada: controle < GM1, MP e MP+GM1; GM1 > MP+GM1

Gráfico 4 - Média e desvio padrão dos valores da área total e área preservada em mm^2 em cada grupo: controle, GM1, MP e MP+GM1



* $p < 0,05$ para área preservada: controle < GM1, MP e MP+GM1

Gráfico 5 - Média e desvio padrão dos valores do percentual de área preservada, em cada grupo: controle, GM1, MP e MP+GM1



* $p < 0,05$ para percentual de área preservada: controle < GM1, MP e MP+GM1; GM1 > MP+GM1

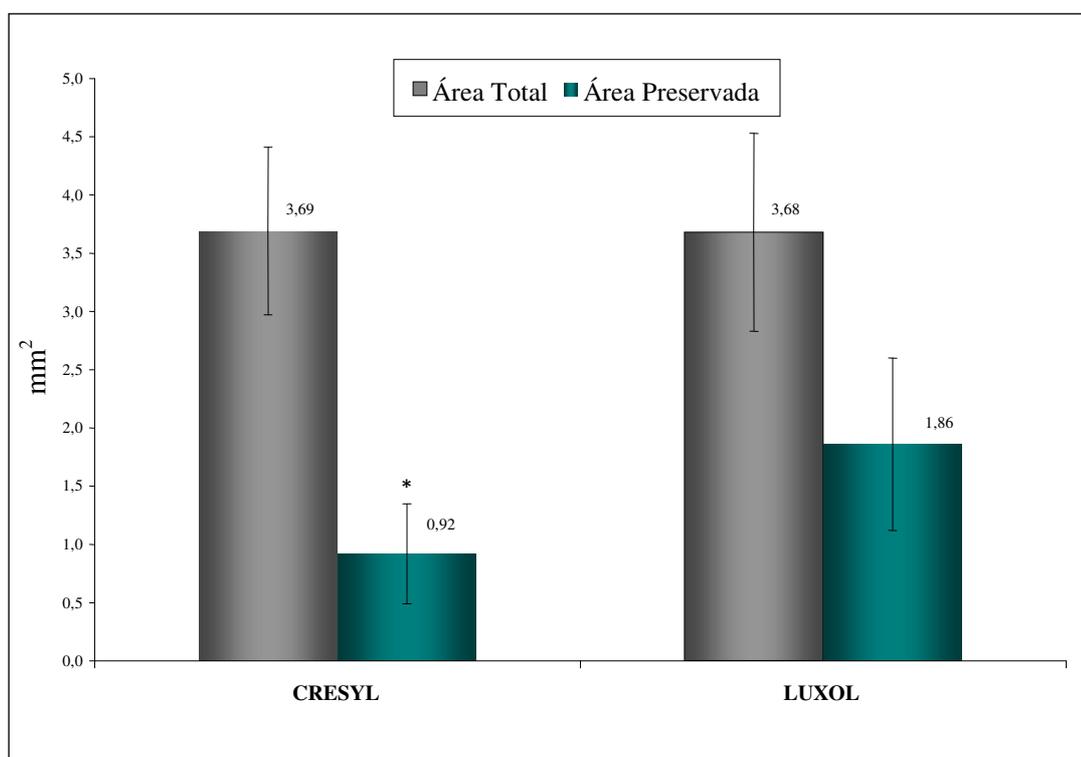
Ao analisarmos a média dos valores morfométricos segundo o tipo de coloração utilizada, independentes dos grupos e das zonas, observou-se que não houve diferença estatística em relação à área total ($p>0,05$) nas duas colorações. Em relação aos dados de área preservada e percentual de área preservada, os cortes com coloração de luxol apresentaram números superiores ($p<0,01$) em comparação aos cortes com a coloração de cresyl (Tabela 6, Gráficos 6 e 7).

Tabela 6 - Distribuição da média e desvio padrão dos dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) segundo a coloração cresyl e luxol

	CRESYL		LUXOL		Valor-p
	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	
Área total (mm ²)	3,69	0,72	3,68	0,85	0,9308
Área Preservada (mm ²)	0,92	0,43	1,86	0,74	< 0,0001
Percentual de área preservada	24,2	7,06	50,52	18,32	< 0,0001

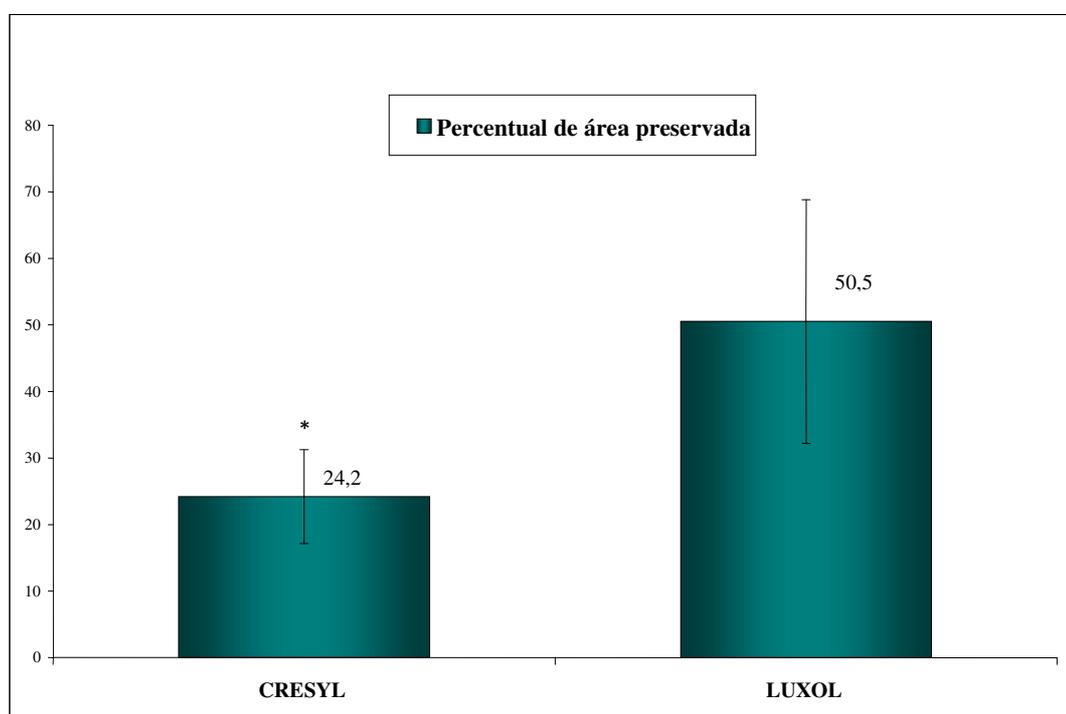
Anova

Gráfico 6 - Média e desvio-padrão dos valores da área total e área preservada em mm^2 segundo a coloração cresyl e luxol.



* $p < 0,01$ para área preservada: luxol > cresyl

Gráfico 7 - Média e desvio-padrão do valor percentual de área preservada segundo a coloração cresyl e luxol



* $p < 0,01$ para percentual de área preservada: luxol > cresyl

Comparando-se os dados morfométricos com os grupos e com o tipo de coloração, independente da zona (Tabela 7), observa-se que, para a coloração de cresyl, o grupo GM1 foi o único que teve o percentual de área preservada superior ($p < 0,05$) ao grupo controle (Gráfico 8; Anexo H).

Em contrapartida, com a coloração de luxol, os grupos em que o percentual de área preservada foi superior ao grupo controle foram os grupos MP e o GM1 ($p < 0,01$). O grupo MP+GM1 foi superior ao grupo controle, porém sem significância ($p > 0,05$) e foi inferior ao grupo que recebeu o GM-1 isolado ($p < 0,05$) (Tabela 7; Gráfico 9; Anexo H)

Tabela 7 - Distribuição da média e desvio padrão dos dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) distribuídos quanto ao tipo de coloração em cada grupo. Efeito do tipo de coloração e dos grupos, independente da zona.

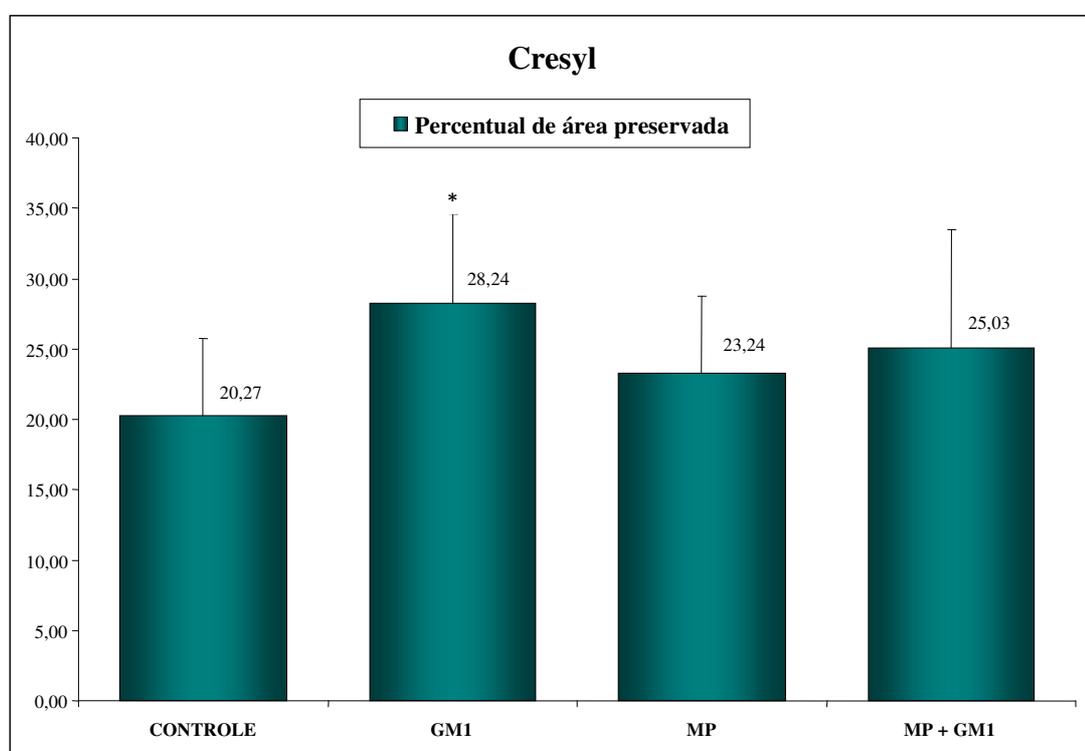
Coloração	Droga	Área total (mm ²)		Área Preservada (mm ²)		Percentual de Área preservada	
		média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão
Cresyl							
	Controle	3,77	0,75	0,79	0,32	20,27	5,52
	GM1	3,61	0,70	1,06	0,47	28,24	6,37
	MP	3,53	0,66	0,84	0,33	23,24	5,49
	MP + GM1	3,86	0,80	1,00	0,52	25,03	8,47
Luxol							
	Controle	3,77	0,80	1,56	0,77	41,06	20,73
	GM1	3,48	0,82	2,01	0,49	58,25	9,62
	MP	3,58	0,56	2,00	0,59	55,48	13,85
	MP + GM1	3,91	1,13	1,87	0,99	47,30	22,18
VALOR-P		0,9058		0,1315		0,0004	

Anova

$p < 0,05$ para cresyl x percentual de área preservada: GM1 > controle

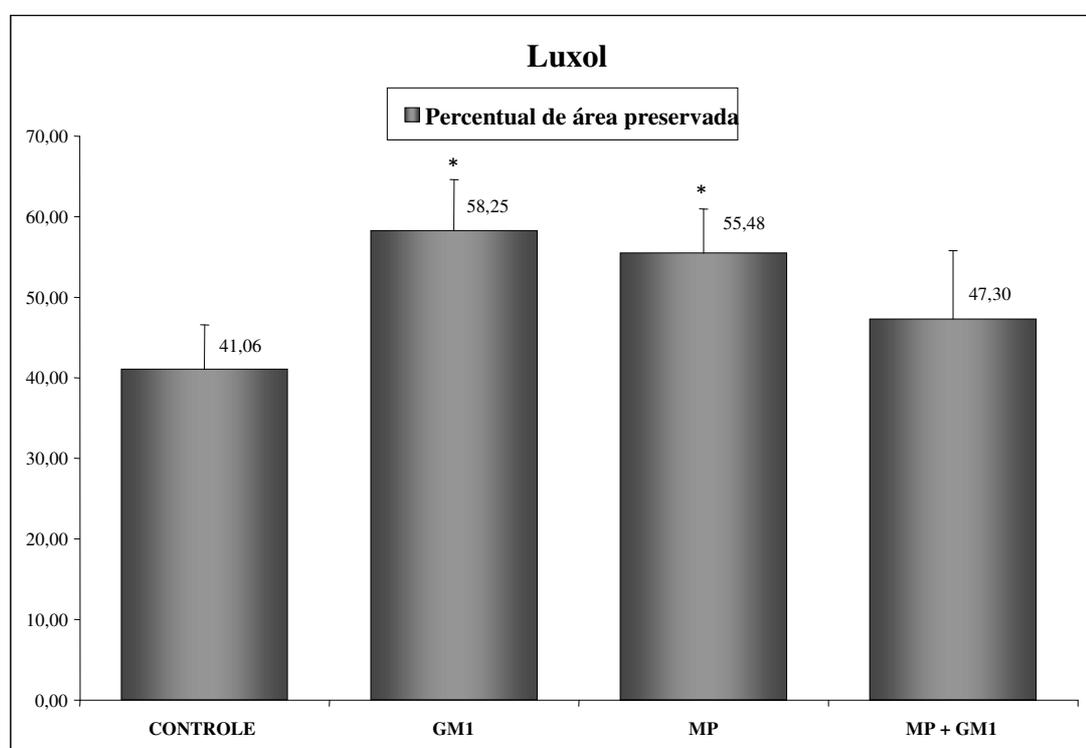
$p < 0,05$ para luxol x percentual de área preservada: GM1 e MP > controle ; GM1 > MP+GM1

Gráfico 8 - Média e desvio padrão dos valores do percentual de área preservada, em cada grupo (Controle, GM1, MP e MP+GM1) distribuídos segundo a coloração de cresyl



* $p < 0,05$ para cresyl: GM1 > controle

Gráfico 9 - Média e desvio padrão dos valores do percentual de área preservada, em cada grupo (Controle, GM1, MP e MP+GM1) distribuídos segundo a coloração de luxol



* $p < 0,05$ para luxol: GM1 e MP > controle; GM1 > MP+GM1

Analisando-se os dados morfométricos de percentual de área preservada em cada grupo na zona B, independente da coloração utilizada, os grupos MP e GM1 preservaram mais área que o grupo controle ($p < 0,01$) (Tabela 8; Gráfico 10; Anexo I).

Na zona A não houve diferença estatística no percentual de área preservada entre os grupos ($p > 0,05$), e na zona C, os grupos GM1, MP e MP+GM1 apresentaram médias superiores ($p < 0,01$) às do grupo controle (Tabela 8; Gráfico 10; Anexo I).

Tabela 8 - Distribuição da média e desvio padrão dos dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) em relação aos grupos (Controle, GM1, MP e MP+GM1) e às zonas A, B e C. Efeito do grupo e da zona, independente da coloração

Droga	Zona	Área total (mm ²)		Área preservada (mm ²)		Percentual de Área preservada	
		média	desvio-padrão	média	desvio-padrão	média	desvio-padrão
Controle							
	A	3,43	0,39	1,48	0,89	42,94	25,21
	B	3,24	0,30	0,61	0,24	18,49	6,62
	C	4,64	0,60	1,43	0,43	30,56	7,70
GM1							
	A	3,26	0,33	1,45	0,73	44,47	21,37
	B	3,06	0,30	1,20	0,38	40,18	15,57
	C	4,33	0,77	1,95	0,68	45,09	15,09
MP							
	A	3,42	0,51	1,51	0,90	44,06	25,54
	B	3,25	0,36	1,04	0,53	31,38	12,80
	C	3,98	0,67	1,70	0,69	42,64	16,49
MP + GM1							
	A	3,42	0,27	1,56	0,85	45,46	24,24
	B	3,42	0,27	1,56	0,85	19,13	9,00
	C	4,62	1,14	2,06	0,81	43,91	11,51
VALOR-P		0,3626		0,0007		< 0,0001	

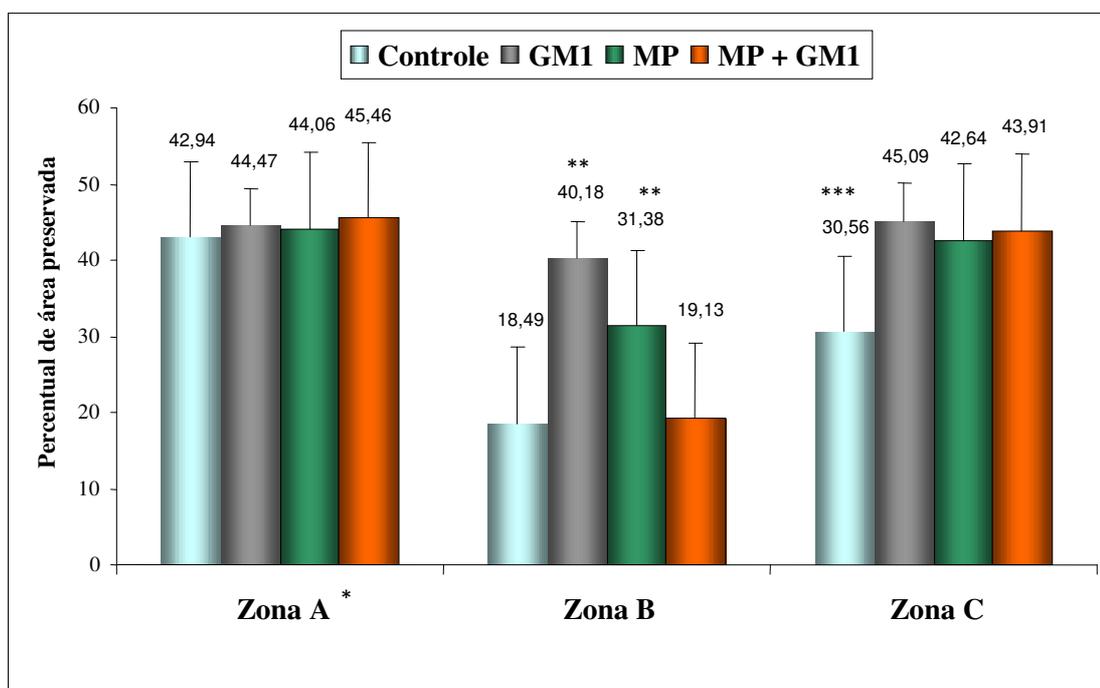
Anova

p>0,05 para zona A: comparando-se todos os grupos

p<0,05 para zona B x percentual de área preservada: controle < GM1 e MP

p<0,05 para zona C x percentual de área preservada: controle < GM1, MP e MP+GM1

Gráfico 10 - Média e desvio padrão dos valores do percentual de área preservada em relação aos grupos (Controle, GM1, MP e MP+GM1) e às zonas A, B e C



* $p > 0,05$ para zona A: comparando-se todos os grupos

** $p < 0,05$ para zona B: GM1 e MP > controle

*** $p < 0,05$ para zona C: controle < GM1, MP e MP+GM1

Avaliando os dados morfométricos segundo a coloração e os grupos na zona B, o percentual de área preservada segundo o tipo da coloração, houve maior preservação de tecido nos grupos GM1 e MP em comparação com o grupo controle na coloração de luxol ($p < 0,05$). Na coloração de cresyl, somente o grupo que recebeu gangliosídeo isolado (grupo GM1) preservou mais substância cinzenta que o controle ($p < 0,05$), não sendo observado o mesmo em relação ao grupo MP+GM1 em nenhuma coloração ($p > 0,05$) (Tabela 9; Gráfico 11, Anexo J).

Tabela 9 - Distribuição da média do dado morfométrico de percentual de área preservada dos grupos em relação a zona B em cada coloração: cresyl e luxol

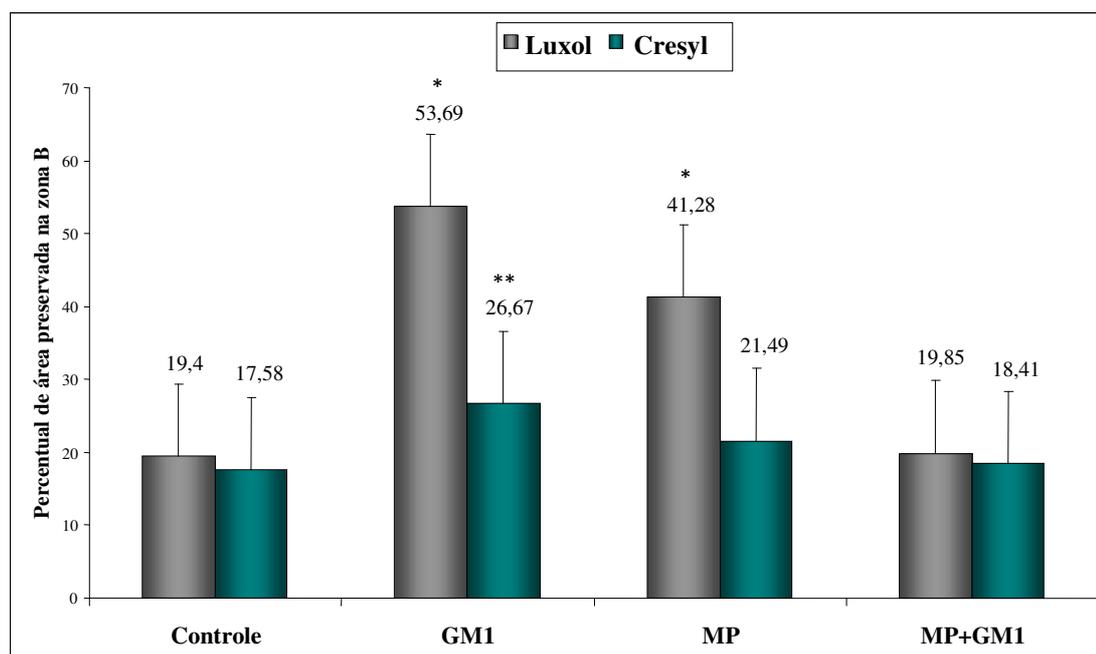
Percentual de área preservada na zona B			
	Grupo	média	desvio-padrão
Cresyl	Controle	17,58	8,32
	GM1	26,67	1,59
	MP	21,49	4,54
	MP + GM1	18,41	7,99
Luxol	Controle	19,4	5,03
	GM1	53,69	9,64
	MP	41,28	10,24
	MP + GM1	19,85	10,64

Anova

$p < 0,05$ para luxol: controle e MP+GM1 < GM1 e MP

$p < 0,05$ para cresyl: controle e MP+GM1 < GM1 e MP

Gráfico 11 - Média e desvio padrão dos valores do percentual de área preservada dos grupos (Controle, GM1, MP e MP+GM1) na zona B



* $p < 0,05$ para luxol: controle e MP+GM1 < GM1 e MP

** $p < 0,05$ para cresyl: GM1 > MP, MP+GM1 e controle

5.3 – Correlação função locomotora e histomorfometria

Avaliamos os resultados dos achados histológicos e os dos achados da avaliação da função locomotora de BBB utilizando o índice de correlação (r) de Spearman. Observamos não haver correlação direta ao compararmos tanto os dados morfométricos, independente da zona, como os dados de percentual de área preservada na zona B, isoladamente na coloração de luxol ou na coloração de cresyl com a avaliação da recuperação da função locomotora no décimo quarto dia.



6. DISCUSSÃO



6 - DISCUSSÃO

O conhecimento das alterações fisiopatológicas da lesão medular secundária, por meio de estudos experimentais, permitiu o desenvolvimento e o estudo de drogas que agem diretamente impedindo a cascata bioquímica que ocorre após a lesão primária intensificando o dano tecidual, com o objetivo de diminuir a progressão e até promover a recuperação da função neurológica (**Hall et al., 1984; Faden et al., 1987; Noble e Wrathall, 1985, 1989; Tator e Fehlings, 1991**).

Com este intuito, várias drogas foram estudadas experimentalmente nas últimas três décadas como a naloxona, tilirazade, nimodipina, GM-1, MP, entre outras (**Hall et al., 1984; Cuello et al., 1989; Hall, 1992; Ducker e Zeidman, 1994; Constantini e Young, 1994; Geisler et al., 1991, 1993a, 2001; Geisler, 1993a; Walker e Harris, 1993; Lee et al., 2005a**), e mais recentemente células-tronco, fatores genéticos de proliferação celular (GAP-43, Bcl-2, c-Jun), eritropoetina recombinante humana e fator de crescimento insulina-*like* (**Bregman e Bagden, 1994; Kaptanoglu et al., 2004; Bartholdi e Schwab, 1997; Hung et al., 2007; Vitellaro-Zuccarello et al., 2007**). As duas drogas de uso clínico estabelecido e reconhecido para o tratamento da lesão medular aguda em humanos são a MP e o

GM-1, e, segundo alguns autores, o uso em conjunto dessas drogas pode promover ação sinérgica no tratamento desses pacientes (**Taoka e Okajima, 1998, 2000**).

O uso da metilprednisolona em estudos experimentais em ratos é bastante presente na literatura e sua dosagem já foi bem estudada e estabelecida (30 mg/kg), variando apenas no tempo em que é utilizada após o trauma (**Constantini e Young, 1994; Yoon et al., 1999; Rabchevsky et al., 2002; Takami et al., 2002; Tebet, 2002; Lee et al., 2005a**). Estudos têm demonstrado existir janela terapêutica para o uso da MP em ratos com lesão medular, onde 30 minutos após o trauma parece ser o tempo limite para se iniciar o tratamento (**Yoon et al., 1999**).

A dose ideal do GM-1 em ratos não está bem estabelecida (**Fusco et al., 1986**). Os pesquisadores **Constantini e Young (1994)** realizaram estudo com várias dosagens de GM-1 e concluíram que a dose ideal é a de 30 mg/kg. Dessa forma, resolvemos seguir o protocolo instituído por esses autores como referência, da mesma forma que **Tebet em 2002 e Tebet et al. em 2003**, utilizando-se essa dosagem tanto para o GM-1, quanto para a MP, iniciada cinco minutos e repetida após três horas do trauma.

O mecanismo de ação, a eficácia e as relações entre os achados histológicos e funcionais do tratamento, tanto com o GM1, quanto com a MP, ainda não são totalmente entendidos e seu uso ainda não é um consenso na prática clínica. Dessa forma, decidimos melhor avaliar seus efeitos experimentais em ratos.

A necessidade incessante de conhecimento sobre as alterações biológicas do trauma medular agudo e de avaliar o potencial terapêutico de novas drogas levou alguns autores a revisar a evolução do desenvolvimento e aprimoramento dos modelos experimentais de lesão medular em animais como transecção parcial e completa, contusão, compressão por clipe ou por fita, balão e impacto por queda de peso (**Kuhn e Wrathall, 1998; Kwon et al. 2002; Oliveira, 2005**).

O modelo de impacção por queda de peso oferece a vantagem de ser clinicamente relevante, uma vez que mimetiza a lesão em humanos, nos quais a maioria das lesões teciduais é provocada pelo movimento rápido da coluna posterior da vértebra com impacto do osso sobre a medula (**Kuhn e Wrathall, 1998; Metz et al., 2000**).

O sistema NYU, inicialmente descrito por **Gruner** em 1992, é o modelo de queda de haste de 10g de diferentes alturas sobre a medula exposta: 6,25 mm, 12,5 mm, 25 mm e 50 mm. Permite a avaliação e o controle de alguns parâmetros biomecânicos como a velocidade de impacto, taxa de compressão medular e a força dinâmica aplicada à medula, promovendo lesão com poucas variáveis.

Rodrigues, em 1999, padronizou o uso do sistema NYU no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São

Paulo (IOT-FMUSP) segundo os parâmetros determinados pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* – MASCIS.

Esse modelo é capaz de gerar lesões medulares controladas e padronizadas em ratos, sendo o escolhido para realização desse experimento. Optamos pela utilização de queda de peso da altura de 25 mm, pois estudos anteriores demonstram que a altura de 50 mm está associada a uma alta taxa de mortalidade e provoca lesão completa impossibilitando estudos de recuperação, e na lesão provocada por 12,5 mm ocorre a recuperação funcional completa, mesmo nos ratos sem tratamento nos primeiros dez dias (**Basso et al. 1996; Constantini e Young, 1994; Rodrigues, 1999**). Pudemos confirmar a ocorrência de lesão medular parcial e incompleta uma vez que observamos melhora progressiva na avaliação da função locomotora, concordando com o encontrado em outras publicações (**Basso et al. 1995, 1996; Constantini e Young, 1994; Tebet, 2002; Tebet et al., 2003**)

O estudo comportamental para avaliação da função neurológica é importante para determinar a eficácia terapêutica de drogas experimentais. Os primeiros a desenvolver uma escala de avaliação da função locomotora foram **Tarlov e Klinger** em 1954. Depois deles, diversos investigadores desenvolveram testes para avaliação locomotora, sensitiva e a função reflexa de animais com medula lesionada (**Lhose et al., 1980; Gale et al., 1985; Noble e Wrathall, 1989; Basso et al., 1994; Vielle et al., 2002**)

A maioria dessas escalas é uma descrição qualitativa simples do comportamento de marcha, tendo uma limitação na avaliação da sensibilidade do teste, o que não permite uma avaliação precisa, consistente e reproduzível da evolução da recuperação funcional (**Basso et al., 1995**).

O método de avaliação da recuperação neurológica deve idealmente ser de fácil uso, alta sensibilidade, detectar mudanças comportamentais e ser capaz de acessar rapidamente a função locomotora de um grande número de animais. Esses métodos, porém, são geralmente de difícil aplicação e interpretação, não havendo um consenso sobre qual método de avaliação é o mais adequado e preciso (**Gale et al., 1985; Basso et al., 1995; Vialle et al., 2002**)

Basso et al., em 1995, desenvolveram uma escala de avaliação locomotora com 21 pontos, desenvolvida para avaliar os ratos submetidos à lesão medular pelo sistema NYU. Esse modelo de avaliação locomotora foi utilizado em nosso meio por **Tebet (2002); Tebet et al., (2003); Marcon (2006) e Molina (2006)** que, assim como **Basso et al.**, concluíram ser um método válido, aplicável, preditivo e capaz de avaliar as medidas de recuperação locomotora, distinguindo os resultados comportamentais em vários momentos.

Assim como **Tebet (2002) e Tebet et al. (2003)**, optamos por avaliar a função locomotora no segundo, sétimo e décimo quarto dia após lesão medular, uma vez que a recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular tem algumas características peculiares, nos quais, nas primeiras 24 horas, praticamente

não ocorre melhora funcional (**Gale et al., 1985**), após 14 dias da lesão a melhora é pequena (**Behrmann et al., 1992**) e após 4 semanas todos os ratos apresentam recuperação próximo ao normal, independente do tratamento, dificultando a avaliação do efeito de drogas (**Basso et al., 1996**).

Os resultados funcionais do segundo dia após lesão foram muito baixos, não ultrapassando o valor de seis, não havendo diferença entre os grupos, o que sugere ocorrer uma paralisia funcional transitória, similar ao choque medular no homem, o que não permite a avaliação da ação das drogas administradas neste momento como demonstrado por **Gale et al. (1985)** e **Basso et al (1995, 1996)**.

Analisando os resultados finais da recuperação funcional, verificamos que os ratos tratados com MP e sua associação com GM-1 (grupos MP e MP+GM1) obtiveram médias superiores ao grupo controle com diferença estatística significativa, sugerindo que as drogas administradas dessa forma podem atenuar as alterações biológicas da lesão medular secundária às custas de seus efeitos antiinflamatórios e neuroprotetores tanto da MP (**Oudega et al., 1999; Blight e Zimber, 2001; Taoka et al., 2001; Merola et al., 2002; Lee et al., 2005a**) quanto do gangliosídeo (**Sabel et al., 1988; Geisler et al., 1991, 1993; Geisler, 1993; Walker e Harris, 1993**). No entanto, contrariando aos achados de **Constanini e Young (1994)**, que concluíram que o GM-1, quando usado em associação com a MP, suprimem-se os efeitos benéficos da MP.

Mesmo os efeitos da metilprednisolona na recuperação da função locomotora ainda permanecem controversos, uma vez que **Marcon (2006)** demonstrou não haver diferença estatística entre ratos com lesão medular que receberam a MP e os que receberam placebo.

Na comparação do grupo que recebeu GM-1 isoladamente com o grupo controle, apesar de apresentar resultado funcional superior, não foi evidenciada diferença significativa. Estudos têm demonstrado que os efeitos dos gangliosídeos são encontrados mais na fase crônica (**Sabel et al., 1988; Borzeix et al., 1989; Geisler et al., 1991; Walker e Harris, 1993; Constantini e Young, 1994**), em longo prazo, não podendo ser excluídos seus efeitos benéficos porque o estudo terminou com quatorze dias.

Resolvemos dividir a medula contusa em zonas, A proximal, B no centro da lesão e C distal, para avaliarmos as alterações secundárias que ocorrem periféricamente ao epicentro da contusão, pois acreditávamos que drogas com a finalidade de diminuir as alterações biológicas e se poupar níveis neurológicos agiriam nessas zonas, principalmente na proximal, o que não observamos.

Quanto aos achados histológicos, observamos que no epicentro da lesão (zona B) os achados de tecido lesionado foram mais freqüentemente encontrados na porção dorsal, principalmente no corno posterior e nos tratos dorsais estendendo-se lateralmente aos funículos, concordando com os resultados encontrados por **Kuhn e Wrathall (1998)**.

Com relação à área de secção total, a zona C apresentou a maior média em comparação com as outras zonas. **Delamarter et al.**, em 1995, também observaram essas alterações distal ao centro da lesão. Acreditamos que a região caudal à lesão seja mais suscetível aos efeitos do edema axonal que se inicia no centro e depois se expande para a periferia, como observado por **Rabchevsky et al.** em 2002.

Acreditamos que, se o experimento tivesse durado mais tempo, os achados histológicos da zona C seriam mais similares aos das zonas A e B, uma vez que alguns autores têm demonstrado que o edema se inicia e atinge seu auge nas primeiras 48 horas e depois vai sendo reabsorvido lentamente. O volume do edema retorna aos padrões iniciais e as outras lesões teciduais se desenvolvem e são observadas após quatro semanas na periferia (**Noble e Wrathall, 1989; Kuhn e Wrathal, 1998; Rabchevsky et al., 2002**).

Observamos que a zona A apresentou maior preservação de área (maiores valores de percentual de área preservada) do que a zona B e C, sem correlação estatística com a droga administrada ou mesmo o grupo controle, tendo seus valores semelhantes em todos os grupos, demonstrando que a zona A pouco sofreu com as alterações vasculares secundárias após quatorze dias de trauma.

A zona C apresentou-se mais suscetível à lesão secundária e à ação das medicações usadas, uma vez que o percentual de área preservada foi menor que na zona A e os animais medicados (grupos MP, GM1 e MP+GM1) apresentaram média de preservação superior em comparação ao grupo controle.

Os valores médios de área preservada e percentual de área preservada na coloração de luxol foram maiores que o encontrado na coloração por cresyl com diferença estatisticamente significativa. Esse achado se deve provavelmente ao fato de que a coloração de cresyl é mais específica para observação de substância cinzenta, local onde ocorre a maior parte da destruição tecidual como demonstrado em outros estudos (**Duker et al., 1971; Noble e Wrathall, 1989; Behrmann et al., 1992; Kuhn e Wrathall, 1998; Rabchevsky et al., 2002; Takami et al., 2002**). Dessa forma, ao realizarmos o estudo morfométrico com a coloração de luxol, não se pôde avaliar ao certo a área de substância cinzenta lesionada, aumentando a área preservada encontrada.

A alteração histológica que mais se correlaciona com o estado da função neurológica é o percentual de substância branca remanescente no epicentro da lesão (**Gale et al., 1985; Noble e Wrathall, 1985; Bresnahan et al., 1987; Basso et al., 1996; Kuhn e Wrathall, 1998**). Observamos que todos os ratos que receberam medicação (Grupos MP, GM1 e MP+GM1) apresentaram um maior percentual de área preservada em relação ao grupo controle, independente do tipo de coloração. Não se concorda com os achados histológicos encontrados por **Constantini e Young**

(1994), em que a associação do GM-1 a MP inibiu a ação neuroprotetora apresentada pelos ratos que receberam a segunda droga isoladamente.

Entretanto, quando analisamos os dados de percentual de área preservada apenas nos cortes com coloração de luxol, específico para substância branca, observamos que os grupos MP e GM1 apresentaram efeitos histológicos benéficos ao compararmos com o grupo controle, o que não foi observado com a associação das duas drogas.

A ação da metilprednisolona na preservação de substância branca é controversa, pois da mesma forma que alguns experimentos de lesão medular em ratos com análise de campimetria têm demonstrado que a utilização da MP aumenta o volume de substância branca preservada (Merola et al., 2002; Takami et al., 2002), outros autores concluem que ocorre diminuição do volume de tecido residual (Rabchevsky et al., 2002).

O uso da metilprednisolona em ratos com lesão contusa da medula não tem demonstrado ser capaz de preservar substância cinzenta (Merola et al., 2002; Takami et al., 2002), concordando com nossos resultados histológicos. Ao utilizarmos a coloração de cresyl para substância cinzenta, observamos que o grupo que recebeu GM1 isoladamente obteve o maior percentual de área preservada, evidenciando sua ação neuroprotetora promovendo fatores neurotróficos endógenos e

diminuindo a perda de neurônios após o trauma e agindo principalmente na preservação de neurônios.

Esses achados sugerem que o gangliosídeo GM-1 tem ação na preservação, tanto de substância branca quanto de substância cinzenta, e que a MP age somente na preservação dos tratos e tecido axonal da substância branca.

Tebet (2002) observou não haver correlação entre os resultados da recuperação da função locomotora e os da avaliação histológica, visto que o grupo com o melhor resultado da função locomotora foi o grupo que recebeu MP isoladamente e o grupo que recebeu MP associado ao GM-1. O grupo com menor pontuação de alterações histológicas foi o que recebeu GM-1 isoladamente, ressaltando os efeitos histológicos favoráveis encontrados como uso do gangliosídeo.

Divergindo dos resultados de **Tebet**, os resultados histomorfométricos mais favoráveis foram encontrados nos ratos que receberam medicação (Grupos GM1, MP e MP+GM1) e, especificamente na preservação de substância branca no centro da lesão, os ratos que receberam a MP e o GM-1 isoladamente foram mais beneficiados.

Não observamos correlação entre os achados histomorfométricos e a recuperação da função locomotora, concordando com o encontrado por **Means et al.**

(1981) e **Tebet** (2002) e contrariando os resultados encontrados por outros estudos (**Gale et al., 1985; Noble e Wrathall, 1985; Bresnahan et al., 1987; Basso et al., 1995, 1996; Kuhn e Wrathall, 1998**), que demonstraram correlação direta, principalmente do tecido de substância branca residual e a função neurológica remanescente, o que nos faz concluir que essa relação ainda é uma dúvida e não podemos correlacionar os efeitos clínicos de uma droga aos seus efeitos biológicos e histológicos.

Na literatura, persistem controvérsias quanto à melhora do resultado da função locomotora e da preservação de tecido nervoso com a utilização da MP na lesão medular experimental em ratos, tampouco se pode relacionar a diminuição de tecido lesionado em estudos histológicos com a melhora funcional (**Tebet, 2002; Rabchevsky et al., 2002**). Dessa forma, os princípios em que ocorre a recuperação da função neurológica permanecem desconhecidos, podendo envolver diferentes mecanismos ainda não entendidos.

O homem tem procurado estudar incessantemente os mecanismos e alterações biológicas que ocorrem no paciente com trauma medular agudo. Este presente estudo abre portas e incentiva novos estudos para o melhor entendimento dessas alterações e para novas pesquisas com essas e outras novas drogas. Talvez um dia a ciência médica consiga encontrar um tratamento que nos possibilite curar ou, ao menos, melhorar a qualidade de vida desses pacientes.



7. CONCLUSÕES



7 - CONCLUSÕES

- 1 - A metilprednisolona isolada e sua associação com o gangliosídeo GM-1 mostraram-se eficazes na recuperação da função locomotora;
- 2 - A metilprednisolona, o GM-1 e sua associação demonstraram, independente do tipo de coloração e da zona, eficácia na preservação de tecido medular;
- 3 - No centro da lesão, o gangliosídeo GM-1 teve ação na preservação, tanto de substância branca como de substância cinzenta, e a MP agiu somente na preservação da substância branca;
- 4 - A substância cinzenta apresentou-se mais suscetível à lesão que a substância branca;
- 5 - Não houve correlação entre os achados histomorfométricos e a recuperação da função locomotora.



8. ANEXOS



8 - ANEXOS

Anexo A - Ficha de pontuação com os atributos que acompanham a escala de avaliação locomotora de BBB

Rat#: _____ Data: _____ DPO: _____ Escore: E _____ D _____

Movimento do membro						Posição do Tronco		Abdomen	Posição da Pata			Passo		Coordination	Limpas Patas		Posição Predominante da pata		Instabilidade do Tronco	Rabo									
Quadril		Joelho		Tornoz.		Lado	Prop		Varrer	Plantar PL.		Dorsal	Plantar		E	D	E	D			I	I							
E	D	E	D	E	D					w/o Sup.	w. Sup.	E	D										E	D	E	D	E	D	E
Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	E	D	E	D	Arrasto	E	D	E	D	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	I	I	I	I		Acima	
S	S	S	S	S	S			Paralelo						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	E	E	E	E		
E	E	E	E	E	E			Alto						F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	P	P	P	P		Baixo
														C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C			

E= esquerdo D=direito Tornoz=tornozelo

Comment: _____

Ø – Sem movimento
 S – Movimento leve
 E – Movimento extenso

Ø – Nada 0%
 0 – Ocasional <50%
 F – Frequente 51 - 94%
 C – Consistente 95-100%

I – Rotação interna
 E – Rotação Externa
 P - Paralela

FONTE: BASSO et al. (1995)

Anexo B - Escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

-
- 0 Sem movimentos observáveis na pata traseira (PT)
 - 1 Leve movimento de uma das duas articulações, usualmente o quadril e/ou o joelho
 - 2 Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e um leve movimento de outra
 - 3 Extenso movimento de duas articulações
 - 4 Leve movimento de todas as três articulações da PT
 - 5 Leve movimento de duas articulações e extenso movimento da terceira
 - 6 Extenso movimento de duas articulações e leve da terceira
 - 7 Extenso movimento de todas as três articulações da PT
 - 8 Arrastar ou acomodação plantar da PT sem suporte de peso
 - 9 Acomodação plantar da PT com suporte de peso somente quando imóvel ou ocasional. Freqüente ou consistente apoio dorsal e sem apoio plantar da pata
 - 10 Ocasional suporte de peso plantar, sem coordenação PT-PD
 - 11 Freqüente a consistente suporte de peso plantar e sem coordenação PT-PD
 - 12 Freqüente a consistente suporte de peso plantar e ocasional coordenação PT-PD
 - 13 Freqüente a consistente suporte de peso plantar e freqüente coordenação PT-PD
 - 14 Suporte de peso plantar consistente, consistente coordenação PT-PD, posição predominante da pata durante a locomoção em rotação (interna ou externa), quando realizado contato inicial no solo quando solto, ou freqüente suporte plantar, consistente coordenação PT-PD e ocasionais passadas dorsais
 - 15 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD e sem limpeza dos pés ou ocasional limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo
 - 16 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e freqüente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar
 - 17 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e freqüente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar
 - 18 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar
 - 19 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar e o rabo está para baixo parte ou todo o tempo
 - 20 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar, e instabilidade do tronco; o rabo está para cima consistentemente
 - 21 Consistentes passadas plantares e coordenação de marcha, consistente limpeza dos pés. Posição predominante da pata é paralela por todo o instante, e consistente estabilidade do tronco; rabo consistentemente elevado

Nota. **Leve:** movimento parcial menor que a metade da amplitude normal. **Extensivo:** movimento maior que a metade da amplitude. **Varrer:** movimentos rítmicos de extensão para flexão completa e novamente extensão da PT. **Sem suporte de peso:** sem contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou sem elevação do quarto traseiro. **Suporte de peso:** presença de contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou elevação do quarto traseiro. **Apoio plantar:** pata em contato plantar com suporte de peso. **Apoio dorsal:** peso suportado pela superfície dorsal em alguns pontos do ciclo da marcha. **Coordenação PT-PD:** para cada passo da pata dianteira um passo da pata traseira é dado. **Ocasional:** menor ou igual a 50%. **Frequente:** maior que a metade, mas não sempre (51-94%). **Consistente:** quase sempre ou sempre (95-100%). **Instabilidade de tronco:** deslocamento lateral do peso que cause balançar de latero-lateral ou colapso parcial do tronco.

FONTE: BASSO et al. (1995)

Anexo C - Distribuição do valor-P da comparação entre os dados da avaliação funcional de BBB no 2º, 7º e 14º dias de pós-lesão medular em cada grupo. Comparação entre os dias de avaliação e entre os grupos. Teste de Mann-Whitney

Comparações	Total*	2º DPLM	7º DPLM	14º DPLM
7º X 2º	< 0,0001			
14º X 2º	< 0,0001			
14º X 7º	< 0,0001			
Entre os Grupos **		0,4181	0,0401	0,0030
Controle X MP		-	0,0668	0,0165
Controle X GM1		-	0,8020	0,0891
Controle X MP+GM1		-	0,0190	0,0165
MP X GM1		-	0,2939	0,1156
MP X MP+GM1		-	0,1444	0,1238
GM1 X MP+GM1		-		

Teste de Mann-Whitney

* teste do Sinal (pareado - antes e depois)

** teste de Kruskal-Wallis

DPLM: dia de pós-lesão medular

FONTE: LETRAN-IOT-HC-FMUSP

Anexo D - Distribuição dos dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) segundo a coloração de luxol agrupados de acordo com a zona de lesão A, B ou C e o grupo: Controle, GMI, MP e MP+GMI

Grupo	Rato	Coloração de Luxol											
		Zona A				Zona B				Zona C			
		Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada	Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada	Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada	Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada
Controle	1	4,12	2,12	51,46	3,40	2,48	27,06	3,80	1,21	31,84			
	2	3,00	1,99	66,33	3,17	2,45	22,71	4,76	1,85	38,87			
	3	3,49	2,45	70,20	3,11	2,67	14,15	4,43	1,76	39,73			
	4	3,69	2,82	76,42	3,42	2,74	19,88	4,81	1,71	35,55			
	5	3,12	1,99	63,78	2,77	2,38	14,08	5,73	2,12	37,00			
	6	3,48	2,45	70,40	3,08	2,51	18,51	4,55	1,87	41,10			
GMI	7	3,21	2,09	65,11	2,76	1,25	54,71	3,27	2,53	77,37			
	8	3,80	2,56	67,37	2,85	1,32	53,68	5,71	2,98	52,19			
	9	2,66	1,59	59,77	3,00	1,74	42,00	4,40	2,43	55,23			
	10	3,31	2,16	65,26	2,77	0,82	70,40	4,12	2,34	56,80			
	11	3,24	2,27	70,06	2,99	1,36	54,52	4,18	1,82	43,54			
	12	3,34	2,03	60,78	2,54	1,35	46,85	4,42	2,34	52,94			
MP	13	2,55	1,97	77,25	3,29	1,91	41,95	3,90	1,63	41,79			
	14	3,78	2,42	64,02	4,03	1,69	58,06	3,56	2,39	67,13			
	15	3,84	2,29	59,64	2,79	1,99	28,67	3,96	2,45	61,87			
	16	3,82	2,70	70,68	3,03	2,04	32,67	5,10	2,83	55,49			
	17	3,47	2,42	69,74	3,27	1,89	42,20	3,27	1,84	56,27			
	18	3,51	2,37	67,52	3,31	1,85	44,11	3,88	2,31	59,54			
MP+GMI	19	3,32	2,07	62,35	3,14	2,74	12,74	3,72	2,31	62,10			
	20	3,96	2,80	70,71	5,42	3,87	28,60	6,08	3,58	58,88			
	21	3,39	2,41	71,09	2,45	1,62	33,88	2,87	1,44	50,17			
	22	3,09	1,99	64,40	4,00	3,65	8,75	5,80	2,41	41,55			
	23	3,29	2,42	73,56	3,25	2,44	24,92	4,82	2,60	53,94			
	24	3,42	2,35	68,71	2,74	2,46	10,22	5,61	3,08	54,90			

Anexo E - Distribuição dos dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) segundo a coloração de cresyl agrupados de acordo com a zona de lesão A, B ou C e o grupo: Controle, GM1, MP e MP+GM1

Grupo	Rato	Coloração de Cresyl											
		Zona A				Zona B				Zona C			
		Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada	Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada	Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada	Área total (mm ²)	Área Preservada (mm ²)	Percentual de área preservada
Controle	1	3,86	0,75	19,43	3,89	0,79	20,31	3,73	0,89	23,86			
	2	2,89	0,53	18,34	2,98	0,61	20,47	4,63	1,21	26,13			
	3	3,34	0,63	18,86	3,08	0,56	18,18	4,98	1,12	22,49			
	4	3,7	0,72	19,46	3,58	0,96	26,82	4,41	0,96	21,77			
	5	2,92	0,55	18,84	3,09	0,06	1,94	5,54	1,56	28,16			
	6	3,58	0,78	21,79	3,32	0,59	17,77	4,31	0,87	20,19			
GM1	7	3,24	0,78	24,07	3,12	0,76	24,36	3,27	0,7	21,41			
	8	3,78	0,87	23,02	3,56	0,98	27,53	5,79	2,52	43,52			
	9	2,74	0,59	21,53	3,28	0,87	26,52	4,32	1,52	35,19			
	10	3,28	0,83	25,30	3,34	0,91	27,25	4,17	1,41	33,81			
	11	3,28	0,76	23,17	3,43	0,99	28,86	4,18	1,74	41,63			
	12	3,19	0,9	28,21	3,02	0,77	25,50	4,07	1,12	27,52			
MP	13	2,29	0,57	24,89	3,63	1,09	30,03	3,95	1,38	34,94			
	14	3,36	0,66	19,64	3,42	0,68	19,88	3,65	0,86	23,56			
	15	3,92	0,68	17,35	3,37	0,59	17,51	3,99	1,15	28,82			
	16	3,77	0,76	20,14	2,8	0,58	20,71	5,37	1,73	32,22			
	17	3,48	0,64	18,39	2,89	0,65	22,49	3,01	0,62	20,60			
	18	3,29	0,64	19,45	3,22	0,59	18,32	4,11	1,21	29,44			
MP+GM1	19	3,37	0,69	20,47	4,07	0,91	22,36	3,7	1,15	31,08			
	20	3,91	1,01	25,83	4,54	0,38	8,37	5,93	2,22	37,44			
	21	3,51	0,74	21,08	3,26	0,26	7,98	2,91	0,86	29,55			
	22	3,08	0,71	23,05	3,27	0,82	25,08	4,44	1,57	35,36			
	23	3,27	0,71	21,71	3,93	0,94	23,92	4,39	1,43	32,57			
	24	3,42	0,77	22,51	3,25	0,74	22,77	5,21	2,05	39,35			

Anexo F - Distribuição do valor-P da comparação entre os dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) em cada zona: A, B e C. Comparação entre as zonas 2 a 2 - teste de Tukey

	ZONAS	
	A	B
Área total (mm²)		
A	-	-
B	0,7418	-
C	< 0,0001	< 0,0001
Área Preservada (mm²)		
A	-	-
B	< 0,0001	-
C	0,0004	< 0,0001
Percentual de Área Preservada		
A	-	-
B	< 0,0001	-
C	0,0190	< 0,0001
	-	-

Anexo G - Distribuição do valor-P da comparação entre os dados morfométricos (área total, área preservada e percentual de área preservada) e os grupos: controle, GM1, MP e MP+GM1. Comparação entre os grupos 2 a 2 - teste de Tukey

	Controle	GM1	MP
Área total (mm²)			
Controle	-	-	-
GM1	0,4088	-	-
MP	0,4374	1,0000	-
MP + GM1	0,8643	0,0965	0,1076
Área preservada (mm²)			
Controle	-	-	-
GM1	0,0002	-	-
MP	0,0213	0,5140	-
MP + GM1	0,0121	0,6371	0,9974
Percentual de Área preservada			
Controle	-	-	-
GM1	< 0,0001	-	-
MP	< 0,0001	0,0635	-
MP + GM1	0,003	< 0,0001	0,1715
	-	-	-

Anexo H - Distribuição do valor -p da comparação entre os dados morfométricos de percentual de área preservada em cada grupo (Controle, GM1, MP e MP+GM1) e em cada tipo de coloração. Comparação entre as associações coloração e grupo 2 a 2 - teste de Tukey

	Crezil / Controle	Crezil / GM1	Crezil / MP	Crezil / MP + GM1	Luxol / Controle	Luxol / GM1	Luxol / MP
Percentual de área preservada							
Crezil / Controle	-	-	-	-	-	-	-
Crezil / GM1	0,0093	-	-	-	-	-	-
Crezil / MP	0,8739	0,3120	-	-	-	-	-
Crezil / MP + GM1	0,3757	0,8225	0,9920	-	-	-	-
Luxol / Controle	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	-	-	-
Luxol / GM1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	-	-
Luxol / MP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,9093	-
Luxol / MP + GM1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0926	< 0,0001	0,0069

Anexo I - Distribuição do valor-p da comparação entre os dados morfométricos (área preservada e percentual de área preservada) e de cada grupo em relação as zonas A, B e C. Efeito do grupo e da zona, independente da coloração. Comparação entre as associações dos grupos e região - 2 a 2 - teste de Tukey

	Controle / A	Controle / B	Controle / C	GMI / A	GMI / B	GMI / C	MP / A	MP / B	MP / C	MP+GMI / A	MP+GMI / B	MP+GMI / C
Área preservada												
Controle / A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle / B	< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle / C	1,0000	< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GMI / A	1,0000	< 0,0001	1,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GMI / B	0,7176	0,0052	0,9094	0,8349	-	-	-	-	-	-	-	-
GMI / C	0,0644	< 0,0001	0,0214	0,0363	< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-
MP / A	1,0000	< 0,0001	1,0000	1,0000	0,5838	0,1076	-	-	-	-	-	-
MP / B	0,1206	0,1223	0,2746	0,1923	0,9964	< 0,0001	0,0730	-	-	-	-	-
MP / C	0,9382	< 0,0001	0,7747	0,8653	0,0345	0,8435	0,9771	0,0009	-	-	-	-
MP + GMI / A	1,0000	< 0,0001	0,9992	0,9999	0,3682	0,2228	1,0000	0,0295	0,9977	-	-	-
MP + GMI / B	< 0,0001	1,0000	< 0,0001	< 0,0001	0,0327	< 0,0001	< 0,0001	0,3901	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	-
MP + GMI / C	0,0069	< 0,0001	0,0018	0,0034	< 0,0001	0,9999	0,0133	< 0,0001	0,3755	0,0357	< 0,0001	< 0,0001
Percentual de área preservada												
Controle / A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle / B	< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle / C	0,0006	0,0009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GMI / A	1,0000	< 0,0001	< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GMI / B	0,9967	< 0,0001	0,0235	0,9063	-	-	-	-	-	-	-	-
GMI / C	0,9997	< 0,0001	< 0,0001	1,0000	0,7976	-	-	-	-	-	-	-
MP / A	1,0000	< 0,0001	< 0,0001	1,0000	0,9517	1,0000	-	-	-	-	-	-
MP / B	0,0019	0,0003	1,0000	0,0002	0,0585	< 0,0001	0,0004	-	-	-	-	-
MP / C	1,0000	< 0,0001	0,0009	0,9999	0,9988	0,9989	1,0000	0,0030	-	-	-	-
MP + GMI / A	0,9986	< 0,0001	< 0,0001	1,0000	0,7149	1,0000	1,0000	< 0,0001	0,9961	< 0,0001	< 0,0001	-
MP + GMI / B	< 0,0001	1,0000	0,0023	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0007	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	-
MP + GMI / C	1,0000	< 0,0001	0,0001	1,0000	0,9636	1,0000	1,0000	0,0005	1,0000	1,0000	< 0,0001	< 0,0001

Anexo J - Distribuição do valor-P da comparação entre os dados morfométricos de percentual de área preservada na zona B e os grupos: controle, GM1, MP e MP+GM1. Comparação entre os grupos 2 a 2 - teste de Tukey

Comparações - somente zona B							
	Cresyl / Controle	Cresyl / GM1	Cresyl / MP	Cresyl / MP+GM1	Luxol / Controle	Luxol / GM1	luXol / MP
Cresyl / Controle							
Cresyl / GM1	0,0747						
Cresyl / MP	1,0000	0,9995					
Cresyl / MP+GM1	1,0000	0,8736	1,0000				
Luxol / Controle	1,0000	0,9609	1,0000	1,0000			
Luxol / GM1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		
Luxol / MP	< 0,0001	0,0339	0,0002	< 0,0001	< 0,0001	0,1716	
Luxol / MP+GM1	1,0000	0,9806	1,0000	1,0000	1,0000	< 0,0001	< 0,0001

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akesson E, Holmberg L, Jönhagen ME, Kjaeldgaard A, Falci S, Sundström E, Seiger A. Solid human embryonic spinal cord xenografts in acute and chronic spinal cord cavities: a morphological and functional study. *Exp Neurol*. 2001;170(2):305-16.

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

Allen AR. Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation. Preliminary report. *J Am. Med Assoc*. 1911;57:878 - 80.

Anderson DK, Means ED, Waters TR. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg*. 1982;56(1):106-13.

Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest*. 1978;39(3):236-53.

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

Bartholdi D; Schwab ME. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. Eur J Neurosci. 1997;9(7):1422-38.

Basso DM, Alexander M, Beattie MS, Bresnahan JC. A new more sensitive scale for measuring locomotor recovery after spinal cord injury in rat. J Neurotrauma. 1994;11:103.

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

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. Exp Neurol. 1996;139:244-56.

Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. J Neurotrauma. 1992;9(3):197-217.

Blight AR. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by linesampling. *Neuroscience*. 1983;10(2):521-43.

Bracken MB. Steroids for acute spinal Cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*;(3):CD001046, 2002.

Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg*. 1993;79(4):500-7.

Bracken MB, Holford TR. Neurological and functional status 1 year after acute spinal cord injury: estimates of functional recovery in National Acute Spinal Cord Injury Study II from results from results modeled in National Acute Spinal Cord Injury StudyIII. *J Neurosurg*. 2002;96(suppl):259-66.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J. A randomized, controlled Trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of theSecond National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl Med*. 1990;322(20):1459-61.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall FL, Nockels RP, Pascale V, Perot PL, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberg JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA. 1997;277(20):1597-604.

Bregman BS, Bagden EK. Potential mechanisms underlying transplant mediated recovery of function after spinal cord injury In: Marwah J, Teitelbaum H, Prasad KN, editores. Neural transplantation, CNS neuronal injuries and regeneration: recent advances. New York: CRC Press Inc; 1994. p 81-102.

Bresnahan JC, Beattie MS, Todd III FD, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. Exp. Neurol. 1987;95(3):548-70.

Burney RE, Maio RF, Maynard F, Karunas R. Incidence, characteristics, and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. Arch Surg. 1993;128(5):596-9.

Chinnock P, Roberts I. Gangliosides for acute spinal cord injury. Cochrane Database Syst Rev;(2):CD004444, 2005.

Cízková D, Rosocha J, Vanický I, Jergová S, Cízek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26(7-8):1167-80.

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.

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 da Universidade de São Paulo; 2007.

Cuello AC, Garofalo L, Kenigsberg RL, Maysinger D. Ganglioside potentiate in vivo and in vitro nerve growth factor on central cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(6):2056-60.

Delamarter RB, Sherman J, Carr JB. Pathophysiology of spinal cord injury. *Jour. Bone and Joint Surg*. 1995;77(7):1042-1049.

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

Ducker TB, Zeidman SM. Spinal Cord Injury: Role of steroid therapy. *Spine*. 1994;19(20): 2281-7.

Faden AI, Chan PH, Longar S. Alterations in lipid metabolism, Na⁺, K⁺, ATPase activity, and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *J Neurochem.* 1987;48(6):1809-16.

Fehlings MG, Tator CH. An evidence-based review of decompressive surgery in acute spinal cord injury: rationale, indication and timing based on experimental and clinical studies. *J Neurosurg.* 1999;91(1 Suppl):1-11.

Fusco M; Donà M; Tessari F; Hallman H; Jonsson G; Gorio A. GM1 ganglioside counteracts selective neurotoxin-induced lesion of developing serotonin neurons in rat spinal cord. *J Neurosci Res.* 1986;15(4):467-79.

Gale K, Kerasidis H, Whathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol.* 1985;88(1):123-34.

Galvão PEC. Avaliação funcional e histológica do efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular contusa [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.

Gebrin AS, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP. Intervenções farmacológicas no trauma raquimedular: uma nova visão terapêutica. *Acta Ortop Bras.* 1997a;5(3):123-36.

Gebrin AS, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. Rev.Bras.Ortop.1997b;32(2):103-8.

Geisler FH. GM-1 ganglioside and motor recovery following human spinal cord injury. J Emerg Med. 1993;11(Suppl 1):49-55.

Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D. The Sygen[®] multicenter acute spinal cord injury study. Spine. 2001;26(Suppl 24):87-98.

Geisler FH, Dorsey EC, Coleman WP. Past and current clinical studies with GM-1 ganglioside in acute cord injury. Ann Emerg Med. 1993;22(6):108-14.

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.

Gerndt SJ, Rodriguez JL, Pawlik JW, Taheri PA, Wahl WL, Micheals AJ, Papadopoulos. Consequences of high-dose steroid therapy for acute spinal cord injury. J Trauma. 1997;42(2):279-84.

Gorio A. Gangliosides as a possible treatment affecting neuronal repair processes. Adv Neurol. 1988;47:523-30.

Greve JMD. Reabilitação da lesão da medula espinhal. In: Barros Filho TEP, Basile Jr. R. Coluna vertebral: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 1995. p. 199-227.

Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. J. Neurotrauma. 1992;9(2):123-6.

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

Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. J Neurosurg. 1992;76(1):13-22.

Hall ED, Braugher JM. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and (Na⁺, K⁺) - ATPase activity dose response analysis during the 1st hour after contusion injury in the cat. J Neurosurg. 1982;57(2);247-53.

Hall ED, Wolf DL, Braugher JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental post traumatic spinal cord ischemia: dose response and time-action analysis. J Neurosurg. 1984;61(1):124-30.

Hung KS, Tsai SH, Lee TC, Lin JW, Chang CK, Chiu WT. Gene transfer of insulin-like growth factor-I providing neuroprotection after spinal Cord injury in rats. J Neurosurg Spine. 2007;6(1):35-46.

Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonaki E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal Cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev.* 2004;27(2):113-20.

Karpiak SE; Wakade CG; Tagliavia 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.

Kimura H, Yoshikawa M, Matsuda R, Toriumi H, Nishimura F, Hirabayashi H, Nakase H, Kawaguchi S, Ishizaka S, Sakaki T. Transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells for spinal cord injury in adult mice. *Neurol Res.* 2005;27(8):812-9,

Kuhn PL, Wrathall JR. A mouse model of graded contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1998;15(2):125-40.

Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine.* 2002;27(14):1504-10.

La Rosa G, Conti A, Cardali S, Cacciola F, Tomasello F. Does early decompression improve neurological outcome of spinal cord injured patients? Appraisal of the literature using a meta-analytical approach. *Spinal Cord.* 2004;42(9):503-12.

Lammertse DP. Update on pharmaceutical trials in acute spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2004;27(4):319-25.

Lee BH, Lee KH, Yoon DH, Kim UJ, Hwang YS, Park SK, Choi JU, Park YG. Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord injured rats. *J Korean Med Sci.* 2005a;20(1):132-8.

Lee KH, Yoon DH, Park YG, Lee BH. Effects of glial transplantation on functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2005b;22(5):575-89.

Legos JJ, Gopez JJ, , Young WF. Non surgical management of spinal cord injury. *Exprt Opin Investig Drugs.* 2002;11(4):469-82.

Lohse DC, Senter HJ, Kauer IS. Spinal cord blood flow in experimental transient paraplegia. *J Neurosurg.* 1980;52(3):335-45.

Mahadik SP; Hawver DB; Hungund BL; Li YS; Karpiak SE. GM1 ganglioside treatment after global ischemia protects changes in membrane fatty acids and properties of Na⁺, K⁺-ATPase and Mg²⁺. *J Neurosci Res.* 1989;24(3):402-12.

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

McCutcheon EP, Selassie AW, Gu JK, Pickelsimer EE. Acute traumatic spinal Cord injury, 1993-2000^a population-based assessment of methylprednisolone administration and hospitalization administration and hospitalization. J trauma. 2004;56(5):1076-83.

McDonald JW, Howard MJ. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. Prog Brain Res. 2002;137:299-309.

Merola A; O'Brien MF; Castro BA; Smith DA; Eule JM; Lowe TG; Dwyer AP; Haher TR; Espat NJ. Histologic characterization of acute spinal cord injury treated with intravenous methylprednisolone. J Orthop Trauma. 2002;16(3):155-61.

Metz GAS, Curt A, Van de Meent H, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. J Neurotrauma. 2000;17(1):1-17.

Molina AIS. Análise da sensibilidade e reprodutibilidade da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.

Nash HH, Borke RC, Anders JJ. Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 2002;22(16):7111-20.

Noble LJ, Wrathall JR. Correlative Analyses of lesion development and functional status after graded spinal cord contusive injuries in the rat. *Exp. Neurol.* 1989;103(1):34-40.

Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat:morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp. Neurol.* 1985;88(1):135-49.

Oliveira AR. Efeitos do tempo de descompressão medular no traumatismo raquimedular: Estudo experimental em ratos. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.

Rabchevsky AG, Fugaccia I, Sullivan PG, Blades DA, Scheff SW. Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *J Neurosci Res.* 2002;68(1):7-18.

Rodrigues. Padronização da lesão na medula espinhal em ratos wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.

Sandler AN, Tator CH. Effect of acute spinal cord compression injury on regional spinal cord blood flow in primates. *J Neurosurg.* 1976;45(6):660-76.

Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury – a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord*. 2000;38(5):273-86.

Takami T, Oudega M, Bethea JR, Wood PM, Bunge MB. Methylprednisolone and interleukin-10 reduce gray matter damage in the contused Fischer rat thoracic spinal cord but do not improve functional outcome. *J Neurotrauma*. 2002;19(5):653-66.

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

Tarasenko YI, Gao J, Nie L, Johnson KM, Grady JJ, Hulsebosch CE, McAdoo DJ, Wu P. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. *J Neurosci Res*. 2007;85(1):47-57.

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

Tator CH, Fehlings MG, Thorpe K, Taylor W. Current use and timing of spinal surgery for management of acute spinal surgery for management of acute spinal cord injury in North America: results of a retrospective multicenter study. *J Neurosurg*. 1999;91(1 Suppl):12-8.

Tator CH, Rowed IW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453-64, 1979.

Tebet MA. Efeito da metilprednisolona e do gangliosídeo GM-1 na lesão medular em ratos: análise funcional e histológica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.

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

Tsutsumi S, Ueta T, Shiba K, Yamamoto S, Takagishi K. Effects of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study of high-dose methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury-results in spinal. *Spine.* 2006;31(26):2992-6.

Urdzísková L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 2006;23(9):1379-91.

Vaccaro AR, Singh K. Pharmacologic treatment and surgical timing for spinal cord injury. *Curr Opin Orthop.* 1999;10:112-6.

Vialle E, Vialle LRG, Rosera E, Cechinel C, Leonel I, Seyboth C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental. *Rev. Bras. Ortop.* 2002;37(3):83-96.

Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P, Gorio A, De Biasi S. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience.* 2007;144(3):865-77.

Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal Cord injured rat. *Yonsei Med J.* 1999;40(4):313-20.

Young W. Recovery mechanisms in spinal cord injury: implications for regenerative therapy. In: SEIL AJ, editor. *Neural Regeneration and Transplantation.* New York: Alan Liss;1995. p. 157-59.

Young W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. *J Emerg Med.* 1993;11(Suppl 1):13-22.

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.

Walker JB, Harris M. GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* 1993;161(2):174-8.