
FERNANDO FLORES DE ARAÚJO

**Avaliação do efeito da glutathiona na recuperação funcional e
histológica após lesão medular 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
2022

FERNANDO FLORES DE ARAÚJO

**Avaliação do efeito da glutathiona na recuperação funcional e
histológica após lesão medular 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
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Araujo, Fernando Flores de
Avaliação do efeito da glutathione na recuperação
funcional e histológica após lesão medular em ratos /
Fernando Flores de Araujo. -- São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Raphael Martus Marcon.

Descritores: 1.Glutathione 2.Traumatismos da
medula espinal 3.Sistema nervoso central/lesões
4.Ratos 5.Antioxidantes/efeitos de drogas

USP/FM/DBD-407/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Araújo FF. Avaliação do efeito da glutathiona na recuperação funcional e histológica após lesão medular experimental em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha esposa, **Nathalia**, por sua sabedoria, suporte e amor, e principalmente pelo exemplo de esforço e perseverança.

Aos meus pais, **Martim** e **Marisa**, pelo núcleo familiar, alicerce moral e exemplos de caráter.

Aos meus sogros, **Dorival** e **Heloísa**, pela forma como me acolheram e me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio à minha formação profissional e pelas oportunidades de desenvolvimento que me foram oferecidas.

Ao Professor Doutor **Olavo Pires de Camargo**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela inestimável atenção com a pós-graduação.

Ao Doutor **Reginaldo Perilo Oliveira**, Diretor do Grupo de Coluna do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela dedicação e atenção aos pacientes com patologias da coluna vertebral.

Ao Professor Doutor **Alexandre Fogaça Cristante**, Chefe do Grupo de Coluna Cervical e Trauma Raquimedular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo inestimável apoio à minha formação pessoal e profissional, pelas inúmeras e inestimáveis oportunidades oferecidas ao longo deste período.

Ao Professor Doutor **Raphael Martus Marcon**, Chefe do Grupo de Coluna Lombar e Deformidades do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela orientação deste trabalho, pela paciência ao longo destes anos de convivência e pela confiança na minha capacidade.

Ao estatístico **Henry Dan Kiyomoto**, pela competência e paciência na análise e discussão dos dados.

Às secretárias do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Srta. **Tânia Fernanda Cardoso da Silva**, sem a qual não seria possível concluir meu trabalho.

A todos os **funcionários do IOT-HC-FMUSP** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Nomes das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica: Terminologia Anatômica Internacional, Editora Manole, 1a ed. São Paulo, 2001.

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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: Parte IV (VANCOUVER). Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso. 3a ed. São Paulo: Sistema Integrado de Bibliotecas; 2016.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Listas de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	OBJETIVO.....	24
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
3	MÉTODOS.....	50
3.1	Ética.....	50
3.2	Estrutura física.....	50
3.3	Animais de experimentação.....	51
3.3.1	Critérios de inclusão.....	51
3.3.2	Critérios de exclusão.....	52
3.4	Grupos experimentais.....	52
3.5	Modelo experimental de lesão medular.....	55
3.5.1	Protocolo de anestesia.....	55
3.5.2	Profilaxia infecciosa e analgesia.....	55
3.5.3	Laminectomia.....	56
3.5.4	Contusão medular.....	58
3.5.5	Cuidados após procedimento cirúrgico.....	62

3.6	Intervenção experimental: tratamento com glutathione (GSH).....	62
3.7	Avaliação funcional.....	63
3.7.1	Avaliação da capacidade locomotora segundo a escala BBB.....	63
3.7.2	Avaliação da capacidade locomotora segundo a Escada Horizontal.....	64
3.8	Eutanásia.....	65
3.9	Estudo histológico.....	66
3.9.1	Remoção da medula espinhal.....	66
3.9.2	Análise histológica.....	66
3.10	Análise estatística.....	68
4	RESULTADOS.....	71
4.1	Análise funcional locomotora de BBB.....	71
4.2	Análise funcional locomotora de Escada Horizontal.....	80
4.3	Resultados da análise histológica.....	86
5	DISCUSSÃO.....	96
6	CONCLUSÃO.....	100
7	ANEXOS.....	102
8	REFERÊNCIAS.....	108

ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
ATA	atmosfera
ATP	adenosinatrifosfato
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
Ca	Cálcio
cm	centímetros
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Anima
DPLM	Dia pós-lesão medular
ECC	Escore combinado comportamental
ENMG	Eletroneuromiografia
EPO	Eritropoetina
EPOr	Receptor de eritropoetina
et al.	e outros
FDA	Food and Drug Administration
FK 506	Tacrolimo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	gramas
G(M1)	gangliosídeo
g.cm	gramas por centímetro

GSH	glutathiona forma reduzida
GSSG	glutathiona forma oxidada
HC	Hospital das Clínicas
HE	hematoxilina e eosina
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IL	interleucina
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
Ip	intraperitoneal
IR	índice de regeneração axonal
LETRAN	Laboratório de Estudos de Traumatismo Raquimedular e de Nervos
LM	lesão medular
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
Máx	Máximo
mg	miligramas
mg/kg	miligramas por quilograma
mg/kg/h	miligramas por quilograma por hora
Mín	Mínimo
mm	milímetros
MP	Metilprednisolona
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
NGF	fator de crescimento de nervo
NYU	New York University
PFA	paraformaldeído

PO ₂	pressão de oxigênio
POrh	eritropoetina recombinante humana
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
ROS	espécies reativas de oxigênio
SF	soro fisiológico
SNC	sistema nervoso central
TRM	trauma raquimedular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tricotomia e demarcação da incisão.....	57
Figura 2 - Dissecção da coluna vertebral.....	57
Figura 3 - Exposição medular após laminectomia.....	58
Figura 4 - Sistema NYU Impactor, com microcomputador acoplado ao sistema de impacção e com um animal acomodado sobre uma esponja momentos antes do procedimento de lesão.....	59
Figura 5 - Animal fixo por presilhas após contusão medular.....	60
Figura 6 - Aspecto após sutura de partes moles.....	61
Figura 7 - Aspecto após sutura de pele.....	61
Figura 8 - Imagem demonstrativa do protocolo de Escada Horizontal.....	65
Figura 9 - Cortes histológicos mostrando: A. infiltração; B. degeneração; C. hiperemia; D. hemorragia; E. Necrose (coloração por hematoxilina-eosina, aumento de 40 x); F. esquema de contagem dos axônios viáveis (pontos em azul, coloração por azul de toliudina, aumento de 100 x).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo de intervenções nos grupos de estudo.....	54
Tabela 2 -	Resultados do escore funcional BBB nos Grupos 1- Controle, Grupo 2 - SF, Grupo 3 - glutathiona e Grupo 4 - SHAM nos diferentes momentos de avaliação.....	72
Tabela 3 -	Média da avaliação funcional de BBB no Grupo 1 - Controle, Grupo 2 - SF, Grupo 3 - glutathiona e Grupo 4 - SHAM nos diferentes momentos de avaliação.....	75
Tabela 4 -	Valores de p relativos à comparação nos diferentes momentos de avaliação entre a pontuação BBB dos quatro grupos.....	79
Tabela 5 -	Resultados da avaliação funcional dos ratos no Grupos 1 - Controle, Grupo 2 - SF, Grupo 3 - glutathiona e Grupo 4 - SHAM no 2º dia após lesão medular, e com 2, 4 e 6 semanas pós-lesão medular.....	81
Tabela 6 -	Média dos resultados de Escada Horizontal em cada grupo..	83
Tabela 7 -	Valores de P relativos à comparação entre os grupos referente ao escore de Escada Horizontal.....	86
Tabela 8 -	Observação de degeneração na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental.....	87
Tabela 9 -	Observação de hemorragia na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental.....	88
Tabela 10 -	Observação de hiperemia na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental.....	89

Tabela 11 - Observação de infiltrado celular na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental.....	90
Tabela 12 - Observação de necrose celular na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental.....	91
Tabela 13 - Descrição do índice de regeneração (IR) axonal dos ratos....	94
Tabela 14 - Valores de P relativos à comparação entre os grupos referente ao índice de regeneração axonal.....	94

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação da evolução do valor médio do escore BBB de cada grupo.....	78
Gráfico 2 - Média de acertos no escore de Escada Horizontal de cada grupo.....	84
Gráfico 3 - Evolução da média de acertos no escore de Escada Horizontal de cada grupo ao longo do tempo.....	85
Gráfico 4 - Média do índice de regeneração (IR) axonal nos diferentes grupos.....	93

RESUMO

Araujo FF. *Avaliação do efeito da glutatona na recuperação funcional e histológica após lesão medular experimental em ratos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2022.

A lesão medular se dá por dois mecanismos diferentes: a lesão primária, ocasionada pelo trauma direto da medula, e a lesão secundária, decorrente da cascata inflamatória e da liberação de espécies reativas de oxigênio que consomem os mecanismos protetores antioxidantes celulares. Dentre esses agentes, destaca-se a glutatona (GSH) em sua forma reduzida. Os efeitos farmacológicos da glutatona (GSH) no tratamento da lesão medular secundária foram investigados de forma indireta, pela administração de fatores que estimulam sua produção, mas são escassos os trabalhos que avaliam o uso da glutatona (GSH) diretamente. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da glutatona (GSH) na recuperação funcional e histológica após lesão medular experimental em ratos. Foram submetidos 40 ratos Wistar à lesão contusa da medula espinhal produzida pelo sistema NYU Impactor. Os animais foram sorteados e divididos em quatro grupos, sendo: Grupo 1 - laminectomia e lesão medular contusa; Grupo 2 - laminectomia, lesão medular contusa e soro fisiológico (SF) 0,9%; Grupo 3 - laminectomia, lesão medular contusa e glutatona (GSH); Grupo 4 - laminectomia sem lesão medular. A glutatona (GSH) e o soro fisiológico foram administrados por via intraperitoneal. O Grupo 1 e o Grupo 4 não receberam nenhuma intervenção. Os animais foram avaliados quanto à recuperação da função locomotora em sete diferentes momentos pelo teste de BBB no 2º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias após lesão contusa na medula espinal. No 42º dia, os animais foram sacrificados para análise dos achados histológicos da medula lesionada. Nosso projeto experimental revelou melhores escores funcionais na avaliação com os escores BBB e Escada Horizontal no grupo submetido à GSH, assim como em relação à contagem de axônios cranial e caudal. As diferenças encontradas foram estatisticamente significantes nos escores BBB e na análise de contagem axonal.

Descritores: glutatona; Traumatismos da Medula Espinal; Sistema Nervoso Central/lesões; Ratos; Antioxidantes/efeitos de drogas.

ABSTRACT

Araujo FF. *Evaluation of the effect of glutathione on functional and histological recovery after experimental spinal cord injury in rats* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Spinal cord injury occurs by two different mechanisms: the primary injury, caused by direct spinal cord trauma, and the secondary injury, due to the inflammatory cascade and the release of reactive oxygen species that deplete cellular antioxidant protective mechanisms. Among these agents, glutathione (GSH) in its reduced form stands out. The pharmacological effects of glutathione (GSH) investigated in the treatment of indirect spinal cord injury by the administration of factors that stimulate its production, but there are few studies that evaluate the use of glutathione (GSH) directly. The aim of the present study was to evaluate the effect of glutathione (GSH) on functional and histological recovery after experimental spinal cord injury in rats. They underwent spinal cord blunt injury produced by the NYU Impactor system 40 Wistar rats. The animals were drawn and divided into four groups: group 1 - laminectomy and blunt spinal cord injury; group 2 - laminectomy, blunt spinal cord injury and saline (SF) 0.9%; group 3 - laminectomy, blunt spinal cord injury and glutathione (GSH); group 4 - laminectomy without spinal cord injury. Glutathione (GSH) and saline were administered intraperitoneally. Group 1 and group 4 received no intervention. The animals were evaluated for locomotor function recovery at seven different times by the BBB test on the 2nd, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd days after blunt spinal cord injury. On day 42, the animals were sacrificed for analysis of the histological findings of the injured spinal cord. Our experimental study revealed better functional results in the evaluation with BBB and Horizontal Ladder scores in the group submitted to GSH, as in relation to cranial and caudal axon count. The differences found were statistically significant in the BBB results and axon count analysis.

Keywords: Glutathione; Spinal Cord Injuries; Central Nervous System/injuries; Rats; Antioxidants/drug effects.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular pode apresentar um efeito devastador na qualidade de vida de uma pessoa, podendo ter característica incapacitante, irreversível e de alto custo econômico e social. As etiologias mais frequentes são os ferimentos por arma de fogo (36,7%), acidentes em água rasa (7,7%) e queda de objeto sobre o paciente (4,2%)¹. A extensão das alterações fisiopatológicas leva a déficit neurológico sensitivo-motor, alterações musculoesqueléticas como ossificação heterotópica e osteoporose, alterações vasculares como trombose venosa profunda, hipotensão postural e disreflexia autonômica, bexiga neurogênica, intestino neurogênico, úlceras por pressão, automatismos e espasticidade. Essas alterações estão diretamente relacionadas com a gravidade do dano neurológico, podendo apresentar desde alterações menores como preservação da função deambulatoria, até lesão medular completa com anestesia abaixo do nível da lesão, paraplegia ou tetraplegia e perda de controle esfinteriano, mais comumente obstipação e estase urinária²⁻⁸. A causa mais frequente é o trauma raquimedular, que é definido como injúria às estruturas contidas no canal medular (medula, cone medular e cauda equina) decorrente de trauma de causa externa, mas também pode ocorrer em decorrência de neoplasias, infecções, lesões vasculares ou até mesmo iatrogenicamente^{9,10}.

Existem dois mecanismos pelos quais a medula espinhal é lesada no trauma raquimedular, definidos como lesão primária e secundária. A lesão primária ocorre pela compressão mecânica das estruturas neurológicas, com dano direto às estruturas, podendo variar de contusão, compressão até secção medular. Essa compressão leva à interrupção fisiológica e estrutural aguda dos axônios e é resultado de um impacto sobre a substância da medula espinhal com conseqüente rompimento dos axônios, de danos às células nervosas e da ruptura de vasos sanguíneos^{11,12,13}. Frente a esse mecanismo, são de suma importância as políticas públicas de saúde para prevenção de acidentes por veículos automotores, controle da violência urbana e conscientização da população moradora de áreas de risco em relação a quedas/mergulho em águas rasas^{13,14}.

A lesão secundária é uma consequência da lesão primária, resultando em uma sequência de eventos bioquímicos autodestrutivos que podem durar horas ou dias e que levam à disfunção e morte celular^{15,16}. Esses eventos se caracterizam por um padrão de progressiva ativação de uma série de mecanismos fisiopatológicos incluindo alterações de perfusão microvascular, inflamação, liberação de radicais livres de oxigênio e peroxidação lipídica da membrana celular, desregulação do controle do fluxo celular de íons e morte celular por apoptose^{15,16,17}. Na fase aguda, ocorrem a hemorragia e a necrose na substância cinzenta central, principalmente na primeira hora após a lesão, seguida de edema e de hemorragia nas horas seguintes. Esse processo resulta na isquemia causada pela redução do fluxo sanguíneo para o segmento medular afetado. Essa redução do fluxo sanguíneo pode ser causada por uma alteração do canal vertebral, pela hemorragia e pelo edema significativo da medula espinal ou pela redução da pressão sanguínea sistêmica. A isquemia cria uma cadeia de reações bioquímicas que resulta em morte celular. Em seguida, células inflamatórias migram para o local lesionado e ocorre, simultaneamente, a proliferação glial. A formação de tecido cicatricial e de cisto ocorre na fase crônica, no período de uma a quatro semanas, decorrente da proliferação de astrócitos e da hipertrofia, formando uma cicatriz glial^{18,19}.

Os estudos mais recentes sobre os processos fisiopatológicos após a lesão do sistema nervoso central proporcionam um suporte mais racional para as estratégias de tratamento e demonstram alguma melhora da função neurológica em pacientes com lesão medular. O melhor conhecimento dos processos fisiopatológicos primários e secundários abre um campo de pesquisa experimental com modelos de lesão da medula espinal provocada em laboratórios^{20,21}. A padronização da lesão medular permite a reprodutibilidade e a análise dos resultados^{22,23}.

Várias pesquisas foram realizadas ao longo dos anos na tentativa de obter-se um tratamento mais efetivo para a lesão medular espinal, baseando-se em quatro formas básicas de abordagem: a cirúrgica, a por meios físicos, a biológica e a farmacológica²⁴. Nesse contexto, ganha destaque, na última década, a pesquisa por meios farmacológicos de controle da lesão secundária e a pesquisa por meios biológicos de reversão da lesão, com ênfase em células tronco²⁵.

Na abordagem do trauma raquimedular, a principal técnica empregada é a laminectomia descompressiva que consiste na retirada do arco posterior vertebral - principalmente a lâmina vertebral - com objetivo de retirar o anteparo posterior e descomprimir as estruturas neurais. Essa técnica pode ser associada à artrodese dos níveis envolvidos quando há necessidade de estabilização e/ou correção de deformidade associadas. A literatura demonstra que existe uma janela ótima de abordagem cirúrgica precoce para otimizar a possibilidade de recuperação neurológica, que é de até 48 horas a partir do trauma raquimedular agudo^{26,27}. No entanto, nos pacientes com lesão medular completa, o retorno da deambulação é muito baixo, atingindo cerca de 1% a 1,8%²⁸.

Atualmente, a cirurgia apresenta um papel importante na fase aguda da lesão, com objetivo de descomprimir o canal vertebral, estabilizar a coluna e assim prevenir novas lesões e realinhar as estruturas da coluna vertebral, promovendo uma melhora da qualidade de vida desses pacientes^{29,30,31}.

Em relação aos meios físicos, os mais pesquisados são a hipotermia controlada, a oxigenioterapia hiperbárica e, mais recentemente, o uso de tecnologia de emissão de laser de diversos tipos de frequências. Essa tecnologia, nas lesões medulares em modelos animais, tem demonstrado diminuição da concentração de radicais livres e fatores pró-apoptóticos, com diminuição da lesão neurológica secundária; contudo, sua aplicabilidade clínica ainda é muito limitada^{32,33,34}.

A terapia biológica consiste em promover a recuperação neurológica através da regeneração neuronal, utilizando-se terapia celular autóloga ou homóloga com células-tronco totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. Estratégias regenerativas e reparativas experimentais incluem células-tronco adultas ou embrionárias, células de Schwann, fibroblastos geneticamente modificados, células do estroma ósseo e células da bainha olfatória, sendo a mucosa olfatória a única parte do sistema nervoso capaz de regeneração ao longo de toda a vida e que é facilmente acessível com técnicas minimamente invasivas³⁵. Em humanos, os trabalhos têm mostrado segurança no emprego de transplante de células da bainha olfatória, com poucos efeitos adversos menores, como febre, anemia leve, siringomielia, entre outros; contudo, os desfechos não foram avaliados de maneira uniforme³⁶.

A terapia farmacológica apresenta papel promissor na prevenção da lesão secundária, atualmente em diferentes etapas da reação inflamatória que a caracteriza, promovendo aumento do fluxo sanguíneo, estabilização da membrana celular e inibindo a peroxidação lipídica, reduzindo a formação e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Neurônios e células gliais do sistema nervoso central e da medula espinhal são particularmente propensos ao estresse oxidativo e eletrofilico devido a muitos fatores, incluindo um alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, uma alta taxa de atividade metabólica oxidativa, produção intensa de metabólitos reativos de oxigênio e capacidade antioxidante relativamente baixa. Desta forma, o aumento do estresse oxidativo é considerado um marcador da lesão medular¹⁸.

A glutathiona (GSH) é uma molécula produzida por quase todas as células do organismo, com papel fundamental na manutenção do estado redox da célula, protegendo-a do estresse oxidativo. A GSH possui baixo peso molecular e ainda atua como cossustrato para várias outras enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a glutathiona transferase. As principais células do sistema nervoso, os neurônios, possuem níveis relativamente baixos de GSH em comparação com outros órgãos, como o fígado, o que faz com que sejam especialmente vulneráveis ao estresse oxidativo. Por outro lado, a GSH encontra-se presente em altas concentrações em astrócitos, células gliais que ainda atuam fornecendo substratos para a síntese de GSH nos neurônios³⁷. A incubação de neurônios com células gliais por um período de 24 horas levou ao aumento dos níveis de GSH nos neurônios. Os principais substratos para a síntese de GSH são a cisteína, o glutamato e a glicina. Além disso, a glutathiona também pode ser um importante neuromodulador do sistema nervoso central³⁷.

Estudos anteriores mostraram que, uma hora após a lesão medular, os níveis de GSH diminuíram significativamente, sendo um período crítico para o início do espalhamento do dano secundário à lesão como o espalhamento da inflamação, ativação imune e apoptose^{38,39}. Este projeto poderá contribuir com futuras terapias relacionadas à diminuição do estresse oxidativo na lesão medular.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar, em modelo padronizado, a regeneração nervosa e a recuperação funcional motora de ratos Wistar com paraplegia cirurgicamente provocada em resposta ao uso de glutathiona (GSH).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os estudos experimentais sobre o trauma raquimedular tiveram início no final do século XIX, numa tentativa de reproduzir em animais os fenômenos histológicos da lesão medular que acarretam prejuízo funcional. Segundo **Yeo et al.**⁴⁰ (1976), **Schmaus**¹, em 1890, tentou reproduzir o trauma medular prendendo uma tábua no dorso de coelhos e desferindo um golpe. Posteriormente, observou o aparecimento de áreas de degeneração e cavitação na medula espinal. **Kirchgässer**² (**apud Dohrman, 1972**), em 1897, e **Scagliosi (apud Dohrman, 1972)**⁴¹, descreveram a degeneração da bainha de mielina e das células neuronais dos cornos anteriores da medula espinal, mas sem ocorrer fratura da coluna vertebral ou mesmo hemorragia intramedular.

Em 1911, **Allen**⁴² desenvolveu um modelo reprodutível e quantificável de lesão medular em cães, produzindo uma queda padronizada de peso sobre a dura-máter dos animais. Esse modelo gera uma lesão medular passível de ser quantificada através do produto do peso em gramas, pela altura em centímetros, com o resultado expresso em gramas.centímetros (g.cm). Em 1914, **Allen**⁴³ passou a testar diferentes intensidades de impacto, relatando a diferença das lesões encontradas com a queda de um peso de 240 g.cm, em comparação à lesão gerada pela queda de 400 g.cm. Em seu estudo, observou que nos primeiros 15 minutos, ocorre a presença de edema e hemorragia na substância cinzenta e branca da medula espinal e, após 4 horas do trauma, o edema dos axônios da coluna lateral e posterior da substância branca da medula espinal. Nesse mesmo estudo, o autor demonstrou que a redução da pressão intramedular por mielotomia melhora a recuperação clínica dos animais e sugere que o aumento da pressão intramedular ocasionado pelo edema e pela hemorragia resulta no agravamento da necrose isquêmica após a lesão traumática experimental.

¹ Schmaus H. Beiträge zur pathologischen anatomie der rückenmarkerschütterung. *Virchows Arch.* 1980;122:470-95.

² Kirchgaser G. Experimentelle untersuchungen über rückenmarkerschütterung. *Dtsch Z Nervenheilk.* 1897;11:406-19.

Embora exista certa controvérsia a respeito da descoberta da glutathione (GSH), atribui-se a **Hopkins e Dixon**⁴⁴, em 1922, a descrição e a caracterização da glutathione como uma molécula essencial ao metabolismo celular capaz de prevenir que Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) como radicais livres, peróxidos, metais pesados e peróxidos lípicos causem dano aos componentes celulares.

Em trabalho publicado em 1923, **McVeigh**⁴⁵ relatou a lesão medular por meio da compressão digital tanto nos animais vivos, ao nível de T7-T8, quanto em cadáveres humanos frescos. O autor observou edema na coluna lateral e anterior da medula após a lesão, com progressão até o segundo dia, ocorrendo hemorragia na substância cinzenta, estendendo-se acima e abaixo do nível da lesão e através da substância branca anterior e lateral. O autor passou a acreditar que as lesões experimentais obtidas em cães e cadáveres frescos são comparáveis às lesões que ocorrem nos seres humanos, principalmente no que diz respeito aos fatores mecânicos que ocasionam a lesão e às alterações histológicas encontradas. Esse paralelo serviu de base e impulsionou o desenvolvimento de várias investigações nessa área.

Em 1954, **Tarlov**⁴⁶, para produzir lesão medular experimental em cães, realizou laminectomia de T12 e introduziu um balão que, ao ser inflado, resulta em lesão medular extradural por compressão. No mesmo estudo, o autor apresentou um método de avaliação da recuperação locomotora em animais que sofreram lesão medular experimental, identificando que o tempo para produzir paralisia e o tempo de compressão medular são inversamente proporcionais ao prognóstico de recuperação funcional.

Seguindo a linha de estudo com espécimes caninos, **Woodward e Freeman**⁴⁷ (1956) promoveram a lesão medular por isquemia em 27 cães adultos, seccionando vasos sanguíneos junto dos pares de raízes nervosas de T6 a T11, e sacrificaram os animais entre uma e quatro semanas após a lesão. Ao realizar a análise histológica, identificaram lesões precoces, surgidas na isquemia leve, com perda de neurônios no corno dorsal, seguida de redução da substância cinzenta posterior com separação passiva dos elementos neurais intersticiais e pela formação de cavitação. Ao promover graus mais avançados de isquemia, os autores encontraram necrose

através dos tratos longos e dos elementos neurais e redução no número de neurônios, produzindo quadro de lesão medular com cavitação.

Em 1969, **Ducker e Hamit**⁴⁸ iniciaram os trabalhos com corticosteroides ao realizarem tratamentos experimentais em cães submetidos à lesão medular por queda de peso, observando melhora significativa na recuperação funcional nos grupos que receberam dexametasona intramuscular e hipotermia local.

Ducker et al.⁴⁹ (1971) propuseram estudo com macacos Rhesus, submetendo-os a um trauma medular por queda de peso na forma de um cilindro, com impacto controlado, medido em g.cm, na coluna. Diferentemente dos estudos prévios, os grupos de animais foram divididos em lesão aguda ou subaguda, para avaliação da capacidade funcional dos animais após o trauma (capacidade de andar, correr, ficar em pé ou paraplegia total) e em diferentes momentos de sacrifício para análise histológica. Os autores graduaram os achados histológicos e observaram que os vários graus de progressão da lesão medular são dependentes e diretamente relacionados à gravidade do trauma. Diferentes fatores, como o metabolismo celular e anatomia vascular arterial e venosa, foram determinados como contribuintes para o efeito cumulativo da fragilidade da região medular central. Tanto a quantidade de trauma aplicado quanto a localização da lesão interferem na progressão da lesão medular: nos traumas leves, as alterações histológicas ocorrem somente na região central; nos traumas moderados, as alterações histológicas também ocorrem na substância branca; e nos traumas graves, as alterações histológicas envolvem toda a substância medular.

Seguindo a mesma linha de estudo em macacos Rhesus com modelo por queda de peso, **Wagner Jr. et al.**⁵⁰ (1971) puderam verificar a efetividade da lesão medular produzida, provocando paralisia sensitiva e motora completa das extremidades inferiores. O desenho utilizado no estudo possuía grupos de animais submetidos à lesão e sacrificados em diferentes intervalos de tempo após a lesão para observação dos achados histológicos com 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas. Os autores incluíram grupos controle, em que somente a laminectomia era realizada ou animais eram mantidos vivos durante 6 meses após a lesão medular. Ao comparar esses grupos, observaram que, entre 7 e 10 dias, todos os macacos apresentavam

movilidade satisfatória dentro de suas gaiolas e, em seis meses, não havia diferença para os grupos controle. Com esse estudo, pode-se avançar no registro de importantes modificações histológicas na medula lesionada. Observando os vasos sanguíneos em diferentes momentos, os autores descobriram que, em 5 minutos, a aparência da medula espinal quase não apresenta alterações, sem formação de trombos. Em 15 minutos, ocorrem na substância cinzenta central rupturas isoladas de vasos mais finos com extravasamento de eritrócitos para os espaços perivasculares. Em 30 minutos, os eritrócitos e o fluido seroso estendem-se dentro e ao redor do parênquima, principalmente nas áreas do canal central, mas também já no corno dorsal. Entre 1 e 4 horas, as hemorragias perivasculares começam a coalescer, com as alterações já evidentes na substância branca.

Ainda em 1971, **Fairholm e Turnbull**⁵¹ utilizaram o modelo de queda de peso em coelhos para estudar as lesões medulares. Além de utilizar modelo animal diferente, o estudo teve como diferencial a realização de exame de microangiografia, de 7 a 14 dias após o trauma, identificando duas zonas de lesão na medula espinal: Zona 1, localizada na porção posterocentral da medula espinal, em que os capilares perdem progressivamente a capacidade de condução de sangue, e zona 2, ao redor da zona 1, com padrão microvascular normal. Com base nesses achados, os autores concluíram que a preservação da microcirculação interfere diretamente na recuperação dos neurônios e axônios danificados, o que serviu de base, anos mais tarde, para a proposta de intervenções terapêuticas na linha da preservação ou recuperação medular.

O emprego de meios físicos no tratamento da lesão medular teve seus estudos iniciados na década de 1970. Os principais meios físicos estudados ao longo do tempo na reversão da lesão medular foram a hipotermia, a oxigenioterapia hiperbárica e o exercício físico. **Kelly Jr. et al.**⁵² concluíram, através do estudo dos efeitos da hipotermia local e dos níveis de oxigênio tecidual em cães submetidos à lesão experimental por queda de peso, que a hipotermia oferece uma proteção à medula espinal traumatizada pela diminuição da demanda metabólica. **Tator e Deecke**⁵³, em 1973, realizaram perfusão de solução normotérmica e hipotérmica em macacos Rhesus. Os autores observaram que a perfusão hipotérmica e normotérmica melhoram a recuperação neurológica, mas em compressões maiores, somente a

perfusão normotérmica resultou em melhora significativa, sugerindo que a diálise de substâncias nocivas tem um importante papel na recuperação neurológica.

A oxigenoterapia foi foco de estudo na década de 1970 como método auxiliar na recuperação da lesão medular. **Kelly Jr. et al.**⁵⁴ (1972) estudaram cães submetidos à lesão por impacto da medula espinal que foram divididos em quatro grupos, um controle e três submetidos à terapia com 100% de oxigênio à pressão de 2 ATA, por períodos diferentes. Os autores atestaram que a medula espinal traumatizada se torna muito hipóxica por um período de 30 minutos após a lesão, e a inalação com oxigênio hiperbárico a 2 ATA é capaz de aumentar a PO₂ tecidual na medula espinal traumatizada. Não foi obtido o mesmo efeito com oxigênio a 100% e não foram manifestas alterações nesses níveis.

Yeo et al.⁴⁰, em 1976, confirmando os achados em novo estudo em 1977⁵⁵, atestaram, em experimento com oxigênio hiperbárico em ovelha, que a terapia com oxigênio hiperbárico instituída dentro de 2 horas após a lesão, resulta em melhora da recuperação motora. Os autores concluíram que a melhora na recuperação motora e o grau de degeneração medular depois do tratamento com oxigênio hiperbárico sugerem que a isquemia tem papel significativo na lesão de contusão da medula espinal.

Em 1976, **Dohrmann et al.**⁵⁶ descreveram um aparelho que consistia em um modelo de queda de peso com a haste contida dentro de um tubo de plástico transparente. Esse modelo poderia ser aplicado em diferentes tipos de animais, com maior acurácia para se poder correlacionar a quantidade de lesão, o grau de disfunção neurológica e a eficácia dos vários métodos de tratamento. No mesmo ano, os autores realizaram um estudo em gatos para testar o sistema, comparando os parâmetros biomecânicos e o volume de lesão entre os grupos, observando que o volume de lesão é diferente em todos os grupos embora todos tenham recebido a lesão controlada em 400 g.cm.

Hansebout et al.⁵⁷ (1975), ao investigarem hipotermia e corticosteroides, atestaram que em 7 semanas, os grupos submetidos à intervenção com corticosteroide ou resfriamento, obtiveram taxas de recuperação motora

significativamente superiores em relação ao grupo não tratado. No mesmo ano, **de la Torre et al.**⁵⁸ (1975) estudaram o tratamento com solução salina, manitol, dexametasona e dimetil-sulfoxide em cães com lesão experimental por queda de peso. Os autores atestaram recuperação parcial ou total da função nos cães que receberam dimetil-sulfoxide (6 de 8) ou dexametasona (2 de 8), enquanto a solução salina isotônica e o manitol não foram capazes de reverter a paralisia.

Kuchner e Hansebout⁵⁹ (1976) submeteram cães com lesão medular a um tratamento isolado com dexametasona, hipotermia ou associação de dexametasona e hipotermia. Desenvolveram um método diferenciado de controle do efeito da perfusão na recuperação medular: a hipotermia foi obtida através da colocação de uma bolsa de Silastic local com conteúdo fluido resfriado $60 (\pm 30)$, não havendo a possibilidade de a irrigação contribuir para a recuperação funcional. Os resultados mostraram que o grupo de terapia combinada apresentou o melhor índice de recuperação motora final. Os grupos que receberam tratamentos isolados com dexametasona e hipotermia recuperaram a capacidade de deambulação, enquanto o grupo não tratado não foi capaz de restabelecer a capacidade de marcha.

Yeo et al.⁶⁰ (1977) estudaram, em ovelhas, o efeito de metilprednisolona intratecal, alfa-metil-paratiroxina e oxigênio hiperbárico nas mudanças patológicas associadas com a necrose central pós-traumática da medula espinal. Nenhum animal do grupo controle ou dos grupos experimentais obteve recuperação funcional total. No grupo tratado com alfa-metil-paratiroxina, houve uma recuperação motora significativa e menor degeneração cística central e microcistos na substância branca, contudo a aplicação clínica dessa substância é impedida pela sua toxicidade renal. No grupo submetido à lesão por queda de peso e que não recebeu tratamento, os autores encontraram intensa necrose da substância cinzenta central, microcistos e desmielinização ao redor e na substância branca, com vários graus de fibrose, gliose e extensa degeneração cística central. Mesmo no grupo controle, houve recuperação motora importante, com todos os animais recuperando pelo menos os movimentos antigravitacionais. No grupo dos animais tratados com metilprednisolona intratecal, o grau de degeneração cística central e desmielinização manteve-se similar ao grupo não tratado. Nos animais tratados com oxigenioterapia hiperbárica, houve melhora

significativa da recuperação motora por 8 semanas e menor degeneração cística central e formação de microcistos nas colunas anterior e lateral.

Holbach et al.³² (1977) estudaram prospectivamente o efeito da oxigenioterapia hiperbárica em 15 pacientes (13 homens), entre 18 e 65 anos (média de 44 anos), com lesões compressivas da medula espinal, que mantiveram ou tiveram seu deficit agravado no pós-operatório. A oxigenioterapia hiperbárica foi aplicada em sessões diárias totalizando 10 a 15 sessões, com duração de 40 minutos cada, a uma pressão de 1,5 ATA. Os autores avaliaram a função motora antes, durante e após as sessões. Além disso, foi feita uma avaliação por eletroneuromiografia (ENMG) da pressão de oxigênio (PO₂) arterial e do líquido cefalorraquidiano. Os autores encontraram resultados promissores com melhora do deficit neurológico na maioria dos pacientes e aumento considerável da PO₂ arterial e no líquido cefalorraquidiano. Também encontraram aumento do recrutamento dos neurônios motores na eletroneuromiografia. Os autores concluíram que o tratamento com oxigênio hiperbárico poderia ser útil no tratamento das lesões medulares, mas que estudos clínicos adicionais com melhor metodologia teriam de ser realizados para comprovar os resultados.

No ano de 1978, **Balentine et al.**^{61,62}, através de um estudo experimental de lesão da medula em ratos produzida pela técnica de queda de peso sobre a medula na região torácica alta, observaram uma alteração axonal imediatamente após o trauma, a tubulovesiculação e edema da substância branca. Aos 30 minutos, observaram o início da necrose axonal, que se completa entre 8 e 24 horas da lesão. Além disso, encontraram duas anormalidades na mielina: degeneração vesicular e vacuolização intramielínica. No mesmo ano, **Ducker et al.**¹⁵ sugeriram que a lesão medular produz grande diminuição do fluxo sanguíneo e dos níveis de oxigênio tecidual na medula em cães parapléjicos decorrente de trauma medular. Com base nesse achado, os autores sugeriram que os esforços terapêuticos devem ter como objetivo melhorar a oxigenação e aumentar o fluxo sanguíneo para medula.

Na década de 1980, iniciou-se uma retomada do modelo experimental de lesão medular que havia sido descrito por **Allen**⁴² em 1911. **Noble e Wrathall**⁶³ (1985) modificaram a técnica de forma a diminuir as variáveis que resultem em lesões assimétricas. Utilizando pinças para fixação dos processos espinhosos adjacentes à

região da laminectomia, conseguiram direcionar de forma mais efetiva a energia de impacto para a medula espinal, reduzindo o efeito amortecedor das demais regiões da coluna vertebral, da caixa torácica e os movimentos respiratórios. Nesse modelo, a lesão medular foi produzida por queda de 10g a partir de diferentes alturas, e a área de lesão foi avaliada 4 cv semanas após seu início em relação ao volume, extensão e dimensão dos tecidos em seu epicentro. Os autores concluíram que a técnica pode ser usada em ratos para produzir lesões leves, moderadas e graves, sendo apropriada para modelos experimentais em ratos.

Gamache et al.³³ (1981) avaliaram o uso da terapia hiperbárica prospectivamente em 25 pacientes com lesão aguda da medula espinal por um período de 18 meses. Todos os pacientes de ambos os grupos receberam metilprednisolona e os escores motores foram avaliados antes e após a intervenção. Os autores não encontraram diferença entre os escores ao final da avaliação, com 4 e 12 meses. Contudo, o grupo submetido à oxigenioterapia hiperbárica atingiu o resultado antes da intervenção, levando os autores a concluírem que existe, portanto, evidência de que o tratamento com oxigênio hiperbárico altera o tempo de recuperação sem alterar o resultado final.

Anderson et al.^{64,65} (1982, 1985) publicaram estudos experimentais em gatos utilizando doses muito elevadas de metilprednisolona. Analisaram a microvascularização no sítio da lesão por método indireto, através do uso de carbono coloidal. No grupo tratado com altas doses de metilprednisolona, encontraram preservação substancial da perfusão microvascular quando comparado com o grupo não tratado. Os autores interpretaram que a metilprednisolona apresenta papel efetivo na prevenção de eventos fisiopatológicos subsequentes ao trauma. Esses eventos foram identificados como responsáveis pela destruição tecidual e lesão neurológica: necrose hemorrágica, isquemia, edema, inflamação, perda de cálcio no espaço extracelular e perda de potássio no espaço intracelular. Os autores concluíram que a metilprednisolona possui efeito protetor contra a ação de radicais livres de oxigênio na peroxidação lipídica.

Hall et al.⁶⁶ (1984) estudaram o fluxo sanguíneo medular em gatos submetidos à contusão medular, ao nível de L3, e a diferentes dosagens de metilprednisolona. Os

autores concluíram que o corticoide diminui a isquemia medular pós-traumática, quando administrado na dose de 30 mg/kg dentro das primeiras horas após o trauma, mas não é capaz de reverter a isquemia já instalada. **Hall**⁶⁷ (1992), posteriormente, relatou que um regime intensivo de metilprednisolona em altas doses dentro de 8 horas após o trauma medular melhora a recuperação funcional de pacientes e de animais de laboratório. Ressaltou que a ação neuroprotetora da metilprednisolona envolve a capacidade de inibir os radicais livres de oxigênio induzidos pela peroxidação lipídica e discute a possibilidade de novas drogas ou a associação de drogas diminuir os efeitos colaterais do uso de altas doses de metilprednisolona.

Bracken et al.⁶⁸ (1985) publicaram um estudo multicêntrico comparando a eficácia do uso de altas doses de metilprednisolona (1.000 mg em bolo e diariamente por 10 dias) com a dose padronizada (100 mg em bolo e diariamente por 10 dias) em pacientes vítimas de trauma raquimedular. Não encontraram diferença significativa em relação à recuperação motora em 6 semanas e em 6 meses após a 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.

Em 1987, **Bresnahan et al.**⁶⁹ afirmaram que a lesão medular experimental reprodutível depende de uma resposta imediata das propriedades mecânicas ao impacto e descrevem um aparelho de impacção com função eletromecânica. O aparelho desenvolvido era sensível às características do tecido lesado e permitia a manipulação contínua da força de impacto ou do deslocamento tecidual. Os autores descreveram os resultados anatômicos e comportamentais de um determinado índice de impacto e relataram a capacidade do aparelho desenvolvido de produzir uma lesão traumática consistente e controlada.

Em 1989, **Noble e Wrathall**⁷⁰, seguindo a linha de pesquisa de lesão medular contusa controlada e graduada em ratos, avaliaram a relação entre a substância branca residual e o déficit funcional em diferentes momentos após o trauma medular. Observaram que a hemorragia é mais evidente entre 15 minutos e 24 horas da lesão inicial, com formação progressiva de cavidades em todos os grupos que sofreram lesão, após 24 horas, atingindo seu pico após uma semana da lesão. Para avaliação

da função motora, utilizaram uma modificação do teste de Tarlov, o escore motor. Aplicaram o escore combinado comportamental (ECC) que varia de zero para o rato normal até 100% para o rato com paralisia dos membros inferiores, demonstrando existir total correlação entre a substância branca residual e o deficit funcional medido pelo ECC após 4 semanas, quando a lesão está totalmente desenvolvida.

Janssen e Hansebout²⁸ (1989), em revisão sistemática da literatura, analisaram a patogênese da lesão medular e os métodos químicos e físicos de tratamento atuantes na prevenção da lesão secundária. Concluíram que os casos nos quais ocorre interrupção completa da circulação na área lesada, o tratamento com oxigenioterapia hiperbárica não seria efetivo.

Na década de 1990, **Tator e Fehlings⁷¹ (1991)** descreveram as principais causas de lesão medular, citando os acidentes automobilísticos, traumas em atividades esportivas ou recreativas, acidentes de trabalho e quedas em casa. Observaram que a metade desses pacientes apresentam lesão medular completa, ou seja, sem preservação da função neurológica abaixo do nível da lesão. Nesse trabalho, definiram a lesão primária como o trauma mecânico e a lesão anatômica no instante do trauma, e a lesão secundária como aquela decorrente de uma cascata de episódios bioquímicos subsequentes ao trauma inicial. Descreveram as alterações histológicas encontradas após a lesão medular, como a hemorragia, edema, necrose axonal e neuronal, desmielinização, formação cística e infarto. Utilizando-se de microscopia eletrônica, os autores observaram a microcirculação medular, o fluxo sanguíneo medular, os efeitos da autorregulação medular no trauma agudo e os efeitos cardiovasculares e hemodinâmicos do trauma medular. Com isso, relataram que a hemorragia observada imediatamente após o trauma agudo está associada a zonas isquêmicas na substância branca. Através dos achados, abordaram como diferentes tipos de tratamento podem atuar sobre os efeitos vasculares da lesão medular aguda, como os bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas opioides e os esteroides. Apresentaram evidências de que a isquemia pós-traumática é um mecanismo secundário importante de lesão e que os corticoides poderiam atuar para contê-la. Os autores também demonstraram que a normotensão pode ser restaurada com a expansão de volume ou vasopressores e o fluxo medular pode melhorar com

dopamina, corticoides e expansores de volume, concluindo que os efeitos vasculares pós-traumáticos podem ser tratados.

Liu et al.⁷² (1991), pesquisando a sinalização celular, demonstraram que a ciclosporina A e o tacrolimo (FK 506) possuem um passo citoplasmático em comum na sinalização dependente do cálcio.

Retomando os trabalhos experimentais em 1992, **Behrmann et al.**⁷³ apresentaram um aparelho para produzir lesão medular contusa em ratos e os compararam com outro grupo submetido à secção anatômica da medula. Realizaram análise histológica e comportamental da recuperação locomotora pela modificação da escala de Tarlov, observando a marcha dos animais em campo aberto, em plano inclinado e em grade. Os autores demonstraram haver recuperação funcional nos animais que sofreram contusão medular em comparação ao grupo submetido à secção, correlacionando esse fato com a existência de substância branca residual no modelo experimental de lesão contusa.

No mesmo ano, **Gruner**⁷⁴ (1992) apresentou um novo modelo de aparelho para realizar lesão contusa na medula de ratos que permitia a mensuração da velocidade de impacto e da quantidade de contusão medular, através de um circuito elétrico conectado ao monitor do impactador em contato com a dura-máter.

Bracken et al.⁷⁵ (1992), em estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, multicêntrico, em pacientes com lesão medular aguda, observaram que os pacientes que recebem metilprednisolona dentro de 8 horas após a lesão, na dose de 30 mg/kg em bolo na primeira hora e 5,4 mg/kg/h por 23 horas, apresentam melhora da função neurológica nas primeiras 6 semanas e no sexto mês. Nos pacientes tratados após 8 horas, não foram encontrados os mesmos efeitos, tanto os pacientes que receberam metilprednisolona quanto naloxone apresentaram resultados piores do que no grupo placebo. O grupo tratado com naloxone (5,4 mg/kg em bolo na primeira hora e 4,0 mg/kg/h por 23 horas) também não apresentou recuperação significativamente maior. A partir desses achados, os autores afirmaram que o tratamento com a dose utilizada de metilprednisolona é indicado quando iniciado dentro de 8 horas após a lesão.

Bracken e Holford⁷⁶ (1993) publicaram um artigo em que apresentam os resultados observados pela National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS 1 e NASCIS 2) afirmando que a metilprednisolona aplicada precocemente após o trauma raquimedular em altas doses resulta em melhora da função motora nas avaliações com 6 semanas, 6 meses e 12 meses após a lesão.

Basso et al.⁷⁷ apresentaram, em 1995, uma escala de índice de recuperação locomotora em ratos que sofreram lesão medular produzida em laboratório e demonstram que ela é eficiente, ampla e não ambígua, diferentemente das modificações da escala de Tarlov, que dificultavam a comparação e reprodutibilidade de resultados entre os laboratórios. Os autores denominaram a escala de BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) e concluem que é uma medida válida e previsível da recuperação funcional motora, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais em diferentes tipos de lesões e prever alterações anatômicas no centro da lesão. Enaltecem sua reprodutibilidade, afirmando que examinadores, em diferentes laboratórios, poderiam reproduzir a análise dos resultados do teste BBB, oferecendo uma medida mais discriminativa do resultado comportamental, permitindo uma melhor avaliação do uso de drogas aplicadas após lesão medular.

Em 1996, **Basso et al.**⁷⁸ desenharam e padronizaram um aparelho para realizar lesão medular contusa em ratos que permite produzir uma lesão graduada, consistente e reprodutível, o New York University, que ficou conhecido depois como "NYU-Impactor". Os autores afirmaram que um exame dos efeitos terapêuticos para índices lentos e rápidos de recuperação é mais evidente nos grupos graduados com 12,5 e 25 mm de altura da queda do peso de 10 g sobre a medula, e confirmaram que uma maior quantidade de tecido poupado está diretamente relacionada com uma melhor função locomotora final. Relataram também o teste BBB como sendo mais sensível que os demais testes descritos até então para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram lesão medular experimental. Concluíram que a escala é aplicável, após a utilização do sistema NYU Impactor, na análise da recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular contusa.

Schwab e Bartholdi⁷⁹ revisaram, em 1996, os mecanismos envolvidos na degeneração e regeneração axonal após lesão medular em mamíferos e humanos.

Ressaltaram que o futuro das pesquisas deveria buscar idealmente a redução do dano secundário associado com a otimização do uso das conexões remanescentes, aumento da plasticidade e regeneração a longa distância dos axônios lesados.

Gebrin et al.^{80,81} (1997), em revisão da literatura, indicaram a metilprednisolona como droga com efeitos positivos comprovados e citaram o gangliosídeo (G(M1)) como substância eficiente na recuperação de pacientes com lesões crônicas do sistema nervoso central. Concluíram que axônios íntegros, mesmo em quantidade reduzida, podem propiciar integridade de arco reflexos viscerais, como vesical, sexual e intestinal e que 10% de axônios remanescentes podem oferecer condições de marcha para o paciente.

Bracken et al.⁸² (1997), em ensaio clínico randomizado duplo-cego, multicêntrico, concluíram que pacientes com lesão medular aguda que recebem metilprednisolona nas primeiras 3 horas devem manter o tratamento por 24 horas, enquanto nos pacientes que recebem o tratamento entre 3 e 8 horas, a metilprednisolona deve ser mantida por 48 horas.

Lucas et al.⁸³ (1998) avaliaram se a glutathione é um fator importante na sobrevivência dos neurônios medulares de mamíferos em um modelo de trauma *in vitro*. Seus resultados indicaram que o nível de glutathione é um fator determinante na sobrevivência dos neurônios medulares após trauma físico, e que a suplementação de glutathione poderia ser uma intervenção efetiva na lesão medular aguda.

O modelo experimental com o NYU-Impactor foi padronizado no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) do IOT-HC-FMUSP por **Rodrigues**²³ (1999), 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). Em seus resultados, o autor verificou correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Concluiu que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos, sendo este o modelo atualmente utilizado em nosso laboratório.

Yoon et al.⁸⁴ (1999) comprovaram que, em lesão medular produzida pelo sistema NYU-Impactor, uma dose única de 30 mg/kg de metilprednisolona, aplicada 10 minutos após o trauma medular, reduz significativamente o volume de lesão em 24 horas, quando comparado com o grupo controle. Os autores concluíram que, nesse modelo de lesão medular, a janela terapêutica é muito curta.

Na revisão de **Amar e Levy**¹⁹ (1999), o foco foi a patogênese e estratégias farmacológicas para atenuar o dano secundário na lesão medular aguda. Os autores afirmaram que os conceitos de lesão primária e secundária estavam bem estabelecidos e tinham amplas implicações no tratamento da lesão medular aguda. Avaliaram os efeitos de vários agentes farmacológicos, entre eles dos glicocorticoides, lazeroides, gangliosídeos, antagonistas dos opioides, bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas dos receptores do glutamato, agentes antioxidantes, radicais livres e outros agentes farmacológicos em experimentos em modelos animais e humanos. Os autores concluíram que esses agentes poderiam ser úteis, principalmente em estratégia combinada de uso.

No ano seguinte (2000), **Metz et al.**⁸⁵ sugeriram haver uma correlação entre as lesões medulares provocadas em ratos nos modelos experimentais e as lesões traumáticas em humanos, ao compararem parâmetros funcionais, eletrofisiológicos e morfológicos. Os autores concluíram que as técnicas para avaliação da extensão e gravidade da lesão do sistema nervoso central em ratos e humanos são comparáveis e indicam que o rato pode servir como um animal adequado para pesquisa de alterações morfológicas e funcionais após lesão do SNC, assim como para avaliação de novas estratégias terapêuticas.

Revisando a literatura com metodologia de medicina baseada em evidências, **Hurlbert**⁸⁶ (2000) mostrou 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, considerando a metilprednisolona como uma droga sob investigação.

No ano seguinte, **Short**⁸⁷ (2001) 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 a fim de melhorar a recuperação neurológica. Em contrapartida, no mesmo ano, em outra revisão, **Taoka et al.**⁸⁸ (2001) 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, destacando a ação da metilprednisolona e do G(M1).

Hall⁸⁹ (2001) aprofundou esse exame da literatura, demonstrando que a maioria das lesões medulares não é composta de lesões completas e que nelas parte da substância branca permanece íntegra. Salientou que a recuperação neurológica depende da intervenção na prevenção da lesão secundária, para preservar as estruturas que permaneceram íntegras após a lesão primária. Concluiu que a metilprednisolona era a única droga que, em altas doses, melhorava a função neurológica em animais.

Kamencic et al.⁹⁰ (2001) quantificaram o dano medular após lesão medular contusa em ratos e avaliaram se ocorre aumento da síntese da glutathiona e diminuição do estresse oxidativo através do uso de composto de procisteína. Em seu estudo, concluíram que esse aumento da síntese de glutathiona levou a grande diminuição do estresse oxidativo e possibilitou a preservação tecidual após lesão medular contusa experimental.

Lucas et al.³⁹ (2002) demonstraram que, após a lesão medular, há uma depleção celular progressiva dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e aumento da forma oxidada (GSSG), principalmente na primeira hora após o trauma inicial. Essa alteração da relação se dá pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), a partir de fatores pró-inflamatórios e de lesão das organelas e membrana citoplasmática. Após esse período crítico, o aumento do stress oxidativo celular sem mecanismos de controle leva ao aumento da lesão, caracterizando a lesão secundária.

Em 2002, **Vialle et al.**⁹¹ propuseram um protocolo de avaliação funcional motora a partir de testes de um modelo de escala de avaliação locomotora para a lesão medular. Utilizando dois grupos de 10 ratos, submeteram o primeiro grupo à lesão

medular após laminectomia ao nível de T9–T10 pelo sistema NYU Impactor, estabelecendo peso de 10 g e altura de 25 mm. O segundo grupo, utilizado como controle, sofreu apenas laminectomia sem lesão do saco dural. Os autores avaliaram a função locomotora dos animais no 7º, 14º e 21º dia após a lesão medular, realizando seis testes. Concluem que o modelo de avaliação testado é eficaz e quantificam de maneira satisfatória a recuperação das funções locomotoras em três dos seis testes.

Ainda em 2002, **Moshonkina et al.**⁹² (2002), em estudo experimental com ratos, observaram que os animais treinados em esteiras rolantes iniciaram o comportamento motor de membros inferiores mais rapidamente que o grupo de ratos controles, com maior atividade motora em 9 semanas de acompanhamento.

Em artigo de revisão, **Kessler e Keirstead**⁹³ (2003) enaltecem a importância da avaliação funcional como desfecho mensurável em modelos de experimentação animal com lesão medular. Afirmaram que a interpretação adequada dessa avaliação é crítica para a extrapolação dos achados frente a sua possível relevância clínica.

Em revisão de literatura publicada em 2004, **Edgerton et al.**⁹⁴ demonstraram que o treinamento na esteira resulta em melhor recuperação funcional em modelos animais submetidos à lesão completa da medula espinal.

Norenberg et al.⁹⁵ (2004) discutiram as diferenças entre humanos e animais de experimentação, sugerindo que, para a continuidade dos estudos experimentais a respeito da patogênese e terapêutica da lesão medular, seria necessário um melhor entendimento das respostas patológicas em humanos.

Guízar-Sahagún et al.⁹⁶ (2005) avaliaram o emprego da glutatona intraperitoneal em modelos animais de ratos submetidos à contusão medular utilizando o sistema NYU Impactor. Concluíram que o uso precoce da glutatona intraperitoneal após contusão/compressão moderada da medula apresenta melhores resultados histológicos e funcionais do que a metilprednisolona e o placebo.

López-Vales et al.⁹⁷ estudaram, em 2005, a eficácia do tacrolimo (FK 506) em reduzir o dano tecidual secundário, após um trauma raquimedular contuso em modelo

animal comparado ao uso de metilprednisolona intraperitoneal e soro fisiológico, após realizarem trauma contuso medular em ratos ao nível de T8. Num grupo adicional, além do FK 506 em bolo, foi injetada uma dose diária 10 vezes menor que a dose inicial. Como parâmetros de recuperação funcional, foram avaliados a caminhada em campo aberto, o teste em plano inclinado, o potencial evocado motor e a observação de reflexos por 14 dias após a cirurgia. Os animais tratados com FK 506 demonstraram, com significância estatística, melhores resultados na função neurológica e amplitude de potencial evocado motor quando comparados aos controles, sugerindo que o FK 506 teria ação neuroprotetora após a lesão medular.

Ying et al.⁹⁸ (2005) realizaram experimento em animais submetidos à lesão medular contusa e concluíram que o exercício restaura os níveis de neurotrofinas, melhorando, assim, a plasticidade sináptica. **Cha et al.**⁹⁹ (2007) demonstraram 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.

Marcon¹⁰⁰ testou, em 2006, em estudo experimental de lesão medular em ratos *Wistar*, utilizando o modelo de queda de peso com NYU-Impactor, o uso profilático, ou seja, prévio ao trauma, de metilprednisolona. Não observou nenhum efeito benéfico da utilização prévia ao trauma raquimedular bem como descreveu possíveis complicações associadas ao uso da droga.

Genovese et al.¹⁰¹ (2007) buscaram determinar o papel da glutatona endógena em ratos submetidos à lesão medular traumática em modelos experimentais. Utilizando substâncias inibidoras da atuação da glutatona, encontraram piores resultados funcionais e histológicos em comparação ao grupo controle, concluindo que a glutatona tem papel importante contra o dano secundário das lesões medulares traumáticas.

Martinon et al.¹⁰² (2007) estudaram o efeito da glutatona em combinação a neuropeptídeos no cenário da lesão medular contusa em ratos. Observaram que a combinação de glutatona com neuropeptídeos levaram a maior recuperação motora e maior número de axônios mielinizados na contagem histológica, enquanto o

emprego dos neuropeptídeos, em dose dobrada sem o uso da glutathione, apresentou efeito contrário.

Heng e de Leon¹⁰³ (2009) realizaram estudo em ratos submetidos à lesão medular grave, demonstrando resultados semelhantes de recuperação funcional entre o grupo controle e o grupo submetido ao treinamento em esteira, quando considerado o apoio bipedal. Contudo, apenas os ratos submetidos à intervenção por treinamento em esteira após a lesão da medula espinal apresentaram padrão da trajetória e características de velocidade do movimento de marcha similares ao ciclo normal de marcha.

Foret et al.²⁵ (2010) caracterizaram os efeitos do exercício físico na esteira sobre as células-tronco neurais endógenas (células ependimais) de ratos adultos. Observaram que o exercício melhora a recuperação funcional e a micção autônoma, além de promover a expressão de nestina tanto nos ratos com lesão medular como nos controles, identificando uma correlação positiva entre a recuperação da locomoção e o número de células positivas para nestina.

Marcon et al.¹⁰⁴ (2010) demonstraram, em ratos submetidos à lesão medular experimental, que existe papel sinérgico da associação do tratamento do gangliosídeo G(M1) com a terapia de oxigênio em câmara hiperbárica.

Yousuf et al.¹⁰⁵ investigaram, em 2011, os efeitos neuroprotetores da ciclosporina A e do FK 506 no processo oxidativo na substância branca, após lesão medular experimental em ratos utilizando quatro grupos de animais. Os autores submeteram três grupos a condições de hipóxia por 1 hora. Todos os grupos com lesão da medula foram tratados com ciclosporina A e FK 506 e comparados com o grupo controle. Após a hipóxia, foi realizada reperfusão por 2 horas e os tecidos, logo em seguida, foram processados e analisados em relação aos níveis de glutathione, ao edema mitocondrial, aos níveis de ATP (adenosina trifosfato) mitocondrial, de mieloperoxidase, de peroxidação lipídica e de cálcio. Os autores concluíram que tanto a ciclosporina A quanto o FK 506 restauram as reservas depletadas de ATP mitocondrial, inibem o aumento de volume mitocondrial e diminuem os índices de oxidação com elevação da glutathione, um poderoso antioxidante intracelular,

sugerindo que o uso de FK 506 e a ciclosporina A resultam em efeitos antioxidantes protetores das células.

Em 2011, **Santos et al.**¹⁰⁶ padronizaram o modelo de lesão medular e de avaliação motora utilizado no laboratório LETRAN (Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos). Utilizaram 20 ratos Wistar divididos em quatro grupos, diferenciando o nível de gravidade da lesão raquimedular, realizando lesões intermediárias padronizadas, através do sistema do MASCIS: Grupo 1 - 12,5 mm (lesão leve); Grupo 2 - 25 mm (lesão moderada); Grupo 3 - 50 mm (lesão grave); Grupo 4 - animais que não sofrem lesão (grupo controle). Após 48 horas, os autores avaliaram a função motora, segundo a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Concluíram que o modelo de lesão medular utilizando o sistema MASCIS e a avaliação funcional proposta por Basso, Beattie e Bresnahan é confiável e reprodutível, possibilitando que diferentes pesquisadores possam comparar seus resultados.

Fouad et al.¹⁰⁷ (2011), em revisão de literatura, concluíram que não existia, até então, terapia verdadeiramente efetiva no tratamento da lesão medular. Comentaram sobre as novas possibilidades envolvendo a neuroplasticidade como enfoque de futuros trabalhos.

Miranda et al.¹⁰⁸ (2012) estudaram o treinamento de ratos 3 dias após a lesão medular contusa, utilizando o modelo padronizado com o NYU-Impactor. Os animais foram submetidos a três cenários distintos: uma pista, um labirinto e uma rampa. Embora o estímulo tenha promovido a recuperação funcional dos espécimes, essa melhora não se fez aparente nos exames histológicos. Os grupos submetidos ao percurso na rampa e no labirinto tiveram melhora funcional mais precocemente e maior. Contudo, os grupos se igualaram ao longo do tempo, demonstrando que o exercício pode não ser suficiente para manter a recuperação por longo tempo⁹⁹.

Cheriyen et al.¹⁰⁹ (2014), em revisão sistemática, buscaram consolidar o conhecimento até então sobre modelos experimentais animais e introduzir novos paradigmas nesse campo de pesquisa. Indicaram que embora os modelos com roedores permanecessem os mais comumente empregados e melhores para estudos

preliminares, estudos em grandes animais e primatas poderiam se aproximar mais dos efeitos da lesão medular em humanos.

Em 2015, **Lv et al.**¹¹⁰ investigaram os efeitos da alicina na função motora e alterações histopatológicas após a lesão medular e o mecanismo desses efeitos em ratos. Seus resultados sugeriram que a alicina promove a recuperação funcional em ratos submetidos à lesão medular, por conta dos efeitos antioxidantes, antiapoptóticos e anti-inflamatórios.

Kjell et al.¹¹¹ (2016) discutiram as vantagens e desvantagens dos modelos experimentais com ratos no cenário da lesão medular e destacaram o conhecimento adquirido com esses modelos. Ressaltaram que apesar das limitações, poucos outros modelos de desordens e doenças neurológicas são tão relevantes e robustos na translação de conhecimento como os modelos baseados no uso de ratos, possibilitando que muitas intervenções terapêuticas previamente estudadas nesses modelos sejam estudadas em ensaios clínicos.

Yang et al.¹¹² (2016), em revisão sistemática, investigaram os efeitos antioxidantes e a recuperação neurológica promovida pelo uso da melatonina em modelos experimentais de lesão medular com ratos. Indicaram que o uso da melatonina nesses modelos promoveu 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 terapia no cenário da lesão medular traumática.

Sharif-Alhoseini et al.¹¹³ (2017) buscaram prover uma estrutura compreensiva dos modelos animais contemporâneos para o estudo da lesão medular e categorizá-los com base nos objetivos, padrões e graus de lesão através de revisão sistemática. Determinaram que os modelos de contusão e compressão são mais adequados para simular a biomecânica e neuropatologia da lesão medular em humanos, enquanto os modelos de transecção são mais adequados para estudos de regeneração anatômica. Também apontaram que os roedores são os mais frequentemente usados e provavelmente que melhor se encaixam como modelos para estudos de lesão medular preliminares.

Du et al.¹¹⁴ (2018) avaliaram o efeito protetor e a capacidade de abreviar o processo inflamatório e o stress oxidativo com o uso do oxyresveratrol em modelos experimentais com ratos. Apontaram que essa substância é capaz de promover a recuperação neurológica, diminuindo o processo inflamatório e o stress oxidativo pela via do fator estimulador de colônias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF), síntese de óxido nítrico (iNOS), ciclooxigenase 2 (COX-2) e fator nuclear eritrocitário (Nrf-2).

Durdag et al.¹¹⁵ (2018), em modelo experimental de isquemia medular com coelhos, apreciaram os efeitos antioxidantes da vigabatrina tanto em baixas doses como em altas doses. Demonstraram que o uso de vigabatrina em baixas doses apresenta efeito neuroprotetor na isquemia medular de forma estatisticamente significativa, enquanto o seu uso em altas doses não apresentou efeito neuroprotetor adicional e apresentou efeitos neurotóxicos em avaliação histopatológica.

Ma et al.¹¹⁶ (2018) pesquisaram o uso do eugenol, um importante composto fenol encontrado em óleos essenciais, em modelos de lesão medular com ratos, utilizando a escala BBB para avaliar a função locomotora e o reflexo de retirada para avaliar alodínea mecânica e hiperalgesia térmica. Sugeriram que o eugenol apresenta efeito neuroprotetor na lesão medular traumática através da diminuição da via de sinalização de fatores pró-inflamatórios.

Yang et al.¹¹⁷ (2019) estudaram o uso de proteínas análogas a determinadas formas de microRNA em modelos experimentais de lesão medular contusa com ratos. Essas formas proteicas são importantes reguladores para o desenvolvimento e atividade neuronal, sendo que a expressão do microRNA MiR-129-5p encontra-se depletado nas lesões medulares com isquemia e reperfusão. Os autores demonstraram que a promoção da expressão de MiR-129-5p, no cenário da lesão medular aguda experimental em ratos, levou a melhor recuperação funcional, menor necrose tecidual e apoptose celular.

Xu et al.¹¹⁸ (2020), em metanálise, avaliaram a recuperação neurológica e os efeitos antioxidantes do resveratrol em modelos experimentais com ratos. O resveratrol é um composto polifenol, encontrado especialmente nas sementes das uvas, na película da uva preta e no vinho, com capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica e ocasionar recuperação neurológica potencial, efeitos

antioxidantes e efeitos anti-inflamatórios após a lesão medular. Os autores demonstraram que a intervenção com resveratrol no ambiente da lesão medular aguda em modelos experimentais com ratos pode melhorar a recuperação neurológica funcional e efeitos antioxidantes.

Hosseini et al.¹¹⁹ (2020) realizaram revisão sistemática e metanálise de modelos animais avaliando o efeito da vitamina C e E avaliando a recuperação da função motora após lesão medular. Concluíram que a suplementação de vitamina C e E melhorou significativamente a recuperação da função motora em modelos animais, sendo que a vitamina C apresentou esse resultado apenas quando empregada de forma intraperitoneal. O tratamento com a combinação de ambas não demonstrou maior eficácia do que quando utilizadas de forma isolada.

Hazzaa et al.¹²⁰ (2021) avaliaram o uso de duas substâncias no tratamento da lesão por isquemia e reperfusão em modelo experimental com ratos, a L-carnitina e a atorvastatina. Demonstraram que na lesão por isquemia-reperfusão os níveis de GSH estão diminuídos, assim como de outras substâncias antioxidantes, como a superoxidase dismutase e a catalase. Concluíram que o uso da L-carnitina associado à atorvastatina apresentaram os melhores resultados nos estudos histológicos e melhora da função neurológica.

Kim et al.¹²¹ (2021) estudaram a diferença como a quiralidade molecular da glutatona pode interferir no seu efeito supressor da inflamação após a lesão medular traumática. Descobriram que glutatona quiral direita apresenta melhores resultados na supressão inflamatória e leva a maior regeneração neurológica do que a glutatona quiral esquerda, revelando um potencial papel da glutatona quiral em diferentes patologias.

Stewart et al. (2022)¹²² investigaram, em modelo experimental com ratos, como os níveis medulares de glutatona antioxidante (GSH) e sua regulação se alteram com a idade e lesão medular traumática. Identificaram uma redução na capacidade de defesa antioxidante em idades mais avançadas no momento da lesão medular traumática. Sugeriram que futuros trabalhos poderiam revelar como a idade como uma

variável biológica afeta o tratamento com N-acetilcisteína - um precursor da glutathione - em modelos animais de lesão medular traumática.

Wyss et al.¹²³ (2022) examinaram os níveis dos metabólitos da glutathione na ponte cerebral na lesão medular incompleta subaguda em humanos e compararam com controles saudáveis. Encontraram uma associação entre a concentração de metabólitos de glutathione na ponte cerebral e melhora dos escores motores de reabilitação com 10 semanas da lesão. Sugeriram que a avaliação dos níveis de glutathione pontina tem correlação direta com escore funcionais clínicos e poderia ser uma ferramenta benéfica durante a avaliação da reabilitação.

3. MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Ética

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e de Traumatologia (IOT) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por meio da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo de pesquisa número no 956/2018) (**anexo A**).

Os pesquisadores seguiram de forma estrita a ética e os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)¹²⁴ e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)¹²⁵.

3.2 Estrutura física

Foram utilizadas a estrutura do Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) e da Divisão de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) para acomodação dos ratos, realização dos procedimentos de laminectomia e lesão medular nos grupos necessários, a terapia farmacológica, a realização da análise motora e a eutanásia. A análise histológica foi realizada no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo.

3.3 Animais de experimentação

Foram selecionados 40 ratos da raça Wistar, todos machos, com peso variando de 267g a 412g e com aproximadamente 60 dias de vida pós-natal, todos pesados ao início e ao final do estudo. Os animais foram obtidos do Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) do IOT-HC-FMUSP, com temperatura controlada (20-22°C), ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Todos os ratos foram avaliados quanto ao estado geral (pelagem e estado clínico normais) e às condições de motricidade, assegurando que todos tivessem capacidade de movimentação normal para evitar viés de seleção no início do estudo. Foram acondicionados até cinco ratos de uma mesma ninhada por gaiola (40 cm x 60 cm x 17 cm), e submetidos manuseio contínuo antes da lesão medular experimental para acostumá-los aos experimentadores e para estimulá-los a movimentarem-se (condicionamento), facilitando a avaliação da capacidade motora após a lesão experimental.

3.3.1 Critérios de inclusão

Para a seleção dos ratos a serem submetidos à lesão medular, seguimos os critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos por **Rodrigues**²³ (1999) e **Santos et al.**¹⁰⁶ (2011) e utilizados no LETRAN, conforme segue:

- a) Ratos da linhagem Wistar, machos e adultos jovens;
- b) Peso entre 250 e 450 gramas, inclusive;
- c) Pelagem normal sob inspeção visual;
- d) 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 normal de acordo com o BBB.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram estabelecidos como critérios de exclusão:

- a) Óbito após lesão medular;
- b) Alterações cutâneas na área de incisão (observadas macroscopicamente);
- c) Autofagia ou mutilação entre os animais;
- d) Infecção profunda e refratária a antibioticoterapia após lesão;
- e) Infecção na urina diagnosticada pela presença de sangue na urina refratária ao tratamento com antibióticos por 10 dias;
- f) Movimentação normal na primeira avaliação (21 pontos na escala funcional Basso, Beattie e Bresnahan - BBB) após lesão medular nos grupos submetidos à lesão medular experimental;
- g) Diferença de pontuação entre as patas traseiras superior a três pontos após lesão medular (Adotou-se como padrão de análise o menor valor entre os lados ou o de maior deficit motor segundo as orientações internacionais da Ohio State University).

3.4 Grupos experimentais

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com a fórmula $N = [4 \cdot z_{crit}^2 + z_{pwr}^2] / D^2$ (Eng, 2003), em que N é o número de ratos por grupo, σ é o desvio padrão

assumido de cada grupo (que assumimos ser 20%, igual para cada grupo acima discriminado), z_{crit} é o valor correspondente ao critério de significância (neste estudo igual a 0,05), z_{pwr} é o valor correspondente ao poder estatístico (neste estudo igual a 0,90) e D é a diferença mínima esperada entre duas médias (que assumimos como 45%). Com esses parâmetros, temos que o número de ratos calculado por grupo foi de 8,3, o qual foi arredondando para o próximo número inteiro, totalizando nove ratos por grupo. Devido à dificuldade da cirurgia, foi adicionada uma margem no número de animais de 10%, totalizando 10 animais por grupo.

Os ratos foram distribuídos, por sorteio simples, em quatro grupos de 10 animais cada, todos submetidos à laminectomia e três grupos submetidos à lesão medular subsequente, conforme descrito adiante:

- a) Grupo 1 Laminectomia + Lesão Medular sem intervenção – ratos submetidos à laminectomia e à lesão medular contusa sem qualquer tipo de intervenção para controle;
- b) Grupo 2 Laminectomia + Lesão Medular Contusa + administração intraperitoneal de soro fisiológico 0,9% (SF) – ratos submetidos à lesão medular e à administração de soro fisiológico 0,9% (SF) para comparação com grupo de intervenção - grupo controle/placebo;
- c) Grupo 3 Laminectomia + Lesão Medular Contusa + administração intraperitoneal de glutathione (8 mg/kg) – ratos submetidos à lesão medular e à administração intraperitoneal de glutathione (GSH);
- d) Grupo 4 – ratos submetidos somente à laminectomia, sem sofrimento de lesão medular e sem qualquer tipo de intervenção.

Tabela 1 - Protocolo de intervenções nos grupos de estudo

Grupos	Número de ratos	Resumo de intervenção
Grupo 1 - laminectomia + lesão medular	10	Lesão medular sem intervenção
Grupo 2 - laminectomia + lesão medular + SF	10	LM; 1 ml de SF 0,9% com 5 minutos
Grupo 3 - laminectomia + lesão medular + glutathiona (GSH)	10	LM; 8mg/kg glutathiona (GSH) com 5 minutos
Grupo 4 - laminectomia sem lesão medular (SHAM)	10	Sem lesão medular
Total	40	

LM= lesão medular; SF = soro fisiológico; GSH= glutathiona

Os grupos foram definidos segundo o protocolo internacional de diretrizes para pesquisa e publicação em animais: Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE)¹²⁶. O grupo 4 (laminectomia sem lesão medular) é utilizado como controle negativo do procedimento cirúrgico, enquanto o Grupo 1 (laminectomia com lesão medular sem intervenção com veículo) é utilizado como controle negativo da intervenção.

3.5 Modelo experimental de lesão medular

3.5.1 Protocolo de anestesia

Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina e 50 mg/kg de quetamina por via intraperitoneal e, para anestesia local, foi utilizado o cloridrato de lidocaína com epinefrina (adrenalina). Os reflexos palpebral e pupilar foram monitorizados para manter o animal em plano anestésico; quando necessário, foi realizada a administração de um terço da dose inicial como reforço anestésico. O plano anestésico profundo foi, ainda, confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda e patas traseiras.

3.5.2 Profilaxia infecciosa e analgesia

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 3 dias seguintes.

Após a cirurgia, foram ministrados aos ratos 2 mg/kg de meloxicam (anti-inflamatório não hormonal) uma vez ao dia, por 7 dias, e 5 mg/100 gramas de cloridrato de tramadol (opioide) por via intramuscular, por 5 dias, para alívio da dor. Todos os grupos foram submetidos ao protocolo de antibioticoprofilaxia e analgesia pelo mesmo período, para que não houvesse viés nas avaliações comportamentais.

3.5.3 Laminectomia

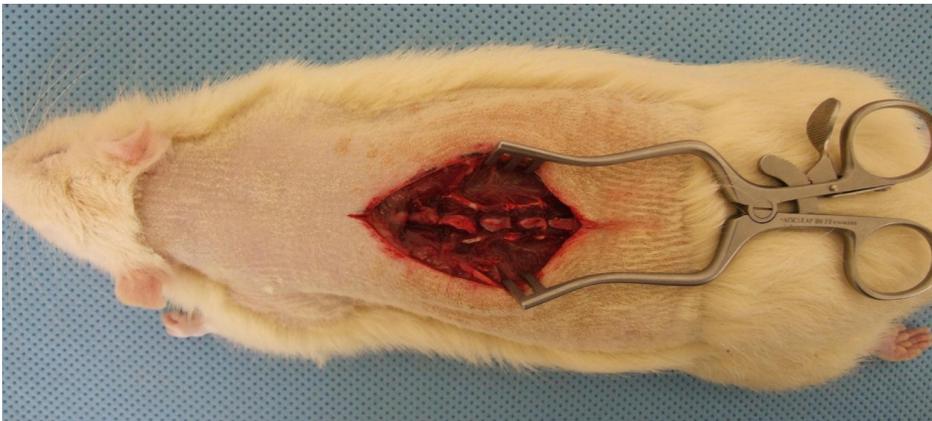
Todos os ratos foram submetidos à laminectomia, inclusive no grupo que não houve lesão medular, conforme a técnica cirúrgica estabelecida no Instituto de Ortopedia e Traumatologia^{23,106}, para a exposição da medula, com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Inicialmente foi realizada a tricotomia no local da incisão no dorso de cada rato (**figura 1**). Para determinar o nível de incisão, foi identificada a última costela, correspondente a T12, e palpados os processos espinhosos de T8 a T12. Após a demarcação, foi realizada uma incisão de pele, de aproximadamente cinco centímetros, na linha média dorsal para expor a coluna vertebral de T8 a T12 (**figura 2**), com subsequente afastamento dos músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas de T10 a T11. A hemostasia foi realizada com coagulador bipolar, quando necessário. O processo espinhoso e a lâmina de T10 foram ressecados, assim como a metade distal do processo espinhoso de T9, com um saca-bocados. A exposição do saco dural foi completada com a realização da laminectomia (**figura 3**), com um tamanho necessário para obter uma margem de segurança, em torno de 0,2 mm, e acomodar adequadamente a extremidade da haste do equipamento computadorizado de impacto. Em seguida, o animal foi posicionado no equipamento computadorizado NYU-Impactor para produzir a contusão medular controlada.

Figura 1 - Tricotomia e demarcação da incisão



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 2 - Dissecção da coluna vertebral



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 3 - Exposição medular após laminectomia

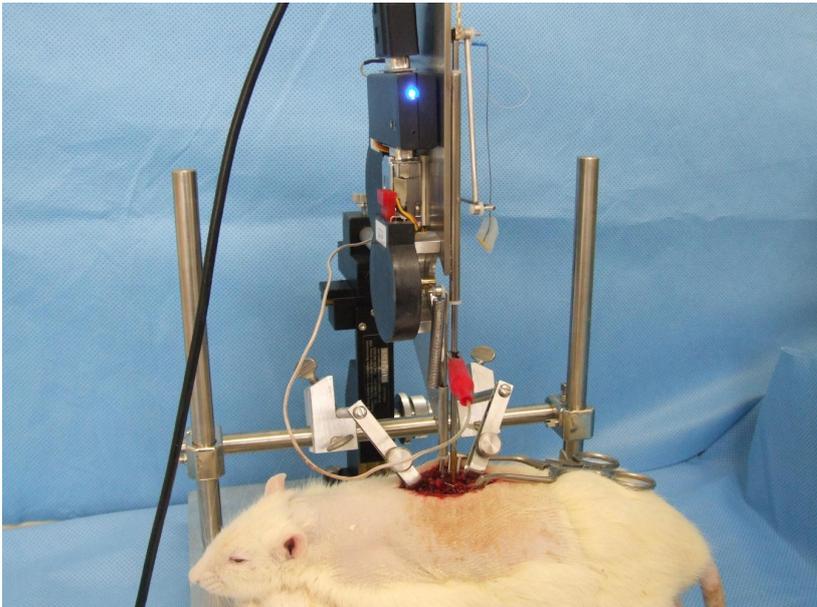


Fonte: Acervo pessoal do autor

3.5.4 Contusão medular

A contusão medular experimental foi realizada utilizando o sistema NYU Impactor⁷⁸, para efetuar e monitorar a contusão medular (**figura 4**), de acordo com o protocolo detalhado já estabelecido e padronizado no laboratório segundo o modelo de lesão medular MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), padronizado para ratos Wistar^{23,106}.

Figura 4 - Sistema NYU Impactor, com microcomputador acoplado ao sistema de impacção e com um animal acomodado sobre uma esponja momentos antes do procedimento de lesão



Fonte: Acervo pessoal do autor

Os ratos foram posicionados no equipamento computadorizado de impacto por queda de peso. Os processos espinhosos de T8 e T11 foram fixados com presilhas e o animal acomodado sobre uma esponja (**figura 5**). Ajustou-se a haste do equipamento na posição zero (inicial) e prendeu-se a garra de base na margem da ferida cirúrgica. A extremidade da haste do equipamento foi centralizada entre T9 e T10, e ajustada para obter um impacto direto na medula; o contato foi confirmado por sinal sonoro e luminoso emitido pelo equipamento. As lesões produzidas foram classificadas como moderadas, nas quais o equipamento é configurado para uso de uma haste de 10 g, disposta à altura predeterminada de 25 mm. O NYU-Impactor dispõe ainda de tubo-guia para a queda da haste e de sistema de monitoração de posição, velocidade de queda, exato instante e período de contato, deformação da coluna e deformação absoluta e relativa da medula. Para isso, é acoplado a dispositivos de interface (instrumentação), microcomputador com monitor, placa de

interface com saída paralela e temporizador. Essas características permitem que se produza uma lesão medular eficaz e reprodutível.

Após a lesão, o animal era colocado em uma superfície aquecida e o sítio de lesão medular (ou de laminectomia, no caso do grupo sem lesão medular) era inspecionado e lavado com soro fisiológico em temperatura ambiente, procedendo-se à hemostasia de qualquer sangramento presente. A ferida cirúrgica foi suturada por planos com fio de nylon monofilamentado (2.0) (**figura 6 e 7**)¹⁰⁶ e foi aplicada uma camada da pomada Fibrase (associação de fibrinolisa, desoxirribonuclease, cloranfenicol).

Figura 5 - Animal fixo por presilhas após contusão medular



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 6 - Aspecto após sutura de partes moles



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 7 - Aspecto após sutura de pele



Fonte: Acervo pessoal do autor

3.5.5 Cuidados após procedimento cirúrgico

Os animais receberam profilaxia com antibiótico Cefazolina sódica e analgesia com Meloxicam (anti-inflamatório não hormonal) e cloridrato de tramadol (opioide) por via intramuscular conforme protocolo descrito previamente. Nos casos com sinais de infecção na ferida operatória, o uso do antibiótico foi prolongado por 7 dias. Não houve nos grupos sinais de sangue na urina que poderiam servir de motivo para exclusão do estudo e eutanásia por configurar sinal de infecção intratável segundo o protocolo, para evitar contaminação de outros animais. Ração e água *ad libitum* foram oferecidos logo que o animal acordou.

Devido à lesão medular, a bexiga foi esvaziada duas vezes ao dia, por compressão vesical manual, 6 e 24 horas após a lesão, e diariamente quando necessário até o momento da eutanásia, de acordo com as necessidades individuais de cada animal, até que o animal recuperasse a função de urinar espontaneamente. A urina era verificada quanto à coloração e odor para diagnóstico de infecção do trato urinário. A hidratação foi avaliada segundo o turgor da pele.

Os animais foram transferidos para uma câmara com temperatura controlada (25 graus Celsius) e acondicionados em gaiolas plásticas forradas de 60 x 40 cm. Colocou-se, no máximo, cinco ratos em cada gaiola, sob condições adequadas de higiene, de alimentação e de hidratação. Os animais foram mantidos numa gaiola durante o experimento para melhor familiarização e redução da agressividade e das mutilações entre eles. Periodicamente era realizada a troca da maravalha e limpeza das gaiolas.

3.6 Intervenção experimental: tratamento com glutathiona (GSH)

A glutathiona (GSH) foi administrada aos ratos do grupo de intervenção por injeção intraperitoneal na dosagem de 8 mg/kg, imediatamente após a lesão medular e enquanto os animais ainda estavam sob efeito da anestesia e sedação. Os ratos do

Grupo 2 sofreram a lesão e receberam uma injeção intraperitoneal de soro fisiológico a 0,9%. O Grupo laminectomia com lesão medular e o Grupo laminectomia sem lesão medular não receberam nenhuma intervenção.

3.7 Avaliação funcional

A avaliação da função locomotora foi realizada seguindo o protocolo de avaliação motora pela escala BBB no 2º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias após a lesão medular contusa, e o protocolo de Escada Horizontal no 2º dia de pós-operatório, e com 2, 4 e 6 semanas.

3.7.1 Avaliação da capacidade locomotora segundo a escala BBB

A escala Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)^{19,77,78} tem uso padronizado no LETRAN¹⁰⁶ e é a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora em ratos com lesão medular nos níveis torácicos em estudos realizados pelo MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study)⁷⁷.

Baseados nos itens da escala BBB, observamos os movimentos da articulação do quadril, joelho e tornozelo e a posição do tronco, cauda e patas traseiras; foram atribuídos então pontos de zero a 21, sendo o zero correspondente à ausência total de movimentos e o 21 à presença de movimentos normais. Os animais eram observados simultaneamente por dois examinadores cegos quanto à origem do animal, previamente treinados quanto à ficha de pontuação, que contém 10 atributos de padrões de recuperação da função locomotora: 1) movimentação dos membros inferiores; 2) posição do tronco; 3) posição do abdome; 4) acomodação das patas; 5) marcha; 6) coordenação; 7) capacidade de limpar as patas; 8) posição predominante das patas traseiras; 9) instabilidade do tronco; 10) posição da cauda de acordo com os termos descritos na escala de avaliação (**anexo B**)^{77,78}.

Os examinadores possuíam uma planilha da escala de BBB em que realizavam anotações sistemáticas dos resultados, comparando as diferenças encontradas entre eles, para reaplicar o teste, caso necessário, assim, reduzindo o risco de erro de interpretação. Caso houvesse discordância entre as avaliações, decidiu-se pela anotação da menor nota. Os ratos foram observados por um tempo entre 4 e 5 minutos e, caso permanecessem imóveis por 15 a 20 segundos, eram estimulados a movimentar-se por meio de pequenos toques. A avaliação se deu com o animal dentro de uma caixa de observação de 80 x 80 cm e borda com 17 cm de altura, forrada com um campo cirúrgico azul escuro para maior contraste com a pelagem clara dos ratos.

3.7.2 Avaliação da capacidade locomotora segundo a Escada Horizontal

O método de avaliação funcional por meio da Escada Horizontal¹²⁷ se dá pela observação da movimentação do animal experimental em um plano horizontal formado por filetes de ferro de 0,4 cm de diâmetro dispostos a uma distância de 1,5 cm (**figura 8**). A plataforma apresenta 100 cm de comprimento e 35 cm de largura. Antes do início do experimento, os animais foram condicionados pelo treinamento de caminhar pela plataforma sendo que necessariamente deviam apoiar-se nos filetes de ferro para não cair. O teste tem por intuito analisar a função proprioceptiva dos animais. Como estímulo para os ratos cruzarem a plataforma, foi utilizado água com açúcar disposta no lado oposto em que o animal inicia a marcha. O mesmo estímulo foi mantido no teste pós-lesão da medula espinhal.

O desfecho analisado foi o número de acertos (passada com boa apreensão da pata traseira do rato ao filete de ferro). Os ratos percorreram a Escada Horizontal três vezes e a média de acertos foi calculada para a análise estatística final.

Figura 8- Imagem demonstrativa do protocolo de Escada Horizontal



Fonte: Acervo pessoal do autor

3.8 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia no 42º dia após a lesão, conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal¹²⁴. O procedimento foi realizado em três passos: anestesia, perfusão cardíaca e morte indolor. O protocolo utilizado foi publicado em “Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA”, em 2015, pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (**CONCEA, 2015**)¹²⁵. O método utilizado foi a exsanguinação dos ratos por perfuração cardíaca via toracotomia. Para tal, os animais devem encontrar-se inconscientes sob anestesia. Durante a exsanguinação, o ventrículo esquerdo é irrigado com soro fisiológico bombeado por bomba de infusão contínua controlada a 1ml/s, de modo a garantir a lavagem da medula espinal. Esse método melhora a qualidade dos cortes histológicos a serem **estudados (Scouten et al., 2006)**¹²⁸.

3.9 Estudo histológico

3.9.1 Remoção da medula espinhal

A coluna vertebral foi cuidadosamente retirada e cortada a partir de incisão dorsal extensa de T8 a T12 (cerca de 2,5 cm de extensão). Todas as estruturas ósseas e de partes moles adjacentes à medula foram removidas com saca-bocados, até expô-la completamente, de maneira que pudesse ser avaliada macroscopicamente no local da contusão para verificação de qualquer anomalia.

3.9.2 Análise histológica

As avaliações em microscopia foram realizadas por um único patologista, experiente e vinculado ao LETRAN, cego quanto à alocação dos animais nos grupos. A área identificada com lesão foi seccionada no plano axial de forma macroscópica em intervalos de dois milímetros, partindo da área central da lesão, em uma extensão de um centímetro.

A medula foi acondicionada em solução de paraformaldeído (PFA) tamponado a 4% e solução tampão por 24 horas e, em seguida, em sacarose a 20%, onde foi mantida até serem realizados os cortes histológicos. A medula foi fixada em papel cartão e identificada da seguinte maneira:

- a) Área “A”: região cranial (proximal) à lesão;
- b) Área “B”: região central com a contusão medular;
- c) Área “C”: região caudal (distal) à lesão.

O tecido medular foi fixado em formalina a 10%. Os fragmentos foram submetidos à desidratação em banhos de álcool, diafanização em xilol e à impregnação por parafina líquida. Cada fragmento foi bloqueado em parafina e

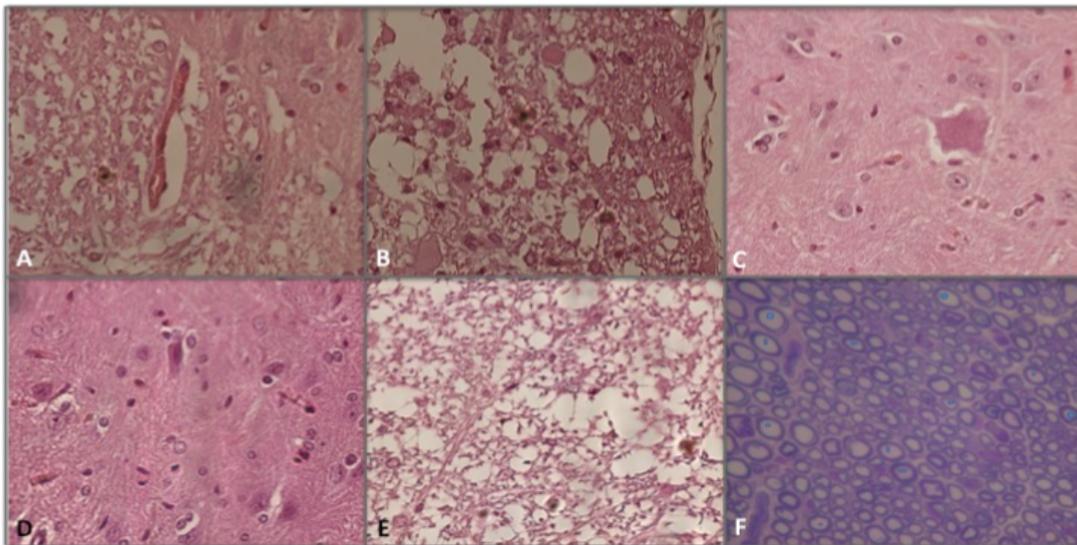
posteriormente identificado com sua topografia. Os blocos foram seccionados (cortes de 5 µm de espessura) com micrótomo (Leica RM 2055) e o material foi disposto em lâminas previamente banhadas em silane.

Os segmentos da medula (“A”, “B” e “C”) foram submetidos a dois tipos de análise histológica: a da lesão tecidual e a da regeneração axonal¹²⁹.

Para a análise qualitativa, as lâminas do segmento B, contendo cortes transversais da medula no epicentro da lesão e regiões próximas, foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Em seguida, classificaram-se as alterações anatomopatológicas como presente (P) e ausente (A), sendo avaliada a presença de: necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa e infiltrado celular. Atribuiu-se uma pontuação que varia de 0 a 3 (ausente, discreto, moderado e intenso) para cada um dos achados em cada corte da medula histologicamente estudado¹³⁰.

Para a análise quantitativa, as porções proximais (“A”) e distais (“C”) ao centro da lesão medular foram fotografadas, fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% e coradas com azul de toluidina a 1%, com boa representação das células, escolhidas de forma aleatória. Para as fotografias, foi utilizada objetiva de 40 vezes. Foram selecionados dois campos de cada segmento, escolhidos ao acaso pelo patologista. As fotos foram analisadas no *software* Sigma Scan Pro5.0 para a contagem das fibras dos axônios. Somente os neurônios com diâmetro igual ou maior do que 15 µm foram considerados para contagem¹³⁰. O número de axônios regenerados no segmento distal e o número dos axônios proximais foram aplicados à seguinte fórmula^{131,132}, para cálculo de um índice de regeneração axonal (IR): $IR = (\text{número de axônios no segmento distal} / \text{número de axônios no segmento proximal}) \times 100$.

Figura 9 - Cortes histológicos mostrando: A. infiltração; B. degeneração; C. hiperemia; D. hemorragia; E. Necrose (coloração por hematoxilina-eosina, aumento de 40 x); F. esquema de contagem dos axônios viáveis (pontos em azul, coloração por azul de toliudina, aumento de 100 x)



3.10 Análise estatística

Para compilação de dados, foram utilizadas planilhas do *software* Microsoft Excel for MAC e posteriormente foram exportados para o *software* SPSS 20.0 for MAC para análise dos dados.

O desfecho primário foi o índice BBB na avaliação do 42º dia. Os desfechos avaliação de plano horizontal e histológicos também passaram por análise estatística como desfechos secundários, sendo que a análise histológica com coloração por HE foi considerada medida subjetiva, e a contagem de neurônios, objetiva.

Toda a amostra foi testada quanto à sua distribuição normal. Como os quatro grupos de animais foram testados ao longo de sete momentos, os testes variaram

entre paramétricos e não paramétricos para medidas independentes e para medidas repetidas, dependendo de sua distribuição gaussiana ou não. Para análise entre os grupos, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, na comparação entre mais de dois grupos, e de Mann-Whitney, na comparação pareada entre dois grupos, e análise de variância (ANOVA) de uma via, para análise do BBB, da contagem de células e da análise histológica. Para análise do seguimento de cada grupo, foi utilizado o teste de ANOVA para medidas repetidas. Foi aceito o erro do tipo I com $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os quatro grupos de ratos foram submetidos às intervenções previstas sem intercorrências técnicas.

Durante a realização deste estudo, não houve perda de animais, sendo mantido o número de 10 ratos por grupo, conforme o padronizado no cálculo amostral.

Houve ganho de peso dos ratos em todos os grupos, mas não houve diferença estatística significativa comparando-se a média de ganho de peso entre os grupos estudados.

4.1. Análise funcional locomotora de BBB

A **tabela 2** mostra o resultado da avaliação funcional, segundo a escala locomotora de BBB, de todos os grupos no 2º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias após a lesão medular. A partir do 7º dia pós-lesão medular (DPLM), observou-se diferença com significância estatística na avaliação da função locomotora, em todos os quatro grupos, quando comparados os valores iniciais de BBB com os valores finais de cada rato ($p < 0,001$), e na comparação de melhora da função motora em relação às médias dos grupos, comparando-se o valor de BBB médio final com o valor médio inicial ($p < 0,001$).

Tabela 2 – Resultados do escore funcional BBB nos Grupos 1- Controle, Grupo 2 - SF, Grupo 3 - glutaciona e Grupo 4 - SHAM nos diferentes momentos de avaliação

	Rato	Dia 2 DPLM	Dia 7 DPLM	Dia 14 DPLM	Dia 21 DPLM	Dia 28 DPLM	Dia 35 DPLM	Dia 42 DPLM
Grupo 1	1	0	0	1	2	3	5	8
	2	0	1	1	2	3	7	12
	3	0	2	3	4	5	8	14
	4	0	1	2	7	6	11	13
	5	0	0	0	2	4	9	12
	6	0	1	2	4	6	7	10
	7	0	0	2	2	5	9	11
	8	0	2	3	3	7	10	14
	9	0	2	2	3	5	11	13
	10	0	0	2	3	3	9	12
Grupo 2	1	0	0	2	5	8	11	15
	2	0	0	2	4	7	9	11
	3	0	3	3	4	8	12	14
	4	0	1	2	6	7	9	12
	5	0	0	4	4	6	9	10

continua

continuação

	Rato	Dia 2 DPLM	Dia 7 DPLM	Dia 14 DPLM	Dia 21 DPLM	Dia 28 DPLM	Dia 35 DPLM	Dia 42 DPLM
	6	0	0	1	5	8	10	11
	7	0	2	2	5	9	11	15
	8	0	0	5	4	7	9	12
	9	0	0	2	5	8	11	13
	10	0	0	2	8	14	14	17
Grupo 3	1	0	0	3	6	12	15	15
	2	0	0	0	4	8	15	18
	3	0	0	4	6	13	12	13
	4	0	0	2	4	8	10	11
	5	0	3	2	3	7	9	12
	6	0	0	1	6	8	12	15
	7	0	1	1	5	6	15	17
	8	0	0	0	8	12	15	18
	9	0	0	1	5	13	16	17
	10	0	1	2	4	5	8	12
	1	21	21	21	21	21	21	21
	2	21	21	21	21	21	21	21

continua

Resultados

continuação

	Rato	Dia 2 DPLM	Dia 7 DPLM	Dia 14 DPLM	Dia 21 DPLM	Dia 28 DPLM	Dia 35 DPLM	Dia 42 DPLM
Grupo 4	3	21	21	21	21	21	21	21
	4	21	21	21	21	21	21	21
	5	21	21	21	21	21	21	21
	6	21	21	21	21	21	21	21
	7	21	21	21	21	21	21	21
	8	21	21	21	21	21	21	21
	9	21	21	21	21	21	21	21
	10	21	21	21	21	21	21	21

DPLM: dia pós-lesão medular

conclusão

As médias dos valores da avaliação BBB obtidos nos respectivos momentos de avaliação são representadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Média da avaliação funcional de BBB no Grupo 1 - Controle, Grupo 2 - SF, Grupo 3 - glutaciona e Grupo 4 - SHAM nos diferentes momentos de avaliação

	Grupos	N	Média	Desvio Padrão
Dia 2 (DPLM)	Grupo 1	10	0	0
	Grupo 2	10	0	0
	Grupo 3	10	0	0
	Grupo 4	10	21	0
Dia 7 (DPLM)	Grupo 1	10	0,9	0,876
	Grupo 2	10	0,6	1,075
	Grupo 3	10	0,5	0,972
	Grupo 4	10	21	0

continua

continuação				
	Grupos	N	Média	Desvio Padrão
Dia 14 (DLPM)	Grupo 1	10	1,8	0,919
	Grupo 2	10	2,5	1,179
	Grupo 3	10	1,6	1,265
	Grupo 4	10	21	0
Dia 21 (DLPM)	Grupo 1	10	3,2	1,549
	Grupo 2	10	5	1,247
	Grupo 3	10	5,1	1,449
	Grupo 4	10	21	0
Dia 28 (DLPM)	Grupo 1	10	4,7	1,418
	Grupo 2	10	8,2	2,201
	Grupo 3	10	9,2	3,011
	Grupo 4	10	21	0

continua

continuação				
	Grupos	N	Média	Desvio Padrão
Dia 35 (DLPM)	Grupo 1	10	8,6	1,897
	Grupo 2	10	10,5	1,65
	Grupo 3	10	12,7	2,908
	Grupo 4	10	21	0
Dia 42 (DLPM)	Grupo 1	10	11,9	1,853
	Grupo 2	10	13	2,211
	Grupo 3	10	14,8	2,658
	Grupo 4	10	21	0

DPLM = Dia Pós-Lesão Medular; SF = soro fisiológico; GSH = glutationa

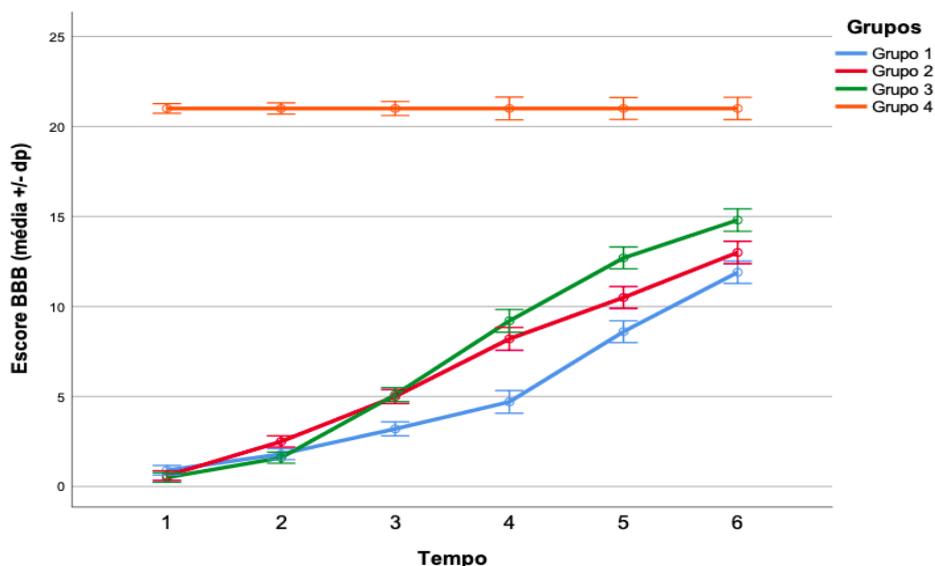
conclusão

No grupo de intervenção com glutatona, a melhora do BBB médio foi de 14,80 pontos ao final do período de estudo. Os grupos controle e SF apresentaram 11,90 pontos e 13,00 pontos de melhora, respectivamente. Não houve variação dentro da média do grupo SHAM, conforme esperado, por tratar-se de grupo sem lesão medular inicial.

Houve aumento progressivo na pontuação média do BBB em todos os momentos de avaliação em todos os grupos, como é demonstrado no **Gráfico 2**.

Foi realizado estudo estatístico dos resultados comparativos do BBB em cada momento, observando-se diferenças com significância estatística a partir do terceiro momento (14º dia) de avaliação ($p \leq 0,05$) entre os grupos. Através das comparações dois a dois, realizaram-se testes *post hoc* semanalmente entre os grupos para verificar significância estatísticas entre eles. Assim, comparando-se a média de melhora do BBB a cada semana, houve significância estatística entre todas as semanas dentro do mesmo grupo, com exceção do Grupo SHAM.

Gráfico 1 - Comparação da evolução do valor médio do escore BBB de cada grupo



Comparando-se a evolução semana a semana entre os grupos, não encontramos diferença estatística no primeiro momento de avaliação entre o Grupo 1 (laminectomia com lesão medular), Grupo 2 (laminectomia com lesão medular e SF) e Grupo 3 (laminectomia com lesão medular e GSH). Como não há lesão medular com deficit no Grupo SHAM, houve significância estatística entre todos os grupos e o mesmo em todos os momentos de avaliação.

Tabela 4 – Valores de p relativos à comparação nos diferentes momentos de avaliação entre a pontuação BBB dos quatro grupos

Grupos de comparação	Dia 2 (DPLM)	Dia 7 (DPLM)	Dia 14 (DPLM)	Dia 21 (DPLM)	Dia 28 (DPLM)	Dia 35 (DPLM)	Dia 42 (DPLM)
Grupo 1 x Grupo 2	1	0,857	0,119	0,002	0,0001	0,034	0,218
Grupo 1 x Grupo 3	1	0,718	0,651	0,001	0,0001	0,0001	0,002
Grupo 1 x Grupo 4	1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Grupo 2 x Grupo 3	1	0,993	0,047	0,857	0,27	0,015	0,047
Grupo 2 x Grupo 4	1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Grupo 3 x Grupo 4	1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

DPLM = Dia pós-lesão medular.

Na segunda semana, houve diferença estatística entre os grupos SF e glutatona, que não se mantiveram na terceira e quarta semana de avaliação. A partir

da quinta semana de avaliação, volta a existir diferença estatisticamente significativa entre o Grupo glutatona e o Grupo SF, com melhores resultados no grupo com intervenção com glutatona.

Comparando-se o Grupo 3 (GSH) com o Grupo 1 (Controle), podemos identificar melhores resultados de função avaliada através da média de BBB já a partir do 21º dia de avaliação - semana 3, mantendo-se dessa forma até o final do estudo.

Logo, ao final do período de estudo da função através do escore BBB, o grupo de intervenção - Grupo glutatona - apresentou melhores resultados que o Grupo Controle e SF com significância estatística. Contudo, como demonstrado pela diferença estatisticamente significativa encontrada entre o Grupo 3 e o Grupo 4, a recuperação funcional não atingiu o resultado prévio à lesão medular.

4.2. Análise funcional locomotora de Escada Horizontal

A **tabela 5** mostra o resultado funcional para o escore locomotor de Escada Horizontal na avaliação pré-operatória, no 2º dia de pós-operatório, e com 2, 4 e 6 semanas. Todos os grupos submetidos à lesão medular apresentaram queda dos resultados quando comparados os resultados pós-operatórios com a avaliação pré-operatória. A partir do 2º dia de pós-operatório, os grupos submetidos à lesão medular apresentaram melhora estatisticamente significativa quando comparados os seus resultados finais com o resultado no 2º dia após lesão medular. O Grupo 4, que não foi submetido à lesão medular, manteve-se estável durante todo o período, sem alterações significantes.

Tabela 5 – Resultados da avaliação funcional dos ratos no Grupo 1 - Controle, Grupo 2 - SF, Grupo 3 - glutathiona e Grupo 4 - SHAM no 2º dia após lesão medular, e com 2, 4 e 6 semanas pós-lesão medular

	Rato	Pré-operatório	Dia 2 (DPLM)	2 semanas	4 semanas	6 semanas
Grupo 1	1	42	0	1	1	5
	2	43	0	1	1	7
	3	40	0	0	0	4
	4	42	0	0	0	1
	5	45	0	1	1	6
	6	41	0	0	2	9
	7	43	0	0	2	2
	8	44	0	0	2	6
	9	40	0	0	1	7
	10	42	0	0	0	7
Grupo 2	1	40	0	1	1	8
	2	43	0	0	2	7
	3	42	0	0	1	12
	4	42	0	1	2	11
	5	39	0	0	3	10
	6	42	0	0	1	10
	7	41	0	2	2	8
	8	45	0	0	2	11
	9	42	0	1	3	12
	10	43	0	0	3	11
Grupo 3	1	49	0	1	2	10
	2	44	0	1	1	11
	3	38	0	0	2	12
	4	50	0	0	1	13
	5	41	0	0	1	11

continuação

continuação						
	Rato	Pré- operatório	Dia 2 (DPLM)	2 semanas	4 semanas	6 semanas
	6	44	0	1	1	13
	7	43	0	0	3	8
	8	36	0	0	2	11
	9	43	0	0	2	12
	10	43	0	0	1	11
	1	41	38	35	40	37
	2	43	41	41	41	35
	3	40	40	40	40	40
	4	37	40	40	38	38
Grupo 4	5	43	41	40	42	43
	6	43	40	40	40	36
	7	35	35	36	37	37
	8	40	41	41	40	38
	9	42	42	40	37	39
	10	40	38	38	42	41

conclusão

DPLM = Dia pós-lesão medular

As médias dos valores de cada grupo para a avaliação do escore de Escada Horizontal estão demonstradas na **tabela 6**.

Tabela 6 - Média dos resultados de Escada Horizontal em cada grupo

	Grupos	Média	Intervalo de confiança 95%	Mín	Máx
Pré-Lesão medular	Grupo 1	42,2	41,04 - 43,36	40	45
	Grupo 2	41,9	40,71 - 43,09	39	45
	Grupo 3	43,1	40,04 - 46,16	36	50
	Grupo 4	40,4	38,49 - 42,31	35	43
Dia 2 (DPLM)	Grupo 1	0	0	0	0
	Grupo 2	0	0	0	0
	Grupo 3	0	0	0	0
	Grupo 4	39,6	38,12 - 41,08	35	42
2 semanas	Grupo 1	0,3	-0,7	0	1
	Grupo 2	0,5	-1,02	0	2
	Grupo 3	0,3	-0,7	0	1
	Grupo 4	39,1	37,61 - 40,59	35	41
4 semanas	Grupo 1	1	0,42 - 1,58	0	2
	Grupo 2	2	1,42 - 2,58	1	3
	Grupo 3	1,6	1,10 - 2,10	1	3
	Grupo 4	39,7	38,39 - 41,01	37	42
6 semanas	Grupo 1	5,4	3,64 - 7,16	1	9
	Grupo 2	10	8,74 - 11,26	7	12
	Grupo 3	11,2	10,14 - 12,26	8	13
	Grupo 4	38,4	36,67 - 40,13	35	43

DPLM = Dia pós-lesão medular; SF = soro fisiológico; GSH = glutatona; Mín = mínimo; Máx= máximo

Quando realizada a comparação intragrupo, houve melhora estatisticamente significativa nos grupos 1, 2 e 3 em todas as avaliações, com exceção do 2º dia pós-lesão medular.

O **gráfico 3** demonstra o número médio de acertos de cada grupo em cada momento de avaliação e o **gráfico 4** demonstra oscilação do escore médio de Escada Horizontal, apresentando queda entre o momento pré-operatório e o 2º dia após lesão medular. A partir de então, ocorre um aumento médio dos valores até 6 semanas nos grupos 1, 2 e 3, porém sem atingir o resultado antes da lesão experimental.

Gráfico 2 - Média de acertos no escore de Escada Horizontal de cada grupo

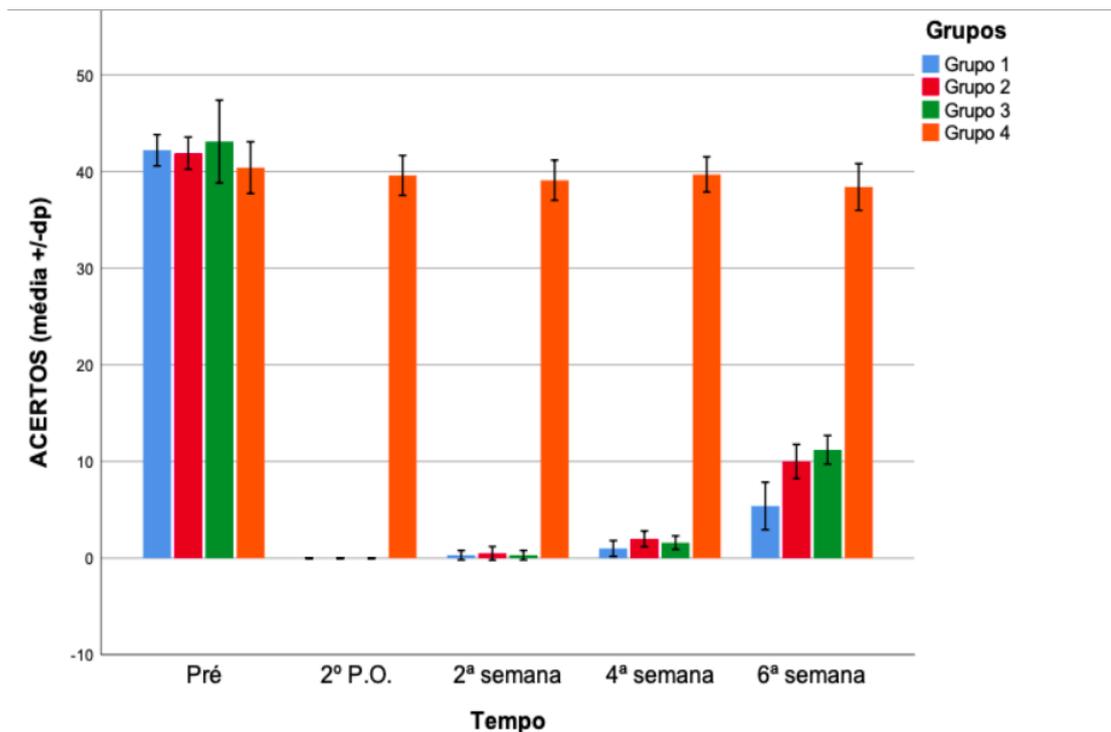
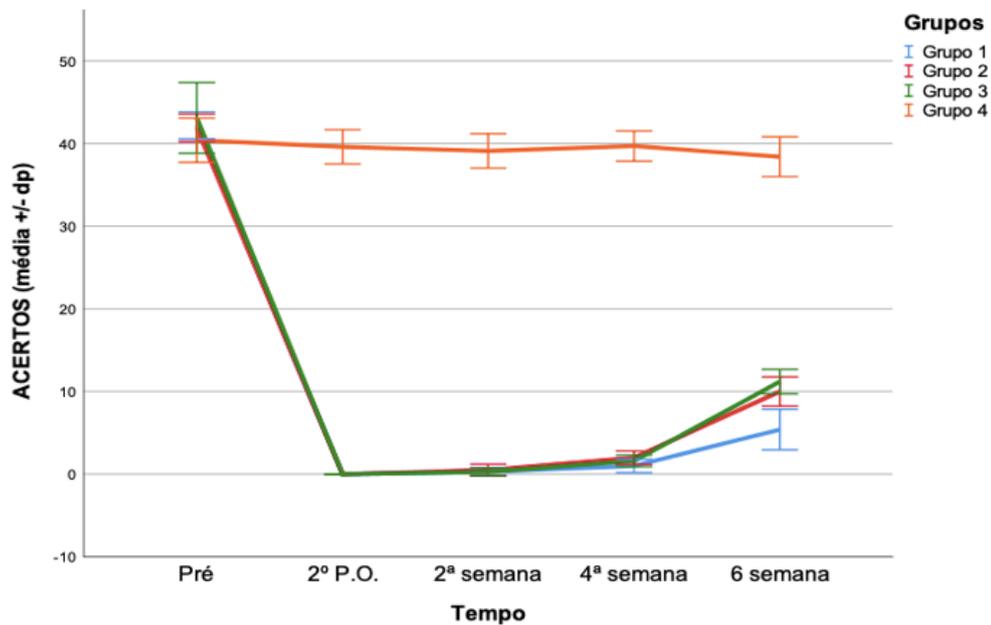


Gráfico 3 - Evolução da média de acertos no escore de Escada Horizontal de cada grupo ao longo do tempo



Comparando-se os valores do escore de Escada Horizontal antes da lesão medular experimental, não encontramos diferença significativa entre os grupos. Ao compararmos a evolução nos diferentes momentos de avaliação entre o Grupo 1 (laminectomia e lesão medular), Grupo 2 (laminectomia, lesão medular e SF) e Grupo 3 (laminectomia, lesão medular e GSH), encontramos diferença estatisticamente significativa entre o Grupo 1 e Grupo 2 a partir de 4 semanas. A diferença encontrada entre o Grupo 1 e Grupo 3 com 4 semanas não foi estatisticamente significativa. No momento de avaliação com 6 semanas, tanto o Grupo 2 quanto o Grupo 3 apresentam melhora estatisticamente significativa em comparação ao Grupo 1. Contudo, apesar de apresentar resultado melhor para o escore no Grupo 3 (laminectomia, lesão medular e GSH) em relação ao Grupo 2 (laminectomia, lesão medular e SF), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O Grupo 4, como esperado, apresentou diferença estatisticamente significativa com todos os grupos nos momentos de intervenção a partir da lesão medular, demonstrando que, apesar da melhora funcional, os escores pré-lesão não foram atingidos.

Tabela 7 - Valores de P relativos à comparação entre os grupos referente ao escore de Escada Horizontal

Grupos de comparação	Valor de P	2	4	6
	Dia 2 (DPLM)	semanas	semanas	semanas
Grupo 1 x Grupo 2	1	0,557	0,022	0,001
Grupo 1 x Grupo 3	1	1	0,122	0,001
Grupo 1 x Grupo 4	0,001	0,001	0,001	0,001
Grupo 2 x Grupo 3	1	0,557	0,255	0,12
Grupo 2 x Grupo 4	0,001	0,001	0,001	0,001
Grupo 3 x Grupo 4	0,001	0,001	0,001	0,001

4.3. Resultados da análise histológica

A avaliação tecidual da área de lesão medular (segmento “B”) demonstrou achados de degeneração (**tabela 8**), hemorragia (**tabela 9**), hiperemia (**tabela 10**), infiltrado celular (**tabela 11**) e necrose (**tabela 12**). As variáveis foram descritas como ausente, discreto, moderado e intenso. O grupo laminectomia sem lesão medular não apresentou áreas de degeneração, hemorragia, hiperemia, infiltrado celular ou necrose, conforme esperado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à lesão medular ($p > 0,05$). Conforme esperado, houve diferença estatística entre os grupos que sofreram lesão medular e o grupo submetido à laminectomia sem lesão medular.

Tabela 8 - Observação de degeneração na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental

Degeneração		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	total
Ausente	Contagem	1	1	3	10	15
	%Degen.	6,66%	6,66%	20%	66,67%	100%
	% Grupo	10%	10%	30%	100%	37,50%
Discreta	Contagem	4	5	2	0	11
	%Degen.	36,36%	45,45%	18,18%	0%	100%
	% Grupo	40%	50%	20%	0%	27,50%
Moderada	Contagem	3	3	3	0	9
	%Degen.	33,33%	33,33%	33,33%	0%	100%
	%Grupo	30%	30%	30%	0%	22,50%
Intensa	Contagem	2	1	2	0	5
	%Degen.	40%	20%	40%	0%	100%
	%Grupo	20%	10%	20%	0%	12,50%
Total	Contagem	10	10	10	10	40
	%Degen.	25%	25%	25%	25%	100%
	%Grupo	100%	100%	100%	100%	100%

Tabela 9 - Observação de hemorragia na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental

Hemorragia		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	total
Ausente	Contagem	1	2	2	10	15
	%Hemor.	6,67%	13,30%	13,30%	66,67%	100%
	% Grupo	10%	20%	20%	100%	37,50%
Discreta	Contagem	3	1	3	0	7
	%Hemor.	42,86%	14,28%	42,86%	0%	100%
	% Grupo	30%	10%	30%	0%	17,50%
Moderada	Contagem	4	4	4	0	12
	%Hemor.	33,33%	33,33%	33,33%	0%	100%
	%Grupo	40%	40%	40%	0%	30%
Intensa	Contagem	2	3	1	0	6
	%Hemor.	33,33%	50%	16,67%	0%	100%
	%Grupo	20%	30%	10%	0%	15%
Total	Contagem	10	10	10	10	40
	%Hemor.	25%	25%	25%	25%	100%
	%Grupo	100%	100%	100%	100%	100%

Tabela 10 - Observação de hiperemia na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental

Hiperemia		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	total
Ausente	Contagem	1	2	2	10	15
	%Hiper.	6,67%	13,33%	13,33%	66,67%	100%
	% Grupo	10%	20%	20%	100%	37,5%
Discreta	Contagem	4	4	3	0	11
	%Hiper.	36,36%	36,36%	27,27%	0%	100%
	% Grupo	40%	40%	30%	0%	27,5%
Moderada	Contagem	3	2	3	0	8
	%Hiper.	37,5%	25%	37,5%	0%	100%
	%Grupo	30%	20%	30%	0%	20%
Intensa	Contagem	2	2	2	0	6
	%Hiper.	33,33%	33,33%	33,33%	0%	100%
	%Grupo	20%	20%	20%	0%	15%
Total	Contagem	10	10	10	10	40
	%Hiper.	25%	25%	25%	25%	100%
	%Grupo	100%	100%	100%	100%	100%

Tabela 11 - Observação de infiltrado celular na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental

Infiltrado		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	total
Ausente	Contagem	3	2	2	10	17
	%Infil.	17,65%	11,76%	11,76%	58,82%	100%
	% Grupo	30%	20%	20%	100%	42,5 %
Discreta	Contagem	4	4	4	0	12
	%Infil.	33,33%	33,33%	33,33%	0%	100%
	% Grupo	40%	40%	40%	0%	30%
Moderada	Contagem	2	2	3	0	7
	%Infil.	28,57%	28,57%	42,86%	0%	100%
	%Grupo	20%	20%	30%	0%	17,5 %
Intensa	Contagem	1	2	1	0	4
	%Infil.	25%	50%	25%	0%	100%
	%Grupo	10%	20%	10%	0%	10%
Total	Contagem	10	10	10	10	40
	%Infil.	25%	25%	25%	25%	100%
	%Grupo	100%	100%	100%	100%	100%

Tabela 12 - Observação de necrose celular na área de lesão medular (segmento “B”) de ratos submetidos à lesão medular contusa experimental

Necrose		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	total
Ausente	Contagem	1	1	2	10	14
	%Necrose	7,14%	7,14%	14,28%	71,43%	100%
	% Grupo	10%	10%	20%	100%	35%
Discreta	Contagem	2	2	4	0	8
	%Necrose	25%	25%	50%	0%	100%
	% Grupo	20%	20%	40%	0%	20%
Moderada	Contagem	3	4	3	0	10
	%Necrose	30%	40%	30%	0%	100%
	%Grupo	30%	40%	30%	0%	25%
Intensa	Contagem	4	3	1	0	8
	%Necrose	50%	37,50%	12,50%	0%	100%
	%Grupo	40%	30%	10%	0%	20%

continua

						continuação
Necrose		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	total
Total	Contagem	10	10	10	10	40
	%Necrose	25%	25%	25%	25%	100%
	%Grupo	100%	100%	100%	100%	100%
						conclusão

O cálculo do índice de regeneração (IR) axonal médio demonstrou diferença estatística entre os grupos tomados em conjunto (**gráfico 4**). O Grupo 3, submetido à lesão medular e intervenção medular, apresentou IR médio maior do que os Grupos 1 e 2, e inferior ao Grupo 4 (**tabela 13**). O Grupo submetido à intervenção com glutathione apresentou melhora estatisticamente significativa em relação aos demais grupos submetidos à lesão medular favorável a intervenção com glutathione ($p < 0,05$), e, conforme esperado, diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo submetido à laminectomia sem lesão medular em favor do último (**tabela 14**).

Gráfico 4 - Média do índice de regeneração (IR) axonal nos diferentes grupos

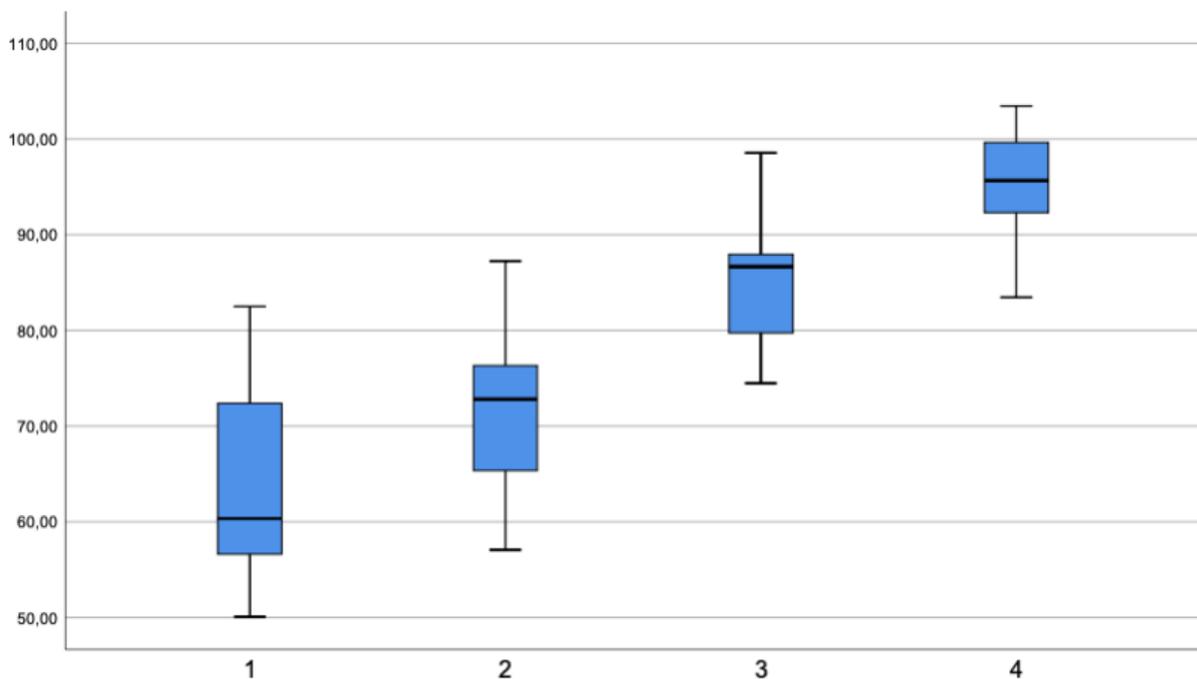


Tabela 13 - Descrição do índice de regeneração (IR) axonal dos ratos

Grupos	N	Média	Intervalo de confiança de 95%	Mín.	Máx.
Grupo 1	10	63,15	55,69 - 70,60	50,07	82,51
Grupo 2	10	71,95	65,52-78,38	57,08	87,24
Grupo 3	10	85,72	80,89-90,55	74,48	98,55
Grupo 4	10	94,70	90,07-99,35	83,45	103,44
Total	40	78,88	74,18-83,58	50,07	103,44

Tabela 14 - Valores de P relativos à comparação entre os grupos referente ao índice de regeneração axonal

Grupos de comparação	Valor de P	Intervalo de confiança 95%
Grupo 1 x Grupo 2	0,103	-18,83 — 1,227
Grupo 1 x Grupo 3	0,001	-32,60 — -12,546
Grupo 1 x Grupo 4	0,001	-41,59 — -21,53
Grupo 2 x Grupo 3	0,004	-23,80 — -3,74
Grupo 2 x Grupo 4	0,001	-32,79 — -12,73
Grupo 3 x Grupo 4	0,093	-19,01 — -1,04

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

As lesões do sistema nervoso apresentam como característica uma capacidade de regeneração lenta e muitas vezes incompleta, principalmente quando localizadas no sistema nervoso central, que apresenta características ainda mais limitadas do que o sistema nervoso periférico¹³³⁻¹³⁵.

Não existem medicamentos aprovados para uso que sejam capazes de reverter o dano neural tecidual¹³⁵. As pesquisas têm buscado diferentes estratégias de melhora da recuperação funcional após o evento do traumatismo raquimedular, focando na redução do dano secundário e no estímulo à regeneração tecidual, utilizando meios físicos como hipotermia, oxigenioterapia e exercícios, substâncias promotoras da melhora do ambiente inflamatório e controle dos radicais livres, e as terapias com diferentes tipos celulares para promover a recuperação neuronal, utilizando diferentes modelos animais^{69,70,104,136-142}.

Os estudos experimentais planejados de maneira correta, com metodologia reprodutível e adequada, possibilitam o ganho de conhecimento necessário para transpor as barreiras para os estudos clínicos, objetivo final dessas pesquisas. No LETRAN, utilizamos esse modelo de pesquisa de forma rotineira, usando ratos da raça Wistar, contribuindo de forma frequente para a literatura internacional sobre as medicações administradas para tratamento da lesão medular por trauma^{69,70,104,136-142}. Neste estudo, utilizamos o modelo padronizado para pesquisar os efeitos da glutathiona (GSH), um antioxidante, no cenário da lesão medular contusa experimental^{47,49,121-123}.

A glutathiona (GSH) apresenta papel importante no controle das espécies reativas de oxigênio (ROS) que surgem após a lesão medular e são responsáveis pela propagação da lesão tecidual¹²¹⁻¹²³. Diferentes estudos demonstram a depleção de sua forma reduzida (GSH) quando há lesão por radicais livres de oxigênio em diferentes tipos celulares, sendo ainda mais importante nas células neuronais¹²¹⁻¹²³. Pesquisas sobre diversas drogas, como o monossialogangliosídeo¹²⁷, demonstraram que o potencial de melhora da recuperação funcional e histológica ocorre justamente

pela melhora do ambiente celular através do bloqueio da ação dos radicais livres nos diferentes componentes celulares^{101,102,121-123}.

Decidimos utilizar a substância glutaciona (GSH), pelo seu papel determinante no metabolismo celular e resultados promissores na literatura, mesmo quando o estímulo ao aumento intracelular de glutaciona se dá pelo emprego de outras substâncias. Essa substância se insere no ciclo da lesão secundária, de forma a interromper a propagação do dano celular possuindo, assim, efeito neuroprotetor^{101,102,121-123}. Existem trabalhos que demonstram esse efeito em diversos tipos celulares, mas a literatura nacional em relação ao emprego da glutaciona é escassa^{101,102,121-123}.

Em nosso estudo, a partir da primeira semana de lesão após lesão medular, os animais que receberam glutaciona apresentaram função locomotora (medida pela escala BBB) significativamente melhor do que o grupo submetido à laminectomia e à lesão medular a partir da terceira semana, e melhor do que o grupo submetido à laminectomia, lesão medular e intervenção com soro fisiológico na segunda semana e a partir da quarta semana até o final do estudo. Em relação à medida com escada horizontal, apesar da melhora dos escores obtidos no grupo submetido à intervenção com glutaciona em relação ao grupo submetido à laminectomia e lesão medular sem intervenção, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à intervenção com soro fisiológico e glutaciona.

A diferença nos resultados dos diferentes escores funcionais avaliados, apresentando melhora estatisticamente significativa no teste BBB e melhora sem diferença estatisticamente significativa no teste da escada funcional, pode acontecer devido à diferença própria dos escores, sendo a escala BBB mais detalhada em relação a sua avaliação. Contudo, ambos os testes são validados na literatura para avaliação motora em estudos experimentais com ratos.

A análise dos cortes histológicos quanto à presença de degeneração, hemorragia, hiperemia, infiltrado celular e necrose foi realizada de forma quantitativa para possibilitar a análise estatística. Contudo, isso gera algum grau de subjetividade para os escores avaliados para cada variável. Em relação a essa análise, não houve

diferença estatisticamente significativa. Em contrapartida, a avaliação da contagem neuronal através do índice de regeneração (IR) axonal foi maior no grupo submetido à intervenção com glutathiona em comparação aos demais grupos submetidos à lesão medular.

Além da lesão mecânica traumática inicial, os eventos celulares secundários que se seguem contribuem para a propagação do dano tecidual, muitas vezes associados ao dano celular ocasionado pela liberação de radicais livres de oxigênio e a depleção dos mecanismos e substâncias responsáveis pela manutenção da homeostase celular, destacando-se o papel da glutathiona em sua forma reduzida (GSH)^{101,102}. Associado ao estresse oxidativo e reação inflamatória, somam-se o efeito deletério dos distúrbios vasculares, isquêmicos e da homeostase nessa propagação do dano secundário, e que também podem ser abordados com diferentes estratégias terapêuticas, fazendo com que cada vez mais, a abordagem ao trauma raquimedular seja multifatorial⁶⁶⁻⁶⁸. Diferentes substâncias são constantemente investigadas pelo seu potencial efeito neuroprotetor, como os bloqueadores dos canais de cálcio e de sódio, hormônios, corticosteroides, antagonistas opioides e da serotonina, fatores de crescimento neurotróficos, entre muitos outros^{67,68,101,102}. As pesquisas envolvendo a expressão de diferentes genes nas células neuronais também têm ganhado cada vez mais impulso como tentativa de proteção ao dano e promoção da recuperação axonal, e a terapia com células-tronco mesenquimais vem ganhando destaque recente nos estudos envolvendo as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, do cordão umbilical, de tecido adiposo e da bainha olfatória^{107,143}.

Dessa forma, a sensação é de que estamos cada vez mais próximos de um tratamento verdadeiramente efetivo para o traumatismo raquimedular, não na forma de uma panaceia que seja completamente efetiva para todas as situações, mas através do tratamento multidisciplinar utilizando mecanismos físicos, químicos, biológicos e celulares individualizados para cada caso, em todas as suas nuances, que procurem assim mitigar o caráter devastador da lesão medular para os seres humanos.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o uso da glutathiona no cenário do trauma medular experimental leva a uma melhor recuperação funcional estatisticamente significativa através do escore BBB e melhora do índice de regeneração axonal em ratos Wistar submetidos à lesão medular experimental.

7. ANEXOS

7 ANEXOS

Anexo A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



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 DA GLUTATIONA NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E NA REGENERAÇÃO APÓS LESÃO MEDULAR EM RATOS**”, registrada com o nº **956/2018**, sob a responsabilidade de **Raphael Martus Marcon** e **Fernando Flores de Araújo**, 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 reunião de 21.03.18

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 20-11-2017 Término: 31-10-2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	20
Peso/Idade	60 dias
Sexo	machos
Origem	Biotério ICB

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

CEUA-FMUSP, 21 de Março de 2018

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

Anexo B - Escala BBB (Basso et. al, 1995)

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

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

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

Comentários: _____

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

QUADRO 1 ESCALA BBB DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE 21 PONTOS DE BASSO ET AL. (1995)⁶

PONTUAÇÃO	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior
8	Pedalada sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) <u>ou</u> passada dorsal ocasional, freqüente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
12	Passo plantar com suporte de piso freqüente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.

(continuação)

PONTUAÇÃO	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.

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

8. REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Barros Filho TEP, Taricco MA, Oliveira RP, Greve JM, Santos LC, Napoli MM. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo da coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1990;45(3):123-6.
2. Barros Filho TEP. Avaliação padronizada nos traumatismos raquimedulares. *Rev Bras Ortop*. 1994;9(3):99-106.
3. van Kuijk AA, Geurts AC, van Kuppevelt HJ. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2002;40(7):313-26.
4. Hsu JE, Keenan MA. Current review of heterotopic ossification. *Univ Pennsylvania Orthop J*. 2010;20:126-30.
5. Demirel G, Yilmaz H, Paker N, Onel S. Osteoporosis after spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1998;36(12):822-5.
6. Frankel HL, Coll JR, Charlifue SW, Whiteneck GG, Gardner BP, Jamous MA, Krishnan KR, Nuseibeh I, Savic G, Sett P. Long-term survival in spinal cord injury: a fifty year investigation. *Spinal Cord*. 1998;36(4):266-74.
7. Rees J, Macdonagh RP, Abrams PJ. Trauma raquimedular. In: D'Ancona CAL, Rodrigues Netto N, editores. *Aplicações clínicas da urodinâmica*. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 211-26.
8. Saunders LL, Krause JS, Peters BA, Reed KS. The relationship of pressure ulcers, race, and socioeconomic conditions after spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2010;33(4):387-95.

9. Carter RE Jr. Etiology of traumatic spinal cord injury: statistics of more than 1,100 cases. *Tex Med.* 1977;73(6):61-5.
10. Kraus JF. Epidemiologic features of head and spinal cord injury. *Adv Neurol.* 1978;19:261-79.
11. Sances A Jr, Myklebust JB, Maiman DJ, Larson SJ, Cusick JF, Jodat RW. The biomechanics of spinal injuries. *Crit Rev Biomed Eng.* 1984;11(1):1-76.
12. Campos MF, Ribeiro AT, Listik S, Pereira CAB, Andrade Sobrinho J, Rapoport A. Epidemiology of spine injuries. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(2):88-93.
13. Solino JL, Melo MFF, Silva DA, Elias N. Traumatismos da coluna vertebral: avaliação de etiologia, incidência e frequência. *Rev Bras Ortop.* 1990;25(6):185-90.
14. D'Andrea Greve JM. Traumatismos raquimedulares nos acidentes de trânsito e uso de equipamentos de segurança. *Diagn & Trat.* 1997;2(3):10-3.
15. Ducker TB, Salzman M, Perot PL Jr, Ballantine D. Experimental spinal cord trauma, I: correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg Neurol.* 1978;10(1):60-3.
16. 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 N Y Acad Sci.* 2001;939:436-49.
17. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2000;17(10):915-25.
18. 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.

19. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999;44(5):1027-39.
20. de la Torre JC. Spinal cord injury models. *Prog Neurobiol*. 1984;22(4):289-344.
21. Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol*. 1992;116(1):40-51.
22. de la Torre JC, Boggan JE. Neurophysiological recording in rat spinal cord trauma. *Exp Neurol*. 1980;70(2):356-70.
23. Rodrigues NR. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.
24. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings MG, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. 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(5):699-706.
25. Foret A, Quertainmont R, Botman O, Bouhy D, Amabili P, Brook G, Schoenen J, Franzen R. Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. *J Neurochem*. 2010;112(3):762-72.
26. Furlan JC, Noonan V, Cadotte DW, Fehlings MG. Timing of decompressive surgery of spinal cord after traumatic spinal cord injury: an evidence-based examination of pre-clinical and clinical studies. *J Neurotrauma*. 2011;28(8):1371-99.

-
27. Piazza M, Schuster J. Timing of surgery after spinal cord injury. *Neurosurg Clin N Am.* 2017;28(1):31-9.
 28. Janssen L, Hansebout RR. Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatments. A review. *Spine (Phila Pa 1976).* 1989;14(1):23-32.
 29. Holdsworth FW, Hardy A. Early treatment of paraplegia from fractures of the thoraco-lumbar spine. *J Bone Joint Surg Br.* 1953;35(4):540-50.
 30. Holdsworth F. Fractures, dislocations, and fracture-dislocations of the spine. *J Bone Joint Surg Am.* 1970;52(8):1534-51.
 31. Masini M. Tratamento de fraturas e luxações da coluna toracolombar por descompressão póstero-lateral e fixação posterior com retângulo e fios segmentares sublaminares associados a enxerto ósseo [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.
 32. 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.
 33. Gamache FW Jr, Myers RA, Ducker TB, Cowley RA. The clinical application of hyperbaric oxygen therapy in spinal cord injury: a preliminary report. *Surg Neurol.* 1981;15(2):85-7.
 34. On-Ong-Arj P, Wattanathorn J, Muchimapura S, Thukham-Mee W. Yellow laser stimulation at gv2 acupoint mitigates apoptosis, oxidative stress, inflammation, and motor deficit in spinal cord injury rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;2018:5407052.
 35. Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci.* 1998;18(10):3803-15.

-
36. Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, Hasse-Ferreira A, Capucho C, Peduzzi JD. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med.* 2006;29(3):191-203.
 37. Logan MP, Parker S, Shi R. Glutathione and ascorbic acid enhance recovery of Guinea pig spinal cord white matter following ischemia and acrolein exposure. *Pathobiology.* 2005;72(4):171-8.
 38. 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.
 39. Lucas JH, Wheeler DG, Guan Z, Suntres Z, Stokes BT. Effect of glutathione augmentation on lipid peroxidation after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2002;19(6):763-75.
 40. Yeo JD, McKenzie B, Hindwood B, Kidman A. Treatment of paraplegic sheep with hyperbaric oxygen. *Med J Aust.* 1976;1(15):538-40.
 41. Dohrmann GJ. Experimental spinal cord trauma. A historical review. *Arch Neurol.* 1972;27(6):468-73.
 42. 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.
 43. 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.
 44. Hopkins FG, Dixon M. On glutathione. II. A thermostable oxidation-reduction system. *J Biol Chem.* 1922;54:527-63.

45. McVeigh JF. Experimental cord crushes: with especial reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cord affected. *Arch Surg.* 1923;7(3):573-600.
46. Tarlov IM. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. *AMA Arch NeurPsych.* 1954;71(5):588-97.
47. Woodward JS, Freeman LW. Ischemia of the spinal cord; an experimental study. *J Neurosurg.* 1956;13(1):63-72.
48. Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1969;30(6):693-7.
49. Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg.* 1971;35(6):700-8.
50. Wagner Jr FC, Dohrmann GJ, Bucy PC. Histopathology of transitory traumatic paraplegia in the monkey. *J Neurosurg.* 1971;35(3):272-6.
51. Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. *J Neurosurg.* 1971;35(3):277-86.
52. 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.
53. Tator CH, Deecke L. Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma. *J Neurosurg.* 1973;39(1):52-64.
54. Kelly Jr DL, Lassiter KR, Vongsvivut A, Smith JM. Effects of hyperbaric oxygenation and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. *J Neurosurg.* 1972;36(4):425-9.

55. 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.
56. Dohrmann GJ, Panjabi MM, Wagner FC Jr. An apparatus for quantitating experimental spinal cord trauma. *Surg Neurol.* 1976;5(5):315-8.
57. Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg Neurol.* 1975;4(6):531-6.
58. de la Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evaluation of permanent experimental spinal cord trauma. *Neurology.* 1975;25(6):508-14.
59. Kuchner EF, Hansebout RR. Combined steroid and hypothermia treatment of experimental spinal cord injury. *Surg Neurol.* 1976;6(6):371-6.
60. Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep's spinal cord. *Paraplegia.* 1977;14(4):276-85.
61. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest.* 1978;39(3):236-53.
62. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. II. Ultrastructure of axons and myelin. *Lab Invest.* 1978;39(3):254-66.
63. Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol.* 1985;88(1):135-49.
64. Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg.* 1982;56(1):106-13.

65. Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, Means ED, Horrocks LA. 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.
66. Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia: dose-response and time-action analysis. *J Neurosurg*. 1984;61(1):124-30.
67. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1992;76(1):13-22.
68. Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, Wagner FC, Flamm ES, Eisenberg HM, Goodman JH, Perot Jr. P, Green BA, Grossman RG, Meagher JN, Young W, Fischer B, Clifton GL, Hunt WE, Rifkinson N. 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.
69. Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD 3rd, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol*. 1987;95(3):548-70.
70. Noble LJ, Wrathall JR. Correlative analyses of lesion development and functional status after graded spinal cord contusive injuries in the rat. *Exp Neurol*. 1989;103(1):34-40.
71. 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.

-
72. Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991;66(4):807-15.
 73. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*. 1992;9(3):197-217.
 74. Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1992;9(2):123-6.
 75. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon JC, Marshall LF, Perot Jr. PL, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner Jr. FC, Wilberger JL, Winn HR, Young W. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg*. 1992;76(1):23-31.
 76. Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg*. 1993;79(4):500-7.
 77. 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.
 78. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996;139(2):244-56.
 79. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev*. 1996;76(2):319-70.
 80. 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.

81. Gebrin AS, Cristante AF, Marcon RM, Da-Silva CF. Intervenções farmacológicas no trauma raquimedular: uma nova visão terapêutica. *Acta Ortop Bras.* 1997;5(3):123-36.
82. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial. *national acute spinal cord injury study.* *JAMA.* 1997;277(20):1597-604.
83. Lucas JH, Wheeler DG, Emery DG, Mallery SR. The endogenous antioxidant glutathione as a factor in the survival of physically injured mammalian spinal cord neurons. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(10):937-54.
84. Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J.* 1999;40(4):313-20.
85. Metz GA, Curt A, van de Meent H, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2000;17(1):1-17.
86. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg.* 2000;93(1 suppl):1-7.
87. Short D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr Opin Neurol.* 2001;14(6):759-63.
88. 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.

89. Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *J Spinal Cord Med.* 2001;24(3):142-6.
90. Kamencic H, Griebel RW, Lyon AW, Paterson PG, Juurlink BH. Promoting glutathione synthesis after spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *FASEB J.* 2001;15(1):243-50.
91. Vialle E, Vialle LRG, Rasera E, Cechinel C, Leonel I, Seyboth C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular. *Rev Bras Ortop.* 2002;37(3):83-96.
92. Moshonkina T, Avelev V, Gerasimenko Y, Mathur R, Bijlani RL. Treadmill training accelerates restoration of locomotion after complete spinal cord transection in the rat. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2002;46(4):499-503.
93. Kessler JP, Keirstead HS. Assessment of behavior in animal models of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2003;26(4):323-8.
94. Edgerton VR, Tillakaratne NJ, Bigbee AJ, de Leon RD, Roy RR. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:145-67.
95. Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma.* 2004;21(4):429-40.
96. Guízar-Sahagún G, Ibarra A, Espitia A, Martínez A, Madrazo I, Franco-Bourland RE. Glutathione monoethyl ester improves functional recovery, enhances neuron survival, and stabilizes spinal cord blood flow after spinal cord injury in rats. *Neuroscience.* 2005;130(3):639-49.
97. López-Vales R, García-Alías G, Forés J, Udina E, Gold BG, Navarro X, Verdú E. FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res.* 2005;81(6):827-36.

-
98. 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.
 99. 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.
 100. Marcon RM. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.
 101. Genovese T, Mazzon E, Esposito E, Muià C, Di Paola R, Di Bella P, Bramanti P, Cuzzocrea S. Role of endogenous glutathione in the secondary damage in experimental spinal cord injury in mice. *Neurosci Lett*. 2007;423(1):41-6.
 102. Martiñon S, García E, Flores N, Gonzalez I, Ortega T, Buenrostro M, Reyes R, Fernandez-Presas AM, Guizar-Sahagún G, Correa D, Ibarra A. Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. *Eur J Neurosci*. 2007;26(2):403-12.
 103. Heng C, de Leon RD. Treadmill training enhances the recovery of normal stepping patterns in spinal cord contused rats. *Exp Neurol*. 2009;216(1):139-47.
 104. Marcon RM, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Cristante AF, Taricco MA, Colares G, Barbarini AF, Teixeira WGJ, Souza FI. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(1):26-30.
 105. Yousuf S, Atif F, Keshewani V, Agrawal SK. Neuroprotective effects of Tacrolimus (FK-506) and Cyclosporin (CsA) in oxidative injury. *Brain Behav*. 2011;1(2):87-94.

-
106. Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87-91.
 107. Fouad K, Krajacic A, Tetzlaff W. Spinal cord injury and plasticity: opportunities and challenges. *Brain Res Bull.* 2011;84(4-5):337-42.
 108. Miranda TAB, Vicente JMY, Marcon RM, Cristante AF, Morya E, Valle AC. Time-related effects of general functional training in spinal cord- injured rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(7):799-804.
 109. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyan J, Paul JC, Lafage V, Kirsch T, Errico TJ. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord.* 2014;52(8):588-95.
 110. Lv R, Mao N, Wu J, Lu C, Ding M, Gu X, Wu Y, Shi Z. Neuroprotective effect of allicin in a rat model of acute spinal cord injury. *Life Sci.* 2015;143:114-23.
 111. Kjell J, Olson L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Dis Model Mech.* 2016;9(10):1125-37.
 112. Yang L, Yao M, Lan Y, Mo W, Sun YL, Wang J, Wang YJ, Cui XJ. Melatonin for spinal cord injury in animal models: a systematic review and network meta-analysis. *J Neurotrauma.* 2016;33(3):290-300.
 113. Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari MM, Safdarian M, Meknatkhah S, Rezvan M, Chalangari M, Derakhshan P, Rahimi-Movaghar V. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord.* 2017;55(8):714-21.
 114. Du H, Ma L, Chen G, Li S. The effects of oxyresveratrol abrogates inflammation and oxidative stress in rat model of spinal cord injury. *Mol Med Rep.* 2018;17(3):4067-73.

-
115. Durdag E, Yildirim Z, Unlu NL, Kale A, Ceviker N. Neuroprotective effects of vigabatrin on spinal cord ischemia-reperfusion injury. *World Neurosurg.* 2018;120:e33-e41.
 116. Ma L, Mu Y, Zhang Z, Sun Q. Eugenol promotes functional recovery and alleviates inflammation, oxidative stress, and neural apoptosis in a rat model of spinal cord injury. *Restor Neurol Neurosci.* 2018;36(5):659-68.
 117. Yang R, Cai X, Li J, Liu F, Sun T. Protective effects of MiR-129-5p on acute spinal cord injury rats. *Med Sci Monit.* 2019;25:8281-88.
 118. Xu BP, Yao M, Li ZJ, Tian ZR, Ye J, Wang YJ, Cui XJ. Neurological recovery and antioxidant effects of resveratrol in rats with spinal cord injury: a meta-analysis. *Neural Regen Res.* 2020;15(3):482-90.
 119. Hosseini M, Sarveazad A, Babahajian A, Baikpour M, Vaccaro AR, Chapman JR, Yousefifard M, Rahimi-Movaghar V. 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.
 120. Hazzaa SM, Abdou AG, Ibraheim EO, Salem EA, Hassan MHA, Abdel-Razek HAD. Effect of L-carnitine and atorvastatin on a rat model of ischemia-reperfusion injury of spinal cord. *J Immunoassay Immunochem.* 2021;42(6):596-619.
 121. Kim SJ, Ko WK, Han GH, Lee D, Lee Y, Sheen SH, Hong JB, Sohn S. Chirality-dependent anti-inflammatory effect of glutathione after spinal cord injury in an animal model. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(8):792.
 122. Stewart AN, Glaser EP, Mott CA, Bailey WM, Sullivan PG, Patel SP, Gensel JC. Advanced age and neurotrauma diminish glutathione and impair antioxidant defense after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2022;39(15-16):1075-89.

123. Wyss PO, Richter JK, Zweers P, Brust AK, Funk C, Zoelch N, Vallesi V, Verma RK, Hock A, Berger MF, Scheel-Sailer A, Henning A. Glutathione in the pons is associated with clinical status improvements in subacute spinal cord injury. *Invest Radiol*. 2022 Aug 2. Epub ahead of print.
124. Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (Cobea). Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (Cobea); 1991.
125. Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília (DF): Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; 2015.
126. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*. 2010;8(6):e100412.
127. Cummings BJ, Engesser-Cesar C, Cadena G, Anderson AJ. Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behav Brain Res*. 2007;177(2):232-41.
128. Scouten CW, O'Connor R, Cunningham M. Perfusion fixation of research animals. *Micros Today*. 2006; 14(3):26-33.
129. Letaif OB. Avaliação do efeito do estrógeno na lesão medular experimental em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.
130. Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. 2001;168(2):273-82.

131. Bertelli JA, dos Santos AR, Taleb M, Calixto JB, Mira JC, Ghizoni MF. Long interpositional nerve graft consistently induces incomplete motor and sensory recovery in the rat. An experimental model to test nerve repair. *J Neurosci Methods*. 2004;134(1):75-80.
132. Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Relationship of altered glutamate receptor subunit mRNA expression to acute cell loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. 2001;168(2):283-9.
133. Festoff BW. Designing drugs that encourage spinal cord injury healing. *Expert Opin Drug Discov*. 2014 Jul 25:1-15. [Epub ahead of print].
134. Blight AR, Zimmer MP. Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001;2(6):801-8.
135. Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawaichi M, Fukamizu A, Kishi N, Matsuno K, Nakamura K, Weinmaster G, Okano H, Nakafuku M. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(48):45031-40.
136. Souza FI, Cristante AF, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB, Barros Filho TEP. Transdermal monosialoganglioside with laser in the treatment of spinal cord lesion in rats. *Acta Ortop Bras*. 2013;21(2):87-91.
137. Cristante AF, Barros Filho TE, Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(10):1219-24.
138. Cristante AF, Damasceno ML, Barros Filho TE, de Oliveira RP, Marcon RM, da Rocha ID. Evaluation of the effects of hyperbaric oxygen therapy for spinal cord lesion in correlation with the moment of intervention. *Spinal Cord*. 2012;50(7):502-6.

139. Marcon RM, Cristante AF, de Barros Filho TE, de Oliveira RP, dos Santos GB. Potentializing the effects of GM1 by hyperbaric oxygen therapy in acute experimental spinal cord lesion in rats. *Spinal Cord*. 2010;48(11):808-13.
140. Guimarães PE, Fridman C, Gregório SP, Kalil EM, Cristante AF, Teixeira WG, Rodrigues CJ, Costa MC, Gattaz WF, Barros TE, Oliveira PS, Dias-Neto E. DNA polymorphisms as tools for spinal cord injury research. *Spinal Cord*. 2009;47(2):171-5.
141. Guimarães PE, Fridman C, Gregório SP, Kalil EM, de Barros Filho TE, Cristante AF, Rodrigues CJ, Costa MC, Gattaz WF, Neto ED, Teixeira WG. WITHDRAWN: Association between polymorphisms in genes of inflammatory response and axonal repair with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2007 Sep 25. [Epub ahead of print].
142. Narazaki DK, Barros Filho TE, Oliveira CR, Cristante AF, Iutaka AS, Marcon RM, Oliveira RP. Spinal cord regeneration: the action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):453-60.
143. Cristante AF, Barros-Filho TE, Tatsui N, Mendrone A, Caldas JG, Camargo A, Alexandre A, Teixeira WG, Oliveira RP, Marcon RM. Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord*. 2009;47(10):733-8.