

RICARDO TEIXEIRA E SILVA

Efeito do riluzole e da minociclina individualmente e associados na lesão
medular aguda experimental em ratos

São Paulo

2025

RICARDO TEIXEIRA E SILVA

Efeito do riluzole e da minociclina individualmente e associados na lesão medular aguda experimental em ratos

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

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante

São Paulo
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Ricardo Teixeira e
Efeito do riluzole e da minociclina individualmente e
associados na lesão medular aguda experimental em ratos /
Ricardo Teixeira e Silva; Alexandre Fogaça Cristante,
orientador. -- São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, 2025.

1.Traumatismos da medula espinhal 2.Medula espinhal
3.Riluzol 4.Minociclina 5.Ratos Wistar I.Cristante, Alexandre
Fogaça, orient. II.Título

USP/FM/DBD-273/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Silva RT. Efeito do riluzole e da minociclina individualmente e associados na lesão medular aguda experimental em ratos [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Celma (*in memoriam*), pela vida, pelo amor sem medida e pelo exemplo de integridade e dedicação à família. Sem seus cuidados e carinho, nada teria sido possível.

Aos meus irmãos, Karina e Eduardo, por ter a certeza de que jamais andarei só.

Ao meu pai, Ílson, pela responsabilidade que viabilizou nossos sonhos e projetos.

À minha esposa e companheira de vida, Raiane, pelo amor, ternura e inteligência, fundamentais em nossa jornada.

À minha filha Luiza e ao meu filho Leonardo por tornarem meu mundo completo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho**, Professor Titular do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP), obrigado pelos tantos caminhos desbravados e compartilhados com todos do grupo de coluna. Agradeço, em particular, pelas inúmeras oportunidades oferecidas e ensinamentos passados.

Ao Professor Doutor **Alexandre Fogaça Cristante**, Professor Titular do IOT-HC-FMUSP, exemplo incontestado de médico, professor e pesquisador. Seu compromisso inabalável com os pacientes, responsabilidade profissional e sua postura ética servem de exemplo e inspiração. Agradeço pelas valiosas oportunidades concedidas, pelo suporte constante e pela confiança depositada.

Ao Professor Doutor **Olavo Pires de Camargo**, Professor Titular do IOT-HC-FMUSP, pelo exemplo de dedicação e amor ao ensino, à pesquisa e à assistência no Instituto de Ortopedia e Traumatologia.

Ao Professor Doutor **Raphael Martus Marcon**, Chefe do Grupo de Coluna Vertebral do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, agradeço pelos ensinamentos, transparência e palavras de apoio.

Ao Doutor **Reginaldo Perilo Oliveira**, diretor do Grupo de Coluna da Disciplina de Coluna Vertebral (IOT-HC-FMUSP), pela presença constante junto aos pacientes e residentes. Agradeço pelo apoio contínuo, pelas oportunidades profissionais e pelo incentivo pessoal ao longo da minha formação.

Ao médico veterinário **Gustavo Bispo dos Santos**, pela expertise e pelo apoio constante ao longo de todo o desenvolvimento deste estudo, cuja contribuição foi essencial para sua concretização.

Ao estatístico **Rogério Ruscitto do Prado**, pela competência e pelo rigor analítico que garantiram uma análise precisa dos dados deste estudo.

Aos colegas do Grupo de Coluna do IOT-HC-FMUSP, pela amizade sincera, pelo companheirismo diário e pelo crescimento conjunto ao longo desses anos.

A todos os funcionários, secretárias, residentes e membros da equipe de enfermagem que, com empenho e dedicação, auxiliaram e viabilizaram a realização deste estudo, deixo meu sincero agradecimento pelo esforço, profissionalismo e apoio ao longo de todo o processo.

RESUMO

Silva RT. Efeito do riluzole e da minociclina individualmente e associados na lesão medular aguda experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

A lesão medular representa uma das principais causas de deficiência física com importante repercussão na qualidade de vida dos pacientes, além do impacto financeiro implicado com gastos em saúde e perda da capacidade laboral. Do ponto de vista fisiopatológico, a lesão medular caracteriza-se por um processo bifásico, envolvendo inicialmente a lesão primária — resultante do insulto traumático direto —, seguida pela lesão secundária, um fenômeno celular multifatorial que contribui para a progressão do dano neurológico. A descompressão cirúrgica precoce permanece como a principal abordagem terapêutica disponível. O aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos da fase secundária tem propiciado o desenvolvimento de intervenções neuroprotetoras experimentais, particularmente em modelos animais. O riluzole e a minociclina têm sido investigados como agentes neuroprotetores. Por atuarem em vias fisiopatológicas distintas da lesão secundária, postula-se que sua associação apresente efeito sinérgico neuroprotetor. O objetivo deste estudo é avaliar a preservação histológica a nível medular e a recuperação funcional motora de ratos Wistar com paraplegia cirurgicamente provocada, seguida de injeção de riluzole e minociclina isoladamente e associados. Foram submetidos à lesão medular ao nível de T8-T10, 50 ratos da linhagem Wistar, divididos em 5 grupos com 10 animais em cada a receberem os seguintes protocolos: grupo 1: sham (somente laminectomia), grupo 2: salina, grupo 3: riluzole, grupo 4: minociclina e grupo 5: riluzole + minociclina. Os ratos foram avaliados pela Escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), pelo Teste da Escada no Plano Horizontal (EPH) e pela presença de bexiga neurogênica por 6 semanas. Também foi realizada a análise histológica da medula espinhal com coloração por hematoxilina-eosina (HE) e *luxol fast blue* (LFB). A minociclina, isoladamente e em associação com o riluzole, demonstrou recuperação neurológica mais veloz por meio da escala de BBB, em comparação aos demais grupos ($p < 0,001$); no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos após 6 semanas ($p > 0,999$). Na avaliação motora pela EPH, todos os grupos submetidos à intervenção farmacológica mostraram desempenho neurológico e funcional superior ao grupo salina ($p < 0,05$); o grupo riluzole + minociclina obteve resultados comparáveis aos do grupo sham ($p > 0,999$). Observou-se que a minociclina, tanto isoladamente quanto em associação com o riluzole, promoveu redução significativa do tempo de bexiga neurogênica em relação aos demais grupos ($p < 0,001$). A análise histológica não revelou diferenças estatísticas com padrão de superioridade para qualquer intervenção. Este estudo reforça a hipótese de melhora funcional após trauma raquimedular com o uso do riluzole e da minociclina e sugere que haja um ganho adicional com a associação de ambos.

Palavras-chave: Traumatismos da medula espinhal. Medula espinhal. Riluzol. Minociclina. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Silva RT. Evaluation of the isolated and combined effects of riluzole and minocycline in an experimental model of acute spinal cord injury in rats [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2025.

Spinal cord injury represents one of the leading causes of physical disability, significantly affecting patients' quality of life, in addition to the financial burden related to healthcare costs and loss of work capacity. From a pathophysiological perspective, spinal cord injury is characterized by a biphasic process involving an initial primary injury—resulting from the direct traumatic insult—followed by a secondary injury, a multifactorial cellular phenomenon that contributes to the progression of neurological damage. Early surgical decompression remains the primary therapeutic approach currently available. Advances in understanding the mechanisms of the secondary phase have enabled the development of experimental neuroprotective interventions, particularly in animal models. Riluzole and minocycline have been investigated as potential neuroprotective agents. As they act on distinct pathophysiological pathways involved in secondary injury, it is hypothesized that their combined use may have a synergistic neuroprotective effect. The aim of this study was to evaluate histological preservation at the spinal level and motor functional recovery in Wistar rats with surgically induced paraplegia, followed by administration of riluzole and minocycline, both separately and in combination. Fifty Wistar rats underwent spinal cord injury at the T8–T10 level and were randomly assigned into five groups ($n = 10$ per group) according to the following protocols: Group 1: sham (laminectomy only), Group 2: saline, Group 3: riluzole, Group 4: minocycline, and Group 5: riluzole + minocycline. The animals were evaluated using the Basso, Beattie, and Bresnahan scale (BBB), the ladder beam walking test and for the presence of neurogenic bladder for a period of six weeks. Histological analysis of the spinal cord was also performed using hematoxylin-eosin and Luxol fast blue staining. Minocycline, both alone and in combination with riluzole, demonstrated faster neurological recovery based on the BBB scale compared to the other groups ($p < 0.001$); however, no statistically significant differences were found between groups at six weeks ($p > 0.999$). In motor assessment using the ladder beam walking test, all pharmacologically treated groups showed superior neurological and functional performance compared to the saline group ($p < 0.05$); the riluzole + minocycline group presented results comparable to the sham group ($p > 0.999$). Minocycline, whether used alone or in combination with riluzole, significantly reduced the duration of neurogenic bladder when compared to the other groups ($p < 0.001$). Histological analysis did not reveal statistically significant differences suggesting superiority of any specific intervention. This study supports the hypothesis of functional improvement following spinal cord trauma with the use of riluzole and minocycline and suggests a potential additive benefit when both are combined.

Keywords: Spinal cord injuries. Spinal cord. Riluzole. Minocycline. Rats, Wistar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da cascata do trauma raquimedular	14
Figura 2 - Fisiopatologia do trauma raquimedular e atuação da minociclina e do riluzole	17
Figura 3 - Calibração do MASCIS <i>Impactor</i>	24
Figura 4 - Sequência de tempos cirúrgicos. A) Anestesia e sedação; B) Dissecção e laminectomia; C) Posicionamento para lesão medular; D: Fechamento por planos	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos pesos dos animais e ganho de peso ao longo do experimento segundo grupos e resultado dos testes comparativos.....	34
Tabela 2 - Resultado das comparações do ganho de peso entre os grupos.....	35
Tabela 3 - Descrição da escala de funcionalidade de BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado dos testes comparativos	36
Tabela 4 - Resultado das comparações múltiplas da escala de BBB entre os momentos nos grupos SF e riluzole	37
Tabela 5 - Resultado das comparações múltiplas da escala de BBB entre os momentos nos grupos minociclina e minociclina + riluzole	38
Tabela 6 - Resultado das comparações múltiplas da escala de BBB entre os grupos em cada momento avaliado	39
Tabela 7 - Descrição dos parâmetros da avaliação da EPH segundo grupos e momentos de avaliação e resultado dos testes comparativos	40
Tabela 8 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do número de passos.....	41
Tabela 9 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do percentual de acertos	42
Tabela 10 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do percentual de escorregões.....	43
Tabela 11 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do percentual de erros	44
Tabela 12 - Descrição da análise histológica segundo grupos e resultado das comparações.....	45
Tabela 13 - Comparações múltiplas dos parâmetros histológicos com Hematoxilina-eosina entre os grupos	47
Tabela 14 - Comparações múltiplas dos parâmetros histológicos com <i>Luxol Fast Blue</i> entre os grupos	48
Tabela 15 - Descrição do tempo de bexiga neurogênica segundo grupos e resultado dos testes comparativos	49
Tabela 16 - Resultado das comparações do tempo de bexiga neurogênica entre os grupos avaliados	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO-SPINE	- Grupo de trabalho para questões de osteossíntese - Coluna
ASIA	- Associação Americana de Lesão Medular
ATP	- Trifosfato de adenosina
BBB	- Basso, Beattie e Bresnahan
Ca ²⁺	- Cálcio
CAPPesp	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa)
CCAC	- Conselho Canadense de Cuidado Animal
CEUA	- Comissão de Ética no uso de Animais
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	- Ciclo-oxigenase
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
EEG	- Equações de estimação generalizadas
EPH	- Escada no Plano Horizontal
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H ⁺	- Hidrogênio
HE	- Hematoxilina-eosina
IL	- Interleucina
IOT	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia
K ⁺	- Potássio
LFB	- <i>Luxol Fast Blue</i>
LOX	- Lipo-oxigenase
MASCIS	- <i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i>
Na ²⁺	- Sódio
NYU	- Universidade de Nova Iorque
OCT	- Composto de temperatura de corte ideal
Rho-ROCK	- Proteína quinase associada a RHO
SF	- Soro fisiológico
T10	- Décima vértebra torácica
T11	- Décima primeira vértebra torácica
T12	- Décima segunda vértebra torácica
T8	- Oitava vértebra torácica
T9	- Nona vértebra torácica
TNF	- Fator de necrose tumoral
TRM	- Trauma raquimedular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	FISIOPATOLOGIA.....	14
1.2	TRATAMENTO	15
1.3	TERAPIAS FARMACOLÓGICAS ASSOCIADAS	16
1.3.1	Riluzole	17
1.3.2	Minociclina	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVOS GERAIS	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	MÉTODOS.....	21
3.1	ÉTICA	22
3.2	MANIPULAÇÕES DOS ANIMAIS E AMOSTRAGEM.....	22
3.3	LESÃO MEDULAR E CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	23
3.4	GRUPOS DE ESTUDO	26
3.5	PROTOCOLO RILUZOLE	26
3.6	PROTOCOLO MINOCICLINA	26
3.7	PROTOCOLO MINOCICLINA/RILUZOLE	26
3.8	TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA.....	26
3.8.1	Avaliação pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan.....	27
3.8.2	Avaliação pela Escada em Plano Horizontal	29
3.8.3	Avaliação de bexiga neurogênica	29
3.9	COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA E <i>LUXOL FAST BLUE</i>	30
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	31
3.11	ANÁLISE DE RISCO, MEDIDAS DE PROTEÇÃO E SUSPENSÃO DA PESQUISA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	GRUPOS AVALIADOS	34
4.2	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	34
4.3	ANÁLISE DE FUNCIONALIDADE (ESCALA DE BBB).....	35
4.4	AVALIAÇÃO DA ESCADA NO PLANO HORIZONTAL	40
4.5	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	44
4.6	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE OS GRUPOS QUANTO AO TEMPO DE BEXIGA NEUROGÊNICA	49
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO	69

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a lesão medular é uma das principais causas de deficiência física em todo o mundo afetando milhões de pessoas. Sua ocorrência reduz significativamente a qualidade e também a expectativa de vida dos pacientes, além do impacto financeiro implicado com gastos em saúde, fundos previdenciários e perda da capacidade laboral¹.

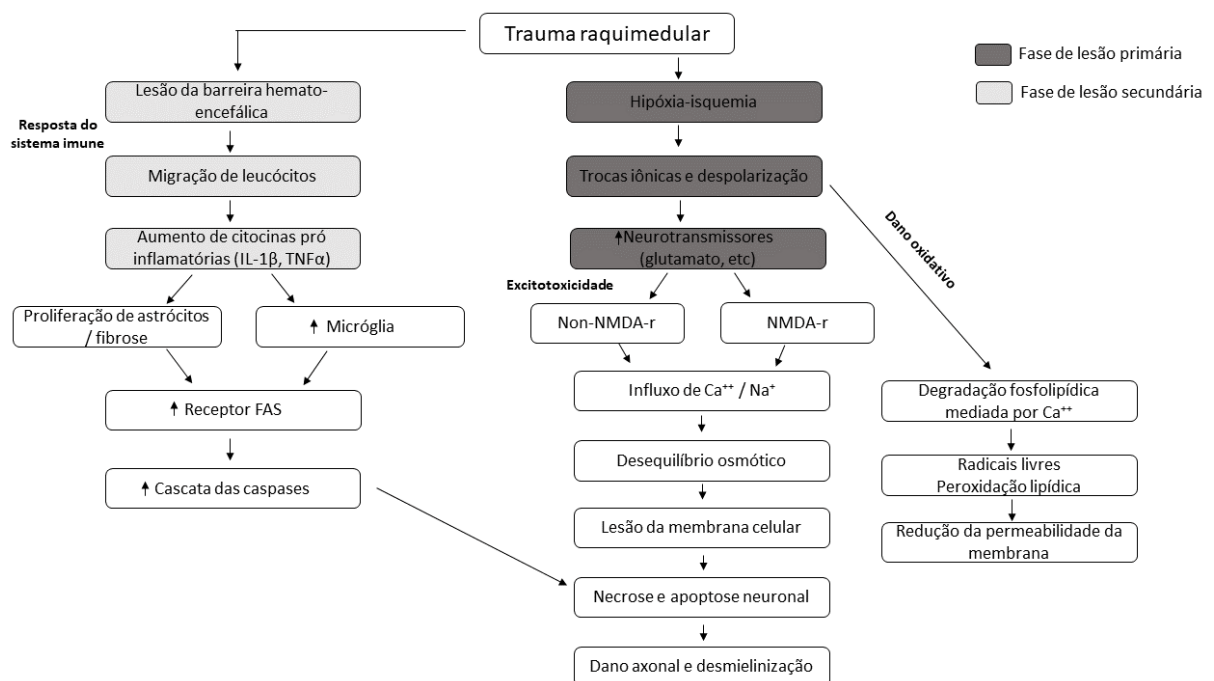
Apesar da real incidência da lesão medular traumática no Brasil ser desconhecida, estima-se que seja em torno de 71 novos casos por milhão habitantes/ano. Dentre as principais causas do trauma raquimedular (TRM) no Brasil, destacam-se os acidentes automobilísticos, queda de altura, mergulho em água rasa e ferimentos por armas de fogo e branca². Tal epidemiologia sofre alterações a depender da região, sexo, faixa etária, nível de escolaridade e entre grandes centros e cidades de pequeno porte³. No Brasil, o principal grupo vítima de TRM são pacientes jovens do sexo masculino e com baixo nível de escolaridade, embora haja um aumento gradativo do TRM em idosos devido às quedas nesta população³⁻⁵.

Além das causas clássicas de TRM, é importante mencionar os eventos iatrogênicos como fator etiológico em expansão pelo envelhecimento da população e pelo aumento de procedimentos invasivos realizados. As principais condições deste grupo são resultantes de cirurgias e procedimentos invasivos da coluna vertebral, tratamentos de aneurismas de aorta, embolizações, procedimentos anestésicos, hematomas espontâneos por uso de anticoagulantes e uso de outros medicamentos, como a quimioterapia intratecal. Estima-se que 2% dos novos casos de TRM aconteçam por complicações cirúrgicas⁶.

1.1 FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da lesão medular é bifásica e consiste na lesão primária, de natureza física ocasionada diretamente pelo trauma, seguida pela lesão secundária (Figura 1). A lesão secundária ocorre em decorrência de um processo celular complexo e multifatorial com ativação de uma série de mecanismos fisiopatológicos em um período de tempo de horas a dias após o trauma inicial culminando, em última análise, com a morte celular programada (apoptose) e expansão da zona de lesão neurológica para além do local do trauma⁷.

Figura 1 - Fisiopatologia da cascata do trauma raquimedular



NMDA-R = receptor N-metil-D-aspartato.

Fonte: adaptado de Ishikawa et al.⁸.

Durante a cascata de lesão secundária, o edema contribui com a isquemia, ocorre a migração de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos para o sítio do trauma e liberação de diferentes citocinas inflamatórias ($TNF-\alpha$, $IL-1B$, $IL-6$) com pico de concentração local após 6-12 horas do trauma e período de ação por até 4 dias após a lesão. Desequilíbrio hidroeletrólítico como hipercalcemia e hipernatremia intracelular, além de hipercalcemia extracelular, são outros fatores implicados na lesão. A hipercalcemia intracelular ativa proteases e leva a disfunção mitocondrial e morte celular⁹.

Também são observadas liberação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e citotoxicidade mediada por aumento glutamato/aspartato^{10,11}. Durante este período, os produtos da necrose celular (ATP, DNA e K⁺) criam um ambiente citotóxico com ativação da micróglia e mais recrutamento de macrófagos¹².

Além da limitada plasticidade do sistema nervoso central, com a perda parenquimatosa, criam-se cavidades que impedem mecanicamente a reestruturação física da anatomia neural e da migração celular reparadora. A hiperproliferação celular anômala, o tecido fibroso circundante (cicatriz glial – hiperproliferação de astrócitos) e a ação de proteoglicanas específicas e glicoproteínas de mielina via proteína quinase associada a RHO (Rho-ROCK) inibem o crescimento neuronal. Estes mecanismos associados limitam de forma severa a regeneração neural e a remielinização^{11,12}.

É importante mencionar que tais mecanismos descritos não acontecem isoladamente, mas sim de forma interconectada. Portanto, cada um destes ciclos, quando iniciado, pode reativar a si e aos outros mecanismos da lesão secundária, perpetuando-a e expandindo-a¹³.

1.2 TRATAMENTO

O tratamento adequado do paciente vítima de TRM se inicia no ambiente extra-hospitalar com as medidas adequadas do Suporte de Vida Avançado no Trauma[®], já que cerca de 25% destes pacientes apresentam politraumatismo¹⁴. Os pacientes com TRM suspeito ou confirmado se beneficiam de imobilização com prancha rígida e/ou colar cervical seguida de transferência para hospitais terciários com equipe multidisciplinar (cirurgiões de coluna, intensivistas, enfermeiras e fisioterapeutas especializados) treinada em suporte a pacientes com TRM¹⁵.

A principal modalidade de tratamento na fase aguda do TRM ainda é a cirurgia descompressiva em até 24 horas^{16,17}. Os pacientes submetidos à cirurgia descompressiva precoce (< 24 horas) apresentam dois níveis superiores de avaliação na Escala de Deficiência da Associação Americana de Lesão Medular (ASIA) quando comparados àqueles com descompressão tardia^{16,18}.

O tratamento com corticosteroides ainda é controverso pois o seu benefício principal reside com a infusão precoce, em menos de 8 horas do trauma, com aumento de efeitos colaterais devido ao seu uso em altas doses, como pneumonia e sepse¹⁹. As

diretrizes do Grupo de trabalho para questões de osteossíntese – Coluna (AO-SPINE) orientam o uso de metilprednisolona por 24 horas, tendo seu início em até 8 horas após o trauma, em paciente sem contraindicações clínicas ao seu uso²⁰.

A fase secundária do trauma gera edema e isquemia neural, sendo a hipotensão e a hipóxia, portanto, fatores importantes no desfecho clínico. Dois estudos demonstraram que a pressão arterial média acima de 85 mmHg-90 mmHg está relacionada com melhores resultados clínicos^{21,22}.

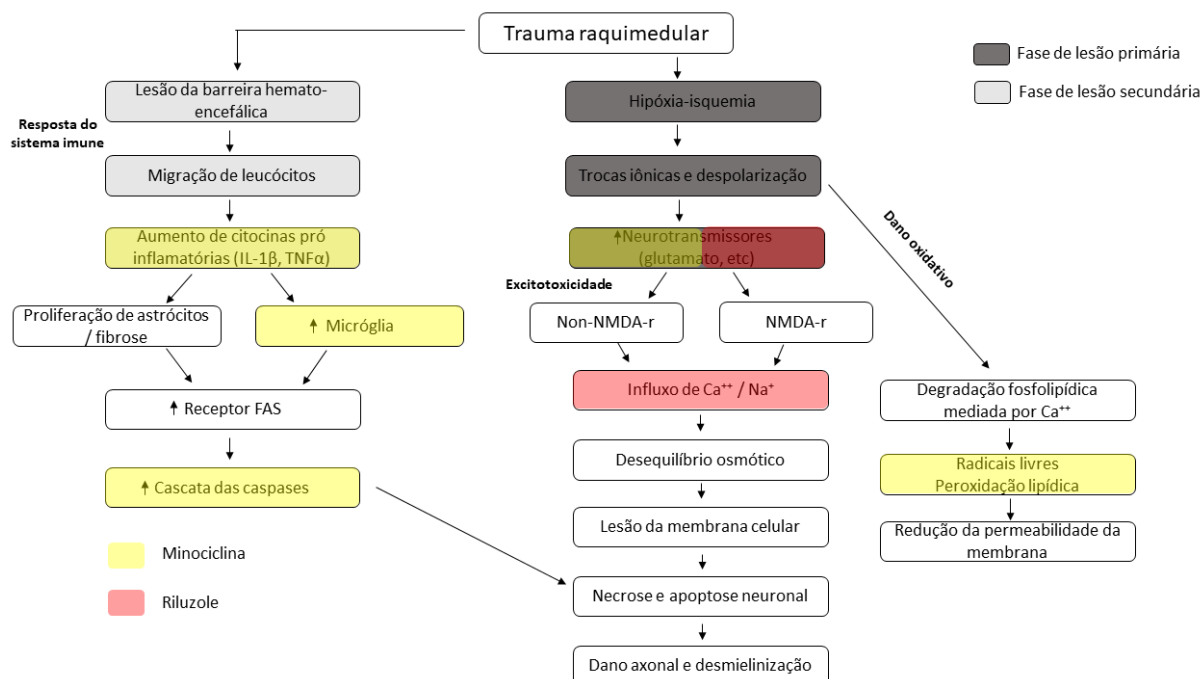
Embora o tratamento do TRM não tenha mudado substancialmente nas últimas décadas, o estudo contínuo da fase secundária e o melhor entendimento de seus múltiplos mecanismos de lesão possibilitaram o desenvolvimento de diferentes estratégias de tratamento neuroprotetoras, principalmente em modelos animais¹¹.

Diversos estudos em período pré-clínico com ação em diferentes componentes da fase secundária já estão em andamento sendo as terapias mais promissoras o riluzole, a minociclina, o magnésio, o fator de crescimento derivado de fibroblasto, o fator estimulador de colônias de granulócitos, o fator de crescimento de hepatócito e a glibenclamida^{23,24}.

1.3 TERAPIAS FARMACOLÓGICAS ASSOCIADAS

O avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na fase secundária do TRM revelou a existência de múltiplas vias patológicas inter-relacionadas, capazes de amplificar reciprocamente o dano tecidual por meio de ciclos de retroalimentação inflamatória, excitotóxica e apoptótica²⁵. Neste contexto, é postulado que o bloqueio concomitante de mais de uma destas vias tenha efeito sinérgico em diminuir a resposta secundária ao TRM¹.

Com base nos conhecimentos atuais sobre os eventos bioquímicos e celulares que compõem essa fase secundária, e considerando os mecanismos de ação complementares de agentes com eficácia já demonstrada de forma isolada, este estudo selecionou o riluzole e a minociclina como candidatos terapêuticos combinados. O riluzole atua predominantemente na modulação da excitotoxicidade por glutamato e na estabilização de canais de sódio, enquanto a minociclina apresenta propriedades anti-inflamatórias e antiapoptóticas, com potencial neuroprotetor. A hipótese central é que a associação desses fármacos possa potencializar os efeitos benéficos observados em monoterapia, ampliando a neuroproteção no contexto do TRM (Figura 2).

Figura 2 - Fisiopatologia do trauma raquimedular e atuação da minociclina e do riluzole

NMDA-R = receptor N-metil-D-aspartato.

Fonte: adaptado de Ishikawa et al.⁸.

1.3.1 Riluzole

O riluzole é um benzotiazol, bloqueador do canal de sódio, com resultados neuroprotetores promissores em estudos animais e humanos. Atualmente, é utilizado em humanos no tratamento da esclerose lateral amiotrófica e em distúrbios psiquiátricos. Seus efeitos neuroprotetores se devem primariamente à melhor regulação do equilíbrio iônico do cálcio e do sódio além de bloquear os mecanismos de lesão celular mediados pelo glutamato^{1,26}. A lesão celular torna a membrana celular altamente permeável ao influxo de sódio, por meio de canais de sódio voltagem-sensíveis induzidos pelo trauma, com consequente aumento intracelular de cálcio, acidose e edema celular^{26,27}. O aumento de sódio e potássio intracelular também levam ao aumento da secreção de glutamato. O excesso de glutamato na fenda sináptica hiperexcita os neurônios, eventualmente, levando-os ao edema e morte²⁵.

Há pesquisas acerca da capacidade do riluzole em diminuir o dano neurológico e melhorar os desfechos sensitivo-motores e eletrofisiológicos em animais^{28,29}. Baseado em tais resultados, já estão em andamento estudos clínicos Fase I/II³⁰⁻³².

Até o presente momento foram encontrados 37 estudos de intervenção envolvendo lesão medular e uso terapêutico de riluzole. Destes, há três estudos clínicos randomizados em andamento, 26 estudos animais e oito estudos farmacológicos. Em termos gerais, foram analisados a performance em testes motores, decréscimo nociceptivo e diminuição da espasticidade com resultados animadores. Também foram notados possíveis ganhos eletrofisiológicos e preservação de células neurais circundantes à área de lesão primária³³.

Portanto, os principais efeitos do riluzole teoricamente seriam por meio da redução do sódio intracelular e reestabelecimento dos trocadores Na^+/Ca^+ , do sistema antiporter Na^+/H^+ . O riluzole também é conhecido por inibir a liberação pré-sináptica de glutamato dependente de influxo Ca^{2+} ^{26,34,35}.

1.3.2 Minociclina

Outro fármaco com potencial de modular a resposta secundária no traumatismo raquimedular é a minociclina, um antibiótico de segunda geração da classe das tetraciclina³⁶. Estudos pré-clínicos já demonstraram seu benefício em patologias como esclerose múltipla, isquemia cerebral e Doença de Huntington^{11,37}.

A minociclina evita a apoptose dos oligodendrócitos e apresenta efeitos anti-inflamatórios importantes por inibir a ativação microglial e liberação da $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, ciclogênase-2 e metaloproteinases^{38,39}. Além disso, sugere-se que a minociclina iniba a disfunção mitocondrial, promova a inativação de radicais livres, iniba a ação de metaloproteinases, ciclo-oxigenases (COX) e lipo-oxigenases (LOX) e interrompa a deflagração da apoptose^{40,41}. A minociclina também inibe por vias alternativas ao riluzole, a excitotoxicidade por glutamato⁴¹.

Similarmente ao riluzole, embora em menor número, estudos animais com a minociclina demonstraram redução da área de lesão em análises histopatológicas e melhores desfechos clínicos com seu uso. Um estudo clínico fase II⁴² demonstrou que pacientes com lesão medular cervical incompleta que receberam minociclina tiveram uma melhor recuperação motora que o placebo. Atualmente, um estudo clínico fase 3, “Minocycline in Acute Spinal Cord Injury (MASC)”, está em curso²³.

Percebe-se, portanto, que a minociclina é um medicamento também potencialmente capaz de diminuir os efeitos secundários do TRM por múltiplas vias⁴¹. Também é notório que os mecanismos de ação da minociclina em tais vias são diferentes dos postulados ao riluzole.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a preservação neurológica histológica e a recuperação funcional motora de ratos Wistar com paraplegia cirurgicamente provocada seguida de injeção de riluzole isoladamente, minociclina isoladamente, riluzole e minociclina associados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a recuperação funcional dos animais submetidos à lesão medular por compressão seguida da injeção de riluzole isoladamente, minociclina isoladamente, riluzole e minociclina associados pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan por 6 semanas.

Avaliar a recuperação motora integrada e proprioceptiva dos animais submetidos à lesão medular por compressão seguida da injeção riluzole isoladamente, minociclina isoladamente, riluzole e minociclina associados pela Escada no Plano Horizontal (EPH) ao final das 6 semanas de estudo.

Avaliar a recuperação da bexiga neurogênica nos animais submetidos à lesão medular por compressão, seguida da administração de riluzole isoladamente, minociclina isoladamente e da associação de riluzole com minociclina após 6 semanas.

Avaliar a magnitude da lesão e a preservação histológica neural após 6 semanas do trauma raquimedular seguido da injeção dos medicamentos conforme protocolo por meio da coloração por hematoxilina-eosina e *luxol fast-blue*.

3 MÉTODOS

3.1 ÉTICA

O protocolo de pesquisa foi submetido e recebeu aprovação da Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), bem como da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) do Hospital das Clínicas da FMUSP, por meio da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo no 1249/2019 (Anexo A).

Os animais utilizados neste estudo foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde são mantidos sob rigoroso controle sanitário, reduzindo o risco de ocorrência de doenças. A manipulação dos animais foi conduzida por um profissional experiente e devidamente treinado, vinculado ao Laboratório de Lesão Medular do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Toda a pesquisa foi conduzida de maneira ética, seguindo os critérios estabelecidos pelo Conselho Canadense de Cuidados com Animais (CCAC) e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 MANIPULAÇÕES DOS ANIMAIS E AMOSTRAGEM

Para a realização deste projeto, foram utilizados 50 ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 60 dias de vida pós-natal (P60). Os animais foram obtidos do Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no Centro de Pesquisa do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, com temperatura controlada (20 °C -22 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas, e foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*.

No momento da recepção, todos os animais passaram por uma avaliação para verificar suas condições gerais, incluindo a aparência da pelagem e estado clínico, assegurando a normalidade de ambos. Além disso, foram analisados quanto à motricidade, garantindo que apresentassem movimentos normais. Somente os animais que atenderam a esses critérios foram incluídos no estudo.

Antes do início do estudo, os animais passaram por um período de treinamento contínuo para se familiarizarem com o manuseio pelos pesquisadores e serem estimulados a se movimentar por meio de um processo de condicionamento. Esse procedimento teve como objetivo facilitar a avaliação da função motora após a lesão.

Os critérios de exclusão foram: (I) morte após a indução da lesão medular; (II) presença de anomalias visíveis na região lesionada da medula espinhal; (III) ocorrência de autofagia ou mutilação entre os animais; e (IV) capacidade de locomoção normal na primeira avaliação após a lesão, alcançando 21 pontos na escala de BBB de avaliação funcional.

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com a fórmula $N = [4\sigma^2(z_{crit} + z_{pwr})^2]/D^2$ (Eng, 2003), onde N é o número de amostras, σ é o desvio padrão assumido de cada grupo (que assumiu-se 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 assumiu-se como 45%). Com estes parâmetros, definiu-se que o número da amostra deveria ser 8,3, o qual foi arredondado para o próximo número inteiro, totalizando 9 ratos por grupo. Ademais, devido à dificuldade da cirurgia, adicionou-se uma margem no número de animais de 10%, totalizando 10 animais por grupo.

O presente projeto, bem como os cuidados e manejo dos animais no pré e pós-operatório, foram avaliados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da FMUSP e foram realizados de acordo com o Princípio Humanitário da Experimentação Animal, ou princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*).

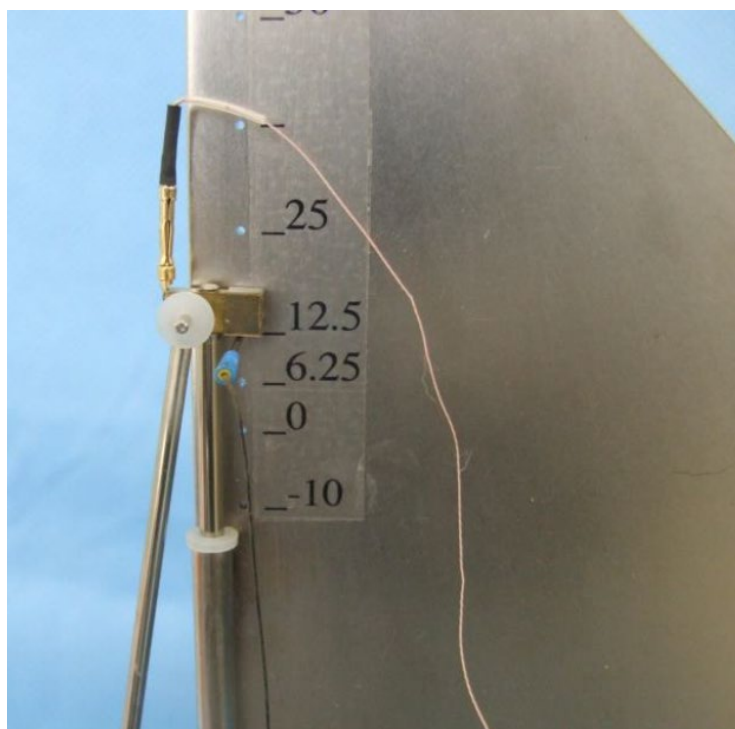
3.3 LESÃO MEDULAR E CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Os animais operados sofreram lesão medular e aplicação de materiais poliméricos. Para isto, receberam injeção intramuscular de pentabiótico e cloridrato de tramadol na dose de 25 mg/kg uma hora antes da cirurgia⁴³.

Com o uso de uma caixa de acrílico, os animais foram induzidos à anestesia com isoflurano (1,5-2,0 vols.%) em 100% de oxigênio. Após sedação leve, uma máscara foi colocada para cobrir todo o focinho do animal levando a um plano anestésico mais profundo para então realizar-se a tricotomia e limpeza da região dorsal que foi submetida à incisão por material cirúrgico.

As lesões foram produzidas obedecendo o protocolo internacional *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS)⁴⁴ pelo sistema NYU (Universidade de Nova Iorque) *Impactor*⁴⁵ (Figura 3).

Figura 3 - Calibração do MASCIS *Impactor*

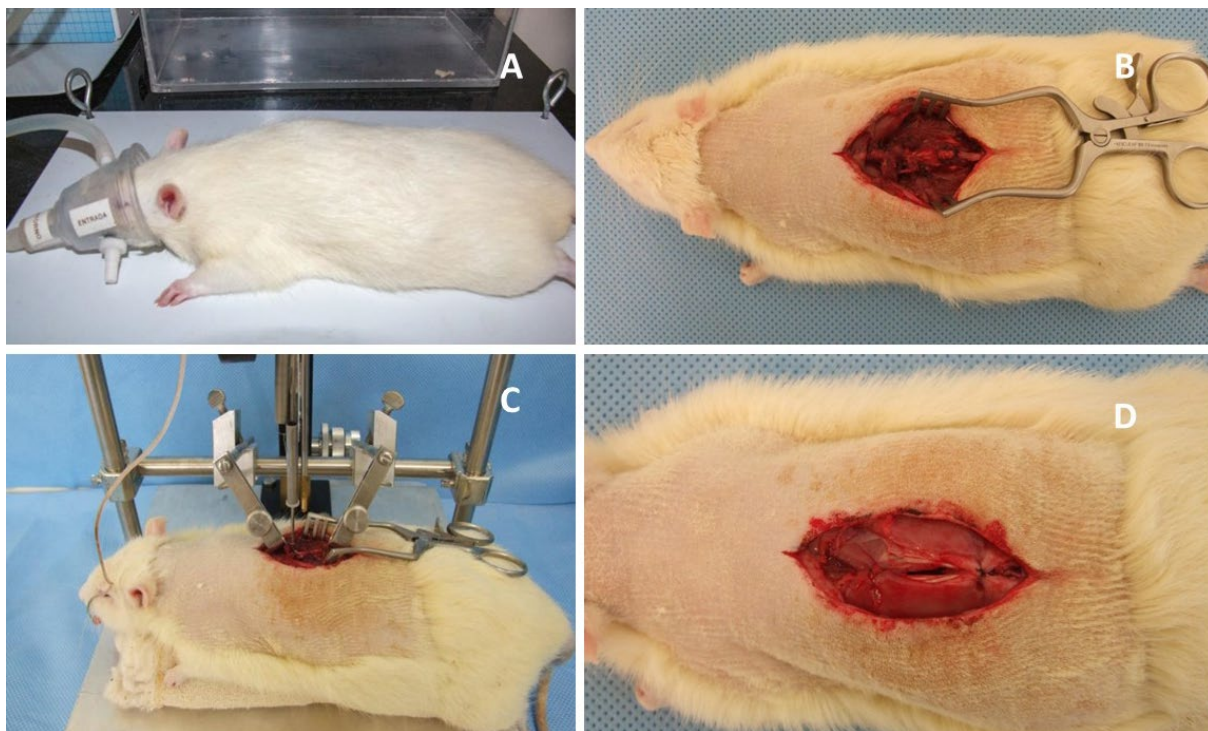


Fonte: acervo pessoal do autor.

As lesões foram feitas utilizando-se o *NYU Impactor*, a uma altura de 12,5 mm (lesão moderada) em todos os ratos (Figura 4). Para isso, realizou-se uma laminectomia que expôs a medula espinhal da seguinte forma: na linha média dorsal, realizou-se uma incisão na pele para se expor T8-T12. Os músculos nos processos espinhosos de T9-T11 foram afastados. Em casos de hemorragia, foi utilizado um coagulador bipolar. Com um alicate, removeu-se o arco posterior de T9 e T10 começando pela borda caudal de T10 e retiraram-se pequenos fragmentos ao longo da lâmina de T10 com o alicate orientado cranialmente até T9. O processo espinhoso de T8 e a medula foram mantidos intactos. Certificou-se que a via de acesso acomodaria a cabeça do *Impactor* com uma margem maior que 2 mm⁴⁶.

Após a lesão, o sítio da lesão da contusão foi inspecionado e lavado com solução fisiológica de cloreto de sódio à temperatura ambiente. Foi realizada a aproximação dos planos teciduais musculares, fasciais e da pele com sutura de ponto simples com fio nylon monofilamentado 2.0.

Figura 4 - Sequência de tempos cirúrgicos. A) Anestesia e sedação; B) Dissecção e laminectomia; C) Posicionamento para lesão medular; D) Fechamento por planos



Fonte: acervo pessoal do autor.

Foi aplicada nos animais uma dose de cloridrato de tramadol 25 mg/kg por 3 dias de 8 em 8 horas após o procedimento. Os animais que apresentaram bexiga neurogênica foram submetidos à massagem para esvaziamento vesical 2 vezes por dia.

Os ratos foram realocados para as mesmas gaiolas de origem sob as mesmas condições ambientais. Essas condições incluíram manejo adequado, alimentação *ad libitum*, substituição periódica da maravalha e higienização da gaiola, que foram mantidas até a conclusão do experimento.

Durante esse período, os animais foram monitorados para identificar possíveis mutilações, infecções ou quaisquer outras alterações que pudessem representar critérios de exclusão ou complicações.

3.4 GRUPOS DE ESTUDO

Os animais foram alocados de forma randômica em 5 grupos: O grupo 1 foi submetido à laminectomia isolada (sham). O grupo 2, salina, foi submetido à laminectomia seguida de lesão medular e soro fisiológico (SF). O grupo 3 foi submetido à laminectomia/lesão medular e tratamento com riluzole. O grupo 4 foi submetido à laminectomia/lesão medular e tratamento com minociclina. O grupo 5 foi submetido à laminectomia/lesão medular e tratamento com minociclina + riluzole.

3.5 PROTOCOLO RILUZOLE

O protocolo terapêutico consiste em 5 mg/kg de riluzole (RILUZOLE, R116-solid, Drogavet, São Paulo, SP, Brasil) dissolvido em 0,1 mol/L de ácido clorídrico diluído com salina tamponada em fosfato a 10 mg/mL aplicados intraperitonealmente em 15 minutos e 60 minutos após o trauma, e então, duas vezes ao dia nos 3 dias subsequentes. A dose escolhida foi baseada nos estudos de Wu et al.⁴⁷ que reportaram taxas de sobrevivência de 92,3% caso fossem aplicadas 2 doses diárias de até 6 mg/kg e de forma análoga à maioria dos estudos atuais que utilizam a dose de 5 mg/kg de riluzole em doses únicas ou seriadas⁴⁸.

3.6 PROTOCOLO MINOCICLINA

Para a infusão intraperitoneal de minociclina (MINOCICLINA, Drogavet, São Paulo, SP, Brasil), foi definida a dose de 45 mg/kg aplicada com 15 minutos e 60 minutos após o trauma medular, e então, duas vezes ao dia nos 3 dias subsequentes de forma similar à realizada com o riluzole. A dose escolhida foi baseada nos estudos de Festoff et al.⁴⁹ e Aras et al.⁵⁰ que mostraram que o efeito da minociclina é dose-dependente com melhores resultados na dose de 90 mg/kg nas primeiras 24 horas.

3.7 PROTOCOLO MINOCICLINA/RILUZOLE

Os ratos do grupo 5 receberam ambas as drogas de forma análoga ao previamente detalhado.

3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

3.8.1 Avaliação pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan

A avaliação da função motora dos animais após a lesão medular, bem como a quantificação da recuperação funcional, no decorrer do tempo foi realizada pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)⁵¹, sempre no mesmo horário e local, sem identificação entre os grupos (teste cego) por 6 semanas. Para a análise comportamental, foram avaliados 10 animais em cada um dos cinco grupos totalizando 50 animais. Cada animal foi então classificado por meio de uma pontuação que varia de 0 a 21, sendo 0, os animais com paraplegia total do membro, e 21, os animais com atividade locomotora normal (Quadro 1).

Quadro 1 - Escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan

Escala de classificação, de 21 pontos, de Basso, Beattie e Bresnahan	
(00)	Nenhum movimento do membro posterior;
(01)	Movimento discreto de uma ou duas articulações, usualmente o quadril e/ou joelho;
(02)	Movimento amplo de uma articulação, ou movimento amplo de uma articulação e movimento discreto de outra articulação;
(03)	Movimento amplo de duas articulações;
(04)	Movimento discreto das três articulações do membro posterior;
(05)	Movimento discreto de duas articulações e movimento amplo da terceira;
(06)	Movimento amplo de duas articulações e movimento discreto da terceira;
(07)	Movimento amplo das três articulações do membro posterior;
(08)	Movimento em “varredura” do membro posterior para se realizar o passo, ou posicionamento plantar da pata, ambos sem sustentação de peso;
(09)	Posicionamento plantar da pata com sustentação do peso do corpo, na posição estática somente, ou passos dorsais com sustentação de peso ocasional, frequente, ou constante e sem passos plantares;
(10)	Passos plantares ocasionais, com sustentação de peso, mas sem coordenação entre o membro anterior e posterior;
(11)	Passos plantares com sustentação de peso, de frequentes a constantes e sem coordenação entre o membro anterior e o posterior;
(12)	Passos plantares com sustentação de peso, de frequentes a constantes e coordenação ocasional entre o membro anterior e o posterior;
(13)	Passos plantares com sustentação de peso, de frequentes a constantes e coordenação frequente entre o membro anterior e o posterior;
(14)	Passos plantares com sustentação de peso constante, com coordenação constante entre o membro anterior e o posterior; posição da pata predominantemente rodada (externamente ou internamente) durante a locomoção, quando é feito o contato inicial com a superfície, bem como, justamente antes que ela seja levantada ao final da fase de apoio, ou passos plantares frequentes, coordenação constante entre o membro anterior e o posterior, e passos dorsais ocasionais;
(15)	Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior; sem abertura dos dedos, ou abertura ocasional dos dedos, durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao corpo no contato inicial;
(16)	Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial, e rodada ao ser levantada;
(17)	Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada;
(18)	Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre constantemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e rodada ao ser levantada;
(19)	Passos plantares e coordenação constante entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre constantemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada; cauda está abaixada durante parte ou durante todo o tempo;
(20)	Passos plantares constantes e andar constantemente coordenada; constante abertura dos dedos; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantado; cauda constantemente erguida e tronco instável;
(21)	Passos plantares constantes e andar coordenado; constante abertura dos dedos; a posição da pata é predominantemente paralela em todas as posições; estabilidade do tronco constante e cauda constantemente erguida.

3.8.2 Avaliação pela Escada em Plano Horizontal

A avaliação da função motora integrada e proprioceptiva dos animais foi realizada pela EPH⁵²⁻⁵⁵. O método de avaliação funcional por meio da EPH consiste na observação da movimentação do animal em um plano horizontal formado por filetes de ferro de 0,4 cm de diâmetro dispostos a uma distância de 1,5 cm. A plataforma apresenta 100 cm de comprimento, 35 cm de largura e é suspensa a 46 cm.

Os animais foram previamente treinados a caminhar pela plataforma sendo que necessariamente devem apoiar-se nos filetes de ferro para não caírem. Eles foram estimulados a cruzar a plataforma para alcançar água com açúcar do lado oposto.

O teste tem por intuito analisar a função proprioceptiva dos animais, a integração do movimento das patas anteriores com as patas posteriores. Além disso, o teste da escada horizontal limita movimentos adaptativos dos ratos com lesão medular por necessidade de movimentos específicos e integrados.

Os parâmetros analisados foram o número de passos, o número de acertos (passada com boa preensão da pata traseira do camundongo ao filete de ferro), número de erros (erros com padrão aleatório, presente mesmo em animais não submetidos à lesão medular experimental) e número de escorregões (erros decorrentes de falha neurológica - proprioceptiva e motora). Os ratos percorreram a Escada Horizontal três vezes e usou-se a média para a análise estatística final. Foram realizadas duas avaliações, a primeira antes da lesão medular e a segunda após 6 semanas de seguimento.

São considerados como escorregões, padrão de falhas neurológicas dos ratos durante suas passagens pela escada horizontal, passos sem contato com o degrau, contato com a região dorsal da pata posterior do animal ou passos seguidos de perda do equilíbrio ou da preensão após contato inicial^{52,54,55}.

3.8.3 Avaliação de bexiga neurogênica

Os animais do estudo foram avaliados quanto à presença ou ausência de bexiga neurogênica após lesão medular. A avaliação foi realizada 2 dias após o TRM e repetida semanalmente até a 6ª semana, concomitantemente à avaliação pela escala de BBB.

3.9 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA E *LUXOL FAST BLUE*

Após 6 semanas de avaliação comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca sob anestesia. Os animais receberam overdose de uretana e foram perfundidos em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB), em pH fisiológico. Um segmento de 1 cm da medula espinhal foi dissecado e colocado em sacarose a 4 °C *overnight* para crioproteção. Os segmentos da medula espinhal foram emblocados em crioprotetor OCT para a preparação de cortes sagitais em lâminas gelatinizadas com a ajuda de um criostato (Leica). As lâminas contendo os cortes foram submetidas a uma bateria de coloração e lavagens incluindo 30 segundos em água MiliQ®, 1 minuto em solução de hematoxilina-eosina (HE), 10 segundos em água MiliQ®, 3 segundos em água amoniacal, 5 segundos em água MiliQ®, 5 segundos em solução de eosina, 1 segundo em água MiliQ®, 5 segundos em álcool 96%, 5 segundos em álcool 99,9% e 5 segundos em xilol. Outras lâminas análogas foram submetidas à coloração por LFB, um marcador de mielina, por 4 horas.

O serviço de patologia analisou e classificou todos os fragmentos de acordo com a presença de necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa (cística) e infiltrado celular, utilizando uma escala de graduação: 0 para ausência, 1 para discreta, 2 para moderada e 3 para acentuada. Os patologistas realizaram a avaliação de forma cega, ou seja, sem conhecimento prévio sobre a qual grupo pertenciam as amostras das medulas dos ratos.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As medidas de peso inicial, final e ganho de peso foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média e desvio padrão) e o tempo de bexiga neurogênica foi descrito com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana e quartis)⁵⁶ e comparados entre os grupos com uso de análises de variâncias (ANOVA) e teste Kruskal-Wallis, seguidos de comparações múltiplas de Bonferroni ou Dunn, respectivamente⁵⁷.

A escala de BBB foi descrita segundo grupos e momentos de avaliação com uso de medidas resumo e comparadas entre os grupos e momentos com uso de equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição Poisson e função de ligação identidade assumindo matriz de correlações autorregressiva de primeira ordem [AR(1)] entre os momentos⁵⁸.

Os parâmetros de avaliações da EPH foram descritos segundo grupos e momentos e comparados entre os grupos e momentos com uso de EEG com distribuição normal e função de ligação identidade assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos⁵⁸.

Os resultados das avaliações pelas escala BBB e EPH foram seguidos de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais grupos e momentos ocorreram as diferenças quando significativas⁵⁷.

Os parâmetros da histologia foram descritos segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e comparados com uso de testes Kruskal-Wallis, seguidos de comparações múltiplas de Dunn.

As análises foram realizadas com uso do software IBM-SPSS for Windows versão 22.0 e tabulados com uso do software Microsoft-Excel 2013 e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

3.11 ANÁLISE DE RISCO, MEDIDAS DE PROTEÇÃO E SUSPENSÃO DA PESQUISA

Os animais deste estudo foram provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP, onde há rígido controle sanitário, minimizando a chance de prevalência de doenças. A manipulação dos animais foi realizada por técnico experiente, devidamente treinado, pertencente ao Laboratório de Lesão Medular do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Toda a pesquisa foi realizada de forma ética segundo os padrões estabelecidos pelo CCAC e pelo COBEA.

Esta pesquisa seria encerrada, caso houvesse processo infeccioso, reação imunológica ou qualquer outra alteração que ocasionasse sofrimento aos animais do estudo.

4 RESULTADOS

4.1 GRUPOS AVALIADOS

Foram concluídos os experimentos nos cinco grupos: grupo 1 (sham), grupo 2 (salina/SF), grupo 3 (riluzole), grupo 4 (minociclina) e grupo 5 (minociclina/riluzole). Em cada grupo, foram estudados 10 ratos. Não houve perda de nenhum rato ao longo do seguimento de 6 semanas nos cinco grupos estudados. Não foram observados efeitos adversos ou não conformidades com os protocolos de administração, análise comportamental e análise histológica.

4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Foram realizadas avaliações do peso inicial e do percentual de ganho de peso dos cinco grupos ao longo do experimento (Tabela 1). Na avaliação do peso inicial, a comparação dos pesos médios do grupo sham ($303,3 \pm 11,5$ g), do grupo salina ($298 \pm 42,9$ g), do grupo riluzole ($293,2 \pm 24,4$ g), do grupo minociclina ($274 \pm 23,6$ g) e do grupo minociclina + riluzole ($288,8 \pm 14,4$ g) não apresentou diferença estatística ($p = 0,133$), o que demonstra homogeneidade das amostras em relação a este parâmetro morfométrico.

Tabela 1 - Descrição dos pesos dos animais e ganho de peso ao longo do experimento segundo grupos e resultado dos testes comparativos

Variável	Grupo					p
	SF	Riluzole	Sham	Minociclina	Minociclina + Riluzole	
Peso Inicial	$298 \pm 42,9$	$293,2 \pm 24,4$	$303,3 \pm 11,5$	$274 \pm 23,6$	$288,8 \pm 14,4$	0,133
Peso Final	$312,1 \pm 42,2$	$322,3 \pm 22,6$	$349,8 \pm 18,7$	$291,9 \pm 26$	$307,2 \pm 15,5$	
Ganho de peso (%)	$4,9 \pm 2,3$	$10,1 \pm 4,7$	$15,3 \pm 3,4$	$6,5 \pm 2,3$	$6,4 \pm 2,3$	<0,001

Anova

Em relação ao percentual de ganho de peso, observou-se que houve diferença entre os grupos ($p < 0,001$). Pela Tabela 2, constatou-se que o ganho médio de peso do grupo sham ($15,3 \pm 3,4$) foi estatisticamente maior que nos demais grupos ($p < 0,05$) e o grupo riluzole ($10,1 \pm 4,7$) teve maior ganho de peso que o grupo SF ($4,9 \pm 2,3$) ($p = 0,005$). Não houve diferença de ganho de peso na análise comparativa dos demais grupos.

Tabela 2 - Resultado das comparações do ganho de peso entre os grupos

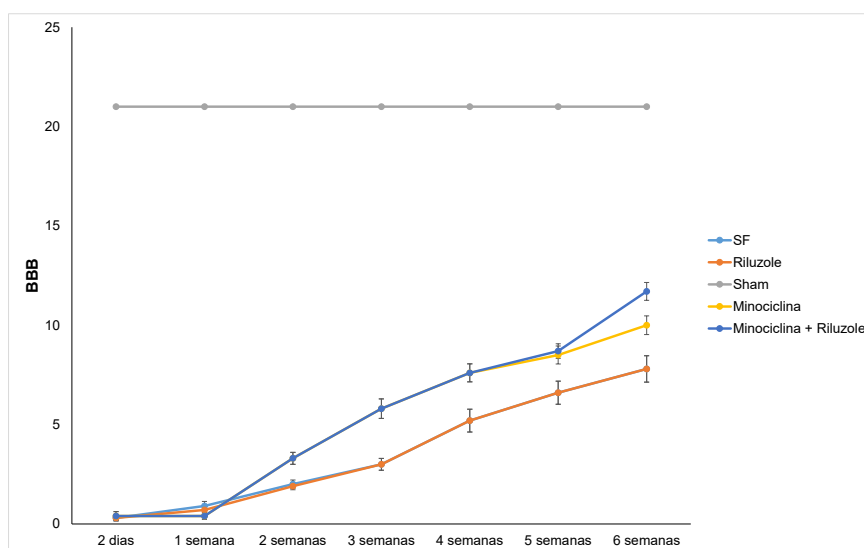
Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
				Inferior	Superior
SF - Riluzole	-5,24	1,40	0,005	-9,37	-1,12
SF - Sham	-10,44	1,40	<0,001	-14,57	-6,32
SF - Minociclina	-1,67	1,40	>0,999	-5,80	2,45
SF - Minociclina + Riluzole	-1,53	1,40	>0,999	-5,66	2,59
Riluzole - Sham	-5,20	1,40	0,006	-9,32	-1,07
Riluzole - Minociclina	3,57	1,40	0,140	-0,55	7,70
Riluzole - Minociclina + Riluzole	3,71	1,40	0,108	-0,41	7,84
Sham - Minociclina	8,77	1,40	<0,001	4,65	12,90
Sham - Minociclina + Riluzole	8,91	1,40	<0,001	4,79	13,04
Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,14	1,40	>0,999	-3,99	4,26

Comparações múltiplas de Bonferroni

4.3 ANÁLISE DE FUNCIONALIDADE (ESCALA DE BBB)

Antes do procedimento cirúrgico, nenhum animal apresentou déficit neurológico. Todos foram classificados com 21 pontos (pontuação máxima) na escala de BBB. O grupo sham permaneceu com 21 pontos durante todo o seguimento, o que confirma que o próprio procedimento de laminectomia isoladamente não resultou em nenhum dano funcional ou viés de análise.

Em todos os momentos de avaliação, o grupo sham apresentou pontuação média na escala de BBB estatisticamente maior que os demais grupos ($p < 0,001$) (Gráfico 1). Observou-se que os grupos SF e riluzole apresentaram uma melhora neurológica progressiva, porém menos acentuada quando comparados aos grupos minociclina e minociclina + riluzole. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao longo do período analisado.

Gráfico 1 - Perfis médios da escala de BBB segundo grupos e respectivos erros padrões

Além disso, não foi identificada a estabilização da melhora neurológica em nenhum dos grupos, fenômeno esperado após determinado período posterior ao TRM. Esse achado sugere que, dentro da janela temporal analisada, a recuperação funcional ainda se encontrava em progresso, sem atingir um platô de estabilização.

A análise dos escores na escala de funcionalidade de BBB ao longo do período de observação revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, bem como uma interação temporal relevante (Tabela 3). A comparação entre os diferentes momentos de avaliação evidenciou uma evolução distinta nos padrões de recuperação funcional entre os grupos tratados.

Tabela 3 - Descrição da escala de funcionalidade de BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado dos testes comparativos

Momento	Grupo					P Grupo	P Momento	P Interação
	SF	Riluzole	Sham&	Minociclina	Minociclina + Riluzole			
2 dias						<0,001	<0,001	0,003
média ± DP	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	21 ± 0	0,4 ± 0,7	0,4 ± 0,7			
mediana (p25; p75)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	21 (21; 21)	0 (0; 1)	0 (0; 1)			
1 semana								
média ± DP	0,9 ± 0,74	0,7 ± 0,68	21 ± 0	0,4 ± 0,52	0,4 ± 0,52			
mediana (p25; p75)	1 (0; 1,25)	1 (0; 1)	21 (21; 21)	0 (0; 1)	0 (0; 1)			
2 semanas								
média ± DP	2 ± 0,67	1,9 ± 0,57	21 ± 0	3,3 ± 0,95	3,3 ± 0,95			
mediana (p25; p75)	2 (1,75; 2,25)	2 (1,75; 2)	21 (21; 21)	3 (2,75; 4)	3 (2,75; 4)			
3 semanas								
média ± DP	3 ± 0,94	3 ± 0,94	21 ± 0	5,8 ± 1,55	5,8 ± 1,55			
mediana (p25; p75)	3 (2; 4)	3 (2; 4)	21 (21; 21)	6 (4; 7,25)	6 (4; 7,25)			
4 semanas								
média ± DP	5,2 ± 1,81	5,2 ± 1,81	21 ± 0	7,6 ± 1,43	7,6 ± 1,43			
mediana (p25; p75)	4,5 (4; 6,25)	4,5 (4; 6,25)	21 (21; 21)	8 (6,75; 8,25)	8 (6,75; 8,25)			
5 semanas								
média ± DP	6,6 ± 1,84	6,6 ± 1,84	21 ± 0	8,5 ± 1,43	8,7 ± 1,16			
mediana (p25; p75)	7 (4,75; 8,25)	7 (4,75; 8,25)	21 (21; 21)	8,5 (7,75; 9,25)	8,5 (8; 9,25)			
6 semanas								
média ± DP	7,8 ± 2,1	7,8 ± 2,1	21 ± 0	10 ± 1,49	11,7 ± 1,42			
mediana (p25; p75)	7,5 (6; 9,25)	7,5 (6; 9,25)	21 (21; 21)	9,5 (9; 12)	11,5 (10,75; 12,5)			

EEG com distribuição Poisson e função de ligação identidade, assumindo correlação AR(1) entre os momentos; & O grupo Sham não participou da análise

Especificamente, os grupos SF e riluzole apresentaram uma melhora estatisticamente significativa a partir da terceira semana pós-lesão (Tabela 4), enquanto os grupos minociclina e minociclina + riluzole demonstraram um início mais precoce da recuperação, com diferenças significativas já observadas a partir da segunda semana (Tabela 5). Esse achado é reforçado pelo efeito de interação tempo x grupo ($p_{\text{interação}} = 0,003$), sugerindo que a resposta terapêutica variou significativamente conforme o tratamento administrado.

Tabela 4 - Resultado das comparações múltiplas da escala de BBB entre os momentos nos grupos SF e riluzole

Grupo	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
SF	2 dias - 1 semana	-0,60	0,30	>0,999	-1,76	0,56
	2 dias - 2 semanas	-1,70	0,47	0,104	-3,49	0,09
	2 dias - 3 semanas	-2,70	0,57	0,001	-4,88	-0,52
	2 dias - 4 semanas	-4,90	0,74	<0,001	-7,73	-2,07
	2 dias - 5 semanas	-6,30	0,83	<0,001	-9,47	-3,13
	2 dias - 6 semanas	-7,50	0,90	<0,001	-10,94	-4,06
	1 semana - 2 semanas	-1,10	0,47	>0,999	-2,88	0,68
	1 semana - 3 semanas	-2,10	0,61	0,194	-4,41	0,21
	1 semana - 4 semanas	-4,30	0,78	<0,001	-7,26	-1,34
	1 semana - 5 semanas	-5,70	0,86	<0,001	-9,00	-2,40
	1 semana - 6 semanas	-6,90	0,93	<0,001	-10,46	-3,34
	2 semanas - 3 semanas	-1,00	0,61	>0,999	-3,31	1,31
	2 semanas - 4 semanas	-3,20	0,82	0,036	-6,33	-0,07
	2 semanas - 5 semanas	-4,60	0,92	<0,001	-8,11	-1,09
	2 semanas - 6 semanas	-5,80	0,99	<0,001	-9,58	-2,02
	3 semanas - 4 semanas	-2,20	0,78	>0,999	-5,17	0,77
	3 semanas - 5 semanas	-3,60	0,95	0,053	-7,21	0,01
	3 semanas - 6 semanas	-4,80	1,03	0,001	-8,74	-0,86
	4 semanas - 5 semanas	-1,40	0,93	>0,999	-4,95	2,15
	4 semanas - 6 semanas	-2,60	1,10	>0,999	-6,80	1,60
	5 semanas - 6 semanas	-1,20	1,02	>0,999	-5,11	2,71
Riluzole	2 dias - 1 semana	-0,40	0,27	>0,999	-1,45	0,65
	2 dias - 2 semanas	-1,60	0,46	0,175	-3,35	0,15
	2 dias - 3 semanas	-2,70	0,57	0,001	-4,88	-0,52
	2 dias - 4 semanas	-4,90	0,74	<0,001	-7,73	-2,07
	2 dias - 5 semanas	-6,30	0,83	<0,001	-9,47	-3,13
	2 dias - 6 semanas	-7,50	0,90	<0,001	-10,94	-4,06
	1 semana - 2 semanas	-1,20	0,44	>0,999	-2,90	0,50
	1 semana - 3 semanas	-2,30	0,59	0,037	-4,56	-0,04
	1 semana - 4 semanas	-4,50	0,76	<0,001	-7,42	-1,58
	1 semana - 5 semanas	-5,90	0,85	<0,001	-9,16	-2,64
	1 semana - 6 semanas	-7,10	0,92	<0,001	-10,62	-3,58
	2 semanas - 3 semanas	-1,10	0,60	>0,999	-3,39	1,19
	2 semanas - 4 semanas	-3,30	0,81	0,019	-6,41	-0,19
	2 semanas - 5 semanas	-4,70	0,91	<0,001	-8,19	-1,21
	2 semanas - 6 semanas	-5,90	0,98	<0,001	-9,66	-2,14
	3 semanas - 4 semanas	-2,20	0,78	>0,999	-5,17	0,77
	3 semanas - 5 semanas	-3,60	0,95	0,053	-7,21	0,01
	3 semanas - 6 semanas	-4,80	1,03	0,001	-8,74	-0,86
	4 semanas - 5 semanas	-1,40	0,93	>0,999	-4,95	2,15
	4 semanas - 6 semanas	-2,60	1,10	>0,999	-6,80	1,60
	5 semanas - 6 semanas	-1,20	1,02	>0,999	-5,11	2,71

Comparações múltiplas de Bonferroni

Tabela 5 - Resultado das comparações múltiplas da escala de BBB entre os momentos nos grupos minociclina e minociclina + riluzole

Grupo	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Minociclina	2 dias - 1 semana	0,00	0,24	>0,999	-0,92	0,92
	2 dias - 2 semanas	-2,90	0,59	<0,001	-5,17	-0,63
	2 dias - 3 semanas	-5,40	0,78	<0,001	-8,39	-2,41
	2 dias - 4 semanas	-7,20	0,89	<0,001	-10,61	-3,79
	2 dias - 5 semanas	-8,10	0,94	<0,001	-11,70	-4,50
	2 dias - 6 semanas	-9,60	1,02	<0,001	-13,50	-5,70
	1 semana - 2 semanas	-2,90	0,55	<0,001	-5,02	-0,78
	1 semana - 3 semanas	-5,40	0,77	<0,001	-8,35	-2,45
	1 semana - 4 semanas	-7,20	0,89	<0,001	-10,60	-3,80
	1 semana - 5 semanas	-8,10	0,94	<0,001	-11,70	-4,50
	1 semana - 6 semanas	-9,60	1,02	<0,001	-13,50	-5,70
	2 semanas - 3 semanas	-2,50	0,82	0,863	-5,63	0,63
	2 semanas - 4 semanas	-4,30	1,01	0,007	-8,15	-0,45
	2 semanas - 5 semanas	-5,20	1,08	0,001	-9,31	-1,09
	2 semanas - 6 semanas	-6,70	1,15	<0,001	-11,10	-2,30
	3 semanas - 4 semanas	-1,80	0,99	>0,999	-5,58	1,98
	3 semanas - 5 semanas	-2,70	1,15	>0,999	-7,10	1,70
	3 semanas - 6 semanas	-4,20	1,25	0,28	-8,96	0,56
	4 semanas - 5 semanas	-0,90	1,08	>0,999	-5,04	3,24
	4 semanas - 6 semanas	-2,40	1,28	>0,999	-7,28	2,48
	5 semanas - 6 semanas	-1,50	1,16	>0,999	-5,94	2,94
Minociclina + Riluzole	2 dias - 1 semana	0,00	0,24	>0,999	-0,92	0,92
	2 dias - 2 semanas	-2,90	0,59	<0,001	-5,17	-0,63
	2 dias - 3 semanas	-5,40	0,78	<0,001	-8,39	-2,41
	2 dias - 4 semanas	-7,20	0,89	<0,001	-10,61	-3,79
	2 dias - 5 semanas	-8,30	0,95	<0,001	-11,95	-4,65
	2 dias - 6 semanas	-11,30	1,10	<0,001	-15,50	-7,10
	1 semana - 2 semanas	-2,90	0,55	<0,001	-5,02	-0,78
	1 semana - 3 semanas	-5,40	0,77	<0,001	-8,35	-2,45
	1 semana - 4 semanas	-7,20	0,89	<0,001	-10,60	-3,80
	1 semana - 5 semanas	-8,30	0,95	<0,001	-11,94	-4,66
	1 semana - 6 semanas	-11,30	1,10	<0,001	-15,50	-7,10
	2 semanas - 3 semanas	-2,50	0,82	0,863	-5,63	0,63
	2 semanas - 4 semanas	-4,30	1,01	0,007	-8,15	-0,45
	2 semanas - 5 semanas	-5,40	1,09	<0,001	-9,55	-1,25
	2 semanas - 6 semanas	-8,40	1,22	<0,001	-13,07	-3,73
	3 semanas - 4 semanas	-1,80	0,99	>0,999	-5,58	1,98
	3 semanas - 5 semanas	-2,90	1,16	>0,999	-7,33	1,53
	3 semanas - 6 semanas	-5,90	1,31	0,003	-10,91	-0,89
	4 semanas - 5 semanas	-1,10	1,09	>0,999	-5,26	3,06
	4 semanas - 6 semanas	-4,10	1,34	0,824	-9,21	1,01
	5 semanas - 6 semanas	-3,00	1,22	>0,999	-7,67	1,67

Comparações múltiplas de Bonferroni

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam que, apesar da tendência observada de melhora precoce na escala de Locomoção de BBB nos grupos tratados com minociclina e minociclina + riluzole em relação aos grupos SF e riluzole, não foi identificada significância estatística entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados ($p > 0,05$). Essa ausência de significância estatística sugere que as diferenças observadas podem ser atribuídas ao acaso, reforçando a necessidade de maior rigor na interpretação clínica dos dados e desenho de estudos futuros.

Tabela 6 - Resultado das comparações múltiplas da escala de BBB entre os grupos em cada momento avaliado

Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
2 dias	SF - Riluzole	0,00	0,25	>0,999	-0,94	0,94
	SF - Minociclina	-0,10	0,27	>0,999	-1,11	0,91
	SF - Minociclina + Riluzole	-0,10	0,27	>0,999	-1,11	0,91
	Riluzole - Minociclina	-0,10	0,27	>0,999	-1,11	0,91
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-0,10	0,27	>0,999	-1,11	0,91
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,00	0,28	>0,999	-1,08	1,08
1 semana	SF - Riluzole	0,20	0,40	>0,999	-1,33	1,73
	SF - Minociclina	0,50	0,36	>0,999	-0,88	1,88
	SF - Minociclina + Riluzole	0,50	0,36	>0,999	-0,88	1,88
	Riluzole - Minociclina	0,30	0,33	>0,999	-0,97	1,57
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	0,30	0,33	>0,999	-0,97	1,57
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,00	0,28	>0,999	-1,08	1,08
2 semanas	SF - Riluzole	0,10	0,62	>0,999	-2,29	2,49
	SF - Minociclina	-1,30	0,73	>0,999	-4,08	1,48
	SF - Minociclina + Riluzole	-1,30	0,73	>0,999	-4,08	1,48
	Riluzole - Minociclina	-1,40	0,72	>0,999	-4,16	1,36
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-1,40	0,72	>0,999	-4,16	1,36
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,00	0,81	>0,999	-3,11	3,11
3 semanas	SF - Riluzole	0,00	0,78	>0,999	-2,96	2,96
	SF - Minociclina	-2,80	0,94	>0,999	-6,39	0,79
	SF - Minociclina + Riluzole	-2,80	0,94	>0,999	-6,39	0,79
	Riluzole - Minociclina	-2,80	0,94	>0,999	-6,39	0,79
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-2,80	0,94	>0,999	-6,39	0,79
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,00	1,08	>0,999	-4,12	4,12
4 semanas	SF - Riluzole	0,00	1,02	>0,999	-3,90	3,90
	SF - Minociclina	-2,40	1,13	>0,999	-6,72	1,92
	SF - Minociclina + Riluzole	-2,40	1,13	>0,999	-6,72	1,92
	Riluzole - Minociclina	-2,40	1,13	>0,999	-6,72	1,92
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-2,40	1,13	>0,999	-6,72	1,92
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,00	1,23	>0,999	-4,71	4,71
5 semanas	SF - Riluzole	0,00	1,15	>0,999	-4,39	4,39
	SF - Minociclina	-1,90	1,23	>0,999	-6,60	2,80
	SF - Minociclina + Riluzole	-2,10	1,24	>0,999	-6,83	2,63
	Riluzole - Minociclina	-1,90	1,23	>0,999	-6,60	2,80
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-2,10	1,24	>0,999	-6,83	2,63
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-0,20	1,31	>0,999	-5,21	4,81
6 semanas	SF - Riluzole	0,00	1,25	>0,999	-4,77	4,77
	SF - Minociclina	-2,20	1,33	>0,999	-7,30	2,90
	SF - Minociclina + Riluzole	-3,90	1,40	>0,999	-9,24	1,44
	Riluzole - Minociclina	-2,20	1,33	>0,999	-7,30	2,90
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-3,90	1,40	>0,999	-9,24	1,44
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-1,70	1,47	>0,999	-7,33	3,93

Comparações múltiplas de Bonferroni

4.4 AVALIAÇÃO DA ESCADA NO PLANO HORIZONTAL

A análise dos dados obtidos nas avaliações pré-intervenção revelou que os animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram desempenhos semelhantes nos testes da EPH (Tabela 7). Esse achado sugere a homogeneidade inicial entre os grupos, garantindo condições comparáveis para a investigação dos efeitos das intervenções. Conforme apresentado na Tabela 7, verificou-se que, para todos os parâmetros avaliados na EPH, houve diferenças estatisticamente significativas na evolução do comportamento médio dos grupos traumatizados ao longo dos momentos de avaliação ($p_{\text{interação}} < 0,05$).

Tabela 7 - Descrição dos parâmetros da avaliação da EPH segundo grupos e momentos de avaliação e resultado dos testes comparativos

Momento	Grupo					P Grupo	P Momento	P Interação
	SF	Riluzole	Sham	Minociclina	Minociclina + Riluzole			
Passos						<0,001	<0,001	<0,001
Pré								
média $\pm$ DP	43,6 $\pm$ 2,3	43,6 $\pm$ 1,2	45,7 $\pm$ 4,6	45,5 $\pm$ 3,7	45,2 $\pm$ 3,7			
mediana (p25; p75)	43,5 (41,8; 45)	44 (43; 44,3)	46 (41,8; 48,5)	44,5 (43; 46,5)	46 (42,3; 48)			
Pós								
média $\pm$ DP	8 $\pm$ 1,3	12,3 $\pm$ 1,6	44,8 $\pm$ 4,5	9,4 $\pm$ 2,4	12,3 $\pm$ 2,1			
mediana (p25; p75)	8 (6,8; 9)	12 (11,5; 13,3)	44,5 (42,3; 46,5)	8,5 (7,8; 12)	12 (10,8; 14,3)			
Acertos (%)						<0,001	<0,001	<0,001
Pré								
média $\pm$ DP	96,9 $\pm$ 2,1	96,1 $\pm$ 2,6	95,6 $\pm$ 0,9	95,6 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2			
mediana (p25; p75)	96,6 (95,4; 98,3)	95,5 (95,3; 98,3)	95,4 (95,1; 95,8)	95,5 (93,4; 97,7)	95,8 (95; 97,8)			
Pós								
média $\pm$ DP	64,4 $\pm$ 23,5	81,2 $\pm$ 10,1	96,2 $\pm$ 2,3	80,8 $\pm$ 10,4	87,3 $\pm$ 6,2			
mediana (p25; p75)	70,8 (51,2; 80,2)	81,7 (71,1; 86,4)	95,6 (94,6; 98,3)	82,6 (70,2; 91,7)	86,2 (81,7; 91,7)			
Escorregões (%)						<0,001	<0,001	<0,001
Pré								
média $\pm$ DP	1,8 $\pm$ 1,7	2,1 $\pm$ 2	1,9 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 1,5	2,2 $\pm$ 1,2			
mediana (p25; p75)	2,2 (0; 2,8)	2,3 (0; 2,4)	2,2 (1,6; 2,4)	2,3 (2,2; 4,4)	2,2 (2,1; 2,3)			
Pós								
média $\pm$ DP	19 $\pm$ 11,1	11,5 $\pm$ 5,9	1,9 $\pm$ 1,5	10 $\pm$ 6	6,5 $\pm$ 3,6			
mediana (p25; p75)	17,4 (11,1; 29,8)	11,7 (7,7; 16,7)	2,2 (0; 2,8)	11,8 (6,3; 14,9)	7,7 (4,7; 9,1)			
Erros (%)						0,002	<0,001	<0,001
Pré								
média $\pm$ DP	1,4 $\pm$ 1,2	1,8 $\pm$ 1,4	2,5 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 1,5			
mediana (p25; p75)	2,2 (0; 2,3)	2,3 (0; 2,4)	2,2 (2,1; 2,4)	2,1 (0; 2,3)	2,2 (0; 2,5)			
Pós								
média $\pm$ DP	16,6 $\pm$ 14,3	8,1 $\pm$ 6,4	1,4 $\pm$ 1,7	9,2 $\pm$ 6,8	6,2 $\pm$ 4,6			
mediana (p25; p75)	11,8 (10,8; 19)	8,8 (0; 14,6)	0,9 (0; 2,3)	11,8 (0; 14,9)	7,7 (0; 9,3)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo correlação AR(1) entre os momentos

Conforme apresentado na Tabela 8, observou-se que todos os grupos experimentais, com exceção do grupo sham ($p > 0,999$), exibiram uma redução estatisticamente significativa no número médio de passos ao longo do período de avaliação ($p < 0,001$). Esse achado confirma o impacto substancial da intervenção na locomoção dos animais, denotando o declínio da capacidade motora após o TRM. Não houve diferença estatística do número de passos ao final do experimento entre os diferentes grupos que sofreram TRM.

Tabela 8 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do número de passos

Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
SF	Pré - Pós	35,60	1,01	<0,001	32,31	38,89
Riluzole	Pré - Pós	31,30	1,01	<0,001	28,01	34,59
Sham	Pré - Pós	0,90	1,01	>0,999	-2,39	4,19
Minociclina	Pré - Pós	36,10	1,01	<0,001	32,81	39,39
Minociclina + Riluzole	Pré - Pós	32,90	1,01	<0,001	29,61	36,19
Pré	SF - Riluzole	0,00	1,34	>0,999	-4,38	4,38
	SF - Sham	-2,10	1,34	>0,999	-6,48	2,28
	SF - Minociclina	-1,90	1,34	>0,999	-6,28	2,48
	SF - Minociclina + Riluzole	-1,60	1,34	>0,999	-5,98	2,78
	Riluzole - Sham	-2,10	1,34	>0,999	-6,48	2,28
	Riluzole - Minociclina	-1,90	1,34	>0,999	-6,28	2,48
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-1,60	1,34	>0,999	-5,98	2,78
	Sham - Minociclina	0,20	1,34	>0,999	-4,18	4,58
	Sham - Minociclina + Riluzole	0,50	1,34	>0,999	-3,88	4,88
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,30	1,34	>0,999	-4,08	4,68
Pós	SF - Riluzole	-4,30	1,34	0,062	-8,68	0,08
	SF - Sham	-36,80	1,34	<0,001	-41,18	-32,42
	SF - Minociclina	-1,40	1,34	>0,999	-5,78	2,98
	SF - Minociclina + Riluzole	-4,30	1,34	0,062	-8,68	0,08
	Riluzole - Sham	-32,50	1,34	<0,001	-36,88	-28,12
	Riluzole - Minociclina	2,90	1,34	>0,999	-1,48	7,28
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	0,00	1,34	>0,999	-4,38	4,38
	Sham - Minociclina	35,40	1,34	<0,001	31,02	39,78
	Sham - Minociclina + Riluzole	32,50	1,34	<0,001	28,12	36,88
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-2,90	1,34	>0,999	-7,28	1,48

Comparações múltiplas de Bonferroni

A Tabela 9 apresenta as comparações múltiplas entre grupos e momentos em relação ao percentual de acertos, evidenciando alterações significativas na performance ao longo do tempo. Observou-se uma redução significativa no percentual médio de acertos entre o momento pré e 6 semanas nos grupos SF, riluzole e minociclina ($p < 0,05$), sugerindo um declínio no desempenho desses grupos ao longo do período avaliado. Ao analisar as comparações entre grupos no momento pós-intervenção, verificou-se que todos os grupos que receberam tratamento farmacológico (minociclina, riluzole e minociclina + riluzole) apresentaram desempenho superior ao grupo SF ($p < 0,05$), indicando um efeito benéfico do uso dessas medicações na preservação do percentual de acertos. No entanto, em relação aos grupos medicados, o grupo sham demonstrou desempenho superior aos grupos riluzole e minociclina de forma isolada ($p = 0,010$ e $p = 0,006$, respectivamente). Por outro lado, o grupo minociclina + riluzole mostrou desempenho estatisticamente equivalente ao grupo sham ($p > 0,999$), sugerindo que a associação dessas substâncias pode mitigar a queda no percentual de acertos observada nos grupos tratados isoladamente.

Tabela 9 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do percentual de acertos

Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
SF	Pré - Pós	32,43	4,28	<0,001	18,48	46,38
Riluzole	Pré - Pós	14,86	4,28	0,023	0,92	28,81
Sham	Pré - Pós	-0,62	4,28	>0,999	-14,57	13,33
Minociclina	Pré - Pós	14,86	4,28	0,023	0,91	28,81
Minociclina + Riluzole	Pré - Pós	8,65	4,28	>0,999	-5,30	22,60
Pré	SF - Riluzole	0,77	4,07	>0,999	-12,49	14,03
	SF - Sham	1,27	4,07	>0,999	-12,00	14,53
	SF - Minociclina	1,25	4,07	>0,999	-12,01	14,52
	SF - Minociclina + Riluzole	0,92	4,07	>0,999	-12,35	14,18
	Riluzole - Sham	0,49	4,07	>0,999	-12,77	13,76
	Riluzole - Minociclina	0,48	4,07	>0,999	-12,78	13,75
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	0,14	4,07	>0,999	-13,12	13,41
	Sham - Minociclina	-0,01	4,07	>0,999	-13,28	13,25
	Sham - Minociclina + Riluzole	-0,35	4,07	>0,999	-13,61	12,91
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-0,34	4,07	>0,999	-13,60	12,93
Pós	SF - Riluzole	-16,80	4,07	0,002	-30,06	-3,53
	SF - Sham	-31,79	4,07	<0,001	-45,05	-18,52
	SF - Minociclina	-16,32	4,07	0,003	-29,58	-3,05
	SF - Minociclina + Riluzole	-22,87	4,07	<0,001	-36,13	-9,60
	Riluzole - Sham	-14,99	4,07	0,010	-28,25	-1,73
	Riluzole - Minociclina	0,48	4,07	>0,999	-12,78	13,74
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-6,07	4,07	>0,999	-19,33	7,19
	Sham - Minociclina	15,47	4,07	0,006	2,21	28,73
	Sham - Minociclina + Riluzole	8,92	4,07	>0,999	-4,34	22,18
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-6,55	4,07	>0,999	-19,81	6,71

Comparações múltiplas de Bonferroni

A Tabela 10 apresenta as comparações múltiplas entre grupos e momentos em relação ao percentual de escorregões, um indicativo de déficits neurológicos subsequentes ao TRM. Antes da lesão (avaliação pré), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sugerindo condições basais semelhantes. No entanto, após a indução do trauma (avaliação pós), os grupos SF e riluzole foram os únicos que apresentaram um aumento estatisticamente significativo no percentual médio de escorregões em relação ao momento pré-lesão ($p < 0,001$ e $p = 0,002$, respectivamente), evidenciando maior comprometimento motor nesses grupos. Na avaliação entre grupos no momento pós-lesão, verificou-se que o grupo SF apresentou um percentual médio de escorregões significativamente maior em comparação a todos os demais grupos ($p < 0,05$), reforçando a piora funcional na ausência de tratamento farmacológico. Além disso, o grupo sham demonstrou menor percentual de escorregões quando comparado aos grupos tratados com riluzole e minociclina de forma isolada ($p < 0,001$ e $p = 0,006$, respectivamente), indicando que esses fármacos, quando administrados isoladamente, não foram suficientemente eficazes para preservar a função motora em nível semelhante ao controle. Entretanto, a associação de minociclina e riluzole apresentou um desempenho estatisticamente

equivalente ao grupo sham ($p > 0,999$), sugerindo que a combinação dessas substâncias foi capaz de mitigar os déficits motores decorrentes da lesão.

Tabela 10 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do percentual de escorregões

Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
SF	Pré - Pós	-17,20	2,28	<0,001	-24,65	-9,75
Riluzole	Pré - Pós	-9,40	2,28	0,002	-16,85	-1,95
Sham	Pré - Pós	0,00	2,28	>0,999	-7,45	7,45
Minociclina	Pré - Pós	-7,20	2,28	0,072	-14,65	0,24
Minociclina + Riluzole	Pré - Pós	-4,27	2,28	>0,999	-11,72	3,18
Pré	SF - Riluzole	-0,30	2,11	>0,999	-7,17	6,58
	SF - Sham	-0,17	2,11	>0,999	-7,04	6,71
	SF - Minociclina	-1,07	2,11	>0,999	-7,94	5,81
	SF - Minociclina + Riluzole	-0,45	2,11	>0,999	-7,33	6,43
	Riluzole - Sham	0,13	2,11	>0,999	-6,75	7,00
	Riluzole - Minociclina	-0,77	2,11	>0,999	-7,64	6,11
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-0,15	2,11	>0,999	-7,03	6,72
	Sham - Minociclina	-0,90	2,11	>0,999	-7,77	5,98
	Sham - Minociclina + Riluzole	-0,28	2,11	>0,999	-7,16	6,60
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,62	2,11	>0,999	-6,26	7,49
Pós	SF - Riluzole	7,50	2,11	0,017	0,63	14,38
	SF - Sham	17,03	2,11	<0,001	10,15	23,90
	SF - Minociclina	8,93	2,11	0,001	2,05	15,80
	SF - Minociclina + Riluzole	12,48	2,11	<0,001	5,60	19,35
	Riluzole - Sham	9,53	2,11	<0,001	2,65	16,40
	Riluzole - Minociclina	1,43	2,11	>0,999	-5,45	8,30
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	4,98	2,11	0,822	-1,90	11,85
	Sham - Minociclina	-8,10	2,11	0,006	-14,98	-1,22
	Sham - Minociclina + Riluzole	-4,55	2,11	>0,999	-11,43	2,32
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	3,55	2,11	>0,999	-3,33	10,42

Comparações múltiplas de Bonferroni

A Tabela 11 apresenta as comparações múltiplas entre grupos e momentos em relação ao percentual de erros, um indicador do comprometimento funcional subsequente ao TRM. Observou-se que apenas o grupo SF apresentou um aumento estatisticamente significativo na taxa de erros entre os momentos pré e pós-lesão ($p < 0,001$), indicando maior deterioração funcional na ausência de intervenção farmacológica. Os demais grupos, incluindo aqueles tratados com riluzole, minociclina ou a combinação de ambos, não demonstraram variações significativas na taxa de erros ao longo do período avaliado. Na análise entre grupos no momento pós-lesão, verificou-se que o grupo SF apresentou a pior performance, apresentando um percentual médio de erros significativamente maior quando comparado a todos os demais grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo tratado com minociclina isolada, para o qual a diferença não atingiu significância estatística ($p = 0,169$).

Tabela 11 - Comparações múltiplas entre grupos e momentos do percentual de erros

Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
SF	Pré - Pós	-15,23	2,58	<0,001	-23,65	-6,82
Riluzole	Pré - Pós	-6,23	2,58	0,706	-14,65	2,18
Sham	Pré - Pós	1,07	2,58	>0,999	-7,34	9,49
Minociclina	Pré - Pós	-7,44	2,58	0,178	-15,85	0,98
Minociclina + Riluzole	Pré - Pós	-4,38	2,58	>0,999	-12,79	4,04
Pré	SF - Riluzole	-0,47	2,55	>0,999	-8,79	7,84
	SF - Sham	-1,10	2,55	>0,999	-9,41	7,22
	SF - Minociclina	-0,41	2,55	>0,999	-8,72	7,90
	SF - Minociclina + Riluzole	-0,47	2,55	>0,999	-8,78	7,85
	Riluzole - Sham	-0,62	2,55	>0,999	-8,94	7,69
	Riluzole - Minociclina	0,06	2,55	>0,999	-8,25	8,38
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	0,01	2,55	>0,999	-8,31	8,32
	Sham - Minociclina	0,69	2,55	>0,999	-7,63	9,00
	Sham - Minociclina + Riluzole	0,63	2,55	>0,999	-7,68	8,94
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-0,06	2,55	>0,999	-8,37	8,26
Pós	SF - Riluzole	8,53	2,55	0,037	0,21	16,84
	SF - Sham	15,21	2,55	<0,001	6,90	23,53
	SF - Minociclina	7,39	2,55	0,169	-0,92	15,70
	SF - Minociclina + Riluzole	10,39	2,55	0,002	2,07	18,70
	Riluzole - Sham	6,69	2,55	0,393	-1,63	15,00
	Riluzole - Minociclina	-1,14	2,55	>0,999	-9,45	7,18
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	1,86	2,55	>0,999	-6,45	10,18
	Sham - Minociclina	-7,82	2,55	0,097	-16,14	0,49
	Sham - Minociclina + Riluzole	-4,82	2,55	>0,999	-13,14	3,49
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	3,00	2,55	>0,999	-5,31	11,31

Comparações múltiplas de Bonferroni

4.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A Tabela 12 apresenta os dados da análise histológica realizada por coloração de HE e LFB, com a finalidade de avaliar alterações morfológicas teciduais nos diferentes grupos experimentais. Os parâmetros analisados incluíram necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração e infiltrado celular, tanto em cortes corados com HE quanto com LFB. Cada variável foi classificada de forma semiquantitativa nos seguintes graus: ausente, discreto, moderado e intenso. A comparação entre os grupos revelou diferenças estatisticamente significativas para diversas variáveis, como necrose HE, hemorragia HE, degeneração HE, infiltrado celular HE, necrose LFB, hemorragia LFB, hiperemia LFB e degeneração LFB, com valores de p variando de < 0,001 a 0,045, conforme determinado pelo teste de Kruskal-Wallis. Por outro lado, a variável hiperemia HE apresentou tendência à significância ($p = 0,075$), enquanto o infiltrado celular LFB não demonstrou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,437$).

Tabela 12 - Descrição da análise histológica segundo grupos e resultado das comparações

Variável	Grupo					p
	SF	Riluzole	Sham	Minociclina	Minociclina + Riluzole	
Necrose HE						<0,001
Ausente	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	4 (40)	
Discreto	10 (100)	10 (100)	0 (0)	1 (10)	2 (20)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (80)	4 (40)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	
Hemorragia HE						<0,001
Ausente	0 (0)	1 (10)	7 (70)	7 (70)	4 (40)	
Discreto	7 (70)	8 (80)	3 (30)	3 (30)	6 (60)	
Moderado	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Hiperemia HE						0,075
Ausente	3 (30)	8 (80)	6 (60)	4 (40)	5 (50)	
Discreto	1 (10)	0 (0)	4 (40)	4 (40)	5 (50)	
Moderado	4 (40)	2 (20)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	
Intenso	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Degeneração HE						<0,001
Ausente	0 (0)	0 (0)	10 (100)	6 (60)	8 (80)	
Discreto	7 (70)	7 (70)	0 (0)	4 (40)	2 (20)	
Moderado	3 (30)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Infiltrado Celular HE						0,041
Ausente	7 (70)	9 (90)	10 (100)	4 (40)	8 (80)	
Discreto	1 (10)	0 (0)	0 (0)	6 (60)	2 (20)	
Moderado	2 (20)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Necrose LFB						<0,001
Ausente	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	
Discreto	2 (20)	10 (100)	0 (0)	10 (100)	6 (60)	
Moderado	7 (70)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (40)	
Intenso	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Hemorragia LFB						<0,001
Ausente	0 (0)	0 (0)	7 (70)	0 (0)	0 (0)	
Discreto	6 (60)	7 (70)	3 (30)	7 (70)	9 (90)	
Moderado	2 (20)	3 (30)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	
Intenso	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	
Hiperemia LFB						0,045
Ausente	7 (70)	3 (30)	6 (60)	3 (30)	3 (30)	
Discreto	1 (10)	1 (10)	4 (40)	1 (10)	4 (40)	
Moderado	2 (20)	4 (40)	0 (0)	4 (40)	3 (30)	
Intenso	0 (0)	2 (20)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	
Degeneração LFB						<0,001
Ausente	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	
Discreto	7 (70)	7 (70)	0 (0)	7 (70)	7 (70)	
Moderado	3 (30)	3 (30)	0 (0)	3 (30)	3 (30)	
Infiltrado Celular LFB						0,437
Ausente	8 (80)	7 (70)	10 (100)	7 (70)	8 (80)	
Discreto	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (10)	2 (20)	
Moderado	2 (20)	2 (20)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	

Teste Kruskal-Wallis

A análise das comparações múltiplas realizadas por meio do teste de Dunn evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais em relação aos parâmetros histopatológicos avaliados com coloração por HE conforme a Tabela 13. No que tange ao grau de necrose, observou-se que o grupo tratado com minociclina isolada apresentou um escore significativamente superior aos demais grupos ($p < 0,05$). Por outro lado, o grupo sham demonstrou um grau de necrose significativamente inferior quando comparado a todos os outros grupos ($p < 0,05$). Em relação à hemorragia, os grupos SF e riluzole exibiram escores significativamente maiores em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$), exceto na comparação entre o grupo riluzole e o grupo minociclina + riluzole na qual não se observou diferença estatística significativa ($p = 0,082$). Para o parâmetro de degeneração celular, os grupos SF e riluzole apresentaram os maiores graus de degeneração ($p < 0,05$). No que diz respeito ao infiltrado celular inflamatório, o grupo tratado com minociclina isolada demonstrou escore significativamente mais elevado em relação aos grupos riluzole ($p = 0,024$) e sham ($p = 0,004$).

Tabela 13 - Comparações múltiplas dos parâmetros histológicos com Hematoxilina-eosina entre os grupos

Variável	Comparação	Valor Z	p
Necrose HE	SF - Riluzole	0,00	>0,999
	SF - Sham	3,74	<0,001
	SF - Minociclina	-3,31	<0,001
	SF - Minociclina + Riluzole	0,08	0,936
	Riluzole - Sham	3,74	<0,001
	Riluzole - Minociclina	-3,31	<0,001
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	0,08	0,936
	Sham - Minociclina	-7,05	<0,001
	Sham - Minociclina + Riluzole	-3,66	<0,001
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	3,39	<0,001
Hemorragia HE	SF - Riluzole	1,03	0,303
	SF - Sham	4,16	<0,001
	SF - Minociclina	4,16	<0,001
	SF - Minociclina + Riluzole	2,77	0,006
	Riluzole - Sham	3,13	0,002
	Riluzole - Minociclina	3,13	0,002
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	1,74	0,082
	Sham - Minociclina	0,00	>0,999
	Sham - Minociclina + Riluzole	-1,39	0,163
Degeneração HE	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-1,39	0,163
	SF - Riluzole	0,00	>0,999
	SF - Sham	5,23	<0,001
	SF - Minociclina	3,45	<0,001
	SF - Minociclina + Riluzole	4,34	<0,001
	Riluzole - Sham	5,23	<0,001
	Riluzole - Minociclina	3,45	<0,001
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	4,34	<0,001
	Sham - Minociclina	-1,78	0,075
Infiltrado Celular HE	Sham - Minociclina + Riluzole	-0,89	0,374
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,89	0,374
	SF - Riluzole	1,07	0,284
	SF - Sham	1,67	0,096
	SF - Minociclina	-1,18	0,237
	SF - Minociclina + Riluzole	0,72	0,473
	Riluzole - Sham	0,60	0,551
	Riluzole - Minociclina	-2,25	0,024
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-0,35	0,724
	Sham - Minociclina	-2,85	0,004
	Sham - Minociclina + Riluzole	-0,95	0,342
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	1,90	0,058

Comparações múltiplas de Dunn

Conforme demonstrado na Tabela 14, a análise estatística dos parâmetros histológicos corados com LFB revelou diferenças significativas entre os grupos avaliados, com base no teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$).

o grau de necrose foi significativamente menor no grupo sham quando comparado aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$). O grupo SF apresentou os maiores níveis de necrose, com diferenças estatisticamente significativas em relação a todos os outros grupos, exceto ao grupo tratado com minociclina + riluzole, cuja diferença não atingiu significância estatística ($p = 0,090$). No que se refere à hemorragia, observou-se que o grupo sham apresentou níveis significativamente inferiores aos dos demais grupos ($p < 0,05$), evidenciando menor comprometimento tecidual. Resultados semelhantes foram verificados para o parâmetro de degeneração, com o grupo sham apresentando menores graus de degeneração LFB em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$). Quanto à hiperemia, os grupos tratados com riluzole e com minociclina apresentaram níveis significativamente mais elevados quando comparados aos grupos SF ($p = 0,008$ para ambos) e Sham ($p = 0,005$ para ambos).

Tabela 14 - Comparações múltiplas dos parâmetros histológicos com *Luxol Fast Blue* entre os grupos

Variável	Comparação	Valor Z	p
Necrose LFB	SF - Riluzole	3,27	0,001
	SF - Sham	7,11	<0,001
	SF - Minociclina	3,27	0,001
	SF - Minociclina + Riluzole	1,70	0,090
	Riluzole - Sham	3,84	<0,001
	Riluzole - Minociclina	0,00	>0,999
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	-1,58	0,115
	Sham - Minociclina	-3,84	<0,001
	Sham - Minociclina + Riluzole	-5,41	<0,001
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	-1,58	0,115
Hemorragia LFB	SF - Riluzole	0,63	0,531
	SF - Sham	4,60	<0,001
	SF - Minociclina	0,63	0,531
	SF - Minociclina + Riluzole	1,32	0,186
	Riluzole - Sham	3,97	<0,001
	Riluzole - Minociclina	0,00	>0,999
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	0,70	0,486
	Sham - Minociclina	-3,97	<0,001
	Sham - Minociclina + Riluzole	-3,27	0,001
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,70	0,486
Hiperemia LFB	SF - Riluzole	-2,65	0,008
	SF - Sham	0,15	0,880
	SF - Minociclina	-2,65	0,008
	SF - Minociclina + Riluzole	-1,58	0,115
	Riluzole - Sham	2,80	0,005
	Riluzole - Minociclina	0,00	>0,999
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	1,07	0,284
	Sham - Minociclina	-2,80	0,005
	Sham - Minociclina + Riluzole	-1,73	0,084
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	1,07	0,284
Degeneração LFB	SF - Riluzole	0,00	>0,999
	SF - Sham	5,05	<0,001
	SF - Minociclina	0,00	>0,999
	SF - Minociclina + Riluzole	0,00	>0,999
	Riluzole - Sham	5,05	<0,001
	Riluzole - Minociclina	0,00	>0,999
	Riluzole - Minociclina + Riluzole	0,00	>0,999
	Sham - Minociclina	-5,05	<0,001
	Sham - Minociclina + Riluzole	-5,05	<0,001
	Minociclina - Minociclina + Riluzole	0,00	>0,999

Comparações múltiplas de Dunn

4.6 COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE OS GRUPOS QUANTO AO TEMPO DE BEXIGA NEUROGÊNICA

A Tabela 15 apresenta a descrição do tempo de bexiga neurogênica (em semanas) nos diferentes grupos experimentais. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p < 0,001$). Os grupos tratados com minociclina isoladamente ($4,8 \pm 0,4$ semanas) e com a combinação de minociclina e riluzole ($3,8 \pm 1,3$ semanas) apresentaram redução do tempo de bexiga neurogênica em relação aos grupos controle (SF: $5,9 \pm 0,3$ semanas; riluzole: $5,8 \pm 0,4$ semanas). O grupo sham não foi incluído na análise estatística, conforme indicado na tabela. A mediana do tempo de bexiga neurogênica seguiu tendência semelhante aos valores médios, com menor tempo observado nos grupos tratados com Minociclina, isolada ou combinada.

Tabela 15 - Descrição do tempo de bexiga neurogênica segundo grupos e resultado dos testes comparativos

Variável	Grupo					p
	SF	Riluzole	Sham	Minociclina	Minociclina + Riluzole	
Tempo bexiga neurogênica (semanas)&						<0,001£
média $\pm$ DP	$5,9 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,4$	0 ± 0	$4,8 \pm 0,4$	$3,8 \pm 1,3$	
mediana (p25; p75)	6 (6; 6)	6 (5,8; 6)	0 (0; 0)	5 (4,8; 5)	4 (2,8; 5)	

ANOVA; & O grupo Sham não participou da análise

A Tabela 16 apresenta os resultados das comparações múltiplas de Dunn realizadas para o tempo de bexiga neurogênica entre os grupos experimentais. Verificou-se que os grupos tratados com minociclina, isoladamente ou em associação com riluzole, apresentaram tempos significativamente menores de bexiga neurogênica em comparação aos grupos controle (SF e riluzole) ($p < 0,001$ para todas as comparações).

Tabela 16 - Resultado das comparações do tempo de bexiga neurogênica entre os grupos avaliados

Comparação	Valor Z	p
SF - Riluzole	0,42	0,676
SF - Minociclina	4,22	<0,001
SF - Minociclina + Riluzole	5,34	<0,001
Riluzole - Minociclina	3,80	<0,001
Riluzole - Minociclina + Riluzole	4,92	<0,001
Minociclina - Minociclina + Riluzole	1,13	0,260

Comparações múltiplas de Dunn

6 DISCUSSÃO

O TRM, seja de origem accidental ou iatrogênica, continua sendo um desafio clínico significativo nas áreas da ortopedia e neurocirurgia¹¹. Historicamente, o TRM tem sido associado a altos índices de morbidade, com severas repercussões funcionais e prognósticos geralmente desfavoráveis⁵⁹. Apesar dos avanços nos cuidados intensivos e na imagem diagnóstica, observa-se que o manejo clínico e cirúrgico desses pacientes permanece relativamente estático nas últimas duas décadas, especialmente no que diz respeito à regeneração neural e recuperação funcional⁶⁰.

O tratamento padrão continua a ser a abordagem cirúrgica de urgência, cujo objetivo principal é a descompressão medular precoce e a estabilização da coluna vertebral, na tentativa de minimizar a lesão secundária²⁰. No entanto, essa estratégia, embora eficaz em certos casos, não tem garantido a reversão dos déficits neurológicos, limitando-se, muitas vezes, ao controle dos danos estruturais⁶¹. A ausência de terapias neuroprotetoras ou regenerativas eficazes ressalta a estagnação terapêutica nessa área, refletindo a complexidade fisiopatológica envolvida na lesão medular traumática⁶².

As consequências do TRM transcendem o âmbito clínico, atingindo esferas pessoais, sociais e econômicas. Indivíduos acometidos frequentemente enfrentam incapacidades permanentes, o que compromete sua inserção no mercado de trabalho e gera dependência de cuidadores, impactando diretamente a qualidade de vida e a dinâmica familiar⁶³. Do ponto de vista econômico, os custos com hospitalizações prolongadas, reabilitação e adaptações ambientais impõem um ônus considerável aos sistemas de saúde, especialmente em países com recursos limitados⁶⁴. Assim, é urgente que se invista em políticas públicas, pesquisas translacionais e estratégias terapêuticas inovadoras que visem não apenas o tratamento, mas também a prevenção e reintegração social desses pacientes.

O avanço no entendimento das fases primária e secundária do TRM tem contribuído significativamente para a formulação de novas estratégias terapêuticas. A fase primária, caracterizada pelo impacto mecânico direto, desencadeia uma série de eventos celulares e moleculares que culminam na lesão secundária, responsável por grande parte da perda neurológica observada. Esta última envolve processos como isquemia, excitotoxicidade, inflamação, apoptose e disfunção mitocondrial, que podem perdurar por dias a semanas após o trauma inicial⁶⁵. O mapeamento dessas vias fisiopatológicas tem permitido a identificação de alvos moleculares para intervenções farmacológicas destinadas à proteção tecidual e mitigação da resposta inflamatória exacerbada.

Estudos experimentais e pré-clínicos têm explorado agentes neuroprotetores capazes de modular essas vias secundárias, visando preservar o tecido neural viável e limitar a extensão da lesão. Drogas anti-inflamatórias, antioxidantes e inibidores da apoptose têm mostrado resultados promissores em modelos animais, embora a aplicação desses achados para a prática clínica ainda enfrente obstáculos significativos^{66,67}.

O aprofundamento no conhecimento da fisiopatologia do TRM é, portanto, fundamental não apenas para o desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas, mas também para a definição de janelas terapêuticas e protocolos clínicos personalizados. A preservação da função neurológica e da integridade do tecido medular depende diretamente da rapidez e da precisão das intervenções, o que demanda uma atuação baseada em evidências moleculares e em biomarcadores específicos da progressão da lesão. Assim, a conexão entre pesquisa básica e clínica torna-se essencial para transformar avanços experimentais em terapias efetivas, que possam ser aplicadas de forma segura e eficiente no manejo agudo do paciente com TRM.

A utilização de modelos animais padronizados para o estudo do TRM tem se mostrado essencial na investigação pré-clínica de terapias neuroprotetoras. A reprodutibilidade dos modelos de lesão medular em roedores, aliada ao controle rigoroso das variáveis experimentais, permite não apenas a análise detalhada da progressão do dano neural, como também a avaliação de possíveis estratégias farmacológicas com maior precisão⁶⁸. Tais modelos superam, em muitos aspectos, as simulações computacionais, uma vez que possibilitam a observação direta das respostas biológicas complexas que ocorrem nos níveis molecular, celular, tecidual e sistêmico após a lesão⁶⁹. Assim, justificam-se os estudos experimentais *in vivo* como etapa indispensável no desenvolvimento de novos tratamentos para o TRM.

Os modelos de TRM em ratos apresentam elevada similaridade com os processos fisiopatológicos observados em humanos, especialmente no que se refere à cascata inflamatória, ao comprometimento da barreira hematoencefálica e à degeneração axonal⁷⁰. Essa homologia funcional e estrutural torna os estudos com roedores relevantes e transladáveis, oferecendo um ambiente controlado para testes de intervenções farmacológicas com potencial neuroprotetor ou regenerativo. A administração de medicamentos nesses modelos permite a comparação entre grupos tratados e não tratados, interação entre drogas, fornecendo evidências consistentes

sobre a eficácia e a segurança de compostos antes que estes sejam submetidos à fase de ensaios clínicos em humanos^{1,71}.

Dada a complexidade do TRM, a avaliação de fármacos candidatos em modelos animais oferece a possibilidade de testar intervenções em um contexto biológico real, considerando a interação entre diferentes sistemas do organismo. Além disso, a padronização dos métodos de indução da lesão — seja por compressão, contusão ou transecção parcial — permite uma análise comparativa entre diferentes substâncias, contribuindo para a identificação de abordagens terapêuticas promissoras^{68,72}. Portanto, a presente investigação, ao utilizar ratos com lesão medular controlada em ambiente experimental, reforça a relevância da pesquisa translacional como ponte fundamental entre o conhecimento científico básico e a aplicação clínica.

O Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, possui ampla experiência na condução de estudos experimentais com ratos da linhagem Wistar submetidos ao modelo de TRM pelo MASCIS. Tal expertise foi consolidada ao longo dos anos por meio da validação metodológica e publicação de dados científicos, que atestam a reprodutibilidade e confiabilidade do modelo adotado⁴⁶.

As análises morfométricas e funcionais pré-testes dos animais neste estudo demonstraram que os grupos experimentais eram homogêneos em relação à performance física e ao peso inicial, sem diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,133$), o que assegura a comparabilidade das amostras no início do experimento (Tabela 1). Esta homogeneidade é essencial para garantir a validade interna dos resultados obtidos e diminuição de vieses. Além disso, ao longo do experimento, não foram observadas perdas de animais, comportamentos anômalos, autofagia ou canibalismo, corroborando a manutenção de condições adequadas de cuidado e manejo dos modelos animais, de acordo com as boas práticas em pesquisa pré-clínica⁷³.

A avaliação da performance motora pré e pós-experimento no grupo sham confirmou que o protocolo de laminectomia em ratos praticado nesta instituição é viável, sem repercussões neurológicas e sem interferências por si nos testes motores, conforme demonstrado em estudo prévio⁴⁶.

Em relação ao percentual de ganho de peso, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$). O grupo sham apresentou ganho de peso superior ($15,3 \pm 3,4\%$) em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$),

enquanto o grupo tratado com riluzole ($10,1 \pm 4,7\%$) obteve maior ganho de peso em relação ao grupo salina ($4,9 \pm 2,3\%$) ($p = 0,005$), conforme demonstrado na Tabela 2. A ausência de diferença significativa de ganho de peso entre os grupos tratados com minociclina, isoladamente ou associada ao riluzole, sugere que esses tratamentos não impactaram negativamente o crescimento dos animais, com melhor performance ao uso de riluzole. Este achado é relevante, uma vez que o ganho ponderal é um importante indicador indireto de bem-estar animal e tolerabilidade terapêutica.

Importante destacar que não foram detectados efeitos colaterais associados ao uso de riluzole e minociclina, o que reforça a segurança biológica dessas drogas já amplamente documentada na literatura^{40,74}.

Em relação à análise funcional pela escala de BBB, todos os animais apresentaram escore máximo em tal escala, indicando funcionalidade locomotora preservada (21 pontos). O grupo sham manteve esse escore ao longo de todo o seguimento, confirmando que o procedimento cirúrgico de laminectomia isoladamente não gerou impacto funcional nem introduziu viés de avaliação. Em todos os momentos analisados, esse grupo apresentou desempenho significativamente superior aos demais ($p < 0,001$), servindo como referência de normalidade locomotora (Gráfico 1).

Observou-se evolução significativa dos escores da escala de BBB ao longo das 6 semanas nos grupos com lesão, com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,001$), entre os tempos ($p < 0,001$) e com interação tempo x grupo ($p = 0,003$), conforme mostra a Tabela 3. A análise temporal indicou que os grupos SF e riluzole apresentaram melhora funcional progressiva, com significância estatística a partir da 3ª semana pós-lesão (Tabela 4). Em contraste, os grupos tratados com minociclina e minociclina + riluzole demonstraram recuperação mais precoce, com diferenças estatisticamente significativas já na 2ª semana (Tabela 5).

Apesar dessas tendências, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados em nenhum dos momentos avaliados (Tabela 6), embora o grupo minociclina + riluzole tenha consistentemente apresentado escores médios mais elevados, sugerindo um possível efeito sinérgico. Este achado, embora não significativo estatisticamente nesta amostra, levanta hipóteses relevantes para estudos futuros com tamanhos amostrais maiores ou janelas temporais prolongadas.

Do ponto de vista funcional, a resposta terapêutica mais precoce nos grupos minociclina e minociclina + riluzole pode representar, em um contexto translacional, a possibilidade de recuperação motora mais rápida em pacientes humanos com TRM.

Esse fenômeno poderia se traduzir em menor tempo de hospitalização, redução de complicações secundárias e reabilitação precoce. Além disso, a aceleração da recuperação funcional é clinicamente relevante, uma vez que pacientes que demonstram progressão neurológica precoce têm maior probabilidade de atingir melhores desfechos motores finais⁷⁵.

Cabe, no entanto, cautela na extrapolação desses dados, dado o intervalo de tempo ainda limitado do presente experimento. A ausência de um platô de estabilização da recuperação neurológica nos grupos lesionados é um ponto crítico. O fato de nenhum grupo ter atingido uma curva de recuperação estável ao final de 6 semanas indica que a melhora funcional continuava em curso, dificultando inferências sobre a performance máxima final de cada intervenção terapêutica. Na maioria dos modelos animais, incluindo estudos internacionais com roedores, esse período de observação é comumente adotado (6 a 8 semanas), mas não necessariamente suficiente para estimar o ganho funcional definitivo. Não há na literatura estudo específico para delimitação do tempo de estabilização de recuperação neurológica em ratos após TRM provocado experimentalmente.

No contexto clínico, sabe-se que a estabilização neurológica em humanos ocorre, em média, após 12 meses pós-TRM⁷⁶. Assim, propõe-se como perspectiva futura o prolongamento do tempo de seguimento em modelos experimentais, a fim de definir de forma mais acurada o *tempo de platô funcional* em roedores, servindo como parâmetro padronizado para comparação entre estudos e inferência com humanos.

Por fim, a tendência observada de melhor desempenho funcional com a associação farmacológica minociclina + riluzole, ainda que não estatisticamente significativa em todas as análises, reforça a hipótese de sinergismo terapêutico já discutida em outras publicações^{1,77-83}. Esses dados justificam a continuidade da investigação com números maiores, período de seguimento estendidos e modelos diferenciados, visando esclarecer o potencial combinatório desses agentes neuroprotetores.

Por meio da análise funcional na EPH, demonstrou-se que a associação farmacológica entre minociclina e riluzole exerce efeito neuroprotetor significativo em modelo animal de TRM. Os dados obtidos mostraram que os grupos experimentais apresentavam desempenhos comparáveis na fase basal (pré-lesão), o que garante a homogeneidade inicial entre os grupos e valida a confiabilidade das análises longitudinais realizadas.

Dentre os parâmetros avaliados, o percentual de escorregões demonstrou ser o marcador mais sensível e específico para detecção de déficits motores decorrentes de lesão medular, conforme já descrito na literatura⁵³⁻⁵⁵. Antes da lesão, não se observaram diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$), indicando equivalência funcional basal. Após a intervenção, o grupo SF apresentou aumento significativo no percentual de escorregões ($p < 0,001$), assim como o grupo riluzole isolado ($p = 0,002$), ao passo que os grupos minociclina isolada e minociclina + riluzole não apresentaram variações significativas. Na comparação intergrupos, o grupo SF teve pior desempenho que todos os demais ($p < 0,05$), enquanto o grupo minociclina + riluzole apresentou desempenho estatisticamente equivalente ao grupo sham ($p > 0,999$), sugerindo preservação funcional quase completa com a terapia combinada.

Embora menos específicos para a detecção direta de déficits neurológicos, os parâmetros secundários — número de passos, percentual de acertos e percentual de erros — também refletiram os efeitos das intervenções. Todos os grupos traumatizados apresentaram redução significativa no número médio de passos ao longo do tempo ($p < 0,001$), com exceção do grupo sham ($p > 0,999$), demonstrando o impacto motor do TRM. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos traumatizados ao final do experimento nesse parâmetro ($p > 0,05$), a queda foi atenuada nos grupos tratados com fármacos.

Quanto ao percentual de acertos, observou-se declínio significativo nos grupos SF, riluzole e minociclina entre o momento pré e 6 semanas ($p < 0,05$). Contudo, todos os grupos tratados com fármacos apresentaram desempenho superior ao grupo SF ($p < 0,05$), indicando que as intervenções reduziram o impacto funcional negativo do trauma. A associação minociclina + riluzole foi o único grupo tratado que demonstrou performance equivalente ao grupo sham ($p > 0,999$), reforçando o potencial sinérgico da associação.

A análise dos erros mostrou aumento estatisticamente significativo apenas no grupo SF entre os momentos pré e pós-lesão ($p < 0,001$), com os demais grupos mantendo estabilidade ($p > 0,05$). Na comparação entre grupos após a lesão, o grupo SF teve desempenho significativamente inferior aos demais ($p < 0,05$), exceto em relação ao grupo minociclina isolada ($p = 0,169$), cujo resultado não atingiu significância estatística. Esses achados indicam que, mesmo em parâmetros menos específicos, os tratamentos farmacológicos atenuaram a deterioração funcional esperada após o TRM.

Verificou-se que o grupo tratado com minociclina e riluzole em associação apresentou resultados estatisticamente semelhantes ao grupo sham em diversos parâmetros, o que indica recuperação funcional mais eficaz do que a observada nos grupos tratados com as substâncias de forma isolada. Esse achado sugere um possível efeito sinérgico entre os dois fármacos, hipótese corroborada por estudos prévios que demonstram mecanismos de ação complementares: enquanto a minociclina apresenta propriedades anti-inflamatórias e inibidoras da microglia reativa^{38,39,41}, o riluzole atua na modulação do influxo de íons sódio e glutamato, reduzindo a excitotoxicidade neuronal^{26,27}.

Os grupos que receberam tratamento farmacológico isolado também apresentaram desempenho superior ao grupo salina, evidenciando o efeito benéfico individual dessas terapias na recuperação neurológica pós-trauma, consoante com literatura atual. Por outro lado, a combinação terapêutica mostrou-se capaz de promover neuroproteção e preservação funcional mais próximas à normalidade. A ausência de efeitos colaterais clínicos relevantes nos animais tratados também reforça o perfil de segurança previamente reportado na literatura.

Esses resultados contribuem para o avanço no desenvolvimento de estratégias farmacológicas combinadas para o manejo de lesões raquimedulares, e sugerem que futuros ensaios clínicos em humanos possam explorar a associação terapêutica aqui demonstrada, considerando a complementaridade dos mecanismos e os efeitos positivos observados. Estudos adicionais são necessários para elucidar aspectos farmacocinéticos da combinação, potencial interferência na biodisponibilidade e melhor protocolo de administração após o trauma.

Referente à evolução da bexiga neurogênica, a análise estatística dos grupos experimentais indicou que a administração de minociclina isoladamente ou em associação com riluzole promoveu uma redução significativa no tempo de persistência da bexiga neurogênica, em comparação aos demais grupos (solução salina e riluzole isolado). Estes achados reforçam o potencial terapêutico da minociclina.

No presente estudo, o grupo que recebeu a combinação de minociclina e riluzole apresentou o menor tempo médio de bexiga neurogênica ($3,8 \pm 1,3$ semanas), seguido pelo grupo tratado com minociclina isoladamente ($4,8 \pm 0,4$ semanas). Embora a diferença entre esses dois grupos não tenha atingido significância estatística ($p = 0,260$), observa-se uma tendência de superioridade na intervenção combinada, que poderia se tornar estatisticamente significativa com o aumento do tamanho amostral ou

com a extensão do tempo de seguimento. Tal fato pode representar um possível efeito sinérgico entre os mecanismos de ação das duas drogas.

Do ponto de vista translacional, tais achados têm implicações clínicas relevantes. A redução do tempo de bexiga neurogênica está diretamente associada a uma menor necessidade de cateterismo vesical prolongado, o que implica diminuição da incidência de infecções urinárias de repetição, melhora da qualidade de vida, maior independência funcional e menor sobrecarga dos cuidadores e do sistema de saúde. A recuperação precoce do controle vesical é um dos fatores determinantes para o retorno à autonomia em pacientes com TRM, conforme relatado por Pavese et al.⁸⁴, sendo, portanto, um desfecho clínico de grande valor.

A análise histopatológica dos diferentes grupos experimentais, por meio das colorações HE e LFB, revelou alterações teciduais significativas relacionadas aos efeitos do TRM e às intervenções terapêuticas propostas. De forma geral, o grupo tratado com SF apresentou piores desfechos histológicos em comparação aos grupos que receberam intervenções farmacológicas, como minociclina, riluzole ou a combinação de ambos, embora alguns resultados tenham se mostrado conflitantes entre os métodos de coloração.

Destaca-se que apesar de apresentarem diferenças significativas, não se observou um padrão linear ou convergente que permita afirmar, com plausibilidade, uma superioridade de um dos tratamentos em termos de integridade morfológica da medula espinhal ou de modulação da resposta secundária ao trauma. Fatores metodológicos, como variações técnicas na preparação dos cortes histológicos, limitação da microscopia de luz convencional em detectar alterações subcelulares, ou mesmo a ausência de correlação direta entre achados funcionais e estruturais em alguns modelos de lesão, podem ter influenciado os resultados.

Portanto, embora os achados histopatológicos corroborem parcialmente os efeitos neuroprotetores já descritos para minociclina e riluzole de forma isolada, a análise restrita à histologia não foi suficiente para comprovar de forma consistente um benefício inequívoco da associação entre ambos. Ressalta-se a importância da utilização de métodos complementares, como a imunohistoquímica e a microscopia confocal, para avaliação mais sensível de viabilidade neuronal e modulação glial, bem como a integração com achados funcionais para uma interpretação translacional mais acurada.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a administração de riluzole, minociclina e da associação de ambos promoveu melhora clínica em diversos parâmetros funcionais avaliados.

A minociclina, isoladamente e em associação com o riluzole, demonstrou recuperação neurológica mais veloz por meio da escala de Basso, Beattie e Bresnahan, em comparação aos demais grupos. No entanto, embora o grupo que recebeu a combinação de riluzole e minociclina tenha apresentado tendência de superioridade na escala de Basso, Beattie e Bresnahan, esta diferença não atingiu significância estatística.

Na avaliação motora pela Escada em Plano Horizontal, todos os grupos submetidos a intervenção farmacológica mostraram desempenho neurológico e funcional superior ao grupo controle (salina). Notadamente, os animais tratados com a associação de riluzole e minociclina obtiveram resultados funcionais comparáveis aos do grupo sham.

No tocante ao tempo de persistência da bexiga neurogênica, observou-se que a minociclina, tanto isoladamente quanto em associação com o riluzole, promoveu redução significativa desse tempo em relação aos demais grupos.

A análise histológica não revelou diferenças estatísticas que indicassem superioridade evidente de alguma das intervenções testadas sobre as demais ou sobre o grupo controle.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com Estilo Vancouver.

1. Martins BC, Torres BBJ, de Oliveira KM, Lavor MS, Osório CM, Fukushima FB, Rosado IR, de Melo EG. Association of riluzole and dantrolene improves significant recovery after acute spinal cord injury in rats. *Spine J*. 2018;18(3):532-9.
2. Pereira CU, Jesus RM. Epidemiologia do Traumatismo Raquimedular. *J Bras Neurocirurg*. 2011;22(2):26-31.
3. Brito LM, Chein MB, Marinho SC, Duarte TB. Epidemiological evaluation of victims of spinal cord injury. *Rev Col Bras Cir*. 2011;38(5):304-9.
4. Morais DF, Spotti AR, Cohen MI, Mussi SE, Melo Neto JSd, Tognola WA. Perfil epidemiológico de pacientes com traumatismo raquimedular atendidos em hospital terciário. *Coluna/Columna*. 2013;12(2):149-52.
5. Karsy M, Hawryluk G. Modern Medical Management of Spinal Cord Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2019;19(9):65.
6. Montalva-Iborra A, Alcanyis-Alberola M, Grao-Castellote C, Torralba-Collados F, Giner-Pascual M. Risk factors in iatrogenic spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2017;55(9):818-22.
7. Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(3-4):264-80.
8. Ishikawa T, Suzuki H, Ishikawa K, Yasuda S, Matsui T, Yamamoto M, Kakeda T, Yamamoto S, Owada Y, Yaksh TL. Spinal cord ischemia/injury. *Curr Pharm Des*. 2014;20(36):5738-43.
9. Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 1979;206(4419):700-2.
10. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J*. 2004;4(4):451-64.
11. Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, Wilson J, Kwon B, Harrop J, Choi D, Fehlings MG. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery*. 2017;80(3S):S9-S22.
12. Ahuja CS, Martin AR, Fehlings M. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000Res*. 2016;5: F1000 Faculty Rev-1017.
13. 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.
14. Saboe LA, Reid DC, Davis LA, Warren SA, Grace MG. Spine trauma and associated injuries. *J Trauma*. 1991;31(1):43-8.
15. Hachem LD, Ahuja CS, Fehlings MG. Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *J Spinal Cord Med*. 2017;40(6):665-75.

16. Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, W Cadotte D, Harrop JS, Aarabi B, Shaffrey C, Dvorak M, Fisher C, Arnold P, Massicotte EM, Lewis S, Rampersaud R. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PLoS One*. 2012;7(2):e32037.
17. van Middendorp JJ, Hosman AJ, Doi SA. The effects of the timing of spinal surgery after traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *J Neurotrauma*. 2013;30(21):1781-94.
18. Eli I, Lerner DP, Ghogawala Z. Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurol Clin*. 2021;39(2):471-88.
19. Wing PC. Early acute management in adults with spinal cord injury: a clinical practice guideline for health-care providers. Who should read it? *J Spinal Cord Med*. 2008;31(4):360.
20. Fehlings MG, Wilson JR, Tetreault LA, Aarabi B, Anderson P, Arnold PM, Brodke DS, Burns AS, Chiba K, Dettori JR, Furlan JC, Hawryluk G, Holly LT, Howley S, Jeji T, Kalsi-Ryan S, Kotter M, Kurpad S, Kwon BK, Marino RJ, Martin AR, Massicotte E, Merli G, Middleton JW, Nakashima H, Nagoshi N, Palmieri K, Skelly AC, Singh A, Tsai EC, Vaccaro A, Yee A, Harrop JS. A Clinical Practice Guideline for the Management of Patients With Acute Spinal Cord Injury: Recommendations on the Use of Methylprednisolone Sodium Succinate. *Global Spine J*. 2017;7(3 Suppl):203S-11S.
21. Levi L, Wolf A, Belzberg H. Hemodynamic parameters in patients with acute cervical cord trauma: description, intervention, and prediction of outcome. *Neurosurgery*. 1993;33(6):1007-16; discussion 16-7.
22. Vale FL, Burns J, Jackson AB, Hadley MN. Combined medical and surgical treatment after acute spinal cord injury: results of a prospective pilot study to assess the merits of aggressive medical resuscitation and blood pressure management. *J Neurosurg*. 1997;87(2):239-46.
23. Badhiwala JH, Ahuja CS, Fehlings MG. Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2018;30(1):1-18.
24. Serag I, Abouzid M, Elmoghazy A, Sarhan K, Alsaad SA, Mohamed RG. An updated systematic review of neuroprotective agents in the treatment of spinal cord injury. *Neurosurg Rev*. 2024;47(1):132.
25. Ulndreaj A, Badner A, Fehlings MG. Promising neuroprotective strategies for traumatic spinal cord injury with a focus on the differential effects among anatomical levels of injury. *F1000Res*. 2017;6:1907.
26. Chow DS, Teng Y, Toups EG, Aarabi B, Harrop JS, Shaffrey CI, Johnson MM, Boakye M, Frankowski RF, Fehlings MG, Grossman RG. Pharmacology of riluzole in acute spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2012;17(1 Suppl):129-40.

27. Fehlings MG, Wilson JR, Frankowski RF, Toups EG, Aarabi B, Harrop JS, Shaffrey CI, Harkema SJ, Guest JD, Tator CH, Burau KD, Johnson MW, Grossman RG. Riluzole for the treatment of acute traumatic spinal cord injury: rationale for and design of the NACTN Phase I clinical trial. *J Neurosurg Spine*. 2012;17(1 Suppl):151-6.
28. Stutzmann JM, Pratt J, Boraud T, Gross C. The effect of riluzole on post-traumatic spinal cord injury in the rat. *Neuroreport*. 1996;7(2):387-92.
29. Simard JM, Tsymbalyuk O, Keledjian K, Ivanov A, Ivanova S, Gerzanich V. Comparative effects of glibenclamide and riluzole in a rat model of severe cervical spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2012;233(1):566-74.
30. Nagoshi N, Fehlings MG. Investigational drugs for the treatment of spinal cord injury: review of preclinical studies and evaluation of clinical trials from Phase I to II. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(5):645-58.
31. Grossman RG, Fehlings MG, Frankowski RF, Burau KD, Chow DS, Tator C, Teng A, Toups EG, Harrop JS, Aarabi B, Shaffrey CI, Johnson MM, Harkema SJ, Boakye M, Guest JD, Wilson JR. A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(3):239-55.
32. Fehlings MG, Nakashima H, Nagoshi N, Chow DS, Grossman RG, Kopjar B. Rationale, design and critical end points for the Riluzole in Acute Spinal Cord Injury Study (RISCIS): a randomized, double-blinded, placebo-controlled parallel multi-center trial. *Spinal Cord*. 2016;54(1):8-15.
33. Srinivas S, Wali AR, Pham MH. Efficacy of riluzole in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of the literature. *Neurosurg Focus*. 2019;46(3):E6.
34. Rosenberg LJ, Teng YD, Wrathall JR. Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci*. 1999;19(14):6122-33.
35. Wang SJ, Wang KY, Wang WC. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience*. 2004;125(1):191-201.
36. Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15769-74.
37. Hu CW, Li ZY, Zhu K, Dai YX, Zhang C, Sun YL, Shi Q, Cui XJ, Yao M. Exploring the Effectiveness and Potential Pharmacological Mechanism of Minocycline for Spinal Cord Injury through Meta-Analysis and Network Pharmacology. *Curr Neuropharmacol*. 2025 Mar 14.

38. Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain*. 2003;126(Pt 7):1628-37.
39. Lee SM, Yune TY, Kim SJ, Park DW, Lee YK, Kim YC, Oh YJ, Markelonis GJ, Oh TH. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2003;20(10):1017-27.
40. Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol*. 2004;3(12):744-51.
41. Afshari K, Momeni Roudsari N, Lashgari NA, Haddadi NS, Haj-Mirzaian A, Hassan Nejad M, Shafaroodi H, Ghasemi M, Dehpour AR, Abdolghaffari AH. Antibiotics with therapeutic effects on spinal cord injury: a review. *Fundam Clin Pharmacol*. 2021;35(2):277-304.
42. Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, Hurlbert RJ. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain*. 2012;135(Pt 4):1224-36.
43. Grimm KA LL, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA. *Veterinary Anesthesia and Analgesia. The fifth Edition of Lumb and Jones*. 5.ed. John Wiley & Sons 2015.
44. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma*. 1996;13(7):343-59.
45. Rodrigues NR. *Padronização da lesão experimental em ratos Wistar [tese]*. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de São Paulo; 1999.
46. Santos GB CA, Marcon RM, Souza Fld, 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.
47. Wu Y, Satkunderajah K, Teng Y, Chow DS, Fehlings MG. Evaluation of the sodium-glutamate blocker riluzole in a preclinical model of cervical spinal cord injury. *Evid Based Spine Care J*. 2010;1(2):71-2.
48. Nógrádi A, Szabó A, Pintér S, Vrbová G. Delayed riluzole treatment is able to rescue injured rat spinal motoneurons. *Neuroscience*. 2007;144(2):431-8.
49. Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem*. 2006;97(5):1314-26.
50. Aras M, Altas M, Motor S, Dokuyucu R, Yilmaz A, Ozgiray E, Seraslan Y, Yilmaz N. Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. *Injury*. 2015;46(8):1471-4.

51. 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.
52. 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.
53. Bolton DA, Tse AD, Ballermann M, Misiaszek JE, Fouad K. Task specific adaptations in rat locomotion: runway versus horizontal ladder. *Behav Brain Res*. 2006;168(2):272-9.
54. Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods*. 2002;115(2):169-79.
55. McEwen ML, Springer JE. Quantification of locomotor recovery following spinal cord contusion in adult rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(11):1632-53.
56. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2 ed. Blackwell Science: Massachusetts; 2006.
57. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJAW. *Applied Linear Statistical Models*. 4 ed. Illinois: Richard D; 1996.
58. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. New York: Chapman and Hall; 1989.
59. Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol*. 2014;6:309-31.
60. Furlan JC, Sakakibara BM, Miller WC, Krassioukov AV. Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. *Can J Neurol Sci*. 2013;40(4):456-64.
61. Carroll AH, Fakhre E, Quinonez A, Tannous O, Mesfin A. An Update on Spinal Cord Injury and Current Management. *JBJS Rev*. 2024;12(10).
62. Kretzer RM. A Clinical Perspective and Definition of Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016;41 Suppl 7:S27.
63. Cardile D, Calderone A, De Luca R, Corallo F, Quartarone A, Calabrò RS. The Quality of Life in Patients with Spinal Cord Injury: Assessment and Rehabilitation. *J Clin Med*. 2024 Mar 21;13(6):1820.
64. Devivo MJ. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord*. 2012;50(5):365-72.
65. Lima R, Monteiro A, Salgado AJ, Monteiro S, Silva NA. Pathophysiology and Therapeutic Approaches for Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22).
66. Hejrati N, Fehlings MG. A review of emerging neuroprotective and neuroregenerative therapies in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Pharmacol*. 2021;60:331-40.

-
67. Hassan OI, Takamiya S, Asgarihafshejani A, Fehlings MG. Bridging the gap: a translational perspective in spinal cord injury. *Exp Biol Med* (Maywood). 2024;249:10266.
 68. 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.
 69. Zhang N, Fang M, Chen H, Gou F, Ding M. Evaluation of spinal cord injury animal models. *Neural Regen Res*. 2014;9(22):2008-12.
 70. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med*. 2013;110(3):207-11.
 71. Tator CH, Hashimoto R, Raich A, Norvell D, Fehlings MG, Harrop JS, Guest J, Aarabi B, Grossman RG. Translational potential of preclinical trials of neuroprotection through pharmacotherapy for spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2012;17(1 Suppl):157-229.
 72. Marcon RM, Cristante AF, de Barros TE, Ferreira R, Dos Santos GB. Effects of ganglioside G(M1) and erythropoietin on spinal cord lesions in rats: functional and histological evaluations. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(6):351-60.
 73. Smith AJ. Guidelines for planning and conducting high-quality research and testing on animals. *Lab Anim Res*. 2020;36:21.
 74. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*. 1996;47(6 Suppl 4):S233-41.
 75. Tian T, Zhang S, Yang M. Recent progress and challenges in the treatment of spinal cord injury. *Protein Cell*. 2023;14(9):635-52.
 76. Wilson JR, Cadotte DW, Fehlings MG. Clinical predictors of neurological outcome, functional status, and survival after traumatic spinal cord injury: a systematic review. *J Neurosurg Spine*. 2012;17(1 Suppl):11-26.
 77. Rao Y, Li J, Qiao R, Luo J, Liu Y. Tetramethylpyrazine and Astragaloside IV have synergistic effects against spinal cord injury-induced neuropathic pain via the OIP5-AS1/miR-34a/Sirt1/NF- κ B axis. *Int Immunopharmacol*. 2023;115:109546.
 78. Teixeira WGJ, Cristante AF, Marcon RM, Bispo G, Ferreira R, de Barros-Filho TEP. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Combined with Methylprednisolone Improves Functional Outcomes in Rats with Experimental Acute Spinal Cord Injury. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73:e235.
 79. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg*. 1994;80(1):97-111.

80. Forouzanfar F, Tanha NK, Pourbagher-Shahri AM, Mahdianpour S, Esmaeili M, Ghazavi H. Synergistic effect of ellagic acid and gabapentin in a rat model of neuropathic pain. *Metab Brain Dis.* 2023;38(4):1421-32.
81. Chen G, Zhang Z, Wang S, Lv D. Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats. *Exp Ther Med.* 2013;6(4):868-72.
82. Arvanian VL, Manuzon H, Davenport M, Bushell G, Mendell LM, Robinson JK. Combined treatment with neurotrophin-3 and LSD facilitates behavioral recovery from double-hemisectomy spinal injury in neonatal rats. *J Neurotrauma.* 2006;23(1):66-74.
83. Hama A, Sagen J. Combinations of intrathecal gamma-amino-butyrate receptor agonists and N-methyl-d-aspartate receptor antagonists in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Eur J Pharmacol.* 2012;683(1-3):101-8.
84. Pavese C, Schneider MP, Schubert M, Curt A, Scivoletto G, Finazzi-Agrò E, Mehnert U, Maier D, Abel R, Röhrich F, Weidner N, Rupp R, Kessels AG, Bachmann LM, Kessler TM. Prediction of Bladder Outcomes after Traumatic Spinal Cord Injury: A Longitudinal Cohort Study. *PLoS Med.* 2016;13(6):e1002041.

ANEXO

Anexo A - Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito do riluzole e da minociclina individualmente e associados na lesão medular aguda experimental em ratos”, registrada com o nº 1249/2019, sob a responsabilidade de Alexandre Fogaça Cristante e Ricardo Teixeira e Silva, 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 28.05.19

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 04-03-2019 Término: 06-04-2020
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº total	50
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério ICB

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

CEUA-FMUSP, 28 de Maio de 2019

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