
Daniel de Moraes Ferreira Jorge

**Avaliação do efeito do GM-1 por via intratecal em 24, 48 e 72 horas
após lesão medular aguda em ratos**

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Raphael Martus Marcon

**São Paulo
2023**

Daniel de Moraes Ferreira Jorge

**Avaliação do efeito do GM-1 por via intratecal em 24, 48 e 72 horas
após lesão medular aguda em ratos**

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Raphael Martus Marcon

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Jorge, Daniel de Moraes Ferreira
Avaliação do efeito do GM-1 por via intratecal em
24, 48 e 72 horas após lesão medular aguda em ratos
/ Daniel de Moraes Ferreira Jorge. -- São Paulo,
2023.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.

Orientador: Raphael Martus Marcon.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinhal
2.Gangliosídeo G(M1) 3.Injeções espinhais 4.Ratos
Wistar

USP/FM/DBD-087/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha esposa, pelo apoio e compreensão, sendo a alicerce de nossa família o tempo todo.

À meus filhos por entenderem meus momentos de ausência, e entendendo a importância da
dedicação aos estudos.

À meus pais, por participar ativamente de toda minha formação e me dando exemplos na
condução moral e ética de toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Valter e Terezinha, pelo apoio e incentivo tanto na minha formação profissional como pessoal, estimulando a minha busca perene pelo conhecimento.

À minha querida esposa Melina e meus filhos Gabriela e Lucas, que sempre me compreenderam e estimularam, estando sempre ao meu lado e me dando o alicerce necessário para poder estudar e me dedicar na pesquisa científica.

Ao meu querido irmão, André, que sempre me apoiou em todas as fases de minha vida pessoal e profissional.

Ao meu cunhado, Rodrigo, que me incentivou e apoiou na fase inicial desse projeto.

Ao Prof. Dr. Raphael Martus Marcon, por me orientar e ajudar nesse projeto, além de proporcionar todo conhecimento no estudo da lesão medular e da neuroplasticidade.

Ao Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante, por todo apoio e incentivo em minha trajetória científica dentro da pós-graduação.

Ao amigo Gustavo Bispo dos Santos por todo apoio e dedicação ímpar em me ajudar desde a **fase inicial** até os últimos minutos desse projeto científico.

Ao Prof. José Fábio Lana, por estimular e ampliar meu desejo pela ciência e conhecimentos em benefício sempre dos nossos pacientes.

Ao Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa Barros Filho, pelo apoio e incentivo à nossa disciplina.

Ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, sempre incentivando o desenvolvimento da ciência.

Agradecimentos

Às secretárias do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Tânia Fernanda Cardoso da Silva, sempre disposta em me auxiliar.

Agradecimentos também à todos os funcionários do IOT-HC-FMUSP que contribuíram para a realização desta minha pesquisa científica.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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 Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Nomes das estruturas anatômicas: Terminologia Anatômica Internacional da Federative Committee on Anatomical Terminology aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. 1ed. São Paulo: Editora Manole, 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5ed, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto no 6583/2008.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Gráficos	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Abstract	
1	INTRODUÇÃO..... 1
2	OBJETIVOS..... 8
3	REVISÃO DA LITERATURA..... 10
4	MÉTODOS..... 19
4.1	Ética..... 19
4.2	Estrutura física..... 19
4.3	Animais de experimentação..... 19
4.3.1	CrITÉrios de inclusão..... 20
4.3.2	CrITÉrios de exclusão 20
4.4	Grupos experimentais..... 21
4.5	Modelo experimental de lesão medular..... 21
4.5.1	Protocolo de anestesia..... 21
4.5.2	Profilaxia infecciosa e analgesia..... 23
4.5.3	Modelo de lesão medular..... 23
4.5.4	Padronizao da técnica de aplicao pela via intratecal..... 27
4.5.5	Protocolo ps-operatório..... 29
4.6	Avaliao funcional..... 30

4.6.1	Avaliação da capacidade locomotora segundo a escala BBB.....	30
4.6.2	Plano horizontal.....	33
4.7	Protocolo de eutanásia.....	34
4.7.1	Descarte das carcaças.....	34
4.8	Forma de análise de resultados.....	34
5	RESULTADOS.....	37
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÕES.....	54
8	ANEXOS.....	56
9	REFERÊNCIAS.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EEG	Equações de Estimação Generalizada
GM-1	Monosialogangliosídeo sódico
IOT-HC/FMUSP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos
LIM-41	Laboratório de Biomecânica
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
NYU	New York University

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura de preparo e indução anestésica.....	22
Figura 2 –	Manutenção da anestesia durante procedimento.....	22
Figura 3 –	Ilustra a via de acesso em região dorsal do animal.....	24
Figura 4 –	Ilustra o animal posicionado para a contusão medular e o contato inicial do equipamento com a medula.....	25
Figura 5 –	Ilustra a calibração do NYU impactor.....	25
Figura 6 –	Apresenta a sutura em bloco da musculatura dorsal.....	26
Figura 7 –	Apresenta a sutura cutânea.....	26
Figura 8 –	Microscópio utilizado para guiar aplicação intratecal.....	27
Figura 9 –	Localização anatômica do ponto de aplicação.....	28
Figura 10 –	Aplicação intratecal sob visão em mcicroscópio.....	29
Figura 11–	Escala de avaliação locomotora. Escala desenvolvida por Basso, Beattie e Bresnahan (1995) e utilizada para a avaliação locomotora de ratos que sofreram lesão raquimedular, sendo graduada de 0 a 21 pontos.....	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Valores médios e respectivos erros padrões do BBB segundo grupos e momentos de avaliação.....	40
Gráfico 2 – Valores médios e respectivos erros padrões dos acertos no plano horizontal segundo grupos e momentos de avaliação.....	43
Gráfico 3 – Valores médios e respectivos erros padrões dos passos no plano horizontal segundo grupos e momentos de avaliação.....	45
Gráfico 4 – Valores médios e respectivos erros padrões dos erros no plano horizontal segundo grupos e momentos de avaliação.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Descrição da escala BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	38
Tabela 2 –	Resultado das comparações múltiplas do BBB entre grupos e momentos avaliados conforme as diferenças encontradas.....	39
Tabela 3 –	Descrição dos pesos dos animais segundo grupos no início e ao final do estudo e das variações de peso e resultado das comparações das variações entre os grupos.....	41
Tabela 3.1 –	Resultado das comparações múltiplas da alteração percentual de peso entre os grupos.....	41
Tabela 4 –	Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	42
Tabela 5 –	Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	44
Tabela 6 –	Resultado das comparações múltiplas dos passos entre grupos e momentos avaliados.....	45
Tabela 7 –	Resultado das comparações múltiplas dos acertos entre os momentos avaliados.....	46
Tabela 8 –	Resultado das comparações múltiplas dos escorregões entre grupos e momentos avaliados.....	46
Tabela 9 –	Resultado das comparações múltiplas dos erros entre grupos e momentos avaliados.....	47

RESUMO

Jorge DMF. *Avaliação do efeito do GM-1 por via intratecal em 24, 48 e 72 horas após lesão medular aguda em ratos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: A lesão medular continua desafiando a medicina atual, pois seguimos ainda sem opções terapêuticas com real benefício comprovado na recuperação funcional dos pacientes. Os tratamentos oferecidos buscam reduzir a expansão da lesão na fase secundária, onde os danos podem ser incrementados, buscando promover a regeneração axonal. Estudos realizados a partir de lesão medular induzida em diversos modelos animais têm sugerido que algumas drogas, como o monosialogangliosídeo sódico (GM-1), possuem efeitos neuroprotetores e neurotróficos quando administradas após evento traumático que leve à lesão do tecido neural. Porém, ainda não temos definido o melhor momento para iniciar sua utilização na prática clínica, e a posologia usual, também pode ser um desafio para a utilização padronizada, pois, tradicionalmente, vias endovenosas ou intramusculares mantidas por longos dias podem levar a desconforto e complicações nos locais de aplicação. Além disso, o produto pode enfrentar dificuldade em ultrapassar a barreira hematoencefálica, fazendo com que pequenas concentrações de GM-1 atinjam efetivamente o sistema nervoso central. O objetivo deste trabalho foi estudar o melhor momento e a viabilidade da aplicação do GM-1 por via intratecal após lesão contusa medular em ratos Wistar. **MÉTODOS:** Quarenta ratos da raça Wistar submetidos à lesão contusa da medula após laminectomia, com utilização do sistema NYU Impactor em laboratório. Os animais foram sorteados e divididos em quatro grupos sequencialmente, sendo: Grupo 1 – aplicação de GM-1 intratecal após 24 h da lesão medular; Grupo 2 – aplicação de GM-1 intratecal após 48 h da lesão medular; Grupo 3 – aplicação de GM-1 intratecal após 72 h da lesão medular; Grupo 4 – sham, realizado laminectomia e aplicação intratecal de 0,5 mL de solução fisiológica 0,9%, sem lesão medular. Os animais foram avaliados quanto à recuperação da função locomotora em sete diferentes momentos pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) – em dois dias e semanalmente até a sexta semana pós-lesão medular. Foram ainda avaliados pelo plano horizontal, com critérios de avaliação comportamental sensório-motora, antes da lesão e ao final da sexta semana de pós-operatório. **RESULTADOS:** Esse projeto experimental revelou melhores escores funcionais na avaliação com os escores BBB e plano horizontal no grupo submetido à aplicação de GM-1, com resultados estatisticamente significativos, especialmente no Grupo 2, submetido à aplicação após 48 h da lesão medular. **CONCLUSÃO:** Com os resultados apresentados, este estudo demonstrou que a aplicação do GM-1 por via intratecal após lesão medular contusa em ratos Wistar é viável e que a aplicação após 48 h da lesão, apresentou os melhores resultados funcionais.

Descritores: Traumatismos da medula espinhal; Gangliosídeo G(M1); Injeções intratecais; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Jorge DMF. *Evaluation of the effect of intrathecal GM-1 in 24, 48, and 72 hours after acute spinal cord injury in rats* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUCTION: Spinal cord injury continues to challenge current medicine, as there are still no therapeutic options with real proven benefits in the functional recovery of patients. The treatments offered to reduce the expansion of the injury in the secondary phase, where damage may be increased, in an attempt to promote axonal regeneration. Studies based on induced spinal cord injury in several animal models have suggested that some drugs, such as sodium monosialoganglioside (GM-1), have neuroprotective and neurotrophic effects when administered after a traumatic event that leads to neural tissue injury. However, there is no definition of the best timing to use it in clinical practice. Its dosage may also be a challenge for standardized use, as traditionally, intravenous, or intramuscular routes maintained for long days may lead to discomfort and complications at access sites. In addition, the drug may face difficulty crossing the blood-brain barrier causing small concentrations of GM-1 to reach the central nervous system effectively. The aim of this study was to study the best timing and feasibility of intrathecal application of GM-1 after spinal cord contusion in Wistar rats. **METHODS:** Forty Wistar rats were submitted to spinal cord contusion after laminectomy using the NYU impactor system in the laboratory. The animals were sequentially randomized and divided into four groups: Group 1 – intrathecal application of GM-1 24 h after the spinal cord injury; Group 2 – intrathecal application of GM-1 48 h after the injury; Group 3 – intrathecal application of GM-1 72 h after the injury; Group 4 – Sham, with laminectomy and intrathecal application of 0.5 ml of 0.9% saline solution, without spinal cord injury. The animals were evaluated regarding the recovery of locomotor function at seven different times by the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) test on the second day and weekly until the sixth week after the spinal cord injury. They were also assessed by the horizontal ladder, with sensory-motor behavioral assessment criteria, before the injury and at the end of the sixth week postoperatively. **RESULTS:** This experimental study showed better functional scores in the BBB and horizontal ladder assessment in the group submitted to the application of GM-1, with statistically significant results, especially in group 2 (48 h after spinal cord injury). **CONCLUSION:** With the results presented, this study demonstrated that the intrathecal application of GM-1 after spinal cord contusion in Wistar rats is feasible. The application 48 h after the injury presented the best functional results.

Keywords: Spinal cord injuries; G(M1) Ganglioside; Injections, Spinal; Rats, Wistar.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No instante em que uma lesão traumática da medula espinhal ocorre, consequências físicas, sociais e financeiras de longo alcance aparecem, tanto para os pacientes quanto para suas famílias. Apesar de décadas de progresso, ainda faltam opções viáveis de terapias neuroregenerativas eficazes, capazes de proporcionar a recuperação neurológica e funcional destes pacientes. Motivando diversas pesquisas e ensaios clínicos, a procurar entender claramente os mecanismos e a fisiopatologia desse evento traumático, buscando alternativas para intervir de forma ideal e no melhor momento possível¹.

No mundo havia uma prevalência de 20,64 milhões de casos em 2019, com uma incidência média de 0,91 milhões de casos novos por ano². Já no Brasil, essa estatística para o traumatismo raquimedular no Brasil é de em torno de 70 casos novos/ano/milhão de habitantes, cerca de 11 mil casos novos/ano^{3,4}.

Grande agravo dessa situação clínica, é que essas lesões traumáticas, acometem sobretudo adultos jovens durante a fase produtiva de suas vidas, tais lesões medulares normalmente apresentam-se como resultado de acidentes ou de violência e, embora a incidência seja baixa, o dano causado e a perda de função geralmente são importantes e muitas vezes, incapacitantes. Temos que nos atentar, também, para as questões financeiras envolvidas com esse tipo de lesão, para as famílias e para todo o sistema de saúde, seja público ou privado. O custo médio direto para o cuidado de um paciente, vítima de trauma raquimedular, é de até US\$ 1,1-4,8 milhões durante sua vida nos Estados Unidos, como indicado pela National Spinal Cord Injury Statistical Center², e despesas hospitalares diretas de aproximadamente US\$95.000,00³.

A lesão medular provoca danos que podem ser divididos em duas etapas. A primeira

fase, associada ao momento do trauma, levando à morte celular, que ocorre inicialmente no local da lesão, devido ao estresse mecânico, com natureza necrótica⁵. E num segundo momento, ocorrem alterações secundárias que atingem o local da lesão e o tecido adjacente com natureza apoptótica⁶.

Essa fase secundária inclui alterações neuroquímicas que ocorrem de minutos a dias após a lesão inicial, com pico estimado em três dias (72h), abrangendo a ativação da cascata de ácido araquidônico, resposta inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da concentração extracelular de aminoácidos como o glutamato, edema e uma redução do fluxo sanguíneo na medula espinhal⁷.

A redução de adenosina trifosfato disponível é decorrente da diminuição na disponibilidade de oxigênio e de nutrientes para as células, provocando uma disfunção das bombas eletrolíticas da membrana e resultando em alteração nas concentrações iônicas intra e extracelulares⁸. Ocorre, assim, o edema e a morte das células, com liberação de neurotransmissores aminoacídicos, com ações neurotóxicas, como o glutamato⁹.

Nesse cenário, a via glicolítica também é estimulada, aumentando o lactato e reduzindo o pH local, o que provoca, em contrapartida, uma vasodilatação e um aumento do fluxo sanguíneo, com maior produção de radicais livres, que acabam por induzir maior morte celular.

A formação de radicais livres e a peroxidação lipídica ocorrem pela ativação de proteases induzidas pelo aumento excessivo do influxo de sódio e cálcio nos neurônios, que ocorre devido à citotoxicidade do glutamato.

Essas alterações celulares químicas, que levam à liberação de enzimas líticas e radicais livres, ocorrem principalmente na substância cinzenta medular, mas acabam atingindo tecidos adjacentes e lesando a substância branca, e provocam também

desmielinização e resposta inflamatória¹⁰.

Sabemos que a lesão primária é irreversível, portanto, os esforços terapêuticos têm se concentrado em reduzir a lesão secundária e em promover a regeneração axonal. Porém, até o momento, não dispomos de nenhuma estratégia farmacológica com real benefício demonstrado¹¹. Embora altas doses de metilprednisolona continuem sendo usadas, em curto período de tempo, como demonstrado inclusive, na última publicação da AO Spine em 2022¹², as evidências que comprovam sua eficácia no tratamento do trauma raquimedular em várias instituições são fracas^{11,13,14}. Sabemos, ainda, que existem efeitos colaterais nessa terapia, com processo deletério para a regeneração neuronal por inibir a atividade de células imunitárias e a ação de macrófagos na eliminação de antígenos¹⁵, e por causar discreta neutropenia, exacerbação da necrose pós-isquêmica e inibição do brotamento de axônios¹⁶, complicações respiratórias, sepse e hemorragia gastrointestinal, que dificultam o seu uso como padrão de tratamento.

Existem hoje diversos estudos em animais e ensaios clínicos, que têm sugerido inclusive, a utilização de inúmeros agentes terapêuticos, como estrogênio^{17,18}, agonistas dos receptores de estrogênio¹⁹, progesterona, monossialogangliosídeo sódico (GM-1), eritropoetina²⁰⁻²², magnésio¹¹ e ligantes de imunofilinas (tacrolimus)²³, assim como o uso das vitaminas C e E²⁴ e de melatonina²⁵, dentre outros.

O atual gerenciamento médico da lesão medular aguda é composto por oxigenoterapia associada à descompressão mecânica cirúrgica imediata e à restauração da pressão arterial normal para corrigir a baixa perfusão do tecido medular lesionado dentro de 4h após a lesão para, com isso, limitar a lesão secundária. Idealmente, em cerca de 24h pós-lesão, o tratamento médico adicionaria função neurotrófica e regenerativa para bloquear a morte neuronal².

O GM-1 é um glicosíngolípido natural do tecido nervoso de mamíferos, tido

como estimulador dos efeitos neurotróficos, e quando presentes no sistema nervoso central poderiam mimetizar agentes endógenos favoráveis a neuroregeneração, ou neuroplasticidade. No entanto, temos poucos estudos sobre a viabilidade da administração de GM-1 em nervos periféricos ou em casos de lesões medulares. Mas diversas propriedades desse agente são conhecidas, como a redução do edema neuronal pelo aumento da atividade das bombas de sódio, potássio e magnésio, a homeostase das células nervosas pelo restabelecimento do equilíbrio de membrana e, principalmente, o aumento de fatores neurotróficos endógenos¹¹. Dessa forma, a recuperação de conexões funcionais é potencializada pelo aumento dos mecanismos de plasticidade dos circuitos medulares lesados, por diminuírem a destruição de neurônios após o trauma. Estudos mais atuais demonstram que o GM-1 tem um efeito evidente sobre as expressões de caspase-3, proteína relacionada a mecanismos de apoptose celular e sobre o fator de crescimento neuronal em ratos com lesão medular aguda, possibilitando a redução da expressão de caspase-3 e aumentando a expressão do fator de crescimento neuronal de modo a alcançar seu efeito terapêutico²⁶. O GM-1 já é uma opção terapêutica válida para lesões do sistema nervoso central²⁷ e para lesões medulares traumáticas, mas neste último caso, ainda sem consenso na sua recomendação segundo a última revisão sistemática realizada em 2022².

Temos notado melhora na função locomotora em humanos em resultados de trabalhos realizados com GM-1 para lesão medular, mas essas interpretações ainda são complexas por ter ocorrido, em alguns estudos, uso de metilprednisolona antes da administração do GM-1²⁸.

A técnica de medicação intratecal é amplamente utilizada para administração dos anestésicos para raquianestesia há muitos anos, sendo técnica reprodutível e comum na prática diária dos médicos anesthesiologistas. Recentemente, passou a ser utilizada para aplicação de agentes antineoplásicos que não atravessam a barreira hematoliquórica,

dificuldade que afeta o tratamento e a profilaxia de doenças como leucemia meníngea e carcinomatose meníngea decorrente de câncer de mama, linfoma e rabdomyossarcoma, entre outros tumores. Nesses casos, tem lugar de destaque a quimioterapia intratecal, ou seja, a administração dos antineoplásicos diretamente no líquido cefalorraquidiano. O objetivo do tratamento é expor o líquido, meninges e o sistema nervoso a uma concentração efetiva de antineoplásico²⁹.

Foi seguindo esse conceito de administração e exposição direta do sistema nervoso central ao agente terapêutico apresentado acima, que nos motivamos a propor disponibilizar o GM-1, molécula grande, que apresenta dificuldade de ultrapassar a barreira hematoencefálica^{30,31} e com demonstrado benefício neuroprotetor e regenerativo *in vitro*, diretamente no sistema nervoso central, com maior concentração local do gangliosídeo na área afetada.

Sabemos que a barreira hematoencefálica imposta pela administração intramuscular ou intravenosa tradicionalmente utilizada para o medicamento dificulta a manutenção de concentrações adequadas do composto no sistema nervoso central e acaba por demandar doses diárias e por tempo prolongado, dificultando a adesão ao tratamento por parte dos pacientes.

Há muito tempo se procura uma maneira de acelerar ou de potencializar o processo natural de regeneração neuronal. Os recentes estudos biomoleculares abriram caminhos, identificando o papel de algumas dessas substâncias em modelos experimentais de regeneração nervosa, assim como temos visto em avaliações dos seus efeitos em lesões medulares induzidas em ratos em laboratório com administração por via intraperitoneal²², como por exemplo, descrito por Marcon et al., em 2016³². Porém, ainda há escassez de estudos que comprovem seu potencial para aplicação clínica.

O momento ideal para a aplicação do GM-1 após um evento traumático na medula

e o uso da via de administração intratecal podem representar um avanço significativo na qualidade e velocidade da regeneração nervosa, além de facilitar a adesão ao tratamento por parte dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar qual o melhor momento e a viabilidade da aplicação do GM-1 intratecal após lesão medular contusa em ratos Wistar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

A perda funcional devido a trauma da medula espinhal é o resultado final de um processo multifatorial contínuo dividido em dois estágios principais: a necrose tecidual decorrente da transferência de energia mecânica para o tecido, causando a morte celular⁵, e, na segunda etapa, a fase apoptótica, de evolução após lesão imediata, com uma cascata de efeitos que afeta o local da lesão e o tecido adjacente, aumentando a área de dano⁶.

Com isso, as limitações e a incapacidade funcional relacionadas a tais eventos traumáticos geram danos irreparáveis à nossa sociedade.

Dessa forma, estudos sobre a lesão medular reproduzida em animais com modelos de lesão medular reprodutíveis em laboratório foram desenvolvidos desde início do século XX para tentarmos buscar melhores soluções para esses eventos.

Allen³³, no ano de 1911, desenvolveu um modelo de lesão medular em cães, de forma reprodutível e quantificável, reproduzindo uma queda padronizada de peso sobre a dura-máter dos animais, modelo que gera uma lesão medular passível de ser quantificada por meio do produto do peso, em gramas, multiplicado pela altura, em centímetros, com o resultado expresso em gramas.centímetros (g.cm).

Allen³⁴, já em 1914, testou diferentes intensidades de impacto, demonstrando a diferença das lesões encontradas com a queda de um peso de 240 g.cm em comparação com lesões geradas pela queda de um peso de 400 g.cm. Nesse estudo, já notou, nos primeiros 15 minutos, a presença de edema e hemorragia na substância cinzenta e branca da medula espinhal e, após 4 horas do trauma, a formação de edema dos axônios da coluna lateral e posterior da substância branca da medula espinhal. O autor demonstrou ainda que a redução da pressão intramedular por procedimento de mielotomia, melhora a recuperação clínica dos animais, sugerindo que o aumento da pressão intramedular

ocasionado pelo edema e pela hemorragia leva à piora da necrose isquêmica após lesão medular.

Tarlov³⁵, no ano de 1954, realizou lesão medular experimental em cães por meio de laminectomia na T12 e introduziu um balão que, ao ser inflado, ocasionava lesão medular por compressão num período controlado, identificando que o tempo para produzir paralisia e o tempo de compressão medular são inversamente proporcionais ao prognóstico de recuperação funcional.

No ano de 1969, Ducker e Hamit³⁶ realizaram pesquisa envolvendo corticosteroides ao conduzirem tratamentos experimentais em cães submetidos à lesão medular por queda de peso, notando ganho significativo na recuperação funcional nos grupos que receberam aplicação de hipotermia e dexametasona intramuscular.

Logo depois, em 1971, Fairholm e Turnbull³⁷ realizaram um estudo com um modelo de lesões medulares induzidas por queda de peso em coelhos. Nesse estudo, realizaram exame de microangiografia em momentos distintos após o trauma, identificando duas zonas de lesão na medula espinhal: Zona 1, localizada na porção posterocentral da medula, onde os capilares perdem progressivamente a capacidade de condução de sangue; e Zona 2, ao redor da Zona 1, com padrão microvascular normal. Tais achados levaram à conclusão de que a preservação da microcirculação interfere diretamente na recuperação dos neurônios e axônios danificados, servindo de base, mais tarde, para intervenções terapêuticas na linha da recuperação e preservação do tecido medular.

Nessa década de 1970, os trabalhos foram focados em terapias com oferta de oxigênio no intuito de diminuir as áreas de hipóxia que ocorrem na medula em até 30 minutos após a lesão medular, procurando minimizar os danos medulares. Dentre tais estudos, estão o de Kelly Jr. et al.³⁸, publicado em 1972, em que ofertavam inalação de

oxigênio hiperbárico em estudo realizado em cães. Em 1977^{39,40}, confirmando os achados, Yeo et al. atestaram, com o uso do oxigênio hiperbárico em ovelhas, que o mesmo poderia trazer melhores resultados motores de recuperação.

No ano de 1977, Holbach et al.⁴¹, em um estudo prospectivo, analisaram o efeito da oxigenoterapia hiperbárica em 15 pacientes com lesões compressivas da medula espinhal, com déficit mantido agravado no pós-operatório. A oxigenoterapia hiperbárica foi aplicada em sessões diárias, totalizando 10 a 15 sessões com duração de 40 minutos cada. Avaliaram a função motora antes, durante e após as sessões e realizaram eletroneuromiografia como forma de acompanhamento. Com esse trabalho, os autores encontraram resultados promissores na melhora dos déficits neurológicos na maioria dos pacientes, com aumento considerável da pressão parcial de oxigênio arterial. Também encontraram aumento do recrutamento dos neurônios motores na eletroneuromiografia.

Em 1985, Anderson et al.⁴² realizaram estudos experimentais com gatos utilizando doses muito elevadas de metilprednisolona. Analisaram a microvascularização no sítio da lesão e notaram, no grupo tratado com altas doses de metilprednisolona, preservação substancial da perfusão microvascular quando comparado com o grupo não tratado. Interpretaram que a metilprednisolona apresenta papel efetivo na prevenção de eventos fisiopatológicos subsequentes ao trauma.

Bracken et al.⁴³, em um estudo em 1985, publicaram comparação entre a eficácia do uso de altas doses de metilprednisolona. Utilizaram dose de 1.000 mg no ato e diariamente por dez dias num grupo e com a dose padronizada de 100 mg no ato e diariamente por dez dias no outro grupo, em pacientes vítimas de trauma raquimedular. Não encontraram diferença significativa em relação à recuperação motora, mesmo após seis meses da lesão. Também observaram que houve maior índice de infecção no sítio cirúrgico e maior mortalidade no grupo que recebeu altas doses, mas as diferenças não

foram estatisticamente significantes.

Entrando na década de 1990, um artigo de Tator e Fehlings⁴⁴ discorreram sobre as principais causas de lesão medular, como acidentes automobilísticos, traumas em atividades esportivas ou recreativas, acidentes de trabalho e quedas domiciliares, notando que metade desses pacientes apresentam lesão medular completa, ou seja, sem preservação da função neurológica abaixo do nível da lesão. Com isso, definiram a lesão primária como o trauma mecânico e a lesão anatômica no instante do trauma, e a lesão secundária, como aquela decorrente de episódios bioquímicos subsequentes.

Com uso de microscopia eletrônica, descreveram alterações no fluxo sanguíneo medular e efeitos da autorregulação medular no trauma. A partir dos achados observados, discorreram sobre como diferentes tipos de tratamento podem atuar sobre os efeitos vasculares da lesão medular aguda, como bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas opioides e esteroides.

Também demonstraram que a normotensão pode ser restaurada com expansão de volume ou vasopressores, enquanto o fluxo medular pode melhorar com dopamina, corticoides e expansores de volume.

Em 1991, Geisler et al.⁴⁵ apresentaram um estudo demonstrando benefícios na utilização do GM-1 após lesão medular traumática, melhorando a recuperação motora quando aplicado após 48 h e 72 h do trauma e associado a pequenas doses de metilprednisolona.

Em 1994, Constantini e Young⁴⁶ avaliaram os efeitos de metilprednisolona e GM-1 em lesões medulares agudas em ratos. Esse foi um estudo muito importante, pois demonstrou efeitos pró-inflamatórios do GM-1 que poderiam inibir efeitos do corticosteroide, mas, ao mesmo tempo, talvez poderiam diminuir alguns de seus efeitos deletérios. Nesse estudo, foi iniciado o desenvolvimento do aparelho de impacto para

lesão medular em ratos que viria a ser o New York University (NYU) Impactor⁴⁷, depois definido em nossa instituição como o padrão ideal de impacto por queda de objeto para realizar lesão medular reprodutível em laboratório.

O NYU Impactor foi padronizado no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC/FMUSP) por Rodrigues (1999)⁴⁸, com estudo de lesão de medula espinhal em ratos Wistar utilizando o equipamento computadorizado para impacto por queda de peso de acordo com os parâmetros determinados pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)*.

Seguindo com nossa revisão da literatura, temos a publicação de Hurlbert¹³ no ano 2000, mostrando que a metilprednisolona não deve ser recomendada no uso rotineiro para o tratamento da lesão medular aguda não penetrante, uma vez que o seu uso prolongado pode apresentar risco para o paciente.

Já no ano seguinte, em 2001, Short¹⁴ publicou uma revisão sistemática da literatura com evidências de que não existe suporte para o emprego de altas doses de metilprednisolona na lesão medular aguda. Em contrapartida, no mesmo ano, em outra revisão, Taoka et al. (2001)⁴⁹ salientaram a importância dos eventos secundários ao trauma medular, como eventos vasculares progressivos e dano celular endotelial, enfatizando que poucos agentes farmacológicos possuem ação no sistema nervoso central lesado e destacando a ação da metilprednisolona e do GM-1.

Em 2005, Ying et al.⁵⁰, com trabalho realizado em animais submetidos à lesão medular contusa, concluíram que o exercício restaura os níveis de neurotrofinas, melhorando, assim, a plasticidade sináptica. Cha et al.⁵¹ demonstraram, em 2007, que ratos submetidos à lesão medular contusa experimental apresentam melhora na

recuperação neurológica e melhora no padrão de marcha diretamente proporcional à intensidade de treinamento físico.

No ano de 2006, Marcon⁵², em estudo experimental de lesão medular em ratos utilizando o modelo com o NYU Impactor, testou o uso profilático de metilprednisolona, ou seja, prévio ao trauma. Não observou nenhum efeito benéfico da utilização prévia ao trauma raquimedular, bem como descreveu possíveis complicações associadas ao uso do corticosteroide.

Novamente, em 2010, Marcon et al.⁵³ apresentaram, em estudo com ratos submetidos à lesão medular experimental, haver papel sinérgico na associação do tratamento com gangliosídeo GM-1 com a terapia em câmara hiperbárica de oxigênio.

Santos et al.²⁵, em 2011, realizaram estudo que trouxe a padronização do modelo de lesão medular e de avaliação motora utilizado no LETRAN do HC-FMUSP. Para isso, dividiram 20 ratos Wistar em quatro grupos com níveis diferentes de gravidade da lesão raquimedular, com lesões intermediárias padronizadas por meio do sistema do *MASCIS*: Grupo 1 – 12,5 mm (lesão leve); Grupo 2 – 25 mm (lesão moderada); Grupo 3 – 50 mm (lesão grave); e Grupo 4 – animais que não sofreram lesão (controle). Depois de 48 h, avaliaram a função motora dos animais segundo a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)⁵⁴, chegando à conclusão de que o modelo de lesão medular utilizando o sistema *MASCIS* e a avaliação funcional pela escala BBB são confiáveis e reprodutíveis. Dessa forma, os autores disponibilizaram a diferentes pesquisadores uma forma confiável de comparar seus resultados clínicos em ratos.

No ano de 2014, Ji et al.⁵⁵ realizaram estudo comparando o uso de GM-1 intratecal com seu uso intravenoso após neurotoxicidade induzida pela bupivacaína em ratos. Os autores demonstraram resultados relevantes de melhor ação do GM-1 em reverter a toxicidade induzida pela bupivacaína pela via intratecal quando comparado com a

administração endovenosa, porém, não havendo capacidade de reverter plenamente todos os efeitos tóxicos. Os autores relatam que isso pode ocorrer devido aos vários mecanismos envolvidos na ação neurotóxica da bupivacaína no tecido medular.

Em 2016, Yang et al.⁵⁶ trouxeram uma revisão sistemática na qual investigaram efeitos antioxidantes e na recuperação neurológica pelo uso da melatonina em modelos experimentais de lesão medular em ratos. A melatonina teria a capacidade de promover, nesses modelos, maior recuperação neurológica e efeitos antioxidantes, com dose ideal em ratos de 12,5 mg/kg. Contudo, apontaram a baixa qualidade dos trabalhos encontrados como um fator limitante para indicar a melatonina como parte da terapia rotineira.

Barros Filho et al.²², em 2016, avaliaram resultados da utilização do GM-1 em 30 pacientes recebidos após trauma raquimedular, mas não submetidos ao uso da metilprednisolona. Notaram que os índices de melhora sensitiva, quanto à sensibilidade ao toque e dor, foram maiores nos pacientes submetidos ao uso do GM-1, mas sem diferença relevante na análise de funções motoras.

Em 2020, Hosseini et al.⁵⁷, em revisão sistemática e metanálise, avaliaram o efeito das vitaminas C e E em modelos animais com base na recuperação da função motora após lesão medular. Tiveram como conclusão que a suplementação das vitaminas C e E melhorou significativamente a recuperação da função motora, sendo que a vitamina C apresentou esse resultado apenas quando empregada de forma intraperitoneal. Já a combinação de ambas não demonstrou maior eficácia.

Torelli et al.¹², em 2022, realizaram estudo de comparação dos efeitos de GM-1 e eritropoetina na recuperação medular após lesão induzida em laboratório em ratos, com a utilização de GM-1 isoladamente, de eritropoetina isoladamente e de ambas em conjunto. Os resultados foram comparados àqueles de um grupo controle placebo de solução fisiológica (SF) 0,9%. Os melhores resultados estiveram no grupo utilizando

GM-1 isoladamente, seguido pelo grupo no qual havia combinação dos agentes, quando comparados aos demais grupos.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Ética

A pesquisa foi aprovada pela Comissão Científica do IOT e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (**Anexo A**), e também pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo de pesquisa número no 394/2019) (**Anexo B**), tendo sido aprovada por ambas. Os pesquisadores seguiram de forma estrita a ética e os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)⁵⁸ e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)⁵⁹.

4.2 Estrutura física

A pesquisa foi realizada no LETRAN-IOT-HC/FMUSP.

4.3 Animais de experimentação

Foram selecionados 40 ratos machos da raça Wistar oriundos do Centro de Bioterismo da FMUSP. A idade média foi de 12 semanas, com peso entre 250 g e 450 g – todos de um único fornecedor. Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas com controle de temperatura, filtragem de ar e controle de umidade. Os animais foram mantidos em espaços individuais para evitar dominância entre machos (o que pode causar lesões), com fornecimento de água e ração *ad libitum*.

4.3.1 Critérios de inclusão:

- Ratos da raça Wistar;
 - Machos adultos jovens;
 - Peso entre 250 g e 450 g, inclusive;
 - Estado clínico normal avaliado por um veterinário do Biotério de Manutenção da Área de Pesquisas Biológicas do Laboratório de Biomecânica (LIM-41) do IOT-HC/FMUSP; e
- Motricidade inicial normal, segundo critérios da escala BBB.

4.3.2 Critérios de exclusão:

- Óbito após lesão medular;
- Alterações cutâneas na área de incisão (observadas macroscopicamente);
- Autofagia ou mutilação entre os animais;
- Infecção profunda e refratária à antibioticoterapia após lesão;
- Infecção na urina, diagnosticada pela presença de sangue na urina, refratária ao tratamento com antibióticos por dez dias;
- Movimentação normal na primeira avaliação (21 pontos na escala funcional BBB) após a lesão medular, nos grupos submetidos à lesão medular experimental; e
- Perda maior que 10% do peso corporal após a lesão.

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos de forma sequencial em quatro grupos por meio de sorteio. Cada grupo era formado por dez animais, os quais foram submetidos à lesão medular contusa controlada:

Grupo 1 – 24 h após a contusão, fornecida uma dose intratecal de GM-1 (30 mg/kg);

Grupo 2 – 48 h após a contusão, fornecida uma dose intratecal de GM-1 (30 mg/kg);

Grupo 3 – 72 h após a contusão, fornecida uma dose intratecal de GM-1 (30 mg/kg);

Grupo 4 – Grupo denominado sham, submetido a laminectomia e aplicação de 0,5 mL de SF 0,9% para controle e padronização da técnica de aplicação, sem contusão.

Os grupos foram definidos segundo o protocolo internacional de diretrizes para pesquisa e publicação em animais, o *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE)*⁶⁰. O Grupo 4 (laminectomia sem lesão medular) foi utilizado como controle negativo do procedimento cirúrgico e como controle negativo da intervenção ao se utilizar SF 0,9%, evitando-se um grupo controle adicional.

4.5 Modelo experimental de lesão medular

4.5.1 Protocolo de anestesia

Para a realização da lesão medular e aplicação de materiais poliméricos, os animais foram submetidos à injeção subcutânea de cloridrato de tramadol e pentabiótico na dose de 5 mg/kg uma hora antes do início da cirurgia. Com o uso de uma caixa de acrílico, os animais foram induzidos à anestesia com isoflurano (1,5V%–2,0V%) em 100% de oxigênio¹² (**Figura 1**). Após sedação leve, uma máscara foi colocada para cobrir todo o

focinho do animal, levando a um plano anestésico mais profundo para, então, realizar-se a tricotomia e limpeza da região dorsal (**Figura 2**). O plano anestésico profundo foi, ainda, confirmado pela ausência de reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda e das patas traseiras.



Figura 1 – Estrutura de preparo e indução anestésica
Fonte: Arquivo pessoal do autor



Figura 2 – Manutenção da anestesia durante procedimento
Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.5.2 Profilaxia infecciosa e analgesia

Todos os animais foram submetidos à antibioticoprofilaxia durante a intervenção cirúrgica com cefazolina sódica (antibiótico) intraperitonealmente, na dose de 5 mg/kg, imediatamente antes da lesão e uma vez ao dia durante os três dias seguintes. Após a cirurgia, foram ministrados aos ratos 2 mg/kg de meloxicam (anti-inflamatório não hormonal) uma vez ao dia, por sete dias, e 5 mg/100 g de cloridrato de tramadol (analgésico) por via intramuscular, por cinco dias, para alívio da dor ¹². Todos os grupos foram submetidos ao protocolo de antibioticoprofilaxia e analgesia pelo mesmo período, indiscriminadamente.

4.5.3 Modelo de lesão medular

A exposição da medula para contusão controlada foi realizada com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Após tricotomia, foi realizada uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral de T8 a T12 (**Figura 3**).



Figura 3 – Ilustra a via de acesso em região dorsal do animal
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas de T9 a T11 foram descolados das suas inserções ósseas.

A hemostasia, quando necessária, foi realizada com um coagulador bipolar. Foram removidos com um micro saca-bocados o processo espinhoso e a laminectomia foi realizada, retirando-se a lâmina de T8 até expor a medula e permitir o posicionamento da ponta da haste do NYU Impactor⁴⁶ (**Figura 4**).



Figura 4 – Ilustra o animal posicionado para a contusão medular e o contato inicial do equipamento com a medula

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Após o posicionamento do animal, o equipamento foi devidamente calibrado na altura de 12,5 mm, causando uma contusão moderada com peso de 10 g⁵⁴ (**Figura 5**).

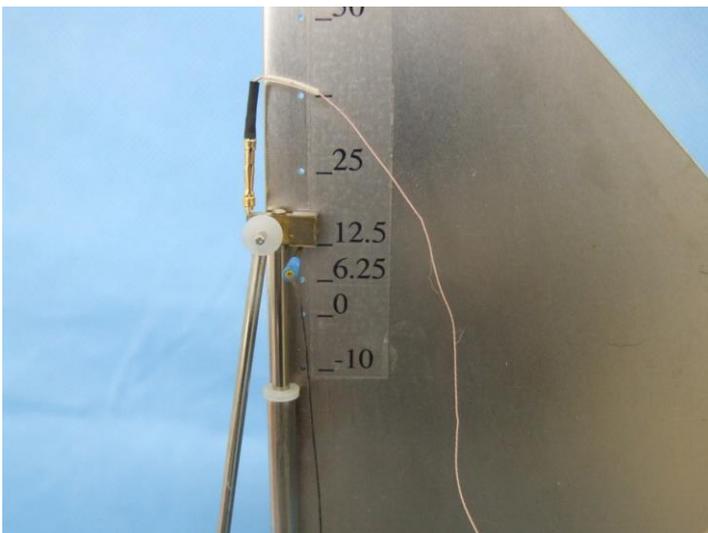


Figura 5 – Ilustra a calibração do NYU impactor

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Após confirmação da contusão medular, o sítio foi inspecionado e lavado com SF de cloreto de sódio à temperatura ambiente. Foi realizado sutura em bloco da musculatura paravertebral e, posteriormente, sutura cutânea de ponto simples com fio mono-nylon 2.0 (Figuras 6 e 7).



Figura 6 – Apresenta a sutura em bloco da musculatura dorsal

Fonte: Arquivo pessoal do autor



Figura 7 – Apresenta a sutura cutânea

Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.5.4 Padronização da técnica de aplicação pela via intratecal

Para padronização do modelo experimental, foram utilizados 10 animais.

No grupo controle (Grupo 4), após procedimento de laminectomia, sem lesão medular associada, foi realizada a injeção intratecal de SF com volume de 0,5 mL.

Com a ideia de entregarmos o medicamento diretamente no sistema nervoso central, optamos por utilizar técnica de aplicação similar à raquianestesia, ou medicação intratecal, pela qual posicionamos uma agulha no espaço liquórico, atravessando a dura-máter. Nesse caso, realizamos a aplicação por meio de laminectomia e exposição visual direta da dura-máter, com aplicação assistida por microscópio no nível da vértebra T8 (**Figuras 8 e 9**).



Figura 8 – Microscópio utilizado para guiar aplicação intratecal
Fonte: Arquivo pessoal do autor



Figura 9 – Localização anatômica do ponto de aplicação
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Introduzimos a agulha 4 mm x 0,23 mm (32 G) até notarmos a presença do líquido cristalino e incolor correspondente ao líquido, mantendo o Jelco locado para, então, injetarmos o volume de 30 mg/kg de GM-1 (0,5 mL) ou SF, nos grupos controle (**Figura 10**).



Figura 10 – Aplicação intratecal sob visão em mcicroscópio
Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.5.5 Protocolo pós-operatório

Todos os ratos receberam antibioticoprofilaxia por sete dias (cefazolina 2 mg/100 g)⁶¹ nos cuidados de pós-operatório. Também seguimos com medicação anti-inflamatória, meloxicam, e analgésica opioide, cloridrato de tramadol, por via intramuscular conforme descrito anteriormente.

Foram realizadas manobras diárias de extração de urina dos animais e avaliação do grau de desidratação, pelo turgor da pele, e da necessidade de antibioticoterapia (levofloxacina, 2,5 mg/kg por dez dias), observando-se a presença de sangue na urina.

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem (40 cm x 60 cm), sendo mantidos em grupos de até cinco animais, nas mesmas condições ambientais do período pré-operatório (manejo, alimentação *ad libitum*, troca periódica da maravalha e limpeza da gaiola). Os animais foram observados para identificar critérios de exclusão e

complicações quanto a mutilações, infecções ou outras alterações.

4.6 Avaliação funcional

Definimos a escala BBB e o plano horizontal para avaliação funcional dos animais após a lesão medular.

A avaliação da escala BBB ocorreu sempre no mesmo horário e local, sem identificação entre os grupos (teste cego), em sete diferentes momentos – após dois dias da lesão medular e semanalmente até a sexta semana de pós-operatório.

O plano horizontal foi avaliado antes e após seis semanas da lesão.

4.6.1 Avaliação da capacidade locomotora segundo a escala BBB

Os animais foram classificados por meio de uma pontuação que varia de 0 a 21, sendo que 0 corresponde aos animais com paraplegia total do membro e 21, a animais com atividade locomotora normal (Figura 11).

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

Rato: _____ Data: ____/____/200____ Dias Pós-Operatório: _____ Pontuação: _____ Esquerda: _____ Direita: _____

Movimento do Membro Posterior			Posição do Tronco		Abdômen	Movimento da Pata			Pisada		C o o r d e m e n t o	Desprendimento dos Dedos		Posição Predominante		I n s t a b i l i z a d o	Cauda				
Quadril	Janela	Tornozelo	Lado	Apoio		Balanço	Colocação Pata		Dorsal	Plantar		E	D	Constante	Elevação			E	D		
E	D	E	D	E	D		Sem Suporte	Com Suporte	E	D	E			D	E	D	E			D	
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	E	D	E	D	0	0	0	0	P	P	P	P	
S	S	S	S	S	S	Central	E						D	Paralelo	E	D					E
E	E	E	E	E	E			Alto	E	D	E	D					E	D	F	F	

Comentários:

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

Figura 11 – Escala de avaliação locomotora. Escala desenvolvida por Basso, Beattie e Bresnahan (1995) e utilizada para a avaliação locomotora de ratos que sofreram lesão raquimedular, sendo graduada de 0 a 21 pontos.

Fonte: Basso et al., 1995⁵⁴

A escala BBB de classificação de 21 pontos pode ser descrita da seguinte forma:

- (0) – Nenhum movimento do membro posterior;
- (1) – Movimento discreto de uma ou duas articulações, usualmente o quadril e/ou joelho;
- (2) – Movimento amplo de uma articulação, ou movimento amplo de uma articulação e movimento discreto de outra articulação;
- (3) – Movimento amplo de duas articulações;
- (4) – Movimento discreto das três articulações do membro posterior;
- (5) – Movimento discreto de duas articulações e movimento amplo da terceira;
- (6) – Movimento amplo de duas articulações e movimento discreto da terceira;
- (7) – Movimento amplo das três articulações do membro posterior;
- (8) – Movimento em “varredura” do membro posterior para se realizar o passo ou posicionamento plantar da pata, ambos sem sustentação de peso;
- (9) – Posicionamento plantar da pata com sustentação do peso do corpo, na posição estática somente, ou passos dorsais com sustentação de peso ocasional, frequente ou constante, e sem passos plantares;
- (10) – Passos plantares ocasionais, com sustentação de peso, mas sem coordenação entre o membro anterior e posterior;
- (11) – Passos plantares com sustentação de peso de frequentes a constantes e sem coordenação entre o membro anterior e o posterior;
- (12) – Passos plantares com sustentação de peso de frequentes a constantes e coordenação ocasional entre o membro anterior e o posterior;
- (13) – Passos plantares com sustentação de peso de frequentes a constantes e coordenação frequente entre o membro anterior e o posterior;
- (14) – Passos plantares com sustentação de peso constante, com coordenação

constante entre o membro anterior e o posterior; posição da pata predominantemente rodada (externamente ou internamente) durante a locomoção, quando é feito o contato inicial com a superfície, bem como justamente antes que ela seja levantada ao final da fase de apoio; ou passos plantares frequentes, coordenação constante entre o membro anterior e o posterior e passos dorsais ocasionais;

(15) – Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior; sem abertura dos dedos ou abertura ocasional dos dedos durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao corpo no contato inicial;

(16) – Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior durante o andar; a abertura dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e rodada ao ser levantada;

(17) – Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior durante o andar; a abertura dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada;

(18) – Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior durante o andar; a abertura dos dedos ocorre constantemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e rodada ao ser levantada;

(19) – Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior durante o andar; a abertura dos dedos ocorre constantemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada; cauda abaixada durante parte do tempo ou durante todo o tempo;

(20) – Passos plantares constantes e andar constantemente coordenado; constante abertura dos dedos; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada; cauda constantemente erguida e tronco instável; e

(21) – Passos plantares constantes e andar coordenado; constante abertura dos dedos; a posição da pata é predominantemente paralela em todas as posições; estabilidade do tronco constante e cauda constantemente erguida.

4.6.2 Plano horizontal

Avaliação comportamental sensório-motora: escada horizontal (*horizontal ladder*).

Uma escada horizontal com 100 cm de comprimento e 35 cm de largura, suspensa a 46 cm do chão e com espaço fixo de 1,5 cm entre cada filete de ferro, foi utilizada para avaliar a função proprioceptiva dos animais^{62,63}. Os animais foram primeiramente treinados a andar na escada por dois dias antes da cirurgia, sendo necessário atravessá-la cinco vezes. Para estimular os animais a andarem na pista, foram colocadas duas caixas escuras em ambas as extremidades. Nas avaliações, os animais precisavam andar voluntariamente três vezes ao longo da escada. Houve contagem do número de passos total, de acertos, de escorregões e de erros. Os acertos consistiram em posicionamentos corretos das patas nos filetes de ferro. Os escorregões eram o posicionamento da pata no filete de ferro, seguido de queda entre os filetes. Já os erros foram considerados separadamente em dois tipos, sendo eles: o arrastar dos membros posteriores ao longo da escada horizontal e o posicionamento da pata entre os filetes de ferro^{64,65}. Os valores das três passagens pela escada horizontal foram obtidos para todos os tipos de respostas (acertos e erros).

4.7 Protocolo de eutanásia

Após seis semanas de avaliação comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia, seguindo legislação e preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal⁵⁸. O processo se iniciou pela anestesia, seguida por perfusão transcardíaca, com morte indolor. Os animais receberam overdose de uretana e foram perfundidos em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,3, e SF 0,9 %.

Esse protocolo foi publicado na “Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA”, em 2015, com elaboração do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018)⁵⁹.

4.7.1 Descarte das carcaças

As carcaças foram colocadas em sacos plásticos e devidamente identificadas, seguindo apostila de descarte de animais da FMUSP.

4.8 Forma de análise de resultados

Os parâmetros avaliados foram descritos segundo grupos e momentos de avaliação com uso de medidas-resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo). Então, eles foram comparados por meio do uso de equações de estimação generalizada (EEG) com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos de avaliação para a escala BBB. Para o teste do plano horizontal, foi utilizado o número de passos como limitante dos dados (*offset*) do plano horizontal⁶⁶. As variações de peso dos animais foram descritas segundo os grupos e

comparadas com uso de análise de variâncias (ANOVA). As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais grupos e momentos ocorreram as diferenças⁶⁷.

Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o software IBM-SPSS para Windows versão 22.0 (IBM Corp., Armonk, New York, USA), e para a tabulação dos dados, foi utilizado o software Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram demonstrados e organizados em tabelas e gráficos com intuito de facilitar e organizar as análises.

A **Tabela 1** mostra que o comportamento médio da escala BBB nos grupos para os momentos avaliados foi estatisticamente diferente ao longo dos momentos de avaliação ($p_{\text{Interação}} < 0,001$).

Tabela 1 – Descrição da escala BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações

Variável/Grupo	Momento de avaliação							P Grupo	P Momento	P Interação
	2 Dias	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6			
BBB								<0,001	<0,001	<0,001
Gm1 24 h										
média ± DP	0,4 ± 0,7	0,9 ± 0,74	2,5 ± 0,97	3,2 ± 0,92	6,4 ± 2,07	7 ± 1,41	8,2 ± 2,04			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 2)	1 (0; 2)	2 (1; 4)	3,5 (2; 4)	6 (4; 11)	7 (5; 9)	8,5 (5; 12)			
Gm1 48 h										
média ± DP	0,5 ± 0,85	0,7 ± 0,48	3,5 ± 0,85	5,8 ± 1,55	7,9 ± 1,79	9,2 ± 1,4	12,3 ± 1,57			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 2)	1 (0; 1)	3,5 (2; 5)	6 (4; 8)	8 (5; 11)	9 (8; 12)	12 (10; 15)			
Gm1 72 h										
média ± DP	0,5 ± 0,85	0,7 ± 0,48	3,5 ± 0,85	5,8 ± 1,55	7,8 ± 1,69	8,7 ± 1,34	10,4 ± 1,96			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 2)	1 (0; 1)	3,5 (2; 5)	6 (4; 8)	8 (5; 11)	9 (6; 11)	10 (8; 14)			
Sham										
média ± DP	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos; Só foram usados os momentos 1, 3 e 6 semanas para a análise e não foi utilizado o grupo Sham

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A **Tabela 2** e **Gráfico 1** mostra que, nos grupos em que GM-1 foi usado, houve aumento médio estatisticamente significativo do score da escala BBB em todos os momentos de avaliação ($p < 0,05$), sendo que, na primeira semana, todos os grupos foram estatisticamente iguais na escala BBB ($p > 0,05$), enquanto na terceira e sexta semanas, o valor médio da escala BBB dos grupos 2 e 3 foi estatisticamente maior que no Grupo 1 ($p < 0,05$).

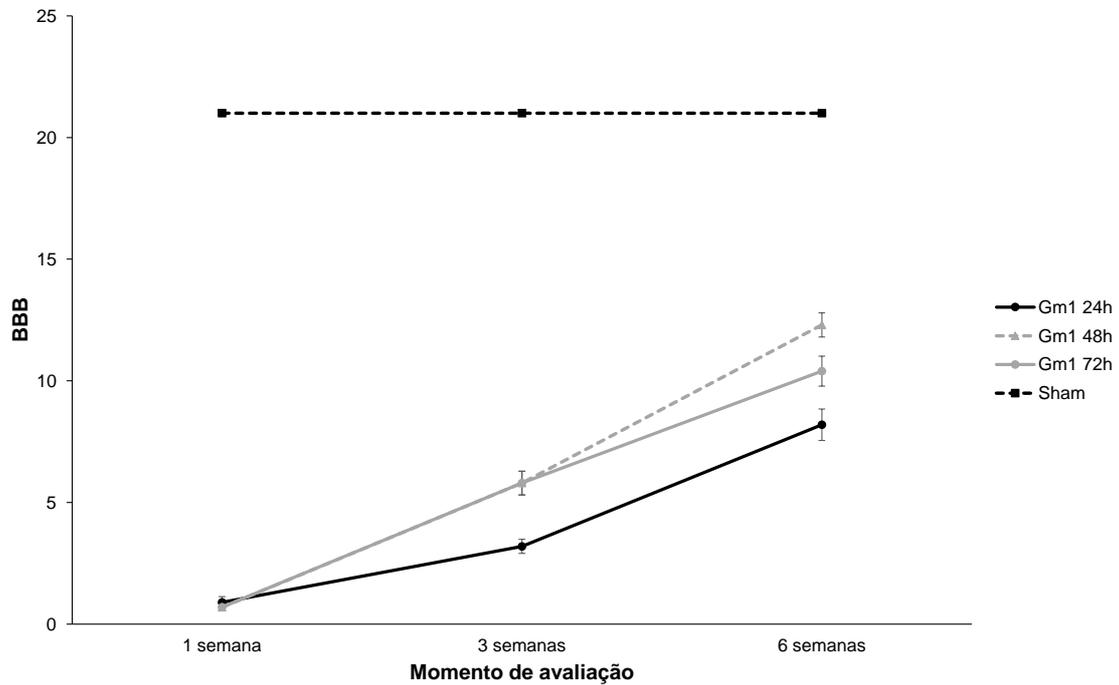
Tabela 2 – Resultado das comparações múltiplas do BBB entre grupos e momentos avaliados conforme as diferenças encontradas

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Gm1 24 h	Semana 1 - Semana 3	-2,30	0,61	0,006	-4,26	-0,34
	Semana 1 - Semana 6	-7,30	0,62	<0,001	-9,27	-5,33
	Semana 3 - Semana 6	-5,00	0,61	<0,001	-6,96	-3,04
Gm1 48 h	Semana 1 - Semana 3	-5,10	0,61	<0,001	-7,06	-3,14
	Semana 1 - Semana 6	-11,60	0,62	<0,001	-13,57	-9,63
	Semana 3 - Semana 6	-6,50	0,61	<0,001	-8,46	-4,54
Gm1 72 h	Semana 1 - Semana 3	-5,10	0,61	<0,001	-7,06	-3,14
	Semana 1 - Semana 6	-9,70	0,62	<0,001	-11,67	-7,73
	Semana 3 - Semana 6	-4,60	0,61	<0,001	-6,56	-2,64
Semana 1	Gm1 24h - Gm1 48h	0,20	0,62	$>0,999$	-1,77	2,17
	Gm1 24h - Gm1 72h	0,20	0,62	$>0,999$	-1,77	2,17
	Gm1 48h - Gm1 72h	0,00	0,62	$>0,999$	-1,97	1,97
Semana 3	Gm1 24h - Gm1 48h	-2,60	0,62	0,001	-4,57	-0,63
	Gm1 24h - Gm1 72h	-2,60	0,62	0,001	-4,57	-0,63
	Gm1 48h - Gm1 72h	0,00	0,62	$>0,999$	-1,97	1,97
Semana 6	Gm1 24h - Gm1 48h	-4,10	0,62	<0,001	-6,07	-2,13
	Gm1 24h - Gm1 72h	-2,20	0,62	0,013	-4,17	-0,23
	Gm1 48h - Gm1 72h	1,90	0,62	0,074	-0,07	3,87

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 1 – Valores médios e respectivos erros padrões do BBB segundo grupos e momentos de avaliação



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Pela **Tabela 3**, tem-se que a variação percentual média do peso dos animais foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p = 0,011$).

Tabela 3 – Descrição dos pesos dos animais segundo grupos no início e ao final do estudo e das variações de peso e resultado das comparações das variações entre os grupos

Variável	Momento		Ganho de peso (%)	p
	Inicial	Final		
Peso (g)				0,011
Gm1 24 h				
média ± DP	292,5 ± 26	311,2 ± 21,1	6,7 ± 6,9	
mediana (mín.; máx.)	287,5 (265; 332)	312 (288; 345)	4,7 (-6; 20,2)	
Gm1 48 h				
média ± DP	298 ± 42,9	320 ± 38	7,8 ± 4,7	
mediana (mín.; máx.)	309,5 (234; 354)	325,5 (268; 366)	7,5 (2,1; 14,5)	
Gm1 72 h				
média ± DP	293,2 ± 24,4	322,3 ± 22,6	10,1 ± 4,7	
mediana (mín.; máx.)	293 (256; 335)	323 (277; 356)	8,6 (4,7; 20,7)	
Sham				
média ± DP	303,3 ± 11,5	346,2 ± 15,9	14,1 ± 3,1	
mediana (mín.; máx.)	302,5 (288; 322)	349,5 (322; 365)	13,4 (9,6; 20,1)	

ANOVA

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Pela **Tabela 3.1**, tem-se que a alteração percentual de peso no grupo sham foi, em média, estatisticamente maior que nos grupos 1 e 2 ($p = 0,013$ e $p = 0,046$, respectivamente).

Tabela 3.1 – Resultado das comparações múltiplas da alteração percentual de peso entre os grupos

Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Gm1 24 h - Gm1 48 h	-1,07	2,24	>0,999	-7,32	5,18
Gm1 24 h - Gm1 72 h	-3,36	2,24	0,855	-9,61	2,89
Gm1 24 h - Sham	-7,40	2,24	0,013	-13,65	-1,15
Gm1 48 h - Gm1 72 h	-2,29	2,24	>0,999	-8,54	3,96
Gm1 48 h - Sham	-6,33	2,24	0,046	-12,58	-0,08
Gm1 72 h - Sham	-4,04	2,24	0,476	-10,29	2,21

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

As **Tabelas 4 e 5 e Gráfico 2** mostram que, com exceção do número de acertos, todos os parâmetros avaliados no plano horizontal apresentaram comportamento médio

estatisticamente diferente entre os grupos ao longo dos momentos de avaliação ($p_{\text{Interação}} < 0,05$), sendo o número de acertos, em média, estatisticamente diferente ao longo dos momentos de avaliação, independente do grupo ($p_{\text{Momento}} = 0,002$).

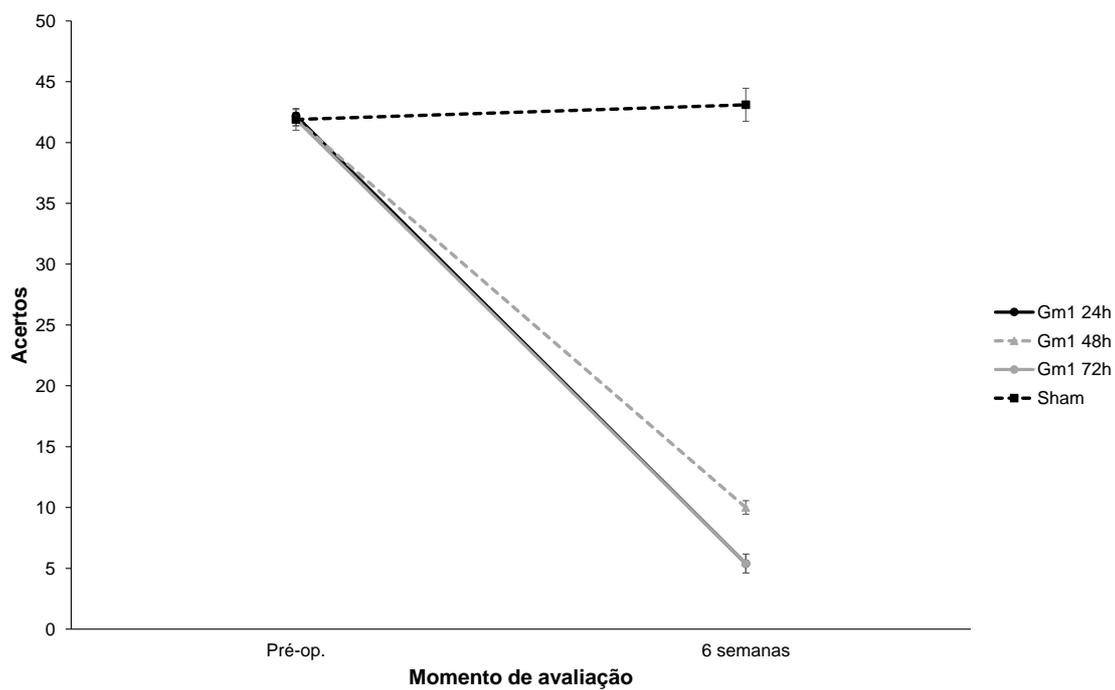
Tabela 4 – Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações

Variável	Momento		p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	6 semanas			
Passos			<0,001	<0,001	<0,001
Gm1 24 h					
média ± DP	43,6 ± 2,3	8 ± 1,33			
mediana (mín.; máx.)	43,5 (40; 48)	8 (6; 10)			
Gm1 48 h					
média ± DP	43,6 ± 1,2	12,3 ± 1,57			
mediana (mín.; máx.)	44 (41; 45)	12 (10; 15)			
Gm1 72 h					
média ± DP	43,4 ± 2,6	8 ± 1,33			
mediana (mín.; máx.)	44 (38; 47)	8 (6; 10)			
Sham					
média ± DP	41 ± 1,6	44,8 ± 4,47			
mediana (mín.; máx.)	41 (38; 44)	44,5 (38; 53)			
Acertos*			0,987	0,002	0,690
Gm1 24 h					
média ± DP	42,2 ± 1,6	5,4 ± 2,46			
mediana (mín.; máx.)	42 (40; 45)	6 (1; 9)			
Gm1 48 h					
média ± DP	41,9 ± 1,7	10 ± 1,76			
mediana (mín.; máx.)	42 (39; 45)	10,5 (7; 12)			
Gm1 72 h					
média ± DP	41,9 ± 2,8	5,4 ± 2,46			
mediana (mín.; máx.)	43 (36; 45)	6 (1; 9)			
Sham					
média ± DP	41,9 ± 1,7	43,1 ± 4,28			
mediana (mín.; máx.)	42 (39; 45)	43 (36; 50)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos; * Mesmo modelo com número de passos como limitador dos acertos

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 2 – Valores médios e respectivos erros padrões dos acertos no plano horizontal segundo grupos e momentos de avaliação



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Tabela 5 – Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações

Variável	Momento		p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	6 semanas			
Escorregões			<0,001	<0,001	<0,001
Gm1 24 h					
média ± DP	0,8 ± 0,79	1,4 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1,5 (0; 2)			
Gm1 48 h					
média ± DP	0,9 ± 0,88	1,4 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 3)	1,5 (0; 2)			
Gm1 72 h					
média ± DP	0,7 ± 0,68	1,4 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1,5 (0; 2)			
SF					
média ± DP	0,9 ± 0,88	1,4 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 3)	1,5 (0; 2)			
Sham					
média ± DP	0,9 ± 0,88	0,9 ± 0,74			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 3)	1 (0; 2)			
Erros			<0,001	<0,001	<0,001
Gm1 24 h					
média ± DP	0,6 ± 0,52	1,2 ± 0,79			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 1)	1 (0; 3)			
Gm1 48 h					
média ± DP	0,8 ± 0,63	1 ± 0,82			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1 (0; 2)			
Gm1 72 h					
média ± DP	0,6 ± 0,7	1,2 ± 0,79			
mediana (mín.; máx.)	0,5 (0; 2)	1 (0; 3)			
SF					
média ± DP	0,8 ± 0,63	1 ± 0,82			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1 (0; 2)			
Sham					
média ± DP	0,8 ± 0,63	0,6 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0,5 (0; 2)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos com número de passos como limitador dos escorregões e erros

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A **Tabela 6** e **Gráfico 3** mostram que, em todos os grupos avaliados, houve diminuição média estatisticamente significativa no número de passos do pré-operatório para seis semanas do ($p < 0,05$), sendo que, na sexta semana, o Grupo 2 apresentou, em

média, estatisticamente mais passos que os demais grupos ($p < 0,05$).

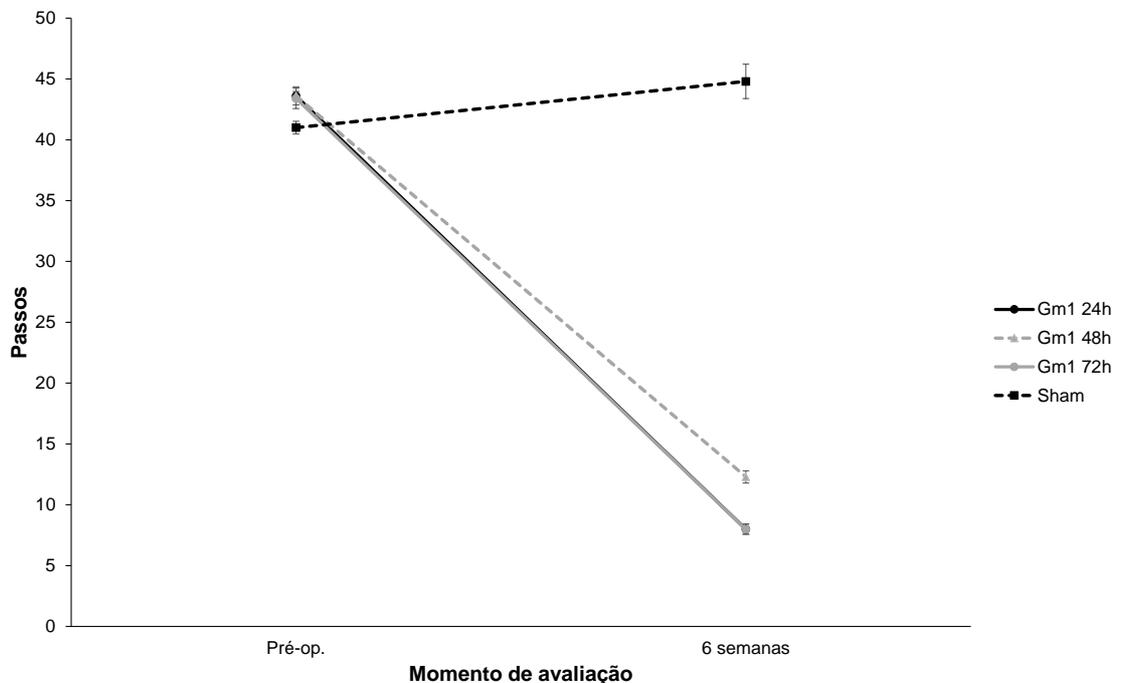
Tabela 6 – Resultado das comparações múltiplas dos passos entre grupos e momentos avaliados

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Gm1 24 h	Pré-op - Semana 6	35,60	0,85	<0,001	33,09	38,11
Gm1 48 h	Pré-op - Semana 6	31,30	0,85	<0,001	28,79	33,81
Gm1 72 h	Pré-op - Semana 6	35,40	0,85	<0,001	32,89	37,91
Pré-op	Gm1 24 h - Gm1 48 h	0,00	0,81	>0,999	-2,38	2,38
	Gm1 24 h - Gm1 72 h	0,20	0,81	>0,999	-2,18	2,58
	Gm1 48 h - Gm1 72 h	0,20	0,81	>0,999	-2,18	2,58
Semana 6	Gm1 24 h - Gm1 48 h	-4,30	0,81	<0,001	-6,68	-1,92
	Gm1 24 h - Gm1 72 h	0,00	0,81	>0,999	-2,38	2,38
	Gm1 48 h - Gm1 72 h	4,30	0,81	<0,001	1,92	6,68

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 3 – Valores médios e respectivos erros padrões dos passos no plano horizontal segundo grupos e momentos de avaliação



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Pela **Tabela 7**, tem-se que o número médio de acertos foi estatisticamente menor na sexta semana em comparação ao pré-operatório, independente do grupo avaliado ($p = 0,002$).

Tabela 7 – Resultado das comparações múltiplas dos acertos entre os momentos avaliados

Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Pré-op - Semana 6	0,97	0,31	0,002	0,37	1,56

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

As **Tabelas 8 e 9 e Gráfico 4** mostram que os escorregões e erros refletiram comportamentos semelhantes dos grupos ao longo dos momentos de avaliação, sendo que, em todos os grupos, houve aumento médio estatisticamente significativo do pré-operatório para a sexta semana ($p < 0,05$). Na sexta semana, o Grupo 2 apresentou, em média, estatisticamente menos escorregões e erros que os demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Resultado das comparações múltiplas dos escorregões entre grupos e momentos avaliados.

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Gm1 24 h	Pré-op - Semana 6	-36,20	0,82	<0,001	-38,61	-33,79
Gm1 48 h	Pré-op - Semana 6	-31,80	0,82	<0,001	-34,21	-29,39
Gm1 72 h	Pré-op - Semana 6	-36,10	0,82	<0,001	-38,51	-33,69
Pré-op	Gm1 24 h - Gm1 48 h	-0,10	0,83	>0,999	-2,55	2,35
	Gm1 24 h - Gm1 72 h	-0,10	0,83	>0,999	-2,55	2,35
	Gm1 48 h - Gm1 72 h	0,00	0,83	>0,999	-2,45	2,45
Semana 6	Gm1 24 h - Gm1 48 h	4,30	0,83	<0,001	1,85	6,75
	Gm1 24 h - Gm1 72 h	0,00	0,83	>0,999	-2,45	2,45
	Gm1 48 h - Gm1 72 h	-4,30	0,83	<0,001	-6,75	-1,85

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

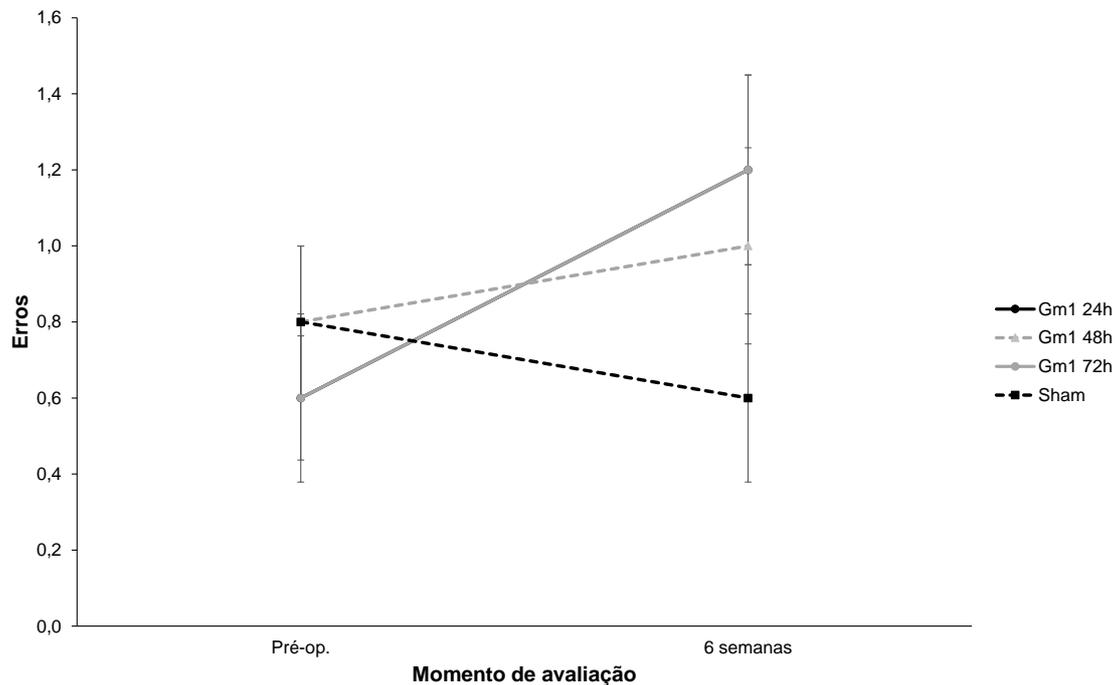
Tabela 9 – Resultado das comparações múltiplas dos erros entre grupos e momentos avaliados.

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Gm1 24 h	Pré-op - Semana 6	-36,20	0,98	<0,001	-39,06	-33,34
Gm1 48 h	Pré-op - Semana 6	-31,50	0,98	<0,001	-34,36	-28,64
Gm1 72 h	Pré-op - Semana 6	-36,00	0,98	<0,001	-38,86	-33,14
Pré-op	Gm1 24 h - Gm1 48 h	-0,20	0,93	>0,999	-2,94	2,54
	Gm1 24 h - Gm1 72 h	-0,20	0,93	>0,999	-2,94	2,54
	Gm1 48 h - Gm1 72 h	0,00	0,93	>0,999	-2,74	2,74
Semana 6	Gm1 24 h - Gm1 48 h	4,50	0,93	<0,001	1,76	7,24
	Gm1 24 h - Gm1 72 h	0,00	0,93	>0,999	-2,74	2,74
	Gm1 48 h - Gm1 72 h	-4,50	0,93	<0,001	-7,24	-1,76

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 4 – Valores médios e respectivos erros padrões dos erros no plano horizontal segundo grupos e momentos de avaliação



Fonte: Arquivo pessoal do autor

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Sabemos que a possibilidade de reconstrução total da medula parece estar distante ainda, porém, podemos obter benefícios significativos através de mínimas reparações e regenerações. Mesmo ainda não sendo capazes de recuperar plenamente a marcha, melhorias, como na recuperação da musculatura respiratória, função da mão ou no controle esfínteriano e urinário, representam ganhos muito importantes e extraordinários para esses pacientes⁶⁸.

Sabendo o quão catastróficas são as sequelas da lesão medular na vida socioeconômica da família envolvida, seguimos na busca por encontrar melhores opções terapêuticas viáveis para tratar e aliviar esses pacientes e seus familiares, pois, mesmo nos dias de hoje, não temos medicamentos estabelecidos e com eficácia comprovada ou estratégias de descompressão cirúrgica imediata apoiadas e indicadas pela maioria dos médicos da área. Conforme descrito no último levantamento realizado pela AO Spine, de 2022¹², esses pacientes encontram dificuldades institucionais por barreiras financeiras ou burocráticas.

O uso de corticoesteroides^{22,42-46} segue ainda carregado de grande controvérsia, sendo sabidamente associado a efeitos adversos e complicações. Outras medidas de suporte são sustentadas, como a manutenção da pressão arterial, oxigenoterapia⁴¹, exercícios e fisioterapia contínua¹². Segue a busca por agentes que possam diminuir, bloquear ou estimular a regeneração da área de lesão secundária, dita zona de penumbra ou fase apoptótica pós-lesão⁵, com substâncias capazes de entregar ação que melhore o ambiente inflamatório e controle agentes neurotóxicos e a liberação de radicais livres. Para isso, diversas pesquisas apresentando diferentes modelos animais foram realizadas ao longo da história⁵⁷.

Estabelecemos em nossa instituição a utilização do NYU Impactor como padrão de equipamento para a realização de pesquisas no LETRAN do IOT-HC/FMUSP⁴⁸, utilizando o equipamento computadorizado para impacto por queda de peso de acordo com os parâmetros determinados pelo *MASCIS*. Com isso, conseguimos padronizar e realizar análises reprodutíveis para estudar o comportamento e a evolução dessas lesões.

Notamos ao longo da história diversos trabalhos com avaliações de diferentes agentes anti-inflamatórios, antioxidantes e com potenciais regenerativos, inclusive o GM-1, que tem representação em diversos trabalhos por apresentar capacidade de estimular as vias de neuroplasticidade e a regeneração do tecido neural.

O GM-1 tem se demonstrado eficaz na melhora de funções neurológicas, com capacidade de inibir a evolução da fase apoptótica após um trauma medular, controlando os níveis da caspase-3, proteína relacionada com mecanismos de morte celular⁶⁹. Sendo o GM-1 um gangliosídeo lipofílico natural de nosso sistema nervoso central, as possibilidades de efeitos adversos são mais remotas.

Sua ação pode ter melhor efeito em um momento após a lesão aguda medular, pois está mais relacionada à inibição da evolução da dita zona de penumbra, ou lesão secundária apoptótica⁷⁰. O GM-1 inibe o acúmulo extracelular de glutamato e o influxo excessivo de íons de sódio e cálcio iônico mediados, inicialmente, pela estimulação de receptores NMDA, com posterior evolução da área de morte celular induzida pela ativação lenta e gradativa de receptores de glutamato AMPA e kainato⁷¹, que levam à manutenção do influxo desses íons, aumentando a área da lesão em horas a dias, com pico estimado em três dias, ou seja 72 h.

Em vista desses mecanismos e momentos de lesão é que estabelecemos os momentos das aplicações de GM-1 após a lesão medular induzida em 24 h, 48 h e 72 h. Pudemos perceber, na prática clínica, ou seja, avaliando a recuperação motora dos

animais conforme tabelas descritas nos resultados, que o melhor resultado estatisticamente significativo atingido foi para as aplicações do GM-1 intratecal em 48 h (Grupo 2), demonstrando os melhores resultados após seis semanas, especialmente nas análises de plano horizontal. Tal resultado corrobora, de fato, com a idéia de que a sua aplicação em 24h, ou seja, muito próximo ao momento da lesão inicial, pode gerar mais agravamento inflamatório induzido pelo fármaco e pela abordagem cirúrgica para aplicação, do que benefícios, não havendo tempo de início da fase apoptótica, quando o GM-1 seria mais efetivo.

Já no momento de 72 h após a lesão medular, estaríamos em uma situação na qual a propagação da ação apoptótica e da zona de penumbra já teriam iniciado, ampliando área de dano ao tecido neural, havendo proximidade de resultados nas análises da escala BBB, mas demonstrando diferenças nos resultados de análise do plano horizontal quando comparados com os animais do grupo 2 (48 h), que demonstraram melhores índices nessa análise.

Procuramos, neste estudo, ter foco nas análises clínicas de evolução final dos animais, como as já padronizadas avaliações da escala BBB e do plano horizontal, sendo que já temos estudos, como o de Ji et al., em 2015⁵⁵, demonstrando os efeitos da utilização de GM-1 por via intratecal com análises imunohistoquímicas extensas e bem ilustradas após neurotoxicidade induzida pela bupivacaína. Nosso foco neste trabalho, estudando a lesão medular, foi avaliar a possibilidade de recuperação e melhora clínica efetiva associadas aos padrões de avaliações sensório-motoras conhecidas²⁵.

Acreditando que o GM-1 teria efeitos de mimetizar os agentes neurotróficos endógenos pela sua capacidade de dimerizar os receptores TRK, ativando cascatas de neuroplasticidade⁷², o mesmo teria papel fundamental no quadro subsequente à lesão neuronal, uma vez que, nessas situações, a quantidade desses fatores neurotróficos é

reduzida⁷⁰.

Para exercer tais funções, o GM-1 depende de ultrapassar a barreira hematoencefálica, sabidamente uma limitação para macromoléculas lipofílicas^{31,73}, mesmo sob condição inflamatória, quando sabemos haver possibilidade de maior transposição dessa barreira³¹. Buscamos, com este estudo, entregar o GM-1 diretamente no sistema nervoso central por meio de injeção intratecal estabelecida, em concentrações efetivas e conhecidas, e definir qual seria o melhor momento dessa aplicação buscando o máximo resultado possível desse agente em seu local efetivo de ação.

O peso dos animais foi monitorado e descrito em tabela nos resultados, não havendo nenhum animal que tenha tido, após lesão medular induzida, perda ponderal que o colocasse dentro dos critérios de exclusão da pesquisa.

Em nossa pesquisa, tivemos a dificuldade de não ter um método de imagem para guiar nossos procedimentos em animais no laboratório, o que nos impôs a necessidade de novas abordagens cirúrgicas a cada aplicação, limitando nossa capacidade de expandir o estudo. Acreditamos que, tendo uma forma de manter o acesso percutânea e guiada por imagem, haveria maior facilidade de ampliar a casuística e os valores de resultados encontrados.

Enfim, parece estarmos cada vez mais próximos de resultados interessantes e efetivos na recuperação e no tratamento dessas lesões neurológicas que geram tanto sofrimento e limitações, muitas vezes definitivos. Todavia, ficamos ainda estimulados a perseverar em mais estudos no sentido de ampliar resultados e facilitar o uso de fármacos e agentes cada vez menos nocivos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a aplicação do GM-1 por via intratecal após lesão medular contusa em ratos Wistar é viável. O GM-1 aplicado 48 h após a lesão apresentou os melhores resultados funcionais.

8 ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO Protocolo IOT nº 1402 CEUA: 1394/2019

Pesquisador Responsável: Prof. Alexandre Fogaça Cristante
Pesquisador Executante: Dr. Daniel de Moraes Ferreira Jorge
Título: Avaliação do efeito do GM1 por via peridural no ato, em 24 e 48 horas após lesão medular aguda em ratos
Grau de Pesquisa: Mestrado

PARA USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO CIENTÍFICA

Parecer da Comissão Científica do IOT:

- Aprovado
 Aprovado com restrições (corrigir e/ou completar)
 Aprovado o mérito, porém apresenta aspectos éticos complexos e/ou discutíveis (à CAPPesq)
 Não aprovado

São Paulo, 18 de outubro de 2019



Prof. Raphael Martus Marcon
Presidente da Comissão Científica

APROVAÇÃO DO DEPARTAMENTO

São Paulo, 23 de outubro de 2019



Prof. Olavo Pires de Camargo
Vice-Chefe do Departamento
Ortopedia e Traumatologia
MUSP

ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**AValiação DO EFEITO DO GM1 POR VIA PERIDURAL NO ATO, EM 24 E 48HORAS APÓS LESÃO MEDULAR AGUDA EM RATOS**”, registrada com o nº **1394/2019**, sob a responsabilidade de **Alexandre Fogaça Cristante** e **Daniel de Moraes Ferreira Jorge**, apresentada pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 05.02.2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 09-12-2019 Término: 08-08-2022
Espécie/linhagem/raça	rato wistar
Nº de animais	30
Peso/Idade	8 a 12 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério ICB

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 05 de fevereiro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- 1 Hejrati N, Moghaddamjou A, Pedro K, Alvi MA, Harrop JS, Guest JD, et al. Current Practice of Acute Spinal Cord Injury Management: A Global Survey of Members from the AO Spine. *Global Spine J.* 2022;29:21925682221116888.
- 2 Guan B, Fan Y, Zheng R, Fu R, Yao L, Wang W, et al. A critical appraisal of clinical practice guidelines on pharmacological treatments for spinal cord injury. *Spine J.* 2022;28:S1529-9430(22)00952-4.
- 3 Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine.* 2001;26(24 Suppl): S2 –12.
- 4 Masini M. Estimativa da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. *J Bras Neurocirurg.* 2001;12(2):97–100.
- 5 Ray SK, Matzelle DD, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Cell death in spinal cord injury (SCI) requires de novo protein synthesis. Calpain inhibitor E-64-d provides neuroprotection in SCI lesion and penumbra. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 939:436–49.
- 6 Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2000; 17(10):915–25.
- 7 Sharma HS, Olsson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience.* 1993; 57(2):443–9.
- 8 Ding WX, Shen HM, Ong CN. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2000;32(3):547–55.

- 9 Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y. Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis. *J Neurotrauma*, 1996; 13(9):537–48.
- 10 Schroeter M, Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *Neuromolecular Med.* 2005;7(3):183–95.
- 11 Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg.* 1998;89:699–706.
- 12 Torelli AG, Cristante AF, de Barros-Filho TEP, Dos Santos GB, Morena BC, Correia FF, et al. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. *Clinics (Sao Paulo)*. 2022;77:100006.
- 13 Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*, 2000;93(1 Suppl):1–7.
- 14 Short D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr Opin Neurol.* 2001;14(6):759–63.
- 15 Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1992;76(1):23–31.
- 16 Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. 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 Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA*. 1997;277(20):1597–604.
- 17 Samantaray S, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Physiological low dose of estrogen-protected neurons in experimental spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1199:86–9.
- 18 Samantaray S, Sribnick EA, Das A, Thakore NP, Matzelle D, Yu SP, et al. Neuroprotective efficacy of estrogen in experimental spinal cord injury in rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1199:90–4.
- 19 McDowell ML, Das A, Smith JA, Varma AK, Ray SK, Banik NL. Neuroprotective effects of genistein in VSC4.1 motoneurons exposed to activated microglial cytokines. *Neurochem Int*. 2011;59(2):175–84.
- 20 Matis GK, Birbilis TA. Erythropoietin in spinal cord injury. *Eur Spine J*. 2009;18(3):314–23.
- 21 Fang XQ, Fang M, Fan S-W, Gu C-L Protection of erythropoietin on experimental spinal cord injury by reducing the expression of thrombospondin-1 and transforming growth factor- β . *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(14):1631–5.
- 22 Barros Filho TEP, Araujo FF, Higino LP, Marcon RM, Cristante AF. The effect of monosialoganglioside (GM-1) administration in spinal cord injury. *Acta Ortop Bras*. 2016; 24(3):123–6.
- 23 Sosa I, Reyes O, Kuffler DP. Immunosuppressants: neuroprotection and promoting neurological recovery following peripheral nerve and spinal cord lesions. *Exp Neurol*. 2005;195(1):7–15.
- 24 Yang L, Yao M, Lan Y, Mo W, Sun YL, Wang J, et al. Melatonin for Spinal Cord Injury in Animal Models: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J Neurotrauma*. 2016;33(3):290–300.

- 25 Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Spinal cord injury experimental model and motion evaluation protocol in wistar rats. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87–91.
- 26 Yuan B, Pan S, Zhang W-W. Effects of gangliosides on expressions of caspase-3 and NGF in rats with acute spinal cord injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(24):5843–9.
- 27 Gebrin AS, Cunha AS, Da Silva CF, Barros Filho TEP, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. *Rev.Bras.Ortop.* 1997;32(2):103–8.
- 28 Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D, Sygen Study Group. The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine.* 2001;26(24 Suppl): S87–98.
- 29 Capozza MA, Triarico S, Mastrangelo S, Attinà G, Maurizi P, Ruggiero A. Narrative review of intrathecal drug delivery (IDD): indications, devices and potential complications. *Ann Transl Med.* 2021;9(2):186.
- 30 Lossinsky AS, Shivers RR. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol.* 2004;19(2):535–64.
- 31 Kuvacheva NV, Salmina AB, Komleva YK, Malinovskaya NA, Morgun AV, Pozhilenkova EA, et al. [Permeability of the hematoencephalic barrier in normalcy, brain development pathology and neurodegeneration]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2013;113(4):80–5. Russian.
- 32 Marcon RM, Cristante AF, de Barros TE Filho, Ferreira R, Dos Santos GB. Effects of ganglioside G(M1) and erythropoietin on spinal cord lesions in rats: functional and histological evaluations. *Clinics (Sao Paulo).* 2016;71(6):351–60.

- 33 Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *JAMA*. 1911;57(11):878–80.
- 34 Allen AR. Remarkes on histopathological changes in the spinal cord due to impact: an experimental study. *J Nerv Ment Dis*. 1914;41(3):141–7.
- 35 Tarlov IM. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1954;71(5):588–97.
- 36 Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1969;30(6):693–7
- 37 Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. *J Neurosurg*. 1971;35(3):277–86.
- 38 Kelly Jr DL, Lassiter KR, Calogero JA, Alexander E Jr. Effects of local hypothermia and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. *J Neurosurg*. 1970;33(5):554–63.
- 39 Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. A study of the effects of hyperbaric oxygen on the experimental spinal cord injury. *Med J Aust*. 1977;2(5):145–7.
- 40 Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep's spinal cord. *Paraplegia*. 1977;14(4):276–85.
- 41 Holbach KH, Wassmann H, Linke D. The use of hyperbaric oxygenation in the treatment of spinal cord lesions. *Eur Neurol*. 1977;16(1-6):213–21.
- 42 Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1985;2(4):257–67.

-
- 43 Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, et al. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury: results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1985;63(5):704–13.
 - 44 Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 1991;75(1):15–26.
 - 45 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.
 - 46 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.
 - 47 New York University, Medical Center. Impactor. NYU spinal cord contusion system. Operation manual. Impactor software version 7.0. New York, 1993.
 - 48 Rodrigues NR. Padronização da lesão de medula espinal em ratos wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP);1999.
 - 49 Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma.* 2001;18(5):533–43.
 - 50 Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Gómez-Pinilla F. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2005;193(2):411–9.
 - 51 Cha J, Heng C, Reinkensmeyer DJ, Roy RR, Edgerton VR, De Leon RD. Locomotor ability in spinal rats is dependent on the amount of activity imposed on the hindlimbs during treadmill training. *J Neurotrauma.* 2007;24(6):1000–12.
-

- 52 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 (FMUSP); 2006.
- 53 Marcon RM, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Cristante AF, Taricco MA, Colares G, et al. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos wistar. *Acta Ortop Bras.* 2010;18(1):26–30.
- 54 Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1–21.
- 55 Ji J, Yan X, Li Z, Lai Z, Liu J. Therapeutic effects of intrathecal versus intravenous monosialoganglioside against bupivacaine-induced spinal neurotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother.* 2015;69:311–6.
- 56 Yang L, Yao M, Lan Y, Mo W, Sun YL, Wang J, et al. Melatonin for Spinal Cord Injury in Animal Models: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J Neurotrauma.* 2016;33(3):290–300.
- 57 Hosseini M, Sarveazad A, Babahajian A, Baikpour M, Vaccaro AR, Chapman JR, et al. Effect of vitamins C and E on recovery of motor function after spinal cord injury: systematic review and meta-analysis of animal studies. *Nutr Rev.* 2020;78(6):465–73.
- 58 Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA). Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA); 1991.
- 59 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução normativa CONCEA nº37/2018. Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. 2018
-

-
- 60 Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Vet Clin Pathol.* 2012;41(1):27–31.
- 61 Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Standardization of spinal Cord injury in Wistar rats. *Acta Ortop Bras.* 2010;18(4):182–6.
- 62 Erschbamer MK, Pham TM, Zwart MC, Baumans V, Olson L. Neither environmental enrichment nor voluntary wheel running enhances recovery from incomplete spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2006;201(1):154–64.
- 63 Girgis J, Merrett D, Kirkland S, Metz GA, Verge V, Fouad K. Reaching training in rats with spinal cord injury promotes plasticity and task specific recovery. *Brain.* 2007;130(Pt 11):2993–3003.
- 64 Sedý J, Urdžíková L, Jendelová P, Syková E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(3):550–80.
- 65 Krajacic A, Weishaupt N, Girgis J, Tetzlaff W, Fouad K. Training-induced plasticity in rats with cervical spinal cord injury: effects and side effects. *Behav Brain Res.* 2010;214(2):323–31.
- 66 McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models.* Chapman and Hall. 2nd ed. New York, USA. 1989. p.511.
- 67 Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models.* 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1996. p.1408.
- 68 Magistretti PJ, Geisler FH, Schneider JS, Li PA, Fiumelli H, Sipione S. Gangliosides: Treatment Avenues in Neurodegenerative Disease. *Front Neurol.* 2019;10:859.
-

- 69 Zhuo Y, Liao W, Wu B. The anti-apoptosis effect of Ganglioside (GM1) after the spinal cord injury. *Chin J Spine Spinal Cord* 2003;9:006.
- 70 Sabel BA, Stein DG. Pharmacological treatment of central nervous system injury. *Nature*. 1986;323(6088):493.
- 71 Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxi-ischemic brain damage. *Ann Neurol*. 1986;19(2):105–11.
- 72 Duchemin AM, Ren Q, Neff NH, Hadjiconstantinou M. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-Kinase: involvement of TRK receptors. *J Neurochem*. 2008;104(6):1466–77.
- 73 Lebedev SV, Petrov SV, Volkov AI, Chekhonin VP. [The translocation of macromolecules via the hematoencephalic barrier]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2007;(6):37–49. Russian.