

RAFAEL RITTER

Avaliação do efeito do GM1 associado à cola de fibrina na lesão medular aguda em ratos

SÃO PAULO

2025

RAFAEL RITTER

Avaliação do efeito do GM1 associado à cola de fibrina na lesão medular aguda 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

Ritter, Rafael

Avaliação do efeito do GM1 associado à cola de fibrina na
lesão medular aguda em ratos / Rafael Ritter; 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 espinal 2.Adesivo tecidual de
fibrina 3.Gangliosídeo G(M1) 4.Fármacos neuroprotetores
5.Modelos animais I.Cristante, Alexandre Fogaça, orient.
II.Título

USP/FM/DBD-330/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Ritter R. Avaliação do efeito do GM1 associado à cola de fibrina na lesão medular aguda em ratos [tese]. 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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Waldir Ritter e Elisabeth Colaiacovo Ritter, pelo constante incentivo ao estudo e à luta pelos meus objetivos, desde a minha infância.

Ao meu irmão, Ricardo Ritter, por me motivar a seguir a medicina desde a minha adolescência.

À minha esposa, Martina Cattaccini Ritter, por estar sempre ao meu lado e por me ensinar, todos os dias, o verdadeiro significado de ser médico, com sua dedicação incansável em promover a melhoria da qualidade de vida das pessoas.

Ao meu filho, Pedro Cattaccini Ritter, por ser essa criança tão amável e carinhosa, que ilumina a minha vida a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante, pelos ensinamentos valiosos e pela imensa contribuição científica ao nosso estimado campo da cirurgia da coluna.

Aos docentes Tarcísio E. P. de Barros Filho e Olavo Pires de Camargo, pela valiosa chance de desenvolver minha formação de pós-graduação no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Ao médico veterinário Gustavo Bispo dos Santos, pela valiosa contribuição ao longo dos anos nesta importante linha de pesquisa desenvolvida no IOT-FMUSP, que busca trazer à luz uma patologia que causa tantos danos à nossa sociedade.

Ao meu querido amigo e colega, Dr. Rafael Carboni de Souza, pela parceria que cultivamos desde os primeiros passos na graduação até o presente momento, sempre atuando com profissionalismo e ética para oferecer os melhores tratamentos e resultados aos nossos pacientes.

Ao amigo e colega, Dr. Alexandre Roberto Aprile, por, desde o início da minha jornada acadêmica, me apresentar a beleza da ortopedia e da cirurgia da coluna, além de me ensinar o poder transformador dessas especialidades na vida daqueles que mais necessitam.

Aos grandes médicos que marcaram e continuam a marcar minha trajetória, acompanhando-me até os dias de hoje.

Aos meus pacientes, pela confiança depositada em meu trabalho, o qual tenho o imenso orgulho de exercer.

"A ciência é a chave para a libertação dos limites impostos pela natureza."

– Louis Pasteur

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de “*International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver)*”.

Estrutura e apresentação: Diretrizes para Apresentação de Dissertação e Teses da USP - Parte IV Vancouver. Elaborado por Vania Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação/Faculdade de Medicina da USP; 2016.

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

Nomes das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica, aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia - CTA-SBA. 1a ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole; 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5a edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto no 6.583/2008.

RESUMO

Ritter R. Avaliação do efeito do GM1 associado à cola de fibrina na lesão medular aguda em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2025.

Introdução: O GM1 é um glicosfingolípídeo encontrado no tecido nervoso de mamíferos, reconhecido por suas propriedades de modulação de fatores neurotróficos e regeneração neural. Dentre suas funções, destaca-se a redução do edema neuronal, a homeostase celular e o aumento de fatores neurotróficos endógenos, fundamentais para a recuperação das conexões neuronais. Estudos indicam que soluções injetáveis de GM1 têm potencial terapêutico no tratamento de lesões medulares (LM), embora sua eficácia seja limitada pela dificuldade de atravessar a barreira hematoencefálica devido à sua natureza anfifílica. Alternativas, como a associação do GM1 com a cola de fibrina (CF), têm sido exploradas. A CF, composta por trombina e fibrinogênio, tem demonstrado potencial como sistema de liberação de fármacos e fatores de crescimento, além de facilitar a adesão tecidual e modular a inflamação, o que pode favorecer a regeneração neural. Este estudo investiga os efeitos do GM1 associado à CF em LM aguda experimental induzida em ratos Wistar. **Métodos:** 50 ratos Wistar foram distribuídos em cinco grupos (10 ratos por grupo) e submetidos a uma LM contusa leve induzida por NYU Impactor após laminectomia. Os grupos foram: 1) CF, 2) CF + GM1 30 mg/kg, 3) CF + GM1 40 mg/kg, 4) CF + GM1 50 mg/kg e 5) apenas laminectomia (sham). A função motora e proprioceptiva foi avaliada por meio das escalas BBB e plano horizontal por seis semanas. Após esse período, os animais foram submetidos a protocolo de eutanásia e analisados histologicamente de forma qualitativa e quantitativa com marcadores imuno-histoquímicos (GFAP e Olig2) e quanto à presença de bexiga neurogênica. **Resultados:** Todos os grupos tratados com GM1 apresentaram melhorias significativas nos escores BBB ao longo das seis semanas ($p < 0,001$), com os grupos CF + GM1 40 mg/kg e CF + GM1 50 mg/kg mostrando os maiores escores em comparação ao grupo CF ($p < 0,001$). Em relação à mobilidade, houve uma recuperação gradual, com aumento de passos entre as cinco e seis semanas ($p < 0,05$). A análise histológica mostrou uma redução significativa na necrose e hiperemia nos grupos tratados com GM1, sugerindo uma modulação positiva da lesão secundária. **Conclusão:** A associação de GM1 com CF apresenta resultados promissores, especialmente nas doses de 40 mg/kg e 50 mg/kg, demonstrando benefícios na recuperação motora e preservação tecidual após lesão medular aguda.

Palavras-chave: Traumatismos da medula espinal. Adesivo tecidual de fibrina. Gangliosídeo G(M1). Fármacos neuroprotetores. Modelos animais.

ABSTRACT

Ritter R. Evaluation of the effect of GM1 associated with fibrin glue in acute spinal cord injury in rats [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2025

Introduction: The ganglioside (GM1) is a glycosphingolipid found in mammalian nervous tissue, recognized for its ability to modulate neurotrophic factors and promote neural regeneration. Its key functions include reducing neuronal edema, maintaining cellular homeostasis, and increasing endogenous neurotrophic factors, all of which are critical for the recovery of neural connections. Studies indicate that injectable GM1 solutions have therapeutic potential for treating spinal cord injuries (SCI), although their effectiveness is limited by their difficulty in crossing the blood-brain barrier due to their amphiphilic nature. Alternatives, such as the combination of GM1 with fibrin glue (FG), have been explored. The FG, composed of thrombin and fibrinogen, has shown potential as a drug and growth factor delivery system, as well as promoting tissue adhesion and modulating inflammation, which may support neural regeneration. This study investigates the effects of GM1 combined with FG in an experimental model of acute SCI induced in Wistar rats. **Methods:** Fifty Wistar rats were randomly divided into five groups (10 rats per group) and subjected to a mild contusive SCI induced by the NYU Impactor following laminectomy. The groups were: 1) FG, 2) FG + GM1 30 mg/kg, 3) FG + GM1 40 mg/kg, 4) FG + GM1 50 mg/kg, and 5) laminectomy-only (sham). Motor and proprioceptive functions were evaluated using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) locomotor scale and the horizontal plane test over a six-week period. After this period, the animals were euthanized, and their spinal cords were subjected to histological analysis, including both qualitative and quantitative assessment with immunohistochemical markers (glial fibrillary acidic protein and oligodendrocyte transcription factor (GFAP and Olig2)). Additionally, the presence and duration of neurogenic bladder were recorded. **Results:** All GM1-treated groups showed significant improvements in BBB scores over the six-week period ($p < 0.001$), with groups 3 and 4 achieving the highest scores compared to group 1 ($p < 0.001$). Regarding mobility, there was a gradual recovery, with an increase in steps between weeks 5 and 6 ($p < 0.05$). Histological analysis revealed a significant reduction in necrosis and hyperemia in the GM1-treated groups, suggesting a positive modulation of secondary injury. **Conclusion:** The combination of GM1 with FG presents promising results, particularly at doses of 40 mg/kg and 50 mg/kg, demonstrating benefits in motor recovery and tissue preservation after acute spinal cord injury.

Keywords: Spinal cord injuries. Fibrin tissue adhesive. G(M1) ganglioside. Neuroprotective agents. Animal models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Laboratório de estudos.....	50
Figura 2 –	Foto da raça Wistar escolhida para o estudo.....	51
Figura 3 –	Foto do protocolo de anestesia.....	53
Figura 4 –	Foto modelo NYU impactor e o rato lesado.....	54
Figura 5 –	Escala BBB de avaliação motora.....	56
Figura 6 –	Foto plano horizontal.....	59
Figura 7 –	Corte histológico com coloração HE com aumento 20x.....	61
Figura 8 –	Imagem de medula com o marcador imuno-histoquímico Olig2....	63
Figura 9 –	Imagem de medula com o marcado imuno-histoquímico GFAP....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Descrição do peso dos animais antes e após os tratamentos e variações de peso e resultado do teste comparativo.....	67
Tabela 2 –	Resultado das comparações múltiplas da variação do peso entre os grupos.....	68
Tabela 3 –	Descrição dos parâmetros histológicos e do tempo de bexiga neurogênica segundo grupos e resultado da comparação.....	69
Tabela 4 –	Resultado das comparações múltiplas dos parâmetros histológicos que diferiram e tempo de bexiga neurogênica entre os grupos.....	70
Tabela 5 –	Descrição dos parâmetros de imuno-histoquímica segundo grupos e resultado das comparações.....	70
Tabela 6 –	Descrição da escala BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	71
Tabela 7 –	Resultado das comparações múltiplas da escala BBB entre grupos e momentos avaliados conforme as diferenças encontradas.....	72
Tabela 8 –	Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	74
Tabela 9 –	Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	75
Tabela 10 –	Resultado das comparações múltiplas dos passos entre grupos e momentos.....	76
Tabela 11 –	Resultado das comparações múltiplas dos acertos entre grupos e momentos.....	77
Tabela 12 –	Resultado das comparações múltiplas dos escorregões entre grupos e momentos.....	78
Tabela 13 –	Resultado das comparações múltiplas dos erros entre grupos e momentos.....	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Perfis médios da escala BBB e respectivos erros-padrões segundo grupos.....	73
Gráfico 2 –	Perfis médios e respectivos erros-padrões do número de passos segundo grupo.....	80
Gráfico 3 –	Perfis médios e respectivos erros-padrões do percentual de acertos segundo grupo.....	80
Gráfico 4 –	Perfis médios e respectivos erros-padrões do percentual de incorreções segundo grupo.....	81
Gráfico 5 –	Perfis médios e respectivos erros-padrões do percentual de erros segundo grupo.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
AIS	Escala de comprometimento
ASIA	American Spinal Injury Association
BBB	Basso, Beattie, Bresnahan
BMS	Escala Basso Mouse
BSA	Albumina sérica bovina
CAPPesq	Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa
CF	Cola de fibrina
DH	Doença de Huntington
ELISA	Teste sorológico imunoenzimático
EPO	Eritropoetina
EUA	Estados Unidos da América
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GM1	Monosialotetraesigosangliosídeo (GM1)
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina
IC95%	Intervalo de confiança
IL-6	Interleucina-6
IOT/FMUSP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos
LM	Lesão medular
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
MDA	Metilenodioxioanfetamina
MFS	Escore de Função dos Membros Posteriores
MPS	Metilprednisolona
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study

NGF	Fator de crescimento nervoso
NYU	New York University
Olig2	Fator de transcrição de oligodendróцитos
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato-salino
SOD	Superóxido dismutase
RA	Recuperação acentuada
RU	Reino Unido
TRM	Trauma raquimedular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVO.....	21
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1	Evolução do estudo das lesões medulares e potenciais tratamentos farmacológicos.....	24
3.2	Cola de fibrina.....	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	Local de execução.....	50
4.2	Ética.....	50
4.3	Seleção e alocação dos animais.....	51
4.4	Protocolo de anestesia.....	53
4.5	Lesão medular.....	53
4.6	Protocolo pós-operatório.....	55
4.7	Avaliação motora.....	55
4.7.1	Plano horizontal.....	58
4.8	Protocolo de eutanásia.....	59
4.9	Descarte das carcaças.....	59
4.10	Avaliação histológica.....	60
4.10.1	Avaliação histológica qualitativa.....	61
4.10.2	Avaliação histológica quantitativa.....	62
5	RESULTADOS.....	65
5.11	Resultados avaliação motora BBB.....	66
5.12	Resultados do plano horizontal.....	66
5.13	Resultados da histologia.....	66
5.14	Forma de análise de resultados.....	66
6	DISCUSSÃO.....	82
7	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90
	ANEXOS.....	100

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O primeiro relato conhecido de lesão traumática da medula espinhal data de aproximadamente 1.700 a.C., entre a 16ª e 17ª dinastias do Segundo Período Intermediário egípcio. Esse registro está presente no papiro de Edwin Smith, considerado o mais antigo tratado de cirurgia traumática da atualidade¹.

A lesão raquimedular, definida como lesão aguda da medula espinhal, pode ser acompanhada de alta variedade de lesões neurológicas sensitivas e/ou motoras, tais como retenção urinária, constipação intestinal e prejuízo no retorno venoso dos membros inferiores. Essas manifestações já haviam sido descritas por Hipócrates (460-377 a.C.)².

No Brasil, a incidência anual de trauma raquimedular (TRM) é estimada em cerca de 70 casos por milhão de habitantes³. Considerando-se a população brasileira, de aproximadamente 214 milhões de pessoas, conforme o Censo de 2021, isso equivale a cerca de 15.000 novos casos por ano.

A lesão medular (LM) pode ter origem traumática ou não traumática. As causas não traumáticas incluem infecções, neoplasias e malformações congênitas. Já as traumáticas decorrem, principalmente, de acidentes automobilísticos, esportivos, quedas de altura e ferimentos por arma de fogo⁴. No Brasil, devido à alta taxa de violência, os ferimentos por arma de fogo representam cerca de 16% dos casos de TRM⁵.

Do ponto de vista fisiopatológico, a LM traumática envolve duas fases distintas. A primeira é a lesão primária, de natureza necrótica, causada por estresse mecânico direto e imediato ao tecido nervoso⁶. Em seguida, ocorre a lesão secundária, caracterizada por uma cascata de eventos bioquímicos e celulares que se estende aos tecidos adjacentes, com natureza predominantemente apoptótica⁶.

A cascata da lesão secundária inicia-se com o colapso vascular decorrente da hipoperfusão causada pelo impacto direto, espasmos e trombose capilar, além da hipotensão sistêmica provocada pela perda da regulação autonômica. Esses fatores culminam na isquemia do tecido medular. A degeneração das membranas celulares leva à liberação de radicais livres, como os peróxidos, que danificam o DNA e proteínas mitocondriais, comprometendo a produção de energia e levando à morte celular⁶.

A instabilidade da membrana celular também promove a liberação excessiva de glutamato, levando à sobrecarga de cálcio intracelular e ao aumento da atividade de fosfolipases e oxigenases, intensificando o processo apoptótico⁷.

Além dessas alterações químicas, há uma intensa resposta inflamatória celular. Neutrófilos liberam prostaglandinas e citocinas, exacerbando a inflamação e a isquemia local. Esse processo persiste por semanas, culminando na formação de um cisto intramedular e de uma cicatriz glial, incapaz de exercer função neuronal⁸.

Sabe-se que a lesão primária é irreversível, razão pela qual os esforços terapêuticos se concentram na atenuação da lesão secundária e na promoção da regeneração axonal.

Diversas linhas de pesquisa em modelos animais vêm investigando agentes com potencial neuroprotetor e neurotrófico para uso nas fases agudas do TRM, como o estrogênio^{9,10}, a eritropoetina (EPO) e o monosialotetraesiosigangliosídeo (GM1)¹¹.

O GM1 é um dos principais glicosfingolípídeos presentes no tecido nervoso de mamíferos, reconhecido por seu potencial de modulação de fatores neurotróficos e de regeneração neural¹². Dentre suas propriedades, destacam-se a redução do edema neuronal por meio da ativação de bombas iônicas (Na^+ , K^+ e Mg^{2+}), a homeostase das células nervosas pelo restabelecimento do equilíbrio da membrana e, principalmente, o aumento de fatores neurotróficos endógenos, estimulando a recuperação de conexões funcionais¹³. Apesar dos benefícios observados, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado⁽¹⁴⁾.

Estudos têm revelado a utilidade terapêutica de soluções injetáveis contendo GM1 no tratamento de LMs⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Contudo, a magnitude de seu efeito parece ser desafiada pela baixa capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica devido à sua natureza anfifílica⁽¹⁹⁾. Nesse caso, em alternativa a alterações na estrutura molecular visando alterar seu perfil farmacocinético, novas vias de administração têm sido consideradas, como intracerebroventricular, para o tratamento da doença de Alzheimer⁽²⁰⁾, e intratecal, recentemente avaliada em modelos experimentais de TRM⁽²¹⁾.

A cola de fibrina (CF) é composta pelos produtos da interação entre trombina e fibrinogênio, formando uma rede de fibrina que promove adesão tecidual. Além de sua função hemostática, seus componentes podem interferir no processo de cicatrização, atuando sobre citocinas, como o fator de crescimento transformador- β . Seu uso abrange hemostasia, sutura e adesão tecidual^(22,23). Em modelos animais, a CF tem mostrado potencial em promover reparo e regeneração em LMs agudas^(24,25).

Além disso, a CF tem sido explorada como sistema de liberação de fármacos e fatores de crescimento, bem como suporte para linhagens celulares em estudos de reparação de ossos, órgãos e tecidos^(26,27), o que reforça o interesse em sua associação com agentes neurotróficos, como o GM1.

Com base nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do GM1 associado à CF na LM aguda experimental induzida em ratos Wistar.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do GM1, agente neuroprotetor e neurotrófico, associado à CF quando aplicado diretamente no local da LM contusa induzida experimentalmente em ratos Wistar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Evolução do estudo das lesões medulares e potenciais tratamentos farmacológicos

Em 1911, Allen⁽²⁸⁾ descreve o primeiro modelo de LM aguda em cães, conhecido como modelo de queda de peso. A quantificação da lesão é feita pelo produto do peso (em gramas) e da altura (em centímetros) da queda.

Em 1923, McVeigh⁽²⁹⁾ estuda cães submetidos à LM por meio de compressões digitais na região torácica (T7–T8). O autor considera que as lesões experimentais em cães reproduzem com fidelidade os aspectos clínicos das LMs humanas.

Em 1953, Tarlov et al.⁽³⁰⁾ demonstram, em modelo experimental com cães submetidos à compressão medular progressiva por meio de balão inflado na região torácica, que a perda e a recuperação neurológicas estão diretamente relacionadas ao tempo de compressão. O estudo conclui que a duração da compressão é um fator determinante para a recuperação funcional.

Em 1956, Woodard e Freeman⁽³¹⁾ desenvolvem um modelo experimental de LM em cães por meio de isquemia não traumática. O procedimento consiste na ligadura dos vasos medulares entre os níveis T6 e T11. A análise histológica revela cavitação, perda neuronal e desorganização dos elementos intersticiais, evidenciando os efeitos da isquemia sobre o tecido nervoso.

Em 1969, Ducker e Hamit⁽³²⁾ realizam um estudo experimental em cães submetidos à LM torácica por queda de peso. Os animais são divididos em quatro grupos:

- Grupo 1 (controle): sem intervenção terapêutica;
- Grupo 2: tratado com hipotermia local, por irrigação da ferida com solução salina circulando por um tubo com água a 0 °C;
- Grupo 3: tratado com dexametasona intramuscular, administrada três horas após a lesão; e
- Grupo 4: tratado com metilprednisolona (MPS) intratecal (8 mg/kg), aplicada sob visão direta, em dose única.

A avaliação funcional baseia-se na escala de Tarlov et al.⁽³⁰⁾. Os autores observam melhora estatisticamente significativa nos grupos tratados com hipotermia (grupo 2) e dexametasona (grupo 3), indicando o potencial terapêutico neuroprotetor dessas abordagens nas fases iniciais da LM.

Em 1970, Holdsworth⁽³⁰⁾ publica um artigo baseado na observação clínica de pacientes paraplégicos e tetraplégicos com lesão traumática da medula espinhal. Descreve aspectos anatômicos, mecanismos de trauma, achados radiográficos e critérios diagnósticos. O autor introduz a diferenciação entre LMs completas e incompletas com base na presença de sensibilidade sacral e função motora distal à lesão.

Ainda em 1970, Kelly Jr. et al.⁽³⁴⁾ investigam os efeitos da hipotermia local e dos níveis de oxigenação tecidual em cães submetidos à LM contusa. Concluem que a hipotermia proporciona proteção à medula espinhal, reduzindo a demanda metabólica dos tecidos lesados.

Em 1971, Fairholm e Turnbull⁽³⁵⁾ estudam 34 coelhos e cinco cães submetidos à contusão medular por queda de peso. Os animais são sacrificados entre o primeiro e o 14º dia após o trauma. Por meio de infusão coloidal de bário e microangiografia, identificam duas zonas distintas:

- Zona 1: região póstero-central da medula, com perda progressiva da capacidade de condução dos capilares; e
- Zona 2: área ao redor da zona 1, com padrão microvascular preservado.

Os autores concluem que a preservação da microcirculação é fundamental para a recuperação neuronal e axonal.

Em 1972, Kelly Jr. et al.⁽³⁶⁾ publicam estudo prospectivo com 40 cães adultos submetidos à LM por impacto e divididos em quatro grupos:

- Grupo controle: sem terapia específica;
 - Grupo 1 (tratamento imediato): exposto a oxigênio a 100% sob 2 atm por quatro horas, uma hora após a lesão;
 - Grupo 2 (tratamento tardio): recebeu o mesmo protocolo após quatro horas da lesão;
- e

- Grupo 3 (tratamento seriado): recebeu oxigenoterapia nas mesmas condições do grupo 1, repetida em 24 horas e 48 horas.

No grupo controle, nove animais são incapazes de caminhar e quatro permanecem completamente paraplégicos. Nos grupos tratados, a recuperação é mais evidente, com maior preservação funcional e recuperação motora acelerada, especialmente nos grupos 1 e 2.

Em 1973, Tator e Deecke⁽³⁷⁾ estudam os efeitos da perfusão hipotérmica e normotérmica e da durotomia em macacos Rhesus com lesão experimental. Observam que ambas as perfusões favorecem a recuperação neurológica. No entanto, em compressões mais graves, apenas a perfusão normotérmica promove melhora significativa. Os autores sugerem que a remoção de substâncias tóxicas da medula lesada tem papel relevante na recuperação funcional.

Em 1975, De La Torre et al.⁽³⁸⁾ estudam 32 cães submetidos à LM experimental por queda de peso e avaliados quanto ao tratamento farmacológico. Os animais são divididos em quatro grupos e tratados com: solução salina, manitol, dexametasona e dimetilsulfóxido. Verifica-se que a solução salina e o manitol não são eficazes para reverter a paralisia. Já os grupos tratados com dimetilsulfóxido (seis, de oito animais) ou dexametasona (dois, de oito animais) apresentam recuperação funcional parcial ou total, sugerindo um possível efeito neuroprotetor.

Ainda em 1975, Hansebout et al.⁽³⁹⁾ avaliam os efeitos da hipotermia e dos corticosteroides em cães submetidos à LM por compressão com balão durante uma hora. Os animais são distribuídos em cinco grupos experimentais:

1. Laminectomia isolada;
2. Laminectomia com troca de calor a 37 °C;
3. Laminectomia + LM;
4. Laminectomia + LM + corticosteroide; e
5. Laminectomia + LM + resfriamento local a 6 °C por quatro horas.

Após sete semanas, observa-se que os grupos tratados com corticosteroides ou hipotermia apresentam melhor recuperação motora em comparação com o grupo não tratado, que permanece incapaz de caminhar.

Também em 1975, Yeo et al.⁽⁴⁰⁾ analisam achados de autópsia em pacientes com LM, observando que, mesmo com aparência morfológica preservada, neurônios contundidos perdem sua função – o que poderia ser parcialmente revertido por métodos físicos ou químicos. O grupo busca diferenciar concussão, contusão e laceração da medula espinhal em ovelhas, além de empregar mielografia isotópica para classificar o grau da lesão. Concluem que a isquemia e hipóxia desempenham papel importante na fisiopatologia da paraplegia pós-traumática.

Em 1976, Dohrmann et al.⁽⁴¹⁾ descrevem um aparelho para produção padronizada de LM experimental capaz de medir variáveis biomecânicas como impulso, velocidade de deformação e energia aplicada. O dispositivo, baseado em queda de peso guiada em tubo vertical, possibilita maior reprodutibilidade e correlação entre intensidade da lesão e disfunção neurológica.

No mesmo ano, Dohrmann et al.⁽⁴²⁾ realizam estudo com 15 gatos submetidos à LM torácica (T5–T6) com energia constante de 400 g.cm, mas distribuída entre diferentes combinações de massa e altura de queda (exemplo: 5 g × 80 cm, 80 g × 5 cm). Concluem que, mesmo com a mesma energia, o volume da lesão varia conforme a combinação de massa e altura, reforçando que fatores biomecânicos influenciam significativamente o padrão de dano medular.

Também em 1976, Kuchner e Hansebout⁽⁴³⁾ avaliam o tratamento de cães com LM por compressão com balão extradural, utilizando dexametasona, hipotermia local e a associação de ambos. Os melhores resultados funcionais são observados no grupo que recebe a combinação das terapias, sugerindo efeito sinérgico entre corticosteroides e hipotermia.

Ainda em 1976, Yeo et al.⁽⁴⁴⁾ investigam o uso da oxigenoterapia hiperbárica em ovelhas após LM aguda. O tratamento iniciado até duas horas após o trauma resulta em melhora significativa da recuperação motora, indicando que a intervenção precoce é determinante para a eficácia da terapia.

Em 1977, Holbach et al.⁽⁴⁵⁾ avaliam 15 pacientes com lesões compressivas da medula espinhal submetidos a sessões diárias de oxigênio hiperbárico (1,5 atm, 40 minutos). Em seis dos 13 pacientes tratados, há melhora clínica e neurofisiológica, com aumento da pressão de oxigênio no líquido e nos sinais da eletroneuromiografia. O estudo conclui que essa abordagem pode ser útil, embora ensaios clínicos adicionais sejam necessários.

Ainda em 1977, Rivlin e Tator⁽⁴⁶⁾ propõem um novo método para a avaliação funcional da locomoção em ratos, utilizando um plano inclinado ajustável. O teste quantifica a capacidade

do animal de sustentar-se em diferentes ângulos, permitindo a avaliação objetiva da função motora após mielectomia.

Também em 1977, Yeo et al.⁽⁴⁷⁾ investigam a degeneração central pós-traumática da medula espinhal em ovelhas. O grupo controle apresenta necrose intensa da substância cinzenta, microcistos e desmielinização da substância branca. Já os grupos tratados com alfa-metil-paratirosina e oxigenoterapia hiperbárica demonstram menos degeneração cística e melhor recuperação motora, sugerindo que essas intervenções reduzem a extensão da lesão secundária.

Em 1978, Balentine⁽⁴⁸⁾ investiga a progressão da necrose tecidual em ratos adultos submetidos à LM experimental por queda de peso. São analisadas amostras da medula espinhal em intervalos de tempo que variam de três minutos a uma semana após o trauma. O estudo demonstra que a necrose tem início na substância cinzenta e, posteriormente, acomete a substância branca. A observação dos vasos sanguíneos revela que a necrose resulta da ruptura de artérias e veias principais lesionadas durante o impacto.

No mesmo ano, Ducker et al.⁽⁴⁹⁾ medem o fluxo sanguíneo medular e os níveis de oxigênio tecidual em cães com paraplegia induzida por lesão traumática. Os autores constataam uma redução significativa da perfusão medular após a lesão e sugerem que intervenções terapêuticas deveriam buscar restabelecer a oxigenação e o fluxo sanguíneo para a medula espinhal como forma de proteção neural.

Também em 1978, Rivlin e Tator⁽⁵⁰⁾ avaliam o fluxo sanguíneo regional em 12 ratos Wistar em diferentes momentos (5 minutos, 2 horas e 24 horas) após a LM. Utilizando a técnica radiográfica com C-antipirina, observam que as lesões compressivas graves causam isquemia persistente por, pelo menos, 24 horas. Além disso, desenvolvem um novo modelo de LM com uso de cliques de aneurisma modificados colocados extraduralmente ao redor da medula espinhal.

Em 1979, Tator e Rowed⁽⁵¹⁾ reforçam a importância da lesão secundária como principal responsável pela disfunção neurológica após o trauma medular. Descrevem que, inicialmente, ocorre hemorragia na substância cinzenta e edema na substância branca, seguida pela formação de cavidades necróticas. Identificam dois tipos principais de lesão vascular:

1. Hemorragia imediata devido à ruptura de pequenos vasos (vênulas); e
2. Infarto isquêmico mais tardio, afetando as substâncias branca e cinzenta.

Os autores propõem que intervenções terapêuticas devem ser dirigidas à fase aguda, a fim de evitar o infarto medular secundário. Destacam ainda o potencial uso dos corticosteroides como forma de inibir essa cascata de eventos danosos.

Em 1980, Lohse et al.⁽⁵²⁾ realizam estudo experimental em 24 gatos submetidos à LM torácica com diferentes intensidades (100 g.cm e 260 g.cm). Observam aumento imediato da pressão arterial e ocorrência de arritmias cardíacas. Nos animais que sofrem o trauma mais leve (100 g.cm), o fluxo sanguíneo não se altera significativamente. No entanto, após trauma mais severo (260 g.cm), há aumento do fluxo sanguíneo nas primeiras seis horas. Os autores concluem que, nesses casos, a paraplegia pode estar mais relacionada à lesão secundária do que à isquemia primária da substância branca.

Em 1981, Gamache et al.⁽⁵³⁾ avaliam 25 pacientes com LM aguda tratados com oxigenoterapia hiperbárica iniciada, em média, 7 horas e 30 minutos após o trauma. Todos os participantes também recebem MPS. Embora os escores motores ao final do acompanhamento (quatro meses e um ano) fossem semelhantes aos do grupo que recebe apenas tratamento tradicional, o grupo com oxigenoterapia apresenta recuperação mais rápida, sugerindo benefício na velocidade de recuperação funcional.

Ainda em 1981, Means et al.⁽⁵⁴⁾ realizam estudo experimental em gatos submetidos à LM aguda e tratados com MPS. Avaliam a porcentagem de área cavitária e a recuperação neurológica. Observam correlação negativa entre o tamanho da cavidade medular e a recuperação motora, indicando que a MPS contribui para a redução da degeneração tecidual e melhora funcional.

No mesmo ano, De La Torre⁽⁵⁵⁾ publica uma revisão abrangente sobre estratégias básicas e aplicadas de pesquisa em LM. O autor destaca os principais modelos experimentais, técnicas de avaliação morfológica e neurofisiológica, mecanismos vasculares, alterações bioquímicas e opções terapêuticas para LM aguda e crônica. Identifica três mecanismos principais de regeneração axonal no sistema nervoso central:

1. Brotamento colateral;
2. Plasticidade neural; e
3. Regeneração axonal verdadeira.

O autor também ressalta o papel dos fatores de crescimento e dos transplantes de tecido neural, incluindo células fetais, como potenciais estratégias terapêuticas.

Ainda em 1981, Young et al.⁽⁵⁶⁾ avaliam os efeitos da naloxona em 25 gatos adultos submetidos à lesão traumática por impacto. O grupo tratado com naloxona apresenta melhora do fluxo sanguíneo medular, maior preservação da função sensitiva e melhora dos potenciais evocados somatossensitivos, indicando o efeito neuroprotetor dessa substância.

Em 1982, Anderson et al.⁽⁵⁷⁾ estudam a perfusão microvascular após LM em gatos divididos em três grupos: sem tratamento, com dose alta (15 mg/kg/24 h) e com megadose de MPS (60 mg/kg/24 h). Utilizando carbono coloidal como marcador, observam que o grupo tratado com 15 mg/kg apresenta preservação substancial da microvasculatura, reforçando a eficácia da MPS em reduzir danos isquêmicos.

Ainda em 1982, Young e Flamm⁽⁵⁸⁾ avaliam os efeitos de duas doses de succinato sódico de MPS (15 mg/kg e 30 mg/kg) em gatos submetidos à LM por impacto. Os animais tratados com 30 mg/kg apresentam melhora precoce do fluxo sanguíneo, redução da concentração de cálcio extracelular e preservação dos potenciais somatossensitivos. Os autores atribuem esses efeitos à vasodilatação induzida pelo corticosteroide, o que explicaria sua ação neuroprotetora.

Em 1983, Braughler e Hall⁽⁵⁹⁾ estudam os efeitos da MPS em 87 gatos com LM compressiva de 400 g.cm. Observam que a lesão provocava aumento acentuado do lactato e queda do piruvato, indicativos de metabolismo anaeróbico. A administração de MPS atenua essas alterações, sugerindo efeito benéfico no metabolismo celular pós-lesão.

No mesmo ano, Ford⁽⁶⁰⁾ modifica o método de queda de peso descrito por Allen⁽²⁰⁾ para LM em gatos, comprovando sua eficácia na indução de LM com menor variabilidade. No entanto, critica as limitações dos métodos então disponíveis para avaliação funcional, destacando a necessidade de escalas mais sensíveis e consistentes.

Em 1984, Hall et al.⁽⁶¹⁾ investigam o fluxo sanguíneo medular em 25 gatos submetidos à lesão contusa padronizada ao nível de L3. Os animais são divididos em quatro grupos:

1. Controle (sem tratamento);
2. Tratados com 15 mg/kg de MPS;
3. Tratados com 30 mg/kg de MPS; e
4. Tratados com 60 mg/kg de MPS.

Os resultados demonstram que a dose de 30 mg/kg é mais eficaz na manutenção do fluxo sanguíneo pós-lesão, enquanto a dose de 60 mg/kg não apresenta benefícios adicionais. O estudo conclui que a administração precoce de MPS pode reduzir a isquemia medular secundária, desde que empregada em dose adequada.

Ainda em 1984, Toffano⁽⁶²⁾ avalia os efeitos do GM1 na recuperação de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais em ratos submetidos à hemitransecção unilateral. O tratamento com GM1 favorece o brotamento colateral de axônios e previne a perda de corpos celulares positivos para tirosina hidroxilase na substância negra. Além disso, há aumento da imunorreatividade para tirosina hidroxilase, indicando o potencial do GM1 na regeneração neural.

Em 1985, Anderson et al.⁽⁶³⁾ descrevem a cascata de eventos fisiopatológicos que ocorre após a LM traumática aguda, incluindo necrose hemorrágica, isquemia, edema, inflamação, perda de íons extracelulares e peroxidação lipídica. Ressaltam que a MPS, em modelos experimentais, mostra-se eficaz na inibição da ação dos radicais livres, atuando como agente neuroprotetor ao mitigar a peroxidação de membranas celulares.

No mesmo ano, Bracken et al.⁽⁶⁴⁾ publicam estudo multicêntrico comparando altas doses (1.000 mg em bolus + manutenção por 10 dias) com doses padrão (100 mg/dia) de MPS no tratamento de LM. Não são observadas diferenças estatisticamente significativas na recuperação motora entre os grupos, embora o grupo de altas doses apresente maior incidência de infecção e mortalidade, sem significância estatística.

Ainda em 1985, Gale et al.⁽⁶⁵⁾ desenvolvem um protocolo de avaliação funcional em ratos com LM por contusão. A escala proposta baseia-se na observação comportamental dos membros posteriores em campo aberto, adaptada da escala de Tarlov⁽²²⁾. Essa metodologia serve de base para futuros sistemas de pontuação funcional mais refinados, como a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).

Por fim, Noble e Wrathall⁽⁶⁶⁾ estudam parâmetros morfométricos em 51 ratos Sprague-Dawley com LM induzida por queda de peso de 10 g a diferentes alturas (2,5 cm a 17,5 cm). Quatro semanas após a lesão, mensuram volume e extensão da área lesada, correlacionando-os com déficits motores e sensitivos. O estudo demonstra que o modelo de queda de peso em ratos permite a produção reprodutível de lesões leves, moderadas e graves, sendo apropriado para estudos pré-clínicos.

Em 1986, Bose et al.⁽⁶⁷⁾ estudam o efeito do tratamento crônico com GM1 no restabelecimento da continuidade axonal e na recuperação funcional em ratos transeccionados na medula espinhal. Segundo os autores, estudos anteriores haviam demonstrado que o tratamento crônico com GM1 é eficaz na regeneração de neurônios dopaminérgicos mesoestriatais lesionados no sistema nervoso central. Além disso, o GM1 promove a regeneração de nervos periféricos após lesão por esmagamento nervoso. A continuidade axonal é determinada pela capacidade da medula espinhal de transportar peroxidase de raiz forte através da região de transecção. Comparações entre controles tratados com GM1 e tratados com solução salina mostram que o tratamento com GM1 resulta no restabelecimento da continuidade axonal entre a medula espinhal distal ao nível da transecção e o tronco encefálico. Controles tratados com solução salina apresentam pouca evidência de continuidade axonal entre essas duas regiões. Assim, os autores concluem que gangliosídeos induzem o restabelecimento da continuidade axonal e, portanto, podem promover a recuperação funcional em ratos após a transecção da medula espinhal.

Em 1987, Albin e White⁽⁶⁸⁾ demonstram que o traumatismo da medula espinal, além da destruição mecânica, desencadeia hemorragia, diminuição da perfusão, hipóxia tecidual, edema e, finalmente, necrose dos elementos neurais.

Em 1988, Bresnahan et al.⁽⁶⁹⁾ desenvolvem um aparelho de impacção com função eletromecânica. Afirmam que a LM experimental reprodutível depende de uma resposta imediata das propriedades mecânicas do impacto. Documentam que o aparelho apresentado é sensível às características do tecido lesado e permite manipulação contínua da força de impacto ou do deslocamento tecidual. Descrevem os resultados anatômicos e comportamentais de um determinado índice de impacto e examinam a capacidade do aparelho em produzir uma lesão traumática consistente.

Em 1989, Janssen e Hansebout⁽⁷⁰⁾, em revisão da literatura, analisam a patogênese da lesão da medula espinhal e os novos tratamentos químicos e físicos que podem diminuir o dano secundário, concluindo que a terapia com oxigênio hiperbárico demonstra resultados positivos. A razão explicada nessa abordagem é que a diminuição da perfusão tecidual pode ser compensada pelo aumento dos níveis de oxigênio no sangue. Concluem que, nos casos em que ocorre cessação completa da circulação na área medular lesada, esse tratamento pode não ser efetivo.

Em 1990, Barros Filho et al.⁽⁷¹⁾, em estudo retrospectivo, analisam 428 casos de TRM no período de 1982 a 1987, encontrando como etiologias mais frequentes os ferimentos por arma

de fogo (36,7%), acidentes em água rasa (7,7%), queda de objeto sobre o paciente (4,2%) e outras causas (2,3%). Chama a atenção o fato de que, nesse estudo, 28% dos pacientes são atendidos nas primeiras seis horas após o acidente, 33,3% são atendidos no hospital um dia após o acidente e 3,3% são atendidos no hospital 15 dias ou mais depois do acidente.

Em 1991, Geisler et al.⁽⁷²⁾ realizam um ensaio clínico prospectivo, randomizado, controlado por placebo e duplo-cego com GM1 em pacientes com LM. Dos 37 pacientes incluídos no estudo, 34 (23 com lesões cervicais e 11 com lesões torácicas) completam o protocolo (100 mg de GM1 ou placebo intravenoso ao dia, por 18 a 32 doses, com a primeira dose administrada até 72 horas após a lesão) e um período de acompanhamento de um ano. A recuperação neurológica é avaliada pela escala de Frankel e pelo escore motor da American Spinal Injury Association (ASIA). Há uma diferença significativa entre os grupos na distribuição da melhora dos graus de Frankel da linha de base para o acompanhamento de um ano. Os pacientes tratados com GM1 também têm uma melhora média significativamente maior na pontuação motora ASIA da linha de base para o acompanhamento de um ano do que os pacientes tratados com placebo. Uma análise das recuperações musculares individuais revela que o aumento da recuperação no grupo GM1 é atribuído aos músculos inicialmente paralisados que recuperam força motora útil, e não ao fortalecimento dos músculos paréticos.

Em 1992, Bracken e Holford⁽⁷³⁾ publicam artigo em que apresentam os resultados observados pelo National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS). Relatam que o NASCIS 1 (1977) conduz estudo randomizado e controlado das terapias que podem melhorar a LM e o NASCIS 2 compara o uso de altas doses de MPS ou naloxona ao placebo, reportando que pacientes que iniciam tratamento dentro das primeiras oito horas têm melhora significativa da função motora em seis semanas, seis meses e um ano após a lesão. Afirmam que a MPS, aplicada precocemente após LM, melhora a função motora de pacientes diagnosticados inicialmente com lesão completa ou incompleta. Destacam que o tratamento tardio com MPS está associado à diminuição da recuperação neurológica. Concluem que essa análise ampara o uso de MPS em altas doses para o tratamento das LMs no TRM.

Em 1993, Walker⁽¹³⁾ realiza um estudo randomizado, duplo-cego e cruzado em humanos com LM crônica. Os pacientes recebem GM1 ou placebo por dois meses. O GM1, administrado por via intravenosa na dose de 100 mg, seis dias por semana, resulta em uma melhora estatisticamente significativa nos escores motores ($p < 0,05$), independentemente de ter sido administrado antes ou após dois meses de placebo. Os indivíduos que recebem GM1 antes do placebo mantêm sua melhora durante a fase placebo. Os indivíduos que recebem GM1

deambulam com marcha recíproca, usando órteses, por distâncias maiores e em um ritmo mais rápido, independentemente de o medicamento ter sido administrado antes ou depois do placebo. Esses resultados constituem a primeira descoberta de que alguma substância química melhora a locomoção em humanos com LM crônica.

Em 1994, Constatini e Young⁽⁷⁴⁾ relatam que ensaios clínicos demonstram que a MPS e o GM1 promovem uma melhora da recuperação neurológica na LM em humanos. Dessa forma, decidem avaliar essas substâncias de forma isolada e associada em um modelo de contusão medular em ratos. A MPS também previne a hiponatremia induzida por lesões e aumenta a perda de peso corporal em ratos com lesões na coluna. Quando usado sozinho, o GM1 tem pouco ou nenhum efeito em qualquer variável medida em comparação com os controles do veículo; quando administrado em conjunto com MPS, o GM1 bloqueia os efeitos neuroprotetores da MPS, sendo desaconselhado o uso em conjunto pelos autores. Possíveis efeitos benéficos do GM1 relatados em lesões do sistema nervoso central podem estar relacionados aos efeitos na recuperação neural e não aos processos de lesões agudas.

Em 1995, Basso et al.⁽⁷⁵⁾ verificam o comportamento depois da LM contusa em ratos fazendo uma modificação da escala locomotora desenvolvida por Tarlov et al.⁽³⁰⁾. Dados obtidos indicam que a escala é válida e é uma medida preditiva da recuperação motora, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais causados pelas diferentes lesões e de prever alterações anatômicas no centro da lesão. Os testes inter-ratos indicam que examinadores com experiência no uso da escala conseguem aplicá-la consistentemente e obter resultados similares. A escala BBB oferece aos avaliadores uma medida mais discriminatória dos resultados comportamentais para avaliar o tratamento depois da lesão da medula espinhal.

Em 1996, Basso et al.⁽⁷⁶⁾ padronizam um aparelho desenvolvido pela New York University (NYU Impactor) para realizar LM contusa em ratos. Citam o teste BBB como sendo mais sensível que os demais até então descritos para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram LM contusa. Demonstram que o sistema da NYU permite produzir uma contusão medular graduada, consistente e reprodutível em todos os ratos. Afirmam que um exame dos efeitos terapêuticos para índices lentos e rápidos de recuperação é mais evidente nos grupos graduados com 12,5 mm e 25 mm de altura da queda do peso de 10 g sobre a medula. Confirmam que uma maior quantidade de tecido poupado está diretamente relacionada a uma melhor função locomotora final quando aplicada a escala BBB. Documentam aumento dos movimentos dos membros inferiores duas semanas após lesão compressiva ou por transecção

medular e concluem que a escala BBB é aplicável, após a utilização do sistema da NYU, na análise da recuperação da função locomotora em ratos com LM contusa.

Em 1997, Segatore e Way⁽⁷⁷⁾ demonstram que avanços nas ciências básicas e clínicas estão aprimorando a capacidade de alterar o curso da lesão que ocorre após traumatismo agudo da medula espinhal. Metilprednisolona, naloxona, GM1, mesilato de tirilazade e outros agentes foram ou estão sendo submetidos a testes rigorosos para determinar sua capacidade de proteger elementos celulares comprometidos, porém viáveis, e melhorar o resultado funcional dos sobreviventes. Os autores resumem os mecanismos de lesão secundária (medula espinhal), discutem a farmacoterapia derivada, revisam os resultados de ensaios clínicos e levantam questões relacionadas a pesquisas futuras. Dá-se especial atenção aos estudos de Maryland sobre GM1 e aos ensaios nacionais sobre lesão aguda da medula espinhal. Trabalhos preliminares sobre os papéis de aminoácidos excitatórios, peptídeos opioides endógenos, bloqueadores dos canais de cálcio e fatores de crescimento nervoso em lesões secundárias também são descritos.

Em 1998, Taoka e Okajima⁽⁷⁸⁾ afirmam em seu estudo que existem apenas medidas terapêuticas limitadas disponíveis para o tratamento de lesões na medula espinhal. Essa revisão descreve os mecanismos patológicos da LM induzida por trauma em ratos, o que contribui para uma nova compreensão do processo patológico que leva à LM e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A LM induzida por trauma é consequência de uma agressão física inicial e de um subsequente processo de lesão progressiva que envolve vários eventos patoquímicos que levam à destruição tecidual; este último processo deve, portanto, ser alvo de tratamento farmacológico. Neutrófilos ativados demonstram estar implicados nesse último processo de LM em ratos. Eles danificam as células endoteliais pela liberação de mediadores inflamatórios, como a elastase dos neutrófilos e os radicais livres de oxigênio. A adesão de neutrófilos ativados à célula endotelial também pode desempenhar um papel na lesão das células endoteliais. Essa lesão das células endoteliais pode, por sua vez, induzir distúrbios microcirculatórios, levando à isquemia da medula espinhal. Os autores descobrem que alguns agentes terapêuticos que inibem a ativação de neutrófilos aliviam os distúrbios motores observados no modelo de LM em ratos. A MPS e o GM1, que são os dois únicos agentes farmacológicos disponíveis clinicamente para o tratamento de LM aguda, não inibem a ativação de neutrófilos neste modelo em ratos. Em conjunto, essas observações levantam a possibilidade de que outros agentes farmacológicos que inibem a ativação de neutrófilos, usados em conjunto com MPS ou GM1, possam ter um efeito sinérgico no tratamento de LM traumática em humanos.

Em 1999, Seidl⁽⁷⁹⁾ afirma em seu estudo que a busca por um tratamento farmacológico para LM aguda remonta à década de 1960. Somente em 1990 o agente farmacológico MPS demonstra melhores resultados em humanos. A MPS demonstra superioridade em relação ao placebo em humanos em dois grandes ensaios multicêntricos e é o padrão de tratamento até aquele momento. Outros agentes potencialmente úteis incluem tirilazade, GM1 e naloxona. Estudos adicionais com esses agentes seriam necessários para determinar a dose ideal e o momento da administração.

Em 1999, Rodrigues⁽⁸⁰⁾ padroniza um modelo de lesão de medula espinal em ratos Wistar e utiliza equipamento computadorizado para impacto por queda de peso, de acordo com parâmetros determinados pelo Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS). Verifica a existência de correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos e conclui que o modelo é capaz de gerar LMs padronizadas em ratos.

Em 2000, Bracken⁽⁸¹⁾ apresenta uma revisão sistemática dos agentes farmacológicos para o tratamento da LM aguda. Conclui, nessa revisão, que altas doses de MPS constituem a única terapia farmacológica que mostra ter eficácia no tratamento da LM aguda.

Em 2001, Blight e Zimmer⁽⁸²⁾ afirmam, em seu estudo, que não há medicamentos especificamente aprovados para LM que tratem diretamente o dano subjacente ao tecido neural. O tratamento imediato com MPS demonstra melhorar o resultado da lesão em uma série de estudos pré-clínicos e clínicos, e é amplamente utilizado, embora os benefícios pareçam modestos. Diversas outras abordagens para proteger a medula espinhal lesionada de processos patológicos secundários são examinadas experimentalmente, incluindo antioxidantes, estabilizadores de membrana, antagonistas do glutamato, anti-inflamatórios, inibidores de caspases, inibidores da calpaína e outros compostos de mecanismo incerto. Todas essas abordagens são apoiadas por estudos positivos em animais, mas sua eficácia em relação à MPS, não é estabelecida.

Em 2001, Geisler et al.⁽⁸³⁾ realizam um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, sequencial e multicêntrico de duas doses de Sygen (GM1) versus placebo para determinar a eficácia e a segurança do Sygen em LM aguda. São randomizados 760 pacientes, avaliados em cada um dos três grupos de tratamento: placebo, Sygen em baixa dose (100 mg) e Sygen em alta dose (200 mg). Os pacientes são estratificados em seis grupos, de acordo com três graus de gravidade da lesão (graus A, B e C do AIS) e dois níveis de lesão anatômica (cervical e torácica). A análise planejada prospectivamente no tempo de desfecho pré-especificado para todos os pacientes é negativa. Há um efeito significativo em todos os pacientes na variável de desfecho

primário (a porcentagem de recuperação acentuada (RA)) na oitava semana, final do período de dosagem. Há um efeito significativo em todos os pacientes no momento em que a RA é alcançada pela primeira vez. Restrita à gravidade do grupo B, que tem um pequeno tamanho de amostra, a análise de eficácia primária mostra uma tendência, mas não atinge significância. Há um efeito amplo, consistente e, em alguns momentos, significativo na variável de desfecho primário nos pacientes não operados até a semana 26. Os escores de motor, toque leve e picada de agulha da ASIA mostram uma tendência consistente a favor do Sygen, assim como a função intestinal, a função da bexiga, a sensibilidade sacral e a contração anal. Os pacientes com lesões menos graves parecem apresentar efeito benéfico maior do medicamento. As evidências contra o efeito do Sygen são mínimas e dispersas. Embora não comprovado na análise de eficácia primária desse estudo, o Sygen demonstra ser benéfico em pacientes com LM grave.

Em 2004, Coleman e Geisler⁽⁸⁴⁾ realizam uma análise retrospectiva de dados coletados prospectivamente para o estudo multicêntrico de GM1. Um total de 760 pacientes são recrutados em 28 centros na América do Norte. As lesões são rostrais a T10 e deixam pelo menos uma perna com uma pontuação motora ASIA inferior a 15 de 25. Os pacientes são avaliados no início do estudo usando a Escala de Comprometimento da ASIA (AIS): Grau A, Grau B e Graus C e D (combinados). Eles são divididos por região da lesão, cervical ou torácica. O desfecho é a RA definida como melhora de pelo menos dois graus da AIS do início do estudo para a Escala de Benzel Modificada na semana 26. Outros desfechos são alterações na ASIA motor, no toque leve e nas pontuações de picada de agulha. O recrutamento é desigual. Em 760 pacientes, 579 lesões são cervicais e 482 são completas. Há poucas lesões torácicas incompletas. O grupo cervical apresenta mais RA do que o grupo torácico (37,2% vs. 15,9%, $p < 0,0001$). Os grupos AIS C e D apresentam mais RA (84,0%) do que o grupo B (46,6%) ($p < 0,0001$), que se recupera mais do que o grupo A (12,8%). O grupo cervical apresenta vantagem na RA, pois apresenta mais pacientes com AIS B e ainda mais pacientes AIS C e D. Dentro do grupo AIS A, o subgrupo cervical apresenta maior RM (15,5%) do que o torácico (7,0%) ($p < 0,02$), mas a RA é quase igual no grupo B e no grupo C e D. Isso sugere uma nova variável de estratificação, "região/gravidade da lesão", para distinguir lesões cervicais ($n = 332$, RA = 15,5%) e torácicas ($n = 150$, RA = 7,0%) dentro do AIS A, mas não no AIS B ($n = 131$, RA = 46,6%) ou no AIS C e D ($n = 147$, RA = 84,1%). Essa variável é um preditor significativo de RA ($p < 0,0001$). Os autores concluem que a gravidade do AIS é o preditor mais forte. A região anatômica também é forte, mas confundida com o efeito da gravidade, porque as cervicais têm menos lesões completas e porque o grupo cervical completo tem melhor desempenho do que o torácico

completo. A variável região/gravidade da lesão mantém o forte valor prognóstico do uso de região e gravidade, mas é mais simples e estatisticamente mais econômica.

Em 2004, Hall e Springer⁽⁸⁵⁾ afirmam que há muito se reconhece que grande parte da degeneração pós-traumática da medula espinhal é causada por um processo de lesão secundária multifatorial que ocorre durante os primeiros minutos, horas e dias após a LM. Um evento bioquímico fundamental nesse processo é a peroxidação lipídica reativa induzida por oxigênio. De acordo com os autores, em 1990 são publicados os resultados do NASCIS 2, que mostram que a administração de um regime de alta dose do esteroide glicocorticoide MPS, que já havia demonstrado inibir a peroxidação lipídica pós-traumática em modelos animais de LM espinhal, poderia melhorar a recuperação neurológica em humanos com esse tipo de lesão. Isso resulta no registro de MPS em altas doses para LM espinhal aguda em vários países, embora não nos Estados Unidos da América (EUA). No entanto, esse tratamento rapidamente se torna o padrão de tratamento para LM espinhal aguda, visto que o medicamento já está no mercado americano para muitas outras indicações. Posteriormente, é demonstrado que o 21-aminoesteroide não glicocorticoide tirilazade poderia duplicar a eficácia neuroprotetora antioxidante do MPS em modelos de LM espinhal, e evidências de eficácia em humanos são obtidas em um terceiro estudo NASCIS (NASCIS 3). Nos últimos anos, o uso de MPS em altas doses na LM espinhal aguda havia tornado-se controverso, em grande parte, devido ao risco de efeitos adversos graves versus o que é percebido como, em média, um benefício neurológico modesto. O antagonista do receptor opiáceo naloxona também é testado no NASCIS 2 com base na demonstração de seus efeitos benéficos em modelos de LM espinhal. Embora não tenha apresentado um efeito geral significativo, algumas evidências de eficácia são observadas em pacientes incompletos (ou seja, paréticos). O GM1 também é examinado em um ensaio clínico no qual os pacientes recebem, inicialmente, tratamento com MPS em altas doses. No entanto, o GM1 não demonstra nenhuma evidência de melhora significativa na extensão da recuperação neurológica em relação ao nível proporcionado pela terapia com MPS isoladamente, embora a tenha acelerado. O artigo analisa o desenvolvimento anterior de MPS, naloxona, tirilazade e GM1 para LM aguda e a controvérsia de então entre MPS e LM, identificando, ainda, as complicações regulatórias envolvidas no desenvolvimento futuro de medicamentos para LM. O autor sugere algumas abordagens neuroprotetoras promissoras que poderiam substituir ou ser usadas em combinação com MPS em altas doses.

Em 2005, Chinnock e Roberts⁽⁸⁶⁾ realizam uma revisão sistemática por meio de avaliação de ensaios clínicos randomizados de gangliosídeos versus controles em pacientes com LM

espinhal. As medidas de desfecho especificadas são: mortalidade, recuperação da função motora, melhora nas medidas sensoriais, medidas de atividade funcional, infecções e quaisquer outros eventos adversos. Os dados são extraídos de estudos publicados e os autores são contatados para mais informações. Todos os dados encontrados são dicotômicos, e razões de chance (com IC95%) são calculadas. Dois estudos preenchem os critérios de inclusão. Não há óbitos em um deles ($n = 37$). No outro ($n = 760$), há um número ligeiramente maior de óbitos no grupo de tratamento do que no grupo controle; razão de chances de 1,07 (IC95% 0,57–2,00) – um resultado que pode ser explicado pelo acaso. Fraquezas metodológicas relacionadas à coleta e apresentação dos dados dos dois estudos impossibilitam a obtenção de quaisquer conclusões sobre o efeito dos gangliosídeos nos outros desfechos especificados, dessa forma, as evidências disponíveis não apoiam o uso do tratamento com gangliosídeos para reduzir a taxa de mortalidade em pacientes com LM espinhal. Segundo os autores, ainda não há evidências de que o tratamento com gangliosídeos melhore a recuperação ou a qualidade de vida dos sobreviventes.

Ainda em 2005, Fehlings e Baptiste⁽⁸⁷⁾ realizam outra revisão sistemática para avaliar o estado atual dos ensaios clínicos para lesão aguda da medula espinhal. Alvos para intervenção terapêutica em LM são identificados utilizando modelos animais. Desde então, pesquisadores têm como alvo edema, produção de radicais livres, concentrações elevadas de glutamato e cálcio extracelular e inflamação, enquanto tentam prevenir processos apoptóticos nas substâncias cinzenta e branca. Espera-se que a compreensão mais aprofundada dos mecanismos bioquímicos subjacentes que contribuem para o déficit neurológico em LMs agudas leve à identificação de novas estratégias para melhorar a função neurológica após esse tipo de lesão. Considerando que, nos últimos 27 anos, há apenas uma terapia com uso de MPS (bolus de 30 mg/kg seguido de 5,4 mg/kg/h ao longo de 24 horas, iniciada em até oito horas após a lesão), que demonstra capacidade modesta de melhorar o resultado neurológico após lesão cerebral traumática, o progresso na transposição de novas abordagens terapêuticas do laboratório para o ser humano estava sendo lento. Até esse momento, vários novos avanços em pesquisas no campo da neuroproteção e do reparo celular demonstram ser promissores em laboratório e provavelmente impactarão futuros ensaios clínicos em LMs agudas. Esses avanços incluem o copolímero fusogênio polietilenoglicol, o derivado semissintético de tetraciclina de segunda geração, a minociclina, e estratégias de neurotransplante com células-tronco. Além disso, a complexidade e a natureza multifatorial da LM aguda sugerem a necessidade de combinar estratégias terapêuticas para uma recuperação aprimorada; não apenas na deambulação, mas também na melhor dor associada ao trauma medular e de déficits sensoriais e funcionais autonômicos.

Em 2006, Baptiste e Fehlings⁽⁸⁸⁾ relatam em seu estudo que nenhuma terapia padrão-ouro para LM aguda está estabelecida, embora ensaios clínicos com MPS (NASCIS 2 e 3) e GM1 (Maryland e Sygen) tenham demonstrado benefícios terapêuticos potencialmente importantes. Em vista do impacto avassalador da LM aguda no indivíduo, outras intervenções terapêuticas são urgentemente necessárias. Diversas terapias farmacológicas promissoras estão sob investigação para capacidades neuroprotetoras em modelos animais de LM aguda. Estas incluem o bloqueador dos canais de sódio riluzol, o derivado da tetraciclina minociclina, o copolímero fusogênio polietilenoglicol e o hormônio protetor tecidual EPO. Além disso, ensaios clínicos que investigam as supostas propriedades neuroprotetoras e neuroregenerativas atribuídas ao antagonista da via Rho, Cethrin (BioAxone Therapeutic, Inc., Boston, MA, EUA), e a implantação de macrófagos autólogos ativados (ProCord; Proneuron Biotechnologies, Nova Iorque, EUA) em pacientes com LM aguda torácica e cervical estão em andamento. Concluem que aqueles estudos inaugurariam uma era de renovado interesse em ensaios clínicos translacionais. Em última análise, devido à fisiopatologia multifatorial da LM aguda traumática, terapias eficazes exigiriam abordagens combinadas.

Em 2008, Carvalho et al.⁽⁸⁹⁾ realizam um estudo experimental em que 24 ratos Wistar são submetidos à lesão contusa da medula espinhal produzida pelo sistema NYU Impactor. Esses animais são divididos em quatro grupos: o grupo I recebe injeção de MPS; o grupo II recebe injeção de GM1; o grupo III recebe injeção de MPS juntamente com GM1; e o grupo controle recebe soro fisiológico. Os animais são avaliados quanto à recuperação da função locomotora por meio do teste BBB no 2º, 7º e 14º dias após a lesão contusa da medula espinhal. Eles são sacrificados no 14º dia. Esse estudo demonstra que os grupos MPS e GM1 apresentam resultados funcionais superiores aos do grupo controle, embora a recuperação mais acentuada do grupo II (GM1) em relação ao grupo controle não seja estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A recuperação mais notável da função locomotora é observada no grupo que recebeu MPS isoladamente ($p < 0,05$). O grupo que recebe MPS juntamente com GM1 apresenta resultados superiores aos do grupo controle ($p < 0,05$). A administração de MPS isoladamente ou com GM1 demonstra ser eficaz na recuperação da função locomotora. A administração combinada desses medicamentos resulta em melhores resultados do que a administração de MPS isoladamente.

Em 2010, Rodrigues et al.⁽⁹⁰⁾ estabelecem um padrão para as LMs contusas por queda de peso em ratos Wistar. Consoante com o estudo NASCIS, os autores utilizam um dispositivo para produzir uma queda de peso que gera lesões padronizadas. Há correlação com significância estatística entre os parâmetros mecânicos e o volume da lesão.

Em 2011, Souza⁽⁹¹⁾ realiza ensaio experimental para a avaliação da eficácia do GM1 por via intraperitoneal após LM experimental em ratos. São utilizados 20 ratos machos da raça Wistar, divididos em dois grupos de 10 animais. No grupo EPO, é administrado soro fisiológico. No grupo EPO/IL-6, administra-se 30 mg/kg de GM1. As lesões são produzidas seguindo o protocolo internacional MASCIS, com o sistema NYU Impactor. Os animais são avaliados funcionalmente pela escala BBB. O potencial evocado motor é realizado em todos os animais, no 42º dia após o trauma. As avaliações funcionais e por meio do potencial evocado não demonstram diferenças com significância estatística entre os dois grupos. O autor conclui que o emprego de GM1 intraperitoneal não demonstra resultados satisfatórios após LM experimental.

Em 2012, Cristante et al.⁽⁹²⁾ publicam estudo de revisão sobre possíveis abordagens terapêuticas para a LM. Observam que a maioria dos estudos dividem a abordagem do paciente com lesão aguda da medula espinhal em quatro: cirurgia corretiva e os métodos de tratamento físico, biológico ou farmacológico. Os autores referem que, mesmo que a ciência tenha progredido bastante em desvendar os mecanismos de proteção celular e regeneração neuronal, clinicamente, o tratamento desses pacientes ainda consiste em cuidados de apoio. A combinação de várias estratégias terapêuticas deveria permitir recuperações funcionais parciais para esses pacientes, o que poderia melhorar a sua qualidade de vida.

Em 2013, Lammertse⁽⁹³⁾ realiza uma revisão histórica dos principais estudos em LM dos 30 anos anteriores, em que ilustra o progresso alcançado no estabelecimento de um alto padrão na condução da pesquisa clínica, ao mesmo tempo em que fornece lições importantes para aprimorar o desenho, a condução e a elaboração de relatórios de ensaios clínicos. Por meio da aplicação dessas lições, o desempenho dos ensaios de LM pode ser aprimorado, encurtando assim o caminho para a tradução bem-sucedida e o desenvolvimento de terapias eficazes. Com a publicação dos resultados do ensaio multicêntrico Sygen falhando em mostrar eficácia, o entusiasmo anterior por esta nova opção havia despencado. O medicamento nunca obteve aprovação regulatória para qualquer uso nos EUA e, embora já tenha estado disponível para o tratamento de condições neurológicas em vários países da Europa, a Agência Europeia de Medicamentos não listava mais o Sygen como um tratamento aprovado. Recomendações de Neurocirurgia de 2002 afirmam que “o tratamento de pacientes com lesões agudas da medula espinhal com gangliosídeo GM1 é recomendado como uma opção sem benefício clínico demonstrado”. Apesar de seus fracassos, o ensaio Sygen é um marco importante, não apenas por estabelecer um novo padrão no desenho e condução de ensaios clínicos em LM, mas também pela riqueza de dados disponibilizados à área para análises publicadas de recuperação após LM.

Em 2015, do Vale Ramos et al.⁽⁹⁴⁾ realizam uma revisão sistemática sobre a terapia farmacológica para a modificação do estado neurológico de traumatizados vertebro-medulares envolvendo estudos publicados em português ou em inglês, nos cinco anos anteriores à publicação. Trabalhos mais antigos são incluídos por sua importância histórica. Os grupos farmacológicos são divididos em função da sua capacidade de interferência nos mecanismos fisiopatológicos da lesão secundária. O uso de MPS deve ser cuidadosamente ponderado. Outros anti-inflamatórios mostram benefícios em humanos ou em animais. O GM1 não aparenta ter maior eficácia do que a MPS, mas estudos em mais longo prazo são necessários. Muitos inibidores da apoptose mostram benefício em estudos *in vitro* ou em animais. A naloxona não dá mostras de benefício. O tempol inibe as principais consequências da oxidação no nível da medula, e outros fármacos antioxidantes aparentam ter um efeito superior ao da MPS.

Os autores sugerem ser urgente encontrar novos tratamentos que melhorem o estado neurológico dos traumatizados vertebro-medulares. Os benefícios do tratamento com MPS estavam sendo questionados, com preocupações em relação à sua segurança. Outros fármacos estão sendo estudados, sendo que alguns deles podem ser opções promissoras. Os autores concluem que estudos adicionais são necessários para tirar conclusões sobre o benefício desses agentes na prática clínica.

Em 2016, Marcon et al.⁽⁹⁵⁾ realizam um estudo experimental cujo objetivo é avaliar os efeitos funcionais e histológicos do GM1 e da EPO após lesão experimental por contusão da medula espinhal. Cinquenta ratos Wistar machos são submetidos à lesão experimental da medula espinhal por dispositivo NYU Impactor e são divididos aleatoriamente nos seguintes grupos, que recebem tratamento intraperitoneal: o grupo GM1 recebe GM1 (30 mg/kg); o grupo EPO recebe EPO (1000 UI/kg); o grupo combinado recebe ambos os fármacos; e o grupo salina recebe salina (0,9%) como controle. Um quinto grupo é o grupo laminectomia, no qual os animais são submetidos apenas à laminectomia, sem lesão espinhal ou tratamento. Os animais são avaliados de acordo com a escala BBB, registros de potenciais evocados motores e, após eutanásia, análise histológica do tecido da medula espinhal. Segundo os autores, o grupo EPO apresenta escores BBB mais altos do que o grupo GM1.

O grupo combinado apresenta os maiores escores BBB, e o grupo com solução salina apresenta os menores escores BBB. Não é observado diferença significativa na latência entre os três grupos submetidos à LM e à intervenção. No entanto, o grupo combinado apresenta amplitude de sinal significativamente maior do que os outros grupos de tratamento ou o grupo com solução salina ($p < 0,01$). A análise histológica do tecido não mostra diferença significativa

entre os grupos. O índice axonal é significativamente aumentado no grupo combinado em comparação com qualquer outra intervenção ($p < 0,01$). Como conclusão, GM1 e EPO exercem efeitos terapêuticos na regeneração axonal e nas funções eletrofisiológicas e motoras em ratos submetidos à LM experimental, e a administração dessas duas substâncias em combinação potencializa seus efeitos.

Em 2017, Yuan et al.⁽¹²⁾ realizam um estudo experimental para investigar os efeitos do GM1 sobre as expressões da caspase-3 e do fator de crescimento nervoso (NGF) em ratos com LM aguda. Ratos machos Sprague-Dawley são selecionados e divididos aleatoriamente em grupo sham, grupo LM e grupo de administração GM1. Os ratos dos grupos sham, LM e GM1 são submetidos a exames comportamentais BBB e teste de placa oblíqua 1 dia, 7 dias e 14 dias após a operação. O conteúdo de metilenodioxianfetamina (MDA) e a atividade da superóxido dismutase (SOD) de cada rato em cada grupo são medidos pelo teste sorológico imunoenzimático (ELISA).

Utiliza-se ensaio de imunofluorescência para detectar os níveis de expressão de caspase-3 e NGF dos ratos em cada grupo. As expressões de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e proteínas de caspase-3 e NGF de ratos nos grupos sham, LM e GM1 são detectadas por meio de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) e ensaio de Western blotting. Os escores BBB e os resultados do teste de placa oblíqua nos grupos sham, LM e GM1 em 1 dia, 7 dias e 14 dias mostram que esses indicadores diminuem em cada grupo significativamente 1 dia após a LM e apresentam diferentes graus de recuperação 7 dias e 14 dias após a lesão. Os resultados da detecção por ELISA revelam que o grupo LM apresenta aumento no conteúdo de MDA e atividade de SOD claramente diminuída em comparação com o grupo sham; ao mesmo tempo, o conteúdo de MDA no grupo GM1 é nitidamente menor do que no grupo LM, enquanto a atividade de SOD é evidentemente aumentada no grupo GM1 em comparação com o grupo LM. De acordo com o ensaio de imunofluorescência, a expressão de caspase-3 é significativamente aumentada e a expressão de NGF é distintamente diminuída no grupo LM. No entanto, esse fenômeno é significativamente revertido pelo GM1. O RT-PCR e o ensaio de Western blotting comprovam, separadamente, que as expressões de mRNA e proteína da caspase-3 aumentam no grupo com LM e diminuem claramente após a administração de GM1; as expressões de mRNA e proteína do NGF são significativamente reduzidas no grupo com LM e nitidamente elevadas após a administração de GM1. A análise de variância (ANOVA) mostra que há diferenças estatisticamente significativas nas expressões de caspase-3 e NGF entre o grupo sham, o grupo LM e o grupo GM1 ($p < 0,05$). O GM1 tem

um efeito evidente nas expressões de caspase-3 e NGF em ratos com LM aguda, sendo capaz de regular negativamente a expressão de caspase-3 e regular positivamente a expressão de NGF, de modo a atingir seu efeito terapêutico na LM.

Em 2019, Magistretti et al.⁽⁹⁶⁾ realizam uma revisão sistemática em 14 ensaios clínicos randomizados, com um total de mais de 2.000 pacientes, e não revelam diferença na sobrevida, mas resultados neurológicos consistentemente superiores em relação ao placebo. Demonstra-se que o GM1 atenua lesões neuronais isquêmicas em pacientes com diabetes por meio da supressão da fosforilação de ERK1/2 e da redução do estresse no retículo endoplasmático. Há evidências de nível I, em cinco dos estudos clínicos randomizados, de uma recuperação significativamente mais rápida com GM1 em comparação com placebo em pacientes com LM aguda e crônica, distúrbio de consciência após hemorragia subaracnoide ou lesões craniocerebrais devido a traumatismo craniano fechado. Na doença de Parkinson, dois estudos clínicos randomizados fornecem evidências de que o GM1 é superior ao placebo na melhora dos sintomas motores e, a longo prazo, resulta em uma progressão dos sintomas mais lenta do que o esperado, sugerindo potencial modificador da doença. Na doença de Alzheimer, o papel dos gangliosídeos é controverso, com alguns estudos sugerindo um papel de "semeadura" para o GM1 na polimerização da β -amiloide em formas tóxicas, e outros, mais recentes, sugerindo um papel bastante protetor *in vivo*. Na doença de Huntington (DH), nenhum ensaio clínico havia sido realizado até o momento. No entanto, baixos níveis de GM1 observados em células de DH demonstram aumentar a suscetibilidade celular à apoptose. Consequentemente, o tratamento com GM1 aumenta a sobrevivência das células de DH *in vitro* e melhora consistentemente os fenótipos patológicos em vários modelos murinos de DH, com efeitos observados em nível molecular, celular e comportamental. Dado que em nenhum dos ensaios clínicos que utilizaram GM1 ocorreram problemas de segurança clinicamente relevantes até o momento, os dados atuais apoiam a expansão da pesquisa clínica com GM1, particularmente para condições com alta necessidade médica não atendida.

Em 2021, Bourguignon et al.⁽⁹⁷⁾ realizam um estudo cujo objetivo é rastrear e quantificar o curso natural dos marcadores sorológicos ao longo do primeiro ano após a LM. Para tanto, dados sobre marcadores sorológicos, dados demográficos e características da lesão são extraídos de prontuários médicos de um ensaio clínico (Sygen) e de um estudo de coorte observacional em andamento (estudo Murnau). Os desfechos primários são concentração/níveis/quantidade de marcadores sorológicos comumente coletados em múltiplos momentos. Técnicas de ANOVA bidirecional e regressão de efeitos mistos são utilizadas para considerar os dados longitudinais e

ajustar potenciais fatores de confusão. As trajetórias dos marcadores sorológicos contidos em ambas as fontes de dados são comparadas usando a inclinação da progressão. Os resultados mostram que, no início do estudo (≤ 2 semanas após a lesão), a maioria dos marcadores sorológicos estava em níveis patológicos, mas retorna aos valores normais ao longo de seis a 12 meses após a lesão. Os níveis basais e as trajetórias longitudinais são dependentes da gravidade da lesão. A comparação dos dois bancos de dados revela algumas diferenças nos marcadores sorológicos, provavelmente atribuíveis a diferenças no delineamento do estudo, tamanho da amostra e padrão de tratamento. Conclui-se que, devido às perturbações fisiológicas induzidas pelo trauma, os marcadores sorológicos sofrem alterações marcantes ao longo da recuperação, a partir de níveis patológicos iniciais que se normalizam em um ano. Os resultados desse estudo são importantes, pois fornecem uma referência para a tomada de decisões clínicas e ensaios clínicos prospectivos.

Em 2022, Torelli et al.⁽¹¹⁾ realizam estudo para avaliar os efeitos funcionais e imuno-histoquímicos do GM1 e da EPO após LM experimental. Trinta e dois camundongos machos são submetidos à LM experimental utilizando o dispositivo NYU Impactor e divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: grupo GM1, recebendo GM1 padrão (30 mg/kg); grupo EPO, recebendo EPO (1000 UI/kg); grupo combinado, recebendo ambos os fármacos; e grupo controle, recebendo solução salina (0,9%). Os animais são avaliados de acordo com a Escala Basso Mouse (BMS) e o Escore de Função dos Membros Posteriores (MFS). Após a eutanásia, a imuno-histoquímica do tecido medular dos camundongos é analisada. Todos os animais recebem tratamento intraperitoneal. O grupo GM1 apresenta maiores escores de BMS e MFS ao final do experimento quando comparado a todos os outros grupos. O grupo combinado apresenta maiores escores de BMS e MFS do que os grupos EPO e controle. O grupo EPO apresenta maiores escores de BMS e MFS do que o grupo controle.

A análise imuno-histoquímica do tecido mostra uma diferença significativa entre os grupos. Há um aumento significativo nos axônios mielinizados e no comprimento do axônio mielinizado no grupo EPO quando comparado aos outros grupos de intervenção ($p < 0,01$). Os autores concluem que a EPO e o GM1 têm efeitos terapêuticos na regeneração axonal em camundongos submetidos à LM experimental, e que a administração isolada de GM1 apresenta as maiores pontuações nas escalas de BMS e MFS.

Em 2023, considerando a controvérsia que envolve o uso de MPS para tratar LM traumática aguda, Geiler et al.⁽⁹⁸⁾ apresentam estudo que demonstra a construção de um novo conjunto de dados de LM espinhal aguda agrupados em nível de caso apto a satisfazer os critérios

contemporâneos e capaz de esclarecer o efeito da MPS à luz de suas diretrizes. O conjunto de dados desenvolvido serve como substituto para um estudo contemporâneo sobre MPS e constata que a administração de MPS não aumenta a melhora na pontuação motora da ASIA nas extremidades inferiores em 26 semanas. A análise secundária dos níveis neurológicos cervicais motores e sensoriais conforme escore ASIA em pacientes com LM anterior cervical em 26 semanas também não encontra efeito da MPS.

Em 2023, Jorge et al.⁽²¹⁾ decidem avaliar o melhor momento e a viabilidade da aplicação intratecal de GM1 após contusão medular em ratos Wistar como modelo experimental. Quarenta ratos Wistar são submetidos à LM por contusão após laminectomia. Os animais são randomizados e divididos em quatro grupos: grupo 1 – aplicação intratecal de GM1 24 horas após a contusão; grupo 2 – aplicação intratecal de GM1 48 horas após a contusão; grupo 3 – aplicação intratecal de GM1 72 horas após a contusão; e grupo 4 – simulado, com laminectomia e aplicação intratecal de 0,5 mL de solução salina a 0,9%, sem contusão. A recuperação da função locomotora é avaliada em sete momentos distintos pelo teste BBB, também sendo avaliada pela escada horizontal, com critérios de avaliação comportamental sensório-motora no pré e pós-operatório. Esse estudo experimental demonstra melhores escores funcionais no grupo submetido à aplicação do GM1, com resultados estatisticamente significativos, apresentando aumento médio quando avaliado em testes motores conhecidos como a escada horizontal e a BBB em todos os momentos de avaliação ($p < 0,05$), especialmente no grupo 2 (48 horas após a LM). Além disso, são observados menos erros e escorregões na escada horizontal, e muitos pontos são alcançados na análise da escala BBB. O estudo demonstra que a aplicação intratecal do GM1 após contusão medular em ratos Wistar é viável. A aplicação 48 horas após a lesão apresenta os melhores resultados funcionais.

Em 2024, Sherrod et al.⁽⁹⁹⁾ realizam uma revisão sistemática e analisam a literatura existente e as diretrizes clínicas para terapia farmacológica investigada para o manejo da LM aguda, incluindo corticosteroides, GM1 (Sygen), riluzol, antagonistas opioides, Cethrin, minociclina e vasopressores para aumento da pressão arterial média. Terapias para o manejo dos efeitos secundários da LM, como bradicardia, são discutidas. Ensaio clínico de então para farmacoterapia e transplante celular após LM aguda também são revisados. Apesar da escassez de evidências atuais de farmacoterapia clinicamente benéfica pós-LM, espera-se que pesquisas futuras elucidem agentes terapêuticos promissores para melhorar a função neurológica.

Em 2025, Ren et al.⁽¹⁰⁰⁾ realizam um estudo para determinar a eficácia clínica do GM1 combinado com MPS no tratamento da LM. Em um estudo observacional realizado de janeiro

de 2018 a junho de 2021 no Departamento de Ortopedia do Hospital Central Baoding, na China, com um total de 80 pacientes com LM, os pacientes são divididos em grupos controle e observação, de acordo com os métodos de tratamento. O grupo controle recebe tratamento com MPS e o grupo observação recebe MPS combinada com GM1. A taxa efetiva de tratamento, o tempo de recuperação da força muscular normal, a capacidade de caminhar no solo e a permanência hospitalar são comparados. São registradas as alterações na pontuação ASIA, de atividades de vida diária, fatores inflamatórios séricos, níveis de fatores de estresse oxidativo e reações adversas. A taxa efetiva de eficácia clínica do grupo de observação é de 92,50%, superando a do grupo controle, de 75,00% ($\chi^2 = 4,501$, $p = 0,034$). O grupo de observação apresenta menor tempo de recuperação para força muscular, de caminhada e de internação hospitalar em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Após o tratamento, os escores de atividades de vida diária de ambos os grupos são maiores do que antes do tratamento, e o grau de aumento no grupo de observação é maior do que no grupo controle ($p < 0,05$). Os níveis séricos de fator de necrose tumoral- α e interleucina-8 para todos os pacientes são significativamente reduzidos, com o grupo de observação apresentando uma diminuição mais significativa ($p < 0,05$). Há um aumento notável nos níveis de glutathione peroxidase e SOD em ambos os grupos, enquanto os níveis de malondialdeído diminuem significativamente. Os níveis de glutathione peroxidase, SOD e malondialdeído são significativamente maiores no grupo de observação ($p < 0,05$). A combinação de MPS e tratamento com GM1 para LM pode reduzir significativamente a resposta inflamatória e melhorar a eficácia clínica.

Ainda em 2025, Migliorini et al.⁽¹⁰¹⁾ realizam revisão sistemática que avalia criticamente a eficácia e a segurança das modalidades de tratamento atuais para fase aguda da LM secundária, identificando lacunas no conhecimento e fornecendo insights para futuras direções de pesquisa. Em dezembro de 2024, as bases de dados PubMed, Web of Science, Google Acadêmico e Embase são acessadas sem restrições de tempo. Todos os estudos clínicos que investigam o tratamento farmacológico da LM secundária são acessados. Dados de 3.017 pacientes (385 mulheres) são coletados. A duração média do acompanhamento é de $6 \pm 3,4$ meses e a idade média dos pacientes é de $43,3 \pm 10,3$ anos. A EPO melhora a função motora, reduz o comprometimento na LM secundária, modula a função antioxidante e a neurogênese e minimiza a apoptose e a inflamação. Embora comumente administrada, a MPS apresenta eficácia incerta. O inibidor de rho-GTPases VX-210 e o levetiracetam não demonstram eficácia no tratamento. O GM1 e o riluzol estão associados a desfechos neurológicos favoráveis. O fator estimulador de

colônias de granulócitos e o fator de crescimento de hepatócitos oferecem melhores escores motores com menos efeitos colaterais.

3.2 Cola de fibrina

A CF foi utilizada pela primeira vez em 1909, por Bergel⁽¹⁰²⁾ (apud. Matras, 1985)⁽¹⁰³⁾, em forma de pó de fibrina para hemostasia de ferimentos. Young e Medawar (1940)⁽¹⁰⁴⁾ realizam anastomoses de nervos periféricos com fibrinogênio em caráter experimental. Entretanto, sua aplicação era limitada devido à instabilidade da fibrina. Na década de 1970, o avanço nas técnicas de isolamento dos fatores de coagulação permite o aumento da concentração do fibrinogênio e a adição do fator XIII, tornando a CF mais resistente e estável⁽¹⁰⁵⁾. Desde então, a CF passa a ser empregada em estudos experimentais e clínicos com as mais variadas aplicações.

A CF mimetiza as etapas finais da cascata de coagulação. Na presença do cloreto de cálcio, o fibrinogênio e o fator XIII são ativados pela trombina. O fibrinogênio é convertido em monômeros de fibrina que se polimerizam, formando um coágulo de fibrina. A CF é biocompatível e biodegradável, além de não provocar necrose tecidual ou reação do tipo corpo estranho.

Em 2020, Yu et al.⁽¹⁰⁶⁾ realiza uma revisão sobre como o desenvolvimento contínuo da engenharia de tecidos neurais tem atraído cada vez mais atenção para a aplicação de hidrogéis de fibrina no reparo de lesões traumáticas da medula espinhal. Além de sua excelente biocompatibilidade, flexibilidade e plasticidade, a fibrina, um componente da matriz extracelular, pode ser equipada com células, proteínas da matriz extracelular e vários fatores de crescimento para promover o reparo de danos. Da perspectiva de melhoria adicional da função celular antes e depois da administração de células-tronco, citocinas e fármacos, a revisão também avaliou a aplicação de hidrogéis de fibrina como carreador para a terapia de reparo e regeneração nervosa, e conclui que quando os hidrogéis de fibrina transportam células, citocinas ou fármacos no reparo de LMs, o efeito terapêutico depende da função das substâncias transportadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de execução

Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LETRAN-IOT/FMUSP) (Figura 1).

Figura 1 – Laboratório de estudos.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.2 Ética

O protocolo do presente estudo foi submetido à avaliação e consequente aprovação pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP) (Anexo A).

4.3 Seleção e alocação dos animais

Foram selecionados 50 ratos machos da raça Wistar oriundos do Centro de Bioterismo da FMUSP, com idade média de 12 semanas e peso entre 230 g e 360 g, todos de um único fornecedor. Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas com controle de temperatura, filtragem de ar e controle de umidade, individualmente (para evitar dominância entre machos, o que pode causar lesões nos animais), com fornecimento de água e ração *ad libitum* (Figura 2).

Figura 2 – Foto da raça Wistar escolhida para o estudo.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Foram adotados os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão

- Ratos da raça Wistar;
- Machos adultos jovens;
- Peso entre 230 g e 360 g, inclusive;

- Condição geral boa; e
- Motricidade inicial preservada.

- Critérios de exclusão

- Óbito após lesão;
- Infecção persistente após 10 dias de tratamento com antibioticoterapia;
- Anomalias observadas macroscopicamente na região medular;
- Perda maior que 10% do peso corporal após a lesão; e
- Ratos com escore BBB > 2 após contusão medular efetiva.

Após indução da LM, aplicou-se 0,3 mL de CF (Tissucol-Baxter Hospitalar Ltda, São Paulo, SP, Brasil) diretamente na região da lesão, adicionando-se, posteriormente, o GM1 (Sygen 100 mg/5 mL, TRB Pharma Industria Química e Farmacêutica Ltda, Campinas, SP, Brasil) na dose específica de cada grupo por meio de homogeneização com duas pinças microcirúrgicas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, com 10 animais cada, e submetidos à LM contusa:

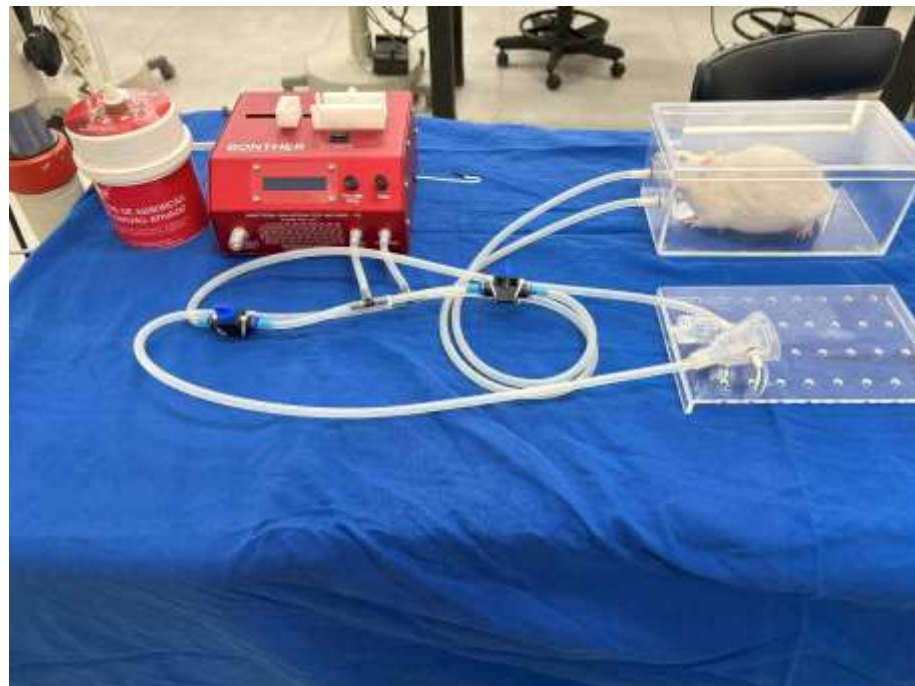
- Grupo 1: Imediatamente após a contusão, foi aplicada CF no foco da contusão;
- Grupo 2: Imediatamente após a contusão, foi aplicada CF associada ao GM1 na dose de 30 mg/kg, em dose única;
- Grupo 3: Imediatamente após a contusão, foi aplicada CF associada ao GM1 na dose de 40 mg/kg, em dose única;
- Grupo 4: Imediatamente após a contusão, foi aplicada CF associada ao GM1 na dose de 50 mg/kg, em dose única; e
- Grupo 5: Foi realizada somente a laminectomia.

4.4 Protocolo de anestesia

Para a realização da LM e aplicação de materiais poliméricos, os animais foram submetidos à injeção subcutânea de cloridrato de tramadol na dose de 50 mg/kg 20 minutos antes do início da cirurgia.

Com o uso de uma caixa de acrílico, os animais foram induzidos à anestesia com isoflurano (1.5 V%–2.0 V%) 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⁽¹⁰⁷⁾ para, então, realizarem-se a tricotomia e limpeza da região dorsal que sofrerá incisão por material cirúrgico (Figura 3).

Figura 3 – Foto do protocolo de anestesia.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

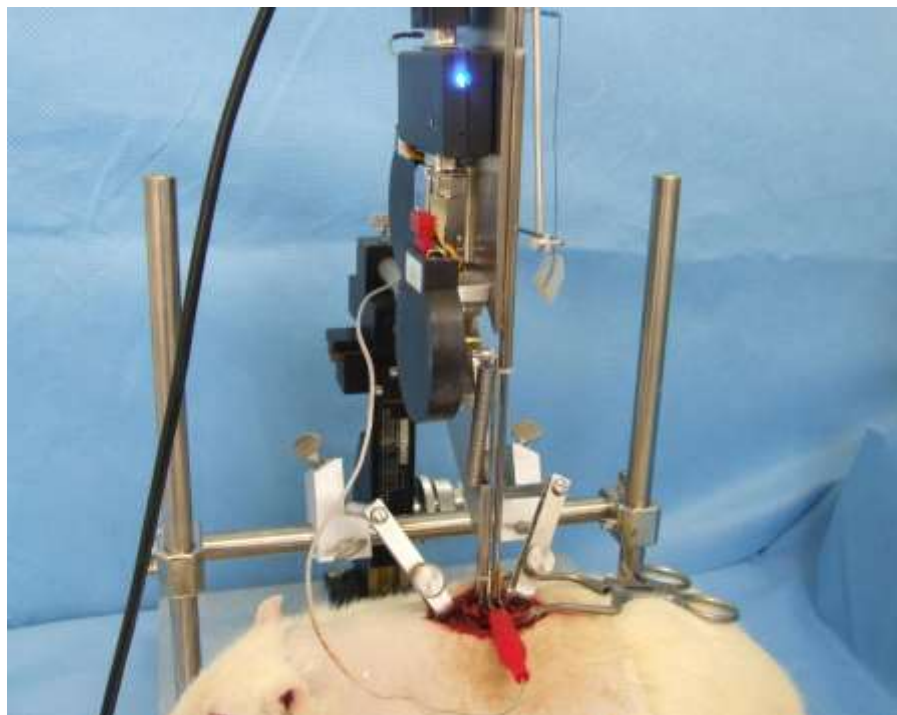
4.5 Lesão medular

As LMs foram feitas utilizando-se o NYU Impactor⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾, com queda de peso de 10 g de uma altura de 12,5 mm (lesão leve) em todos os ratos. Os modelos experimentais até o

presente momento propiciavam lesões de forma padronizada, por isso optou-se pelo modelo do NYU Impactor. Além disso, com a LM leve, a lesão é efetiva e o índice de mortalidade pós-operatório é mínimo. Para tanto, foi feita uma laminectomia expondo a medula espinhal de forma padronizada. Na linha média dorsal, realizou-se uma incisão na pele para se expor T5–T10. Os músculos nos processos espinhosos de T7–T9 foram afastados. Em caso de hemorragia, foi usado um coagulador bipolar. Remove-se a lâmina de T8 com seu respectivo processo espinhoso associado à flavectomia para exposição medular. A abertura deve acomodar a cabeça da haste de impacto do dispositivo de lesão, portanto, deve possuir mais do que 2 mm⁽¹¹⁰⁾.

Após a contusão, o sítio da lesão foi inspecionado e lavado com solução fisiológica de cloreto de sódio a temperatura ambiente. Foi realizada a aproximação dos planos teciduais musculares e fasciais e da pele com sutura de ponto simples com fio nylon monofilamentado 2.0⁽¹⁰⁸⁾ (Figura 4).

Figura 4 – Foto modelo NYU Impactor e o rato lesado.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.6 Protocolo pós-operatório

Nos cuidados pós-operatórios, todos os ratos receberam antibioticoprofilaxia por sete dias (cefazolina 2 mg/100 g)⁽⁹⁰⁾, meloxicam 5 mg/kg via subcutânea a cada 24 horas e cloridrato de tramadol (30 mg/kg) por via subcutânea a cada 12 horas durante cinco dias. Diariamente, foram realizadas manobras de extração de urina dos animais e avaliação do grau de desidratação pelo turgor da pele, avaliando-se a necessidade de antibioticoterapia (levofloxacina 2,5 mg/kg por 10 dias) segundo a presença de sangue na urina. Se, após a terapia, o animal continuasse a apresentar sangue na urina, a infecção seria considerada intratável e o animal seria submetido à eutanásia, pelas más condições do animal e também com o propósito de se evitar a contaminação dos outros ratos^(107,108).

A pesquisa seria interrompida imediatamente caso ocorressem mortes em sequência e inexplicáveis durante o ato anestésico, cirúrgico ou de manutenção. O encerramento seria feito caso não fossem solucionados os problemas que causassem a interrupção.

4.7 Avaliação motora

A avaliação da função motora dos animais após a LM e a quantificação da recuperação funcional no decorrer do tempo foram realizadas por meio da escala BBB⁽⁷⁵⁾, sempre no mesmo horário e local, sem identificação entre os grupos (teste cego). Os animais foram, então, classificados por meio de uma pontuação com variação de 0 a 21, sendo 0 os animais com paraplegia total do membro posterior, e 21, animais com atividade locomotora normal (Figura 5).

Figura 5 – Escala BBB de avaliação locomotora.

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

Movimento do Membro Posterior						Posição do Tronco		Abdome	Movimento da Pata Dianteira				Pisada		Cauda				
Quadril		Joelho		Tornozelo		Lado	Apoio		Balanço	Apoio da Pata		Dorsal	Plantar	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata			
E	D	E	D	E	D					Sem Suporte de Peso	Com Suporte de Peso					E	D	E	D
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	E	D	E	D	0	0	0	0	Para Cima (elevada)		
S	S	S	S	S	S	Central	E		D	E	D	E	D	0	0	0		0	Para Baixo (abaixada)
E	E	E	E	E	E					E	D	E	D	F	F	F		F	

Comentários: _____

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

Fonte: Adaptado de Basso et al., 1995⁽⁷⁵⁾

Escala de classificação BBB de 21 pontos:

- (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 do tempo ou durante todo o tempo;

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

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

Escala de avaliação locomotora desenvolvida por Basso, Beattie e Bresnahan (1995). Utilizada para a avaliação locomotora de ratos que sofreram TRM, graduada de 0 a 21 pontos.

4.7.1 Plano horizontal

A avaliação comportamental sensório-motora foi realizada pelo plano horizontal. Uma escada horizontal com 100 cm de comprimento, 35 cm de largura, suspensa a 46 cm do chão e com espaço fixo de 1,5 cm entre cada filete de ferro foi utilizada para avaliar a função proprioceptiva dos animais⁽¹¹¹⁻¹¹⁵⁾. Os animais foram primeiramente treinados a andar na escada por dois dias antes da cirurgia, sendo necessário atravessá-la cinco vezes. Para estimular os animais a andarem na pista formada, foram colocadas duas caixas escuras em ambas as extremidades. Nas avaliações, os animais precisavam andar três vezes voluntariamente ao longo da escada. Foi conduzida a contagem de número de passos total, de acertos, de escorregões e de erros. Os acertos consistiram em posicionamentos corretos das patas nos filetes de ferro. Os escorregões consistiram no posicionamento da pata no filete de ferro, seguido da queda da mesma entre os filetes. Por fim, dois tipos de erros foram considerados separadamente, sendo eles: o arrastar dos membros posteriores ao longo da escada horizontal e o posicionamento da pata entre os filetes de ferro^(115,116). Os valores das três passagens pela escada horizontal foram obtidos para todos os tipos de respostas (acertos e erros) (Figura 6).

Figura 6 – Foto plano horizontal.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.8 Protocolo de eutanásia

Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de anestesia e, após confirmação do plano anestésico, foram submetidos à perfusão transcardíaca com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M, pH 7,3 e salina 0,9%.

4.9 Descarte das carcaças

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

4.10 Avaliação histológica

Após a realização da avaliação motora final, os animais foram submetidos ao protocolo de eutanásia.

A medula espinhal foi cuidadosamente extraída de todos os animais imediatamente após a perfusão e morte indolor induzida. Estas estruturas permaneceram no mesmo fixador por 24 horas. A medula foi dissecada e ressecada a partir do nível intervertebral C3 ao nível T10 e, posteriormente, suas respectivas identificações topográficas foram linearmente aderidas em papel cartão, principalmente onde se observaram os achados macroscópicos de contusão medular, locais que serão identificados como área “B”, sendo também designadas as áreas cefálicas “A” e caudais à lesão “C”. Cada segmento da medula foi identificado e cortado longitudinalmente para avaliação histológica.

Realizou-se uma avaliação visual macroscópica da medula no local da contusão para se verificar qualquer anomalia (critério de exclusão).

Realizou-se incisão ventral, com toracotomia e laparotomia associadas. Os pulmões foram inspecionados para a identificação de possíveis alterações. No abdômen, inspecionou-se a bexiga para a identificação de bexiga neurogênica flácida (com aumento importante do volume) ou de alterações sugestivas de infecção (hiperemia e hematúria). Os dados assim coletados foram listados para posterior análise estatística de complicações associadas.

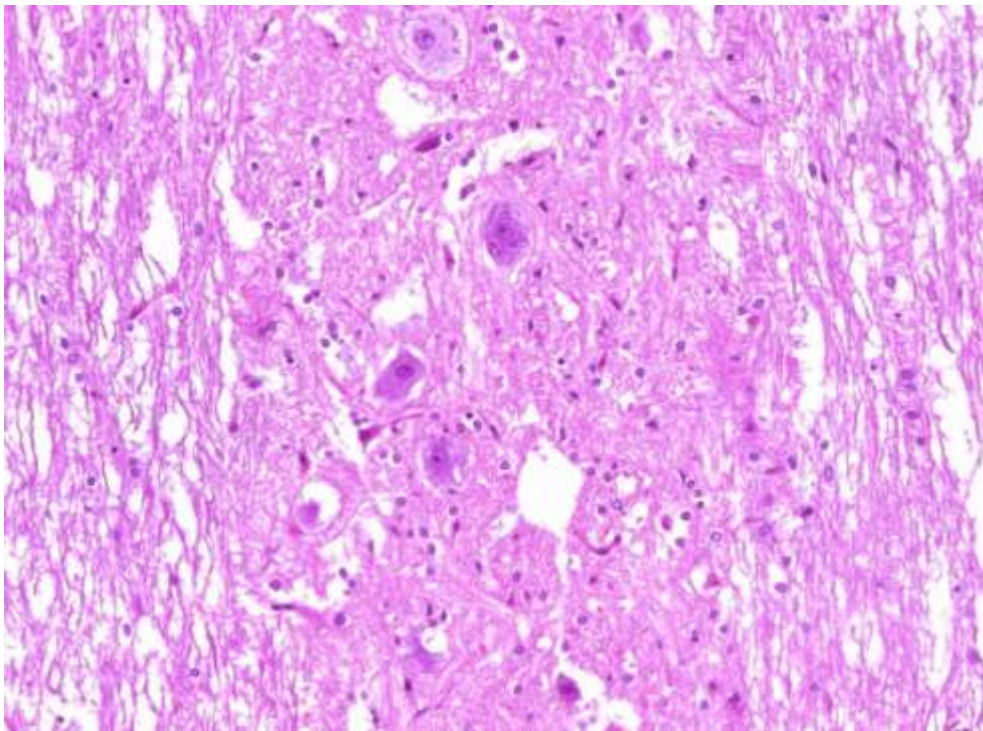
A seguir, a medula retirada foi encaminhada individualmente em frasco, devidamente identificado, com solução de formaldeído (10%) para o Serviço de Anatomia Patológica do IOT/HCFMUSP.

O estudo anatomopatológico consistiu em uma análise microscópica (óptica) de lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE) (Figura 7) e lâminas silanizadas para realização da imuno-histoquímica, analisando de forma qualitativa a presença de necrose, hemorragia, infiltração celular e degeneração cística, e de forma quantitativa, a presença dos marcadores Olig2 (fator de transcrição de oligodendrócitos) e GFAP (proteína ácida fibrilar glial).

O GFAP significa a presença da proteína ácida fibrilar glial. É expressa por tipos celulares do sistema nervoso central, incluindo astrócitos e células endoteliais.

A expressão de Olig2 é, principalmente, restrita ao sistema nervoso central, onde atua como um fator neurogênico em diferentes estágios de desenvolvimento. O Olig2 é bem conhecido por determinar a diferenciação de neurônios motores e oligodendrócitos.

Figura 7 – Corte histológico com coloração HE com aumento 20x.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.10.1 Avaliação histológica qualitativa

Realizaram-se cortes histológicos no plano axial, no segmento medular, com intervalos de 2 mm, representando toda a área lesada, em uma extensão de 1 cm a partir do centro da lesão. Este material foi processado e desidratado em bateria de álcoois, depois sofreu processo de diafanização em xilol e, posteriormente, foi incluído em parafina. Uma vez contido no bloco de parafina, foram feitos cortes histológicos de 5 µm em micrótomo rotativo. Estes cortes foram realizados longitudinalmente em todo segmento medular.

O material foi, então, fixado em lâminas de vidro e corado pela técnica de HE.

O Serviço de Anatomia Patológica avaliou e graduou (ausente: 0, discreto: 1, moderado:

2 e acentuado: 3) todos os fragmentos quanto a:

- Necrose;
- Hemorragia;
- Hiperemia;
- Degeneração da substância nervosa (degeneração cística); e
- Infiltrado celular.

Os patologistas não foram informados quanto ao grupo de origem a que pertenciam as medulas dos ratos (avaliação cega).

4.10.2 Avaliação histológica quantitativa

Para a caracterização da resposta glial após LM, foi realizado análise histológica quantitativa por imuno-histoquímica utilizando os marcadores Olig2 e GFAP. Foram selecionados aleatoriamente três animais de cada grupo, com exceção do grupo 5, totalizando 12 animais. Fragmentos da medula espinhal foram coletados após protocolo de eutanásia, fixados em paraformaldeído a 4% em (PBS) (pH 7,4) por 24 horas a 4 °C, desidratados em séries crescentes de etanol e incluídos em parafina histológica. Cortes transversais de 5 µm de espessura foram obtidos com micrótomo rotativo (Leica RM2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha) e montados em lâminas revestidas com silano.

Os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em álcoois em ordem decrescente (100% a 70%) e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) em banho-maria a 95 °C, por 20 minutos. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos, seguido por bloqueio de ligações inespecíficas com solução de albumina sérica bovina (BSA 5%) por 1 hora em temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários:

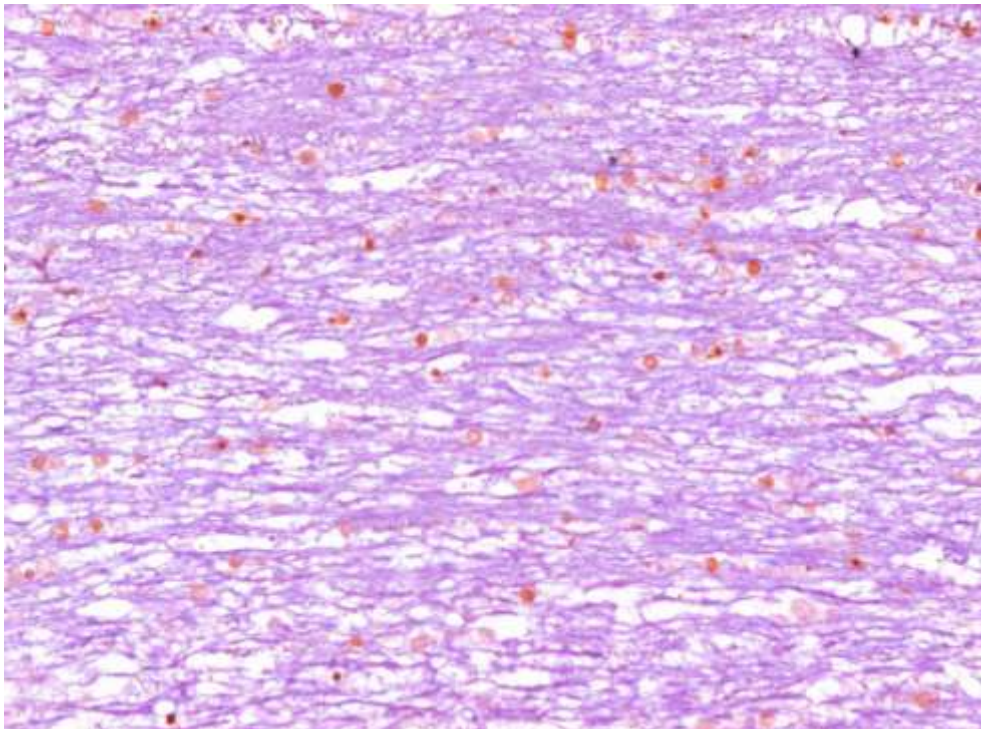
- Anti-Olig2 (Rabbit monoclonal, código ab109186, Abcam, Cambridge, RU; diluição 1:200); e

- Anti-GFAP (Rabbit polyclonal, código Z0334, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA; diluição 1:500).

A incubação primária foi realizada por 18 horas, a 4 °C, em câmara úmida. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 594 (goat anti-rabbit IgG, código A-11012, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA; diluição 1:1000) por 1 hora em temperatura ambiente, no escuro. A marcação nuclear foi feita com DAPI (1 µg/mL) por 5 minutos.

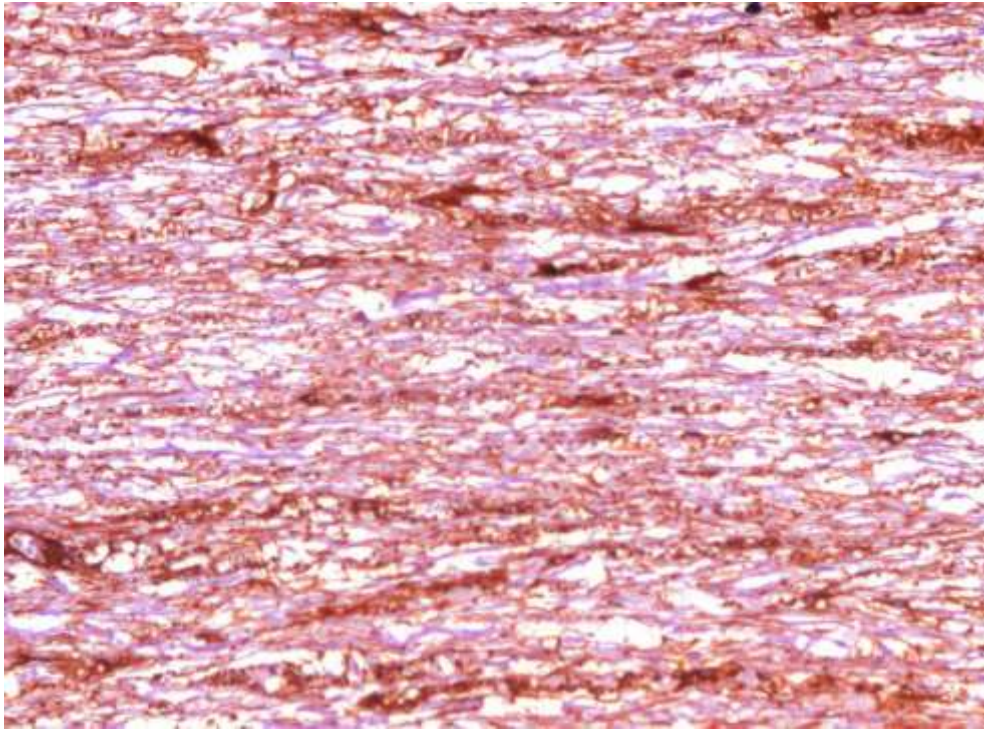
A análise foi realizada com microscópio de fluorescência Opticam O500R (Opticam Mycroscopy, São Paulo, SP, Brasil) e software LAS X (Leica Microsystems, Suécia). Para a quantificação celular, foram capturados três campos por corte em três seções por animal, nas regiões próximas ao epicentro da lesão (± 2 mm), sob aumento de 400x. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (versão 1.53c) com o plugin “Cell Counter” para contagem celular. Os resultados foram expressos como densidade celular (células/mm²) (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Imagem de medula com o marcado imuno-histoquímico Olig2.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 9 – Imagem de medula com o marcador imuno-histoquímico GFAP.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da avaliação motora BBB

As tabelas demonstram os valores da avaliação motora BBB de todos os grupos dois dias após a LM e nas seis semanas consecutivas, além da variação de peso inicial e após seis semanas de avaliação. (Anexo B)

5.2 Resultados do plano horizontal

As tabelas demonstram o número de passos, acertos, escorregões e erros de todos os grupos no momento pré-operatório e da terceira a sexta semana de avaliação. (Anexo C)

5.3 Resultados da histologia e bexiga neurogênica

As tabelas demonstram os valores obtidos pelas avaliações histológicas qualitativas e quantitativas de acordo com a metodologia proposta bem como o tempo de bexiga neurogênica dos animais. (Anexos D-F)

5.4 Análise estatística de resultados

Os parâmetros avaliados foram descritos segundo grupos e momentos de avaliação com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana e quartis) e comparados com uso de equações de estimação generalizadas com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR⁽¹¹⁷⁾. As variações de peso dos animais, os parâmetros histológicos, a imuno-histoquímica e o tempo de bexiga neurogênica foram descritos segundo grupos e comparados com uso de ANOVA e testes Kruskal-Wallis, respectivamente, sendo a ANOVA seguida de comparações múltiplas de Bonferroni e os testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas de Dunn para identificar entre quais grupos ocorrem as diferenças.

As análises do BBB e plano horizontal foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais grupos ou momentos ocorreram as diferenças⁽¹¹⁸⁾.

Para a realização das análises, foi utilizado o software IBM-SPSS para Windows versão 22.0 (IBM Coportation, Nova Iorque, EUA), e para tabulação dos dados foi utilizado o software Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Washington, EUA). Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

A Tabela 1 mostra que houve diferença média estatisticamente significativa na variação do peso dos animais entre os grupos ($p = 0,003$).

Tabela 1 – Descrição do peso dos animais antes e após os tratamentos e variações de peso e resultado do teste comparativo.

Grupo	Peso Inicial	Peso Final	Alteração de peso (%)
Cola de Fibrina (N = 10)			
média ± DP	298 ± 42,9	320 ± 38	7,1 ± 4
mediana (p25; p75)	309,5 (259,8; 335)	325,5 (285; 356,8)	7 (3,2; 11,7)
Cola + GM1 30 mg/kg (N = 10)			
média ± DP	304,6 ± 18,2	329,7 ± 18,1	7,6 ± 4
mediana (p25; p75)	307 (295,5; 315)	330,5 (317; 345)	6,6 (4,8; 9,3)
Cola + GM1 40 mg/kg (N = 10)			
média ± DP	294,7 ± 25,7	316,8 ± 27	7 ± 1,3
mediana (p25; p75)	295 (274,5; 322,3)	314,5 (293,8; 342,5)	7,1 (5,7; 8)
Cola + GM1 50 mg/kg (N = 10)			
média ± DP	293,2 ± 24,4	322,3 ± 22,6	9 ± 3,7
mediana (p25; p75)	293 (273,5; 309)	323 (311,5; 337,3)	7,9 (6,3; 11,6)
Sham (N = 10)			
média ± DP	303,3 ± 11,5	346,2 ± 15,9	12,3 ± 2,3
mediana (p25; p75)	302,5 (293,3; 312,5)	349,5 (330; 359,8)	11,8 (11; 14,2)
P	0.003		

ANOVA

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Pela Tabela 2, tem-se que apenas o grupo sham apresentou maior aumento de peso que quase todos os demais grupos ($p < 0,05$), exceto o grupo cola + GM1 50 mg/kg ($p = 0,278$).

Tabela 2 – Resultado das comparações múltiplas da variação do peso entre os grupos.

Comparação		Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Cola de Fibrina -	Cola + GM1 30 mg/kg	-0.46	1.45	>0,999	-4.75	3.82
Cola de Fibrina -	Cola + GM1 40 mg/kg	0.11	1.45	>0,999	-4.17	4.40
Cola de Fibrina -	Cola + GM1 50 mg/kg	-1.94	1.45	>0,999	-6.22	2.35
Cola de Fibrina -	Sham	-5.24	1.45	0.008	-9.53	-0.96
Cola + GM1 30 mg/kg -	Cola + GM1 40 mg/kg	0.58	1.45	>0,999	-3.71	4.86
Cola + GM1 30 mg/kg -	Cola + GM1 50 mg/kg	-1.47	1.45	>0,999	-5.76	2.81
Cola + GM1 30 mg/kg -	Sham	-4.78	1.45	0.020	-9.06	-0.49
Cola + GM1 40 mg/kg -	Cola + GM1 50 mg/kg	-2.05	1.45	>0,999	-6.34	2.23
Cola + GM1 40 mg/kg -	Sham	-5.35	1.45	0.006	-9.64	-1.07
Cola + GM1 50 mg/kg -	Sham	-3.30	1.45	0.278	-7.59	0.98

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 3 mostra que houve diferença no grau de necrose e hiperemia entre os grupos analisados ($p = 0,020$ e $p = 0,025$, respectivamente), e que o tempo de presença de bexiga neurogênica diferiu estatisticamente entre os grupos com lesão ($p < 0,001$).

Tabela 3 – Descrição dos parâmetros histológicos e do tempo de bexiga neurogênica segundo grupos e resultado da comparação.

Variável	Grupo					p
	Cola de Fibrina (N = 10)	Cola + GM1 30 mg/kg (N = 10)	Cola + GM1 40 mg/kg (N = 10)	Cola + GM1 50 mg/kg (N = 10)	Sham (N = 10)	
Necrose, n (%)						0.020
Ausente	0 (0)	0 (0)	1 (10)	4 (40)	10 (100)	
Discreto	8 (80)	10 (100)	3 (30)	5 (50)	0 (0)	
Moderado	2 (20)	0 (0)	6 (60)	1 (10)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Hemorragia, n (%)						0.181
Ausente	0 (0)	1 (10)	1 (10)	3 (30)	7 (70)	
Discreto	6 (60)	7 (70)	7 (70)	6 (60)	3 (30)	
Moderado	4 (40)	1 (10)	2 (20)	1 (10)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Hiperemia, n (%)						0.025
Ausente	1 (10)	3 (30)	2 (20)	3 (30)	6 (60)	
Discreto	1 (10)	3 (30)	6 (60)	6 (60)	4 (40)	
Moderado	6 (60)	4 (40)	2 (20)	1 (10)	0 (0)	
Intenso	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Degeneração, n (%)						0.363
Ausente	0 (0)	0 (0)	3 (30)	2 (20)	10 (100)	
Discreto	7 (70)	7 (70)	4 (40)	7 (70)	0 (0)	
Moderado	3 (30)	3 (30)	3 (30)	1 (10)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Infiltrado Celular, n (%)						0.199
Ausente	4 (40)	4 (40)	4 (40)	8 (80)	10 (100)	
Discreto	2 (20)	3 (30)	6 (60)	1 (10)	0 (0)	
Moderado	4 (40)	3 (30)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Tempo de bexiga neurogênica (dias)						<0,001
média ± DP	35 ± 3,3	26,6 ± 10,8	19,6 ± 9,2	26,6 ± 3	0 ± 0	
mediana (p25; p75)	35 (35; 35)	31,5 (14; 35)	21 (12,3; 28)	28 (26,3; 28)	0 (0; 0)	

O grupo Sham não participou das análises; Teste Kruskal-Wallis

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 4 mostra que o grau de necrose foi estatisticamente menor no grupo cola + GM1 50 mg/kg do que no grupo cola + GM1 40 mg/kg ($p = 0,009$). O grau de hiperemia foi estatisticamente menor nos grupos cola + GM1 40 mg/kg e cola + GM1 50 mg/kg em relação ao grupo cola de fibrina ($p = 0,025$ e $p = 0,006$, respectivamente), já o tempo de bexiga neurogênica foi estatisticamente maior no grupo cola de fibrina que nos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo cola + GM1 30 mg/kg apresentou estatisticamente maior tempo de bexiga neurogênica que o grupo cola + GM1 40 mg/kg ($p = 0,047$).

Tabela 4 – Resultado das comparações múltiplas dos parâmetros histológicos que diferiram e tempo de bexiga neurogênica entre os grupos.

Variável	Comparação	Valor Z	p
Necrose	Cola de Fibrina - Cola + GM1 30 mg/kg	0.69	0.492
	Cola de Fibrina - Cola + GM1 40 mg/kg	-1.07	0.285
	Cola de Fibrina - Cola + GM1 50 mg/kg	1.56	0.119
	Cola + GM1 30 mg/kg - Cola + GM1 40 mg/kg	-1.76	0.079
	Cola + GM1 30 mg/kg - Cola + GM1 50 mg/kg	0.87	0.383
	Cola + GM1 40 mg/kg - Cola + GM1 50 mg/kg	2.63	0.009
Hiperemia	Cola de Fibrina - Cola + GM1 30 mg/kg	1.92	0.055
	Cola de Fibrina - Cola + GM1 40 mg/kg	2.25	0.025
	Cola de Fibrina - Cola + GM1 50 mg/kg	2.78	0.006
	Cola + GM1 30 mg/kg - Cola + GM1 40 mg/kg	0.32	0.746
	Cola + GM1 30 mg/kg - Cola + GM1 50 mg/kg	0.85	0.394
	Cola + GM1 40 mg/kg - Cola + GM1 50 mg/kg	0.53	0.596
Tempo de bexiga neurogênica (dias)	Cola de Fibrina - Cola + GM1 30 mg/kg	2.09	0.037
	Cola de Fibrina - Cola + GM1 40 mg/kg	4.08	<0,001
	Cola de Fibrina - Cola + GM1 50 mg/kg	3.05	0.002
	Cola + GM1 30 mg/kg - Cola + GM1 40 mg/kg	1.99	0.047
	Cola + GM1 30 mg/kg - Cola + GM1 50 mg/kg	0.96	0.337
	Cola + GM1 40 mg/kg - Cola + GM1 50 mg/kg	-1.03	0.303

Comparações múltiplas de Dunn

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Pela Tabela 5, tem-se que não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de imuno-histoquímica entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Descrição dos parâmetros de imuno-histoquímica segundo grupos e resultado das comparações.

Variável	Grupo				p
	Cola de Fibrina (N = 3)	Cola + GM1 30 mg/kg (N = 3)	Cola + GM1 40 mg/kg (N = 3)	Cola + GM1 50 mg/kg (N = 3)	
Olig2 (%)					0.146
média ± DP	46,7 ± 15,3	62 ± 19,3	66,7 ± 5,8	40 ± 17,3	
mediana (p25; p75)	50 (30; &)	70 (40; &)	70 (60; &)	30 (30; &)	
GFAP (%)					0.984
média ± DP	44 ± 5,3	43,3 ± 11,5	43,3 ± 5,8	50 ± 17,3	
mediana (p25; p75)	42 (40; &)	50 (30; &)	40 (40; &)	40 (40; &)	

& Não há casos suficientes para estimar; Teste Kruskal-Wallis

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 6 mostra que o comportamento médio da escala BBB nos grupos com lesão foi estatisticamente diferente ao longo dos momentos de avaliação ($p_{\text{Interação}} < 0,001$).

Tabela 6 – Descrição da escala BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.

Variável/Grupo	Momento							P Grupo	P Momento	P Interação
	2 dias	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas			
BBB								<0,001	<0,001	<0,001
Cola de Fibrina (N = 10)										
média ± DP	0,3 ± 0,5	0,9 ± 0,7	2 ± 0,7	3 ± 0,9	5,2 ± 1,8	6,6 ± 1,8	7,8 ± 2,1			
mediana (p25; p75)	0 (0; 1)	1 (0; 1,3)	2 (1,8; 2,3)	3 (2; 4)	4,5 (4; 6,3)	7 (4,8; 8,3)	7,5 (6; 9,3)			
Cola + GM1 30 mg/kg (N = 10)										
média ± DP	0,2 ± 0,4	1,1 ± 0,9	3 ± 1,1	4,6 ± 1,4	6 ± 1,7	8,1 ± 1,7	9,9 ± 1,2			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0,3)	1 (0; 2)	3 (2; 4)	4,5 (3,8; 6)	6 (4,8; 8)	8 (8; 8)	10 (9; 11)			
Cola + GM1 40 mg/kg (N = 10)										
média ± DP	0,4 ± 0,7	0,4 ± 0,5	3,3 ± 0,9	5,8 ± 1,5	7,6 ± 1,4	8,7 ± 1,2	11,7 ± 1,4			
mediana (p25; p75)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	3 (2,8; 4)	6 (4; 7,3)	8 (6,8; 8,3)	8,5 (8; 9,3)	11,5 (10,8; 12,5)			
Cola + GM1 50 mg/kg (N = 10)										
média ± DP	0,4 ± 0,7	0,4 ± 0,5	3,3 ± 0,9	5,8 ± 1,5	7,6 ± 1,4	8,5 ± 1,4	10 ± 1,5			
mediana (p25; p75)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	3 (2,8; 4)	6 (4; 7,3)	8 (6,8; 8,3)	8,5 (7,8; 9,3)	9,5 (9; 12)			
Sham (N = 10)										
média ± DP	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0			
mediana (p25; p75)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)			

O grupo Sham não participou das análises e foram usados os momentos 2 dias, 3 semanas e 6 semanas; EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 7 mostra que todos os grupos melhoraram, em média, o escore BBB ao longo do seguimento ($p < 0,001$), mas, em três semanas, os grupos cola + GM1 40 mg/kg e cola + GM1 50 mg/kg apresentaram, em média, escores BBB estatisticamente maiores que o grupo cola de fibrina ($p < 0,001$). Em seis semanas, todos os grupos tratados com GM1 apresentaram, em média, escores BBB estatisticamente maiores que o grupo cola de fibrina ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Resultado das comparações múltiplas da escala BBB entre grupos e momentos avaliados conforme as diferenças encontradas.

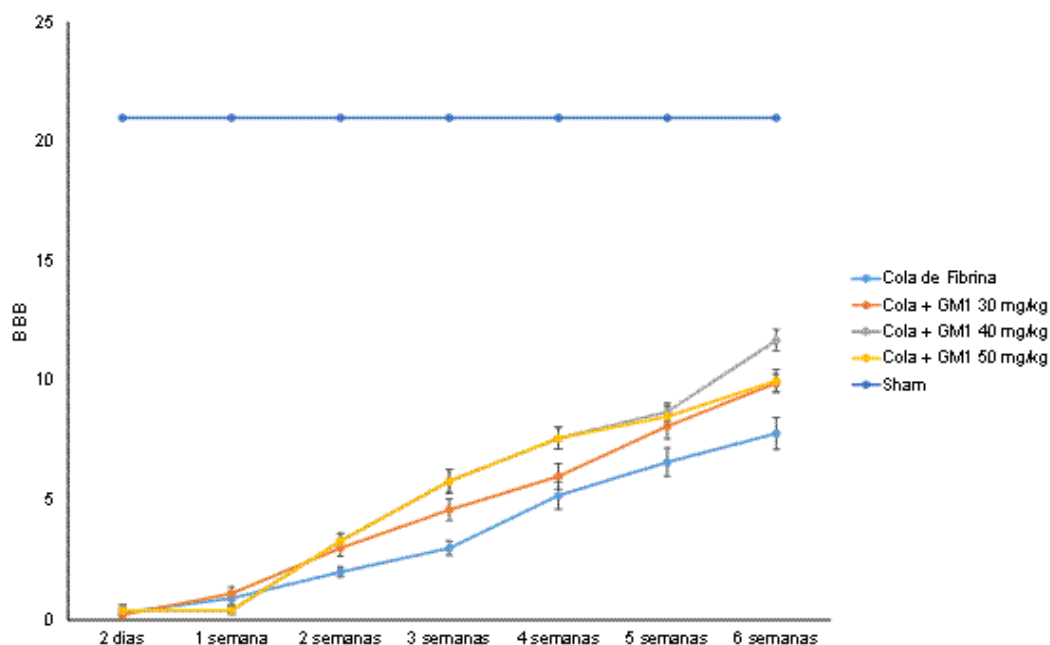
Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Cola de Fibrina	2 dias – 3 semanas	-2.70	0.59	<0,001	-4.68	-0.72
	2 dias – 6 semanas	-7.50	0.56	<0,001	-9.40	-5.60
	3 semanas – 6 semanas	-4.80	0.59	<0,001	-6.78	-2.82
Cola + GM1 30 mg/kg	2 dias – 3 semanas	-4.40	0.59	<0,001	-6.38	-2.42
	2 dias – 6 semanas	-9.70	0.56	<0,001	-11.60	-7.80
	3 semanas – 6 semanas	-5.30	0.59	<0,001	-7.28	-3.32
Cola + GM1 40 mg/kg	2 dias – 3 semanas	-5.40	0.59	<0,001	-7.38	-3.42
	2 dias – 6 semanas	-11.30	0.56	<0,001	-13.20	-9.40
	3 semanas – 6 semanas	-5.90	0.59	<0,001	-7.88	-3.92
Cola + GM1 50 mg/kg	2 dias – 3 semanas	-5.40	0.59	<0,001	-7.38	-3.42
	2 dias – 6 semanas	-9.60	0.56	<0,001	-11.50	-7.70
	3 semanas – 6 semanas	-4.20	0.59	<0,001	-6.18	-2.22
2 dias	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	0.10	0.57	>0,999	-1.80	2.00
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-0.10	0.57	>0,999	-2.00	1.80
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-0.10	0.57	>0,999	-2.00	1.80
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	-0.20	0.57	>0,999	-2.10	1.70
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.20	0.57	>0,999	-2.10	1.70
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	0.00	0.57	>0,999	-1.90	1.90
3 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	-1.60	0.57	0.308	-3.50	0.30
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-2.80	0.57	<0,001	-4.70	-0.90
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-2.80	0.57	<0,001	-4.70	-0.90
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	-1.20	0.57	>0,999	-3.10	0.70
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-1.20	0.57	>0,999	-3.10	0.70
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	0.00	0.57	>0,999	-1.90	1.90
6 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	-2.10	0.57	0.013	-4.00	-0.20
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-3.90	0.57	<0,001	-5.80	-2.00
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-2.20	0.57	0.007	-4.10	-0.30
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	-1.80	0.57	0.096	-3.70	0.10
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.10	0.57	>0,999	-2.00	1.80
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	1.70	0.57	0.175	-0.20	3.60

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

O Gráfico 1 ilustra os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Gráfico 1 – Perfis médios da escala BBB e respectivos erros-padrão segundo grupos.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

As Tabelas 8 e 9 mostram que todos os parâmetros do plano horizontal apresentaram comportamentos médios dos grupos estatisticamente diferentes ao longo dos momentos avaliados ($p_{\text{Interação}} < 0,05$), exceto os erros ($p_{\text{Interação}} = 0,092$). Todavia, houve diferença média entre os grupos ($p_{\text{Grupo}} = 0,039$) e ao longo dos momentos avaliados ($p_{\text{Momento}} < 0,001$) para os erros. Já os passos, escorregões e erros diferiram ao longo dos momentos de avaliação apenas, independente do grupo ($p_{\text{Momento}} < 0,05$).

Tabela 8 – Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.

Variável/Grupo	Momento			P Grupo	P Momento	P Interação
	Pré	5 semanas	6 semanas			
Passos				<0,001	<0,001	<0,001
Cola de Fibrina (N = 10)						
média ± DP	46,1 ± 1,9	4,3 ± 1,6	6,8 ± 0,9			
mediana (p25; p75)	46 (44,8; 48)	4 (3; 6)	6,5 (6; 8)			
Cola + GM1 30 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	46,6 ± 1,6	4 ± 1,8	8,1 ± 1,8			
mediana (p25; p75)	47 (45; 48)	4,5 (3; 5,3)	8 (6; 10)			
Cola + GM1 40 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	46,3 ± 2	8,5 ± 2,2	12,3 ± 1,9			
mediana (p25; p75)	46,5 (44,8; 48)	8 (6,8; 10,3)	12 (10; 14)			
Cola + GM1 50 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	46,7 ± 1,2	7,8 ± 1,5	11,6 ± 2,3			
mediana (p25; p75)	47 (45,8; 48)	8 (6; 9,3)	12 (10,3; 13,3)			
Sham (N = 10)						
média ± DP	44,7 ± 1,3	45,9 ± 1,7	46,4 ± 2,1			
mediana (p25; p75)	44,5 (43,8; 46)	46 (44,8; 47,3)	46 (44,8; 48,3)			
Acertos (%)				<0,001	<0,001	0.001
Cola de Fibrina (N = 10)						
média ± DP	98,5 ± 1,5	62,9 ± 11,1	79,5 ± 6,9			
mediana (p25; p75)	97,9 (97,8; 100)	66,7 (50; 66,7)	83,3 (74,1; 83,9)			
Cola + GM1 30 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	97,5 ± 2	55,2 ± 24,5	76,4 ± 10,1			
mediana (p25; p75)	96,9 (95,7; 100)	63,3 (38,3; 68,8)	77,5 (65,6; 84,4)			
Cola + GM1 40 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	97,4 ± 1,7	77,5 ± 15,6	89,7 ± 5,2			
mediana (p25; p75)	97,8 (95,8; 98,5)	79,2 (71,1; 90,2)	91,7 (87,5; 92,9)			
Cola + GM1 50 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	96,8 ± 2	80,5 ± 6,8	86,4 ± 7,4			
mediana (p25; p75)	97,8 (95,2; 97,9)	81,7 (75; 86,2)	89,2 (81,3; 91,8)			
Sham (N = 10)						
média ± DP	96,4 ± 2,4	96,9 ± 2,1	97,9 ± 1,9			
mediana (p25; p75)	95,7 (95; 98,4)	96,7 (95,5; 98,4)	97,8 (97,2; 100)			

Nas semanas 3 e 4 a maioria dos ratos não conseguiu fazer o teste; O grupo Sham não participou das análises; EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Tabela 9 – Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.

Variável/Grupo	Momento			P Grupo	P Momento	P Interação
	Pré	5 semanas	6 semanas			
Escorregões (%)				<0,001	<0,001	<0,001
Cola de Fibrina (N = 10)						
média ± DP	1,5 ± 1,5	29,3 ± 13,1	16,2 ± 3,5			
mediana (p25; p75)	2,1 (0; 2,2)	29,2 (16,7; 37,5)	16,7 (13,8; 16,7)			
Cola + GM1 30 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	2,1 ± 1,7	33,8 ± 24,6	14,4 ± 6,7			
mediana (p25; p75)	2,1 (0; 4,1)	29,2 (19,2; 35)	14,6 (11,9; 18,6)			
Cola + GM1 40 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	2,1 ± 1,4	13,6 ± 4,2	8,3 ± 1,3			
mediana (p25; p75)	2,1 (1,5; 2,7)	12,5 (9,8; 17,5)	8,3 (7,1; 10)			
Cola + GM1 50 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	2,3 ± 1,2	11,6 ± 4,7	8,5 ± 7			
mediana (p25; p75)	2,2 (2,1; 2,7)	12,5 (10; 14,9)	8 (5; 9,9)			
Sham (N = 10)						
média ± DP	1,8 ± 1,4	1,8 ± 1,4	1,5 ± 1,7			
mediana (p25; p75)	2,2 (0; 2,3)	2,2 (0; 2,3)	1 (0; 2,7)			
Erros (%)				0.039	<0,001	0.092
Cola de Fibrina (N = 10)						
média ± DP	0 ± 0	7,8 ± 10,4	2,9 ± 6,2			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0)	0 (0; 17,5)	0 (0; 3,1)			
Cola + GM1 30 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	0,4 ± 0,9	25 ± 32,6	6,7 ± 7,4			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0,5)	18,3 (0; 40)	4,5 (0; 13,5)			
Cola + GM1 40 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	0,4 ± 0,9	8,9 ± 12,6	2 ± 4,2			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0,5)	5 (0; 12,9)	0 (0; 2,5)			
Cola + GM1 50 mg/kg (N = 10)						
média ± DP	0,8 ± 1,1	6,2 ± 6,7	5,1 ± 6,2			
mediana (p25; p75)	0 (0; 2,1)	5 (0; 12,5)	3,6 (0; 8,5)			
Sham (N = 10)						
média ± DP	1,8 ± 1,5	1,3 ± 1,1	0,6 ± 1			
mediana (p25; p75)	2,2 (0; 2,3)	2,1 (0; 2,2)	0 (0; 2)			

Nas semanas 3 e 4 a maioria dos ratos não conseguiu fazer o teste; O grupo Sham não participou das análises; EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 10 mostra que os passos médios diminuíram estatisticamente do pré-operatório para os demais momentos avaliados em todos os grupos ($p < 0,001$) e aumentaram novamente de cinco para seis semanas ($p < 0,05$), sendo que em cinco e seis semanas os grupos cola + GM1 40 mg/kg e cola + GM1 50 mg/kg apresentaram em média mais passos que os grupos cola de fibrina e cola + GM1 30 mg/kg ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Resultado das comparações múltiplas dos passos entre grupos e momentos.

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
					Inferio r	Superior
Cola de Fibrina	Pré – 5 semanas	41.8	0.7	<0,001	39.4	44.2
	Pré – 6 semanas	39.3	0.8	<0,001	36.7	41.9
	5 semanas – 6 semanas	-2.5	0.7	0.031	-4.9	-0.1
Cola + GM1 30 mg/kg	Pré – 5 semanas	42.6	0.7	<0,001	40.2	45.0
	Pré – 6 semanas	38.5	0.8	<0,001	35.9	41.1
	5 semanas – 6 semanas	-4.1	0.7	<0,001	-6.5	-1.7
Cola + GM1 40 mg/kg	Pré – 5 semanas	37.8	0.7	<0,001	35.4	40.2
	Pré – 6 semanas	34.0	0.8	<0,001	31.4	36.6
	5 semanas – 6 semanas	-3.8	0.7	<0,001	-6.2	-1.4
Cola + GM1 50 mg/kg	Pré – 5 semanas	38.9	0.7	<0,001	36.5	41.3
	Pré – 6 semanas	35.1	0.8	<0,001	32.5	37.7
	5 semanas – 6 semanas	-3.8	0.7	<0,001	-6.2	-1.4
Pré	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	-0.5	0.8	>0,999	-3.2	2.2
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-0.2	0.8	>0,999	-2.9	2.5
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-0.6	0.8	>0,999	-3.3	2.1
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	0.3	0.8	>0,999	-2.4	3.0
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.1	0.8	>0,999	-2.8	2.6
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.4	0.8	>0,999	-3.1	2.3
5 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	0.3	0.8	>0,999	-2.4	3.0
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-4.2	0.8	<0,001	-6.9	-1.5
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-3.5	0.8	0.001	-6.2	-0.8
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	-4.5	0.8	<0,001	-7.2	-1.8
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-3.8	0.8	<0,001	-6.5	-1.1
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	0.7	0.8	>0,999	-2.0	3.4
6 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	-1.3	0.8	>0,999	-4.0	1.4
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-5.5	0.8	<0,001	-8.2	-2.8
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-4.8	0.8	<0,001	-7.5	-2.1
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	-4.2	0.8	<0,001	-6.9	-1.5
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-3.5	0.8	0.001	-6.2	-0.8
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	0.7	0.8	>0,999	-2.0	3.4

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 11 mostra que os grupos cola de fibrina e cola + GM1 30 mg/kg diminuíram, em média, estatisticamente os acertos em cinco e seis semanas em relação ao pré-operatório ($p < 0,001$) e aumentaram os acertos de cinco semanas para seis semanas ($p < 0,05$). Já os grupos cola + GM1 40 mg/kg e cola + GM1 50 mg/kg apresentaram redução média dos acertos em cinco semanas em relação ao pré-operatório ($p < 0,05$), mas, em seis semanas, ambos os grupos já apresentaram, em média, acertos estatisticamente semelhantes ao pré-operatório ($p > 0,05$). Em cinco semanas, os grupos cola + GM1 40 mg/kg e cola + GM1 50 mg/kg apresentaram, em

média, mais acertos que os grupos cola de fibrina e cola + GM1 30 mg/kg ($p < 0,05$); em seis semanas, os acertos médios do grupo cola + GM1 30 mg/kg foram, em média, estatisticamente menores que os do grupo cola + GM1 40 mg/kg ($p = 0,034$).

Tabela 11 – Resultado das comparações múltiplas dos acertos entre grupos e momentos.

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Cola de Fibrina	Pré – 5 semanas	35.6	4.0	<0,001	22.1	49.0
	Pré – 6 semanas	19.0	3.8	<0,001	6.1	31.9
	5 semanas – 6 semanas	-16.6	4.0	0.002	-30.0	-3.1
Cola + GM1 30 mg/kg	Pré – 5 semanas	36.0	4.1	<0,001	22.3	49.8
	Pré – 6 semanas	21.1	3.8	<0,001	8.2	34.0
	5 semanas – 6 semanas	-14.9	4.1	0.017	-28.7	-1.2
Cola + GM1 40 mg/kg	Pré – 5 semanas	20.0	4.0	<0,001	6.5	33.4
	Pré – 6 semanas	7.7	3.8	>0,999	-5.1	20.6
	5 semanas – 6 semanas	-12.2	4.0	0.148	-25.7	1.2
Cola + GM1 50 mg/kg	Pré – 5 semanas	16.3	4.0	0.003	2.8	29.7
	Pré – 6 semanas	10.4	3.8	0.435	-2.5	23.3
	5 semanas – 6 semanas	-5.9	4.0	>0,999	-19.3	7.6
Pré	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	1.0	3.8	>0,999	-11.9	14.0
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	1.1	3.8	>0,999	-11.9	14.0
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	1.7	3.8	>0,999	-11.3	14.6
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 40 mg/kg	0.0	3.8	>0,999	-12.9	13.0
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 50 mg/kg	0.7	3.8	>0,999	-12.3	13.6
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 50 mg/kg	0.6	3.8	>0,999	-12.3	13.6
5 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	1.5	3.9	>0,999	-11.8	14.8
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-14.6	3.8	0.010	-27.5	-1.6
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-17.6	3.8	<0,001	-30.6	-4.7
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 40 mg/kg	-16.1	3.9	0.003	-29.3	-2.8
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 50 mg/kg	-19.1	3.9	<0,001	-32.4	-5.8
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 50 mg/kg	-3.1	3.8	>0,999	-16.0	9.9
6 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	3.1	3.8	>0,999	-9.8	16.0
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-10.2	3.8	0.511	-23.2	2.7
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-7.0	3.8	>0,999	-19.9	6.0
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 40 mg/kg	-13.3	3.8	0.034	-26.3	-0.4
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 50 mg/kg	-10.1	3.8	0.580	-23.0	2.9
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GM1 50 mg/kg	3.3	3.8	>0,999	-9.7	16.2

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Pela Tabela 12, tem-se que os grupos cola de fibrina e cola + GM1 30 mg/kg aumentaram, em média, estatisticamente os escorregões em cinco e seis semanas em relação ao pré-operatório ($p < 0,001$) e o grupo cola de fibrina diminuiu, em média, os escorregões de

cinco semanas para seis semanas ($p < 0,001$). Já o grupo cola + GM1 40 mg/kg e o grupo cola aumentou, em média, os escorregões em cinco semanas em relação ao pré-operatório ($p = 0,003$), enquanto o grupo cola + GM1 50 mg/kg não apresentou diferenças médias nos escorregões ao longo dos momentos avaliados ($p > 0,05$). Em cinco semanas, os grupos cola + GM1 40 mg/kg e cola + GM1 50 mg/kg apresentaram, em média, menos escorregões que os grupos cola de fibrina e cola + GM1 30 mg/kg ($p < 0,05$), mas, em seis semanas, os escorregões médios já não diferiram estatisticamente entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 12 – Resultado das comparações múltiplas dos escorregões entre grupos e momentos.

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Cola de Fibrina	Pré – 5 semanas	-27.8	2.8	<0,001	-37.3	-18.2
	Pré – 6 semanas	-14.7	2.8	<0,001	-24.1	-5.3
	5 semanas – 6 semanas	13.1	2.8	<0,001	3.5	22.6
Cola + GM1 30 mg/kg	Pré – 5 semanas	-21.7	2.8	<0,001	-31.3	-12.2
	Pré – 6 semanas	-12.3	2.8	0.001	-21.7	-2.9
	5 semanas – 6 semanas	9.4	2.8	0.058	-0.1	19.0
Cola + GM1 40 mg/kg	Pré – 5 semanas	-11.5	2.8	0.003	-21.0	-1.9
	Pré – 6 semanas	-6.2	2.8	>0,999	-15.6	3.2
	5 semanas – 6 semanas	5.3	2.8	>0,999	-4.3	14.8
Cola + GM1 50 mg/kg	Pré – 5 semanas	-9.3	2.8	0.070	-18.8	0.3
	Pré – 6 semanas	-6.1	2.8	>0,999	-15.5	3.3
	5 semanas – 6 semanas	3.1	2.8	>0,999	-6.4	12.7
Pré	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	-0.6	2.8	>0,999	-10.0	8.8
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-0.6	2.8	>0,999	-10.0	8.8
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-0.8	2.8	>0,999	-10.2	8.6
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	0.0	2.8	>0,999	-9.4	9.4
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.2	2.8	>0,999	-9.6	9.2
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.2	2.8	>0,999	-9.6	9.2
5 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	5.4	2.8	>0,999	-4.0	14.8
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	15.7	2.8	<0,001	6.3	25.1
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	17.6	2.8	<0,001	8.3	27.0
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	10.2	2.8	0.016	0.9	19.6
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	12.2	2.8	0.001	2.8	21.6
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	2.0	2.8	>0,999	-7.4	11.4
6 semanas	Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	1.8	2.8	>0,999	-7.6	11.2
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	7.9	2.8	0.310	-1.5	17.3
	Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	7.7	2.8	0.373	-1.7	17.1
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	6.1	2.8	>0,999	-3.3	15.5
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	5.9	2.8	>0,999	-3.5	15.3
	Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.2	2.8	>0,999	-9.6	9.2

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 13 mostra que o grupo cola + GM1 30 mg/kg apresentou, em média, estatisticamente mais erros que os demais grupos, independente do momento avaliado ($p < 0,05$), e que, em cinco semanas, os erros médios foram estatisticamente maiores que no pré-operatório e em seis semanas, independente do grupo ($p < 0,05$).

Tabela 13 – Resultado das comparações múltiplas dos erros entre grupos e momentos.

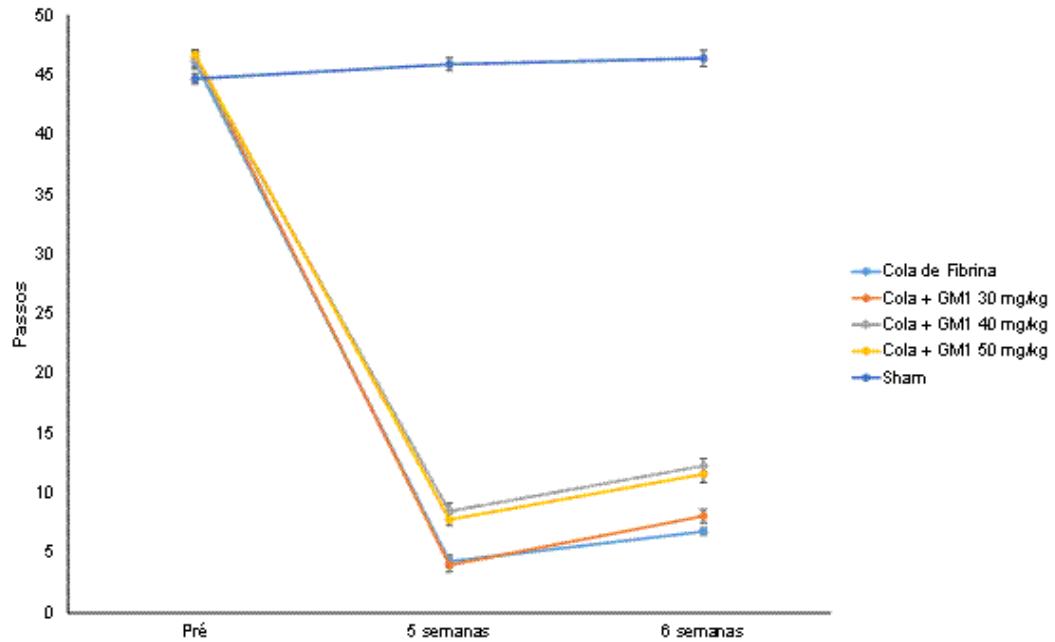
Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Cola de Fibrina – Cola + GM1 30 mg/kg	-7.1	2.9	0.015	-12.9	-1.4
Cola de Fibrina – Cola + GM1 40 mg/kg	-0.2	2.9	0.944	-6.0	5.5
Cola de Fibrina – Cola + GM1 50 mg/kg	-0.5	2.9	0.877	-6.2	5.3
Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 40 mg/kg	6.9	2.9	0.018	1.2	12.7
Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	6.7	2.9	0.023	0.9	12.4
Cola + GM1 30 mg/kg – Cola + GMI 50 mg/kg	-0.3	2.9	0.932	-6.0	5.5
Pré – 5 semanas	-11.6	2.5	<0,001	-17.5	-5.6
Pré – 6 semanas	-3.8	2.5	0.405	-9.8	2.3
5 semanas – 6 semanas	7.8	2.5	0.006	1.8	13.8

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

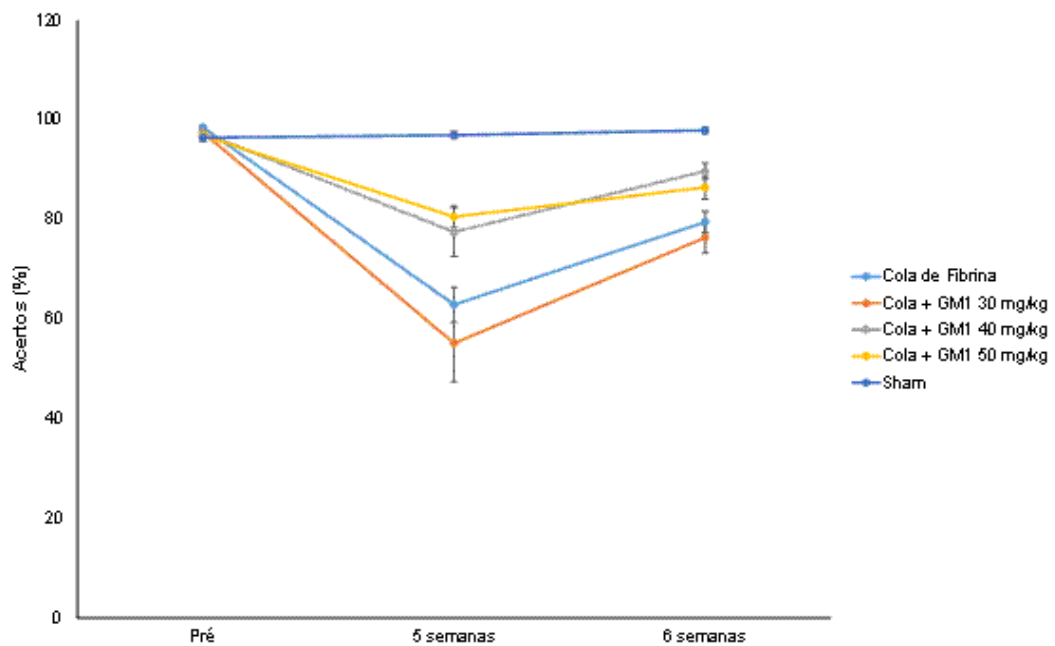
Os Gráficos 2 a 5 ilustram os resultados apresentados nas Tabelas 8 a 13.

Gráfico 2 – Perfis médios e respectivos erros-padrão do número de passos segundo grupo.



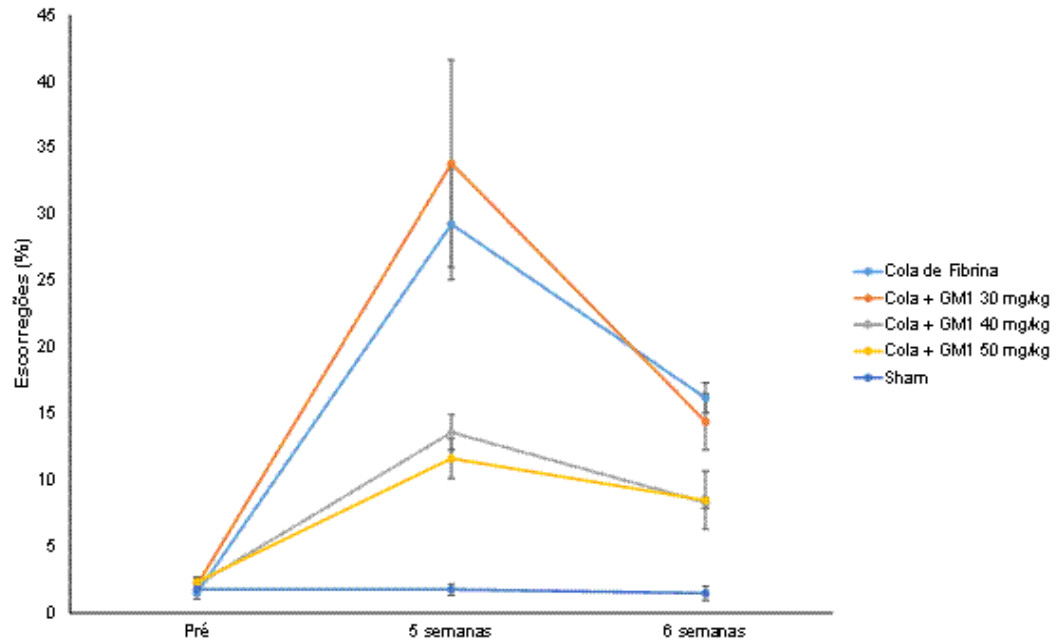
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 3 – Perfis médios e respectivos erros-padrão do percentual de acertos segundo grupo.



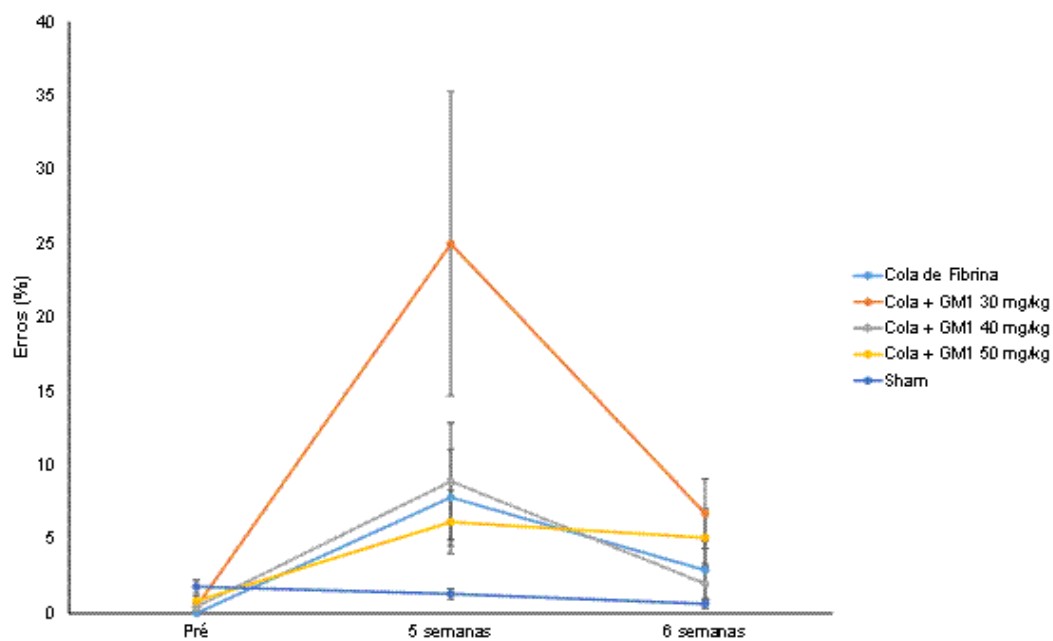
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 4 – Perfis médios e respectivos erros-padrão do percentual de escorregões segundo grupo.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 5 – Perfis médios e respectivos erros-padrão do percentual de erros segundo grupo.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

6 DISCUSSÃO

6 Discussão

A LM é uma condição médica grave, com consequências funcionais, psicológicas e socioeconômicas que impactam a vida dos pacientes, de seus familiares e de cuidadores, assim como o sistema de saúde pública e de assistência social como um todo⁽¹¹⁹⁾.

Embora a reparação da lesão primária seja questionável, o controle da cascata de eventos patoquímicos que levam à destruição tecidual na lesão secundária progressiva pode prevenir sua propagação e as sequelas decorrentes de seus danos.

Apesar desse fato, devido à sua complexidade, não existe um tratamento definitivo, ou considerado “padrão ouro”, para LMs, e sim uma abordagem terapêutica multimodal que pode, conforme o caso, incluir intervenção cirúrgica precoce para descompressão da medula espinhal, medicamentos para tratar lesões secundárias e reabilitação intensiva^(88,120).

Em se tratando da terapia farmacológica, tem sido recomendado o uso de agentes neuroprotetores e anti-inflamatórios durante os estágios primários da lesão e da inflamação⁽¹²¹⁾. Dentre eles, destacam-se a MPS e o GM1.

O uso de corticoides no manejo farmacológico do TRM tem sido bastante debatido, e a eficácia da MPS como um sequestrante de radicais livres que reduz a resposta inflamatória tem sido controversa, especialmente no que se refere à dosagem e ao tempo de administração após a LM⁽¹²²⁾. Isso tem levado alguns pesquisadores a reconsiderar a sua indicação como primeira escolha na abordagem farmacológica do TRM, à medida que resultados de seus estudos revelam que a administração de MPS após lesão da medula espinhal não demonstrou nenhuma melhora na recuperação neurológica em 26 semanas⁽⁹⁸⁾.

O GM1 apresenta efeitos antineurotóxicos, anti-inflamatórios e neuroprotetores que são essenciais para a manutenção da excitabilidade neuronal⁽¹⁸⁾. Ademais, o GM1 estimula o desenvolvimento, o crescimento, a diferenciação e a maturação dos neurônios, além de reduzir a intensidade da degeneração Walleriana^(18,82). Além disso, estudos clínicos em humanos comprovaram que sua aplicação pode promover a melhora da função locomotora em pacientes acometidos por LMs⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

O GM1 aparenta ser um opção terapêutica promissora, pois evidências na literatura demonstram benefícios em uso isolado ou em associação com outros meios, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, podendo melhorar a qualidade de vida e reduzir a morbimortalidade

dos pacientes acometidos por TRM, visto que a mortalidade pode atingir taxas próximas a 80% no momento do trauma ou até 20% após atendimento hospitalar⁽¹²³⁾.

Soluções à base de GM1 estão disponíveis (Sygen – 100 mg/5 mL) para o tratamento de TRM, mediante administração de 300 mg por via intravenosa, como dose de ataque, seguidos de 100 mg (intravenoso ou intramuscular) por dia, durante o período de oito semanas⁽¹²⁴⁾; ou seja, um sistema posológico, que, por vezes, pode se revelar um desafio em relação aos aspectos operacionais e logísticos do respectivo tratamento. Por esse motivo, por exemplo, e também devido às características farmacocinéticas do fármaco e dos obstáculos para sua distribuição até o sistema nervoso central, estudos têm explorado novas vias de administração, como intracerebroventricular, para o tratamento da doença de Alzheimer⁽²⁰⁾, e intratecal, recentemente avaliada em modelos experimentais de TRM⁽²¹⁾.

Com base no exposto, o presente trabalho descreve a avaliação de um recurso farmacoterapêutico inovador, que associa o GM1, como agente neuroprotetor, ao sistema de aplicação e liberação local do fármaco proporcionado pela CF.

A CF tem sido estudada há décadas, originalmente para seu uso cirúrgico como agente hemostático e como selante e, mais recentemente, como sistema de liberação farmacêutico⁽¹²⁵⁾. Ao incorporar ativos terapêuticos à matriz da cola, é possível promover uma liberação sustentada e altamente direcionada, *in loco*, o que maximiza a concentração do agente no sítio da lesão e, simultaneamente, minimiza os efeitos colaterais sistêmicos decorrentes da administração convencional^(125,126). Além disso, estudos recentes demonstram que hidrogéis à base de fibrina, quando empregados como veículos de liberação de fármacos, podem reduzir a inflamação e o risco de complicações pós-operatórias, apresentando resultados promissores em modelos experimentais de LM^(25,106). Além de traduzir compatibilidade e segurança com a aplicação sugerida, isso sugere a possibilidade de efeito sinérgico mediante a associação com o gangliosídeo GM1, conforme revelado nos presentes resultados.

O modelo de indução experimental da LM em ratos Wistar empregando o NYU Impactor torna possível a comparação dos resultados com aqueles obtidos por outras instituições que integram o MASCIS^(76,90), incluindo resultados obtidos em estudos desenvolvidos pelo presente grupo^(21,95).

O número de animais necessários para a formação dos grupos foi baseado na padronização do MASCIS e em estudos anteriores realizados nesta instituição^(80,90,91,92,95,123).

As tabelas 1 e 2 analisam a variação de peso apresentada pelos animais após as intervenções propostas e mostram que houve diferença média estatisticamente significativa na variação dos pesos dos animais entre os grupos ($p = 0,003$) e que apenas o grupo sham, composto por animais submetidos apenas à laminectomia, sem indução efetiva da LM, apresentou aumento de peso significativo em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), exceto quando comparado ao grupo cola + GM1 50 mg/kg ($p = 0,278$).

Essa diferença sugere que a LM experimental provoca alterações metabólicas e eleva a resposta de estresse pós-operatório, e que a associação de CF e GM1 na dose de 50 mg/kg pode ter contribuído para a estabilização do metabolismo e atenuado o estresse sistêmico decorrente da lesão.

As tabelas 3 e 4 descrevem os achados entre a análise histológica qualitativa e o tempo de bexiga neurogênica nos grupos. Os graus de necrose e hiperemia foram estatisticamente maiores nos grupos 1 (cola de fibrina) e 2 (cola + GM1 30 mg/kg), sendo que o grupo 4 (cola + GM1 50 mg/kg) apresentou menos necrose e, juntamente com o grupo 3 (cola + GM1 40 mg/kg), menos hiperemia. O tempo de bexiga neurogênica foi maior no grupo 1 ($p < 0,05$) e, comparando os grupos 2, 3 e 4, notamos um tempo maior no grupo 2 em relação aos demais.

A diminuição da necrose revela que o tratamento pode atenuar os efeitos da lesão secundária, preservando a integridade do tecido medular, enquanto o controle da hiperemia sugere melhor estabilização da microcirculação no sítio da lesão, possivelmente favorecendo a entrega de nutrientes e a remoção de metabólitos tóxicos. A diminuição do tempo de bexiga neurogênica, como indicador de disfunção autonômica e, indiretamente, da gravidade da lesão, reforça a hipótese de que a associação CF e GM1 colabora para uma recuperação autonômica mais rápida.

Apesar de os dados apresentados na Tabela 5 não revelarem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação aos marcadores imuno-histoquímicos (GFAP e Olig2), deve-se destacar que este fato pode estar associado à limitação do tamanho amostral. Entretanto, o cenário geral do presente trabalho sugere uma tendência que, se confirmada com amostra maior, possivelmente indicaria uma menor reatividade astrogliar e melhor preservação ou regeneração dos oligodendrócitos – aspectos essenciais que sustentam a integridade dos tratos neurais.

As tabelas 6 e 7 comparam o escore BBB com seu respectivo momento de avaliação, evidenciando que, a partir da terceira semana, os grupos 3 e 4 apresentaram melhor escore motor.

Vale notar que os grupos com doses mais elevadas de GM1 (3 e 4) já apresentavam escores superiores ao grupo que recebeu apenas a CF na terceira semana, sugerindo uma recuperação locomotora mais rápida. Esses achados indicam que, além de reduzir os danos histopatológicos, o tratamento potencializa a preservação e/ou regeneração dos circuitos motores.

As tabelas 8 e 9 analisam os resultados obtidos por meio do plano horizontal, levando em consideração os acertos, erros e escorregões dos animais. Evidencia-se um comportamento médio diferente ao longo das seis semanas de avaliação. As tabelas 10 e 11 comparam o número de passos em cada momento da avaliação e evidência que o número de passos de cada animal diminuiu ao longo das primeiras cinco semanas e apresentou um aumento significativo após a sexta semana, principalmente nos grupos 3 e 4. Estes últimos apresentaram resultados muito semelhantes aos da avaliação pré-operatória, sendo que o grupo 3 apresentou resultados melhores comparando-se com o grupo 2. As tabelas 12 e 13 analisam os erros e escorregões dos animais em relação ao momento da avaliação, notando-se uma menor média de escorregões nos grupos 3 e 4 a partir da quinta semana comparando com os grupos 1 e 2; após a sexta semana, não houve diferença com significado estatístico entre todos os grupos. O grupo 2 apresentou, em média, mais erros que os demais grupos, independentemente do momento da avaliação.

Os testes realizados no plano horizontal (tabelas 8 a 13) forneceram informações complementares sobre a função sensório-motora. Nesse caso, foi possível notar redução dos passos médios nos períodos iniciais, seguida de recuperação expressiva na sexta semana, particularmente nos grupos 3 e 4, que alcançaram resultados precoces e superiores aos grupos 1 e 2. Destaca-se também o fato de que os grupos com doses mais elevadas de GM1 apresentaram menor percentual de escorregões nas semanas cinco e seis. Esse padrão reforça a ideia de que a dose de GM1 é uma variável crítica para a obtenção de um desempenho motor mais refinado, refletindo melhor controle e coordenação dos membros posteriores.

A análise detalhada dos resultados demonstra que a associação entre CF e GM1, especialmente em doses de 40 mg/kg e 50 mg/kg, proporciona benefícios significativos na recuperação funcional e na preservação tecidual após TRM. A redução dos processos de necrose e hiperemia, associada a melhores escores funcionais na escala BBB e a uma melhora

nos testes comportamentais do plano horizontal, sustenta a hipótese de que essa estratégia terapêutica atua modulando os mecanismos de lesão secundária e promovendo um ambiente mais propício à regeneração neuronal.

Antes do emprego de modelos superiores para avaliação mais sofisticada da eficácia e segurança desta intervenção, sua composição e elaboração podem ser melhor apuradas. A cinética de liberação do fármaco, por exemplo, pode ser ajustada modificando-se a composição da cola e a afinidade do fármaco pela matriz ou criando-se ligações covalentes.

Apesar desse fato, e embora sua administração incorra em procedimentos mais invasivos, quando comparado às vias de administração atualmente aprovadas para soluções à base de GM1 no tratamento do TRM (vias endovenosa e intramuscular), a associação de CF com GM1 traduz um elo de eficiência entre a descompressão medular mediante intervenção cirúrgica e a administração parenteral do fármaco.

O TRM desencadeia uma ruptura da barreira hematoliquórica, fator crucial na amplificação do dano secundário. Imediatamente após a lesão, ocorre extravasamento vascular devido à destruição mecânica e subsequente resposta inflamatória exacerbada. A liberação de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas causa disfunção endotelial e degrada proteínas de junção, aumentando a permeabilidade capilar⁽¹²⁷⁾. A associação do GM1 com a CF parece ter mostrado potencial na proteção da barreira e modulação da inflamação local.

Enquanto a administração local da associação acelera a liberação do fármaco em seu sítio de ação – o que é de grande relevância nos casos de TRM agudo – até que a distribuição sistêmica atinja a situação de equilíbrio, a intervenção cirúrgica deixa de objetivar exclusivamente a descompressão, mas também viabiliza a aplicação de uma solução terapêutica que pode se revelar extremamente útil no controle da cascata de lesão secundária. Obviamente, isso favorece a relação benefício-risco da intervenção.

Esses dados reforçam a relevância e inovação desta abordagem e abrem perspectivas para estudos futuros que possam explorar estratégias combinatórias e doses otimizadas com o objetivo de, eventualmente, compor uma trilha de desenvolvimento translacional desta intervenção para a prática clínica no tratamento das LMs.

7 CONCLUSÃO

7 Conclusão

O presente estudo evidencia que a aplicação tópica do GM1 associado à CF apresenta resultados promissores em relação à melhora motora nos animais submetidos a LM induzida experimentalmente. A dose empregada de GM1 também demonstrou constituir fator importante para a obtenção desses resultados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Wilkins RH. Neurosurgical Classics. USA: American Association of Neurological Surgeons, Thieme; 1992.
2. Cooke J. A treatise on nervous diseases. Boston: Wells and Lilly; 1824.
3. Masini M. An estimation of incidence and prevalence of spinal cord injury in Brazil. *J Bras Neurocirurg*. 2001;12(2):97-100.
4. Chhabra HS. ISCoS text book on comprehensive management of spinal cord injuries. India: LWW-India; 2015.
5. de Barros Filho TE, Cristante AF, Marcon RM, Ono A, Bilhar R. Gunshot injuries in the spine. *Spinal Cord*. 2014;52(7):504-10.
6. Ray SK, Matzelle DD, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Cell death in spinal cord injury (SCI) requires de novo protein synthesis. Calpain inhibitor E-64-d provides neuroprotection in SCI lesion and penumbra. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:436-49.
7. Stenudd M, Sabelström H, Frisén J. Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol*. 2015;72(2):235-7.
8. Herkowitz HN, Garfin SR, Eismont FJ, Bell GR, Balderston RA. Rothman Simeone The Spine: Expert Consult. Philadelphia: Sanders; 2011.
9. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg*. 1992;76(1):23-31.
10. Samantaray S, Sribnick EA, Das A, Thakore NP, Matzelle D, Yu SP, et al. Neuroprotective efficacy of estrogen in experimental spinal cord injury in rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1199:90-4.
11. Torelli AG, Cristante AF, de Barros-Filho TEP, Dos Santos GB, Morena BC, Correia FF, et al. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. *Clinics (Sao Paulo)*. 2022;77:100006.
12. Costa MP, Cunha AS, Da Silva CF, Barros Filho TEP, Rossi Costa HJZ Ferreira MC. Tubo de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. 2009;17(5):286-90.
13. Yuan B, Pan S, Zhang WW. Effects of gangliosides on expressions of caspase-3 and NGF in rats with acute spinal cord injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(24):5843-9.

14. Walker JB, Harris M. GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. *Neurosci Lett*. 1993;161(2):174-8.
15. Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. GM-1 ganglioside in human spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1992;9(Suppl 1):S407-16
16. Geisler FH. GM-1 ganglioside and motor recovery following human spinal cord injury. *J Emerg Med*. 1993;11(Suppl 1):49-55.
17. Geisler FH. Clinical trials of pharmacotherapy for spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;845:374-81.
18. Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D; Sygen Study Group. The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 Suppl):S87-98.
19. Di Biase E, Lunghi G, Maggioni M, Fazzari M, Pomè DY, Loberto N, et al. GM1 Oligosaccharide Crosses the Human Blood-Brain Barrier In Vitro by a Paracellular Route. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):2858.
20. Augustinsson LE, Blennow K, Blomstrand C, Bråne G, Ekman R, Fredman P, et al. Intracerebroventricular administration of GM1 ganglioside to presenile Alzheimer patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1997;8(1):26-33.
21. Jorge DMF, Marcon RM, Cristante AF, Filho TEPB, Dos Santos GB. Evaluation of the effect of intrathecal GM1 in 24, 48, and 72 hours after acute spinal cord injury in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2023;78:100228.
22. Dunn CJ, Goa KL. Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy. *Drugs*. 1999;58(5):863-86.
23. Yoo J, Chandarana S, Cosby R. Clinical application of tissue adhesives in soft-tissue surgery of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;16(4):312-7.
24. Li Ying, Zhao Q. The effects of fibrin glue on acute complete transection spinal cord injury. *Chin J Reparative Reconstr Surg*. 2008;22(7):828-31.
25. Biscola NP, Cartarozzi LP, Ulian-Benitez S, Barbizan R, Castro MV, Spejo AB, et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017;23:13.
26. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2003;31(1):27-33.
27. Spotnitz WD, Prabhu R. Fibrin sealant tissue adhesive--review and update. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15(3):245-70.

28. Allen AR. Surgery of Experimental Lesion Of spinal Cord equivalent to crush injury fracture deslocation of spinal column: a preliminary report. JAMA. 1911;57(11):878-80.
29. McVeigh JF. Experimental cord crushes with special reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cords affected. Arch Surg. 1923;7(3):573-600.
30. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. AMA Arch Neurol Psychiatry. 1953;70(6):813-9.
31. Woodard JS, Freeman LW. ISchemia of the spinal cord: an experimental study. J Neurosurg. 1956;13(1):63-72.
32. Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. J Neurosurg. 1969;30(6):693-7.
33. Holdsworth F. Fractures, dislocations and fracture-dislocations of the spine. J Bone Joint Surg Am. 1970;52(8):1534-51.
34. Kelly DL Jr, Lassiter KRL, Calogero JA, Alexander E Jr. Effects of local hypothermia and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. J Neurosurg. 1970;33(5):554-63.
35. Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. J Neurosurg. 1971;35(3):277-86.
36. Kelly DL Jr, Lassiter KRL, Vongsvivut A, Smith JM. Effects of hyperbaric oxygenation and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. J Neurosurg. 1972;36(4):425-9.
37. Tator CH, Deecke L. Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma. J Neurosurg. 1973;39(1):52-64.
38. De La Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evaluation of permanent experimental spinal cord trauma. Neurology. 1975;25(6):508-14.
39. Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. Surg Neurol. 1975;4(6):531-6.
40. Yeo JD, Payne W, Hinwood B, Kidman AD. The experimental contusion injury of the spinal cord in sheep. Paraplegia. 1975;12(4):279-98.
41. Dohrmann GJ, Panjabi MM, Wagner FC Jr. An apparatus for quantitating experimental spinal cord trauma. Surg Neurol. 1976;5(5):315-8.
42. Dohrmann GJ, Panjabi MM. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. Surg Neurol. 1976;6(5):263-7.

43. Kuchner EF, Hansebout RR. Combined steroid and hypothermia treatment of experimental spinal cord injury. *Surg Neurol.* 1976;6(6):371-6.
44. Yeo, JD, McKenzie B, Hindwood B, Kidman, A. Treatment of paraplegic sheep with hyperbaric oxygen. *Med J Aust.* 1976;1(15):538-40.
45. Holbach KH, Wassmann H, Linke D. The use of hyperbaric oxygenation in the treatment of spinal cord lesions. *Eur Neurol.* 1977;16(1-6): 213-21.
46. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg.* 1977;47(4):577-81.
47. Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep's spinal cord. *Paraplegia.* 1977;14(4):276-85.
48. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma: I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest.* 1978;39(3):236-53.
49. Ducker TB, Salzman M, Perot PL Jr, Ballantine D. Experimental spinal cord trauma, I. Correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg Neurol.* 1978;10(1):60-3.
50. Rivlin AS, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J. Neurosurg.* 1978;49(6):844-53.
51. Tator CH, Rowed IW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453-64.
52. Lohse DC, Senter HJ, Kauer JS, Collins WF Jr. Spinal cord blood flow in experimental transient paraplegia. *J Neurosurg.* 1980;52(3):335-45.
53. Gamache FW, Myers RAM, Ducker TB, Cowley RA. The clinical application of hyperbaric oxygen therapy in spinal cord injury: a preliminary report. *Surg Neurol.* 1981;15(2):85-7.
54. Means ED, Anderson DK, Waters TR, Kalaf L. Effect of methylprednisolone in compression trauma the feline spinal cord. *J Neurosurg.* 1981;55(2):200-8.
55. De La Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine.* 1981;6(4):315-35.
56. Young W, Flamm ES, Demopoulos HB, Tomasula JJ, DeCrescito V. Effect of naloxone on posttraumatic ischemia in experimental spinal contusion. *J Neurosurg.* 1981;55(2):209-19.
57. Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg.* 1982;56(1):106-13.
58. Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg.* 1982;57(5):667-73.

59. Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1983;59(2):256-61.
60. Ford RWJ. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J Neurosurg.* 1983; 59(2):268-75.
61. Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose response and time-action analysis. *J Neurosurg.* 1984;61(1):124-30.
62. Toffano G, Savoini G, Aldinio C, Valenti G, Dal Toso R, Leon A, et al. Effects of gangliosides on the functional recovery of damaged brain. *Adv Exp Med Biol.* 1984;174:475-88.
63. Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma.* 1985;2(4):257-67.
64. Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, et al. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury—Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1985;63(5):704-13.
65. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol.* 1985;88(1):123-34.
66. Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol.* 1985;88(1):135-49.
67. Bose B, Osterholm JL, Kalia M. Ganglioside-induced regeneration and reestablishment of axonal continuity in spinal cord-transected rats. *Neurosci Lett.* 1986;63(2):165-9.
68. Albin MS, White RJ. Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *Crit Care Clin.* 1987;3(3):441-52.
69. Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD 3rd, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol.* 1988;95(3):548-70.
70. Janssen L, Hansebout RR. Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatments. A review. *Spine.* 1989;14(1):23-32.
71. Barros Filho TEP, Taricco MA, Oliveira RP, Greve JM, Santos LCR, Napoli MMM. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo da coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1990;45(3):123-6.

72. Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal-cord injury — a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglio-side. *N Engl J Med* .1991;324:1829-38.
73. Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg*. 1993;79(4):500-7.
74. Constatini 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.
75. 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.
76. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996;139(2):244-56.
77. Segatore M, Way C. Neuroprotection after spinal cord injury: state of the science. *SCI Nurs*. 1997;14(1):8-18.
78. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol*. 1998;56(3):341-58.
79. Seidl EC. Promising pharmacological agents in the management of acute spinal cord injury. *Crit Care Nurs Q*. 1999 Aug;22(2):44-50.
80. Rodrigues NR. Padronização da lesão medular espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
81. Bracken MB. Pharmacological interventions for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;2:CD001046.
82. Blight AR, Zimmer MP. Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001;2(6):801-8.
83. Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D. The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine* (Phila Pa 1976). 2001;26(24 Suppl):S87-98.
84. Coleman WP, Geisler FH. Injury severity as primary predictor of outcome in acute spinal cord injury: retrospective results from a large multicenter clinical trial. *Spine J*. 2004;4(4):373-8.
85. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*. 2004;1(1):80-100.
86. Chinnock P, Roberts I. Gangliosides for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;2005(2):CD004444.
87. Fehlings MG, Baptiste DC. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury*. 2005;36(Suppl 2):B113-22.

88. Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma*. 2006;23(3-4):318-34.
89. Carvalho MO, Barros Filho TE, Tebet MA. Effects of methylprednisolone and ganglioside GM-1 on a spinal lesion: a functional analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008;63(3):375-80.
90. Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, de Barros Filho TEP. Padronização da lesão de medula espinal em ratos wistar. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(4):182-6.
91. Souza FI, Barros Filho TEP, Cristante A. Avaliação do emprego do GM1 após lesão medular experimental em ratos. *Coluna/Columna*. 2011;10(4):305-8.
92. Cristante AF, Barros Filho TE, Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(10):1219-24.
93. Lammertse DP. Clinical trials in spinal cord injury: lessons learned on the path to translation. The 2011 International Spinal Cord Society Sir Ludwig Guttman Lecture. *Spinal Cord*. 2013;51(1):2-9.
94. do Vale Ramos RC, Alegrete N. The role of pharmacotherapy in modifying the neurological status of patients with spinal and spinal cord injuries. *Rev Bras Ortop*. 2015 Oct 1;50(6):617-24.
95. Marcon RM, Cristante AF, de Barros TE Filho, Ferreira R, Dos Santos GB. Effects of ganglioside G(M1) and erythropoietin on spinal cord lesions in rats: functional and histological evaluations. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(6):351-60.
96. Magistretti PJ, Geisler FH, Schneider JS, Li PA, Fiumelli H, Sipione S. Gangliosides: Treatment Avenues in Neurodegenerative Disease. *Front Neurol*. 2019;10:859.
97. Bourguignon L, Vo AK, Tong B, Geisler F, Mach O, Maier D, et al. Natural Progression of Routine Laboratory Markers after Spinal Trauma: A Longitudinal, Multi-Cohort Study. *J Neurotrauma*. 2021;38(15):2151-2161.
98. Geisler FH, Moghaddamjou A, Wilson JRF, Fehlings MG. Methylprednisolone in acute traumatic spinal cord injury: case-matched outcomes from the NASCIS2 and Sygen historical spinal cord injury studies with contemporary statistical analysis. *J Neurosurg Spine*. 2023;38(5):595-606.
99. Sherrod BA, Porche K, Condie CK, Dailey AT. Pharmacologic Therapy for Spinal Cord Injury. *Clin Spine Surg*. 2024;37(9):433-9.
100. Ren D, Li H, Liu X, Wang M. Clinical Efficacy of Ganglioside Combined with Methylprednisolone in the Treatment of Spinal Cord Injury and Its Effect on Inflammatory Response and Oxidative Stress Factors. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2025;35(2):238-41.
101. Migliorini F, Pilone M, Eschweiler J, Katusic D, Memminger MK, Maffulli N. Therapeutic strategies that modulate the acute phase of secondary spinal cord injury

- scarring and inflammation and improve injury outcomes. *Expert Rev Neurother.* 2025;25(4):477-90.
102. Bergel, S. Ueber wickungen des fibrins. *Dtsch. Med. Wochens.* 1909;35:663-5.
 103. Matras, H. Fibrin seal: the state of the art. *J. Oral Maxillofac Surg.* 1985;43:605-11.
 104. Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves: measurement of the rate of regeneration. *The Lancet.* 1940;3:126-8.
 105. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: an overview. *Am J Surg.* 2001;15:7S.
 106. Yu Z, Li H, Xia P, Kong W, Chang Y, Fu C, et al. Application of fibrin-based hydrogels for nerve protection and regeneration after spinal cord injury. *J Biol Eng.* 2020;14:22.
 107. Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. *Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia*, 4eds. Blackwell Publishing; 2009.
 108. Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87-91.
 109. Tebet MA. Efeito da metilprednisolona e do gangliosídeo GM-1 na lesão medular em ratos: Análise funcional e histológica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.
 110. New York University, Medical Center. Impactor. NYU spinal cord contusion system. Operation manual. Impactor software version 7.0. New York, 1993.
 111. 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.
 112. Erschbamer MK, Pham TM, Zwart MC, Baumans V, Olson L. Neither environmental enrichment nor voluntary wheel running enhances recovery from incomplete spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2006;201(1):154-64.
 113. Girgis J, Merrett D, Kirkland S, Metz GA, Verge V, Fouad K. Reaching training in rats with spinal cord injury promotes plasticity and task specific recovery. *Brain.* 2007;130(Pt 11):2993-3003.
 114. Krajacic A, Ghosh M, Puentes R, Pearse DD, Fouad K. Advantages of delaying the onset of rehabilitative reaching training in rats with incomplete spinal cord injury. *Eur J Neurosci.* 2009;29(3):641-51.
 115. RR, Brown EH, Shum-Siu A, Whelan A, Burke DA, Benton RL, et al. Swim training initiated acutely after spinal cord injury is ineffective and induces extravasation in and around the epicenter. *J Neurotrauma.* 2009;26(7):1017-27.
 116. Krajacic A, Weishaupt N, Girgis J, Tetzlaff W, Fouad K. Training-induced plasticity in rats with cervical spinal cord injury: Effects and side effects. *Behav Brain Res.* 2010;214(2):323-31.

117. McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models. 2nd ed. Chapman and Hall: New York, USA. 1989. p. 511.
118. Netter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman, W. Applied Linear Statistical Models. 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1996. p. 1408.
119. Diop M, Epstein D. A Systematic Review of the Impact of Spinal Cord Injury on Costs and Health-Related Quality of Life. *Pharmacoecon Open*. 2024;8(6):793-808.
120. Yari D, Saberi A, Salmasi Z, Ghoreishi SA, Etemad L, Movaffagh J, et al. Recent Advances in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Arch Bone Jt Surg*. 2024;12(6):380-99.
121. Venkatesh K, Ghosh SK, Mullick M, Manivasagam G, Sen D. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell Tissue Res*. 2019;377(2):125-51.
122. Lee BJ, Jeong JH. Review: Steroid Use in Patients With Acute Spinal Cord Injury and Guideline Update. *Korean J Neurotrauma*. 2022;18(1):22-30.
123. Campos MF, Ribeiro AT, Listik S, Pereira CAB, Andrade Sobrinho J, Rapoport A. Epidemiology of spine injuries. *Rev Col Bras Cir*. 2008;35(2):88-93.
124. Sygen [Internet]. São Paulo: TRB Pharma Indústria Química E Farmacêutica Ltda.; 1991 [cited 2025 01 29]. MS 103410003. Available from: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=sygen>
125. Spicer PP, Mikos AG. Fibrin glue as a drug delivery system. *J Control Release*. 2010;148(1):49-55.
126. Madsen SJ, Devarajan AG, Chandekar A, Nguyen L, Hirschberg H. Fibrin glue as a local drug and photosensitizer delivery system for photochemical internalization: Potential for bypassing the blood-brain barrier. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2023;41:103206.
127. Jin LY, Li J, Wang KF, Xia WW, Zhu ZQ, Wang CR, et al. Blood-Spinal Cord Barrier in Spinal Cord Injury: A Review. *J Neurotrauma*. 2021;38(9):1203-24.

ANEXOS

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



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito do gmi associado à cola de fibrina na lesão medular aguda em ratos**” registrada com o nº **1672/2021**, sob a responsabilidade de **Alexandre Fogaça Cristante e Rafael Ritter**, 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 27/10/2021.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 21-06-2021 Término: 28-08-2023
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	50
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério do ICB

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

CEUA-FMUSP, 27 de outubro de 2021

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

ANEXO B – Resultados avaliação motora BBB

Cola de Fibrina (CF)

Grupo 1	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	0	0	2	1	1	2	4	4	4	5	9	9	10	9	9	234	268	14.53%
RATO 2	1	1	1	1	2	2	2	2	6	6	12	8	12	12	12	244	276	13.11%
RATO 3	0	0	0	0	2	2	3	4	9	11	11	9	11	10	10	265	288	8.68%
RATO 4	0	0	1	1	2	1	2	3	6	8	8	7	8	9	8	321	344	7.17%
RATO 5	0	0	1	0	2	3	3	3	5	7	8	7	7	7	7	332	339	2.11%
RATO 6	1	0	2	1	2	2	2	2	4	6	7	7	8	7	7	344	354	2.91%
RATO 7	0	0	0	0	3	2	2	2	3	4	4	6	6	8	7	321	365	13.71%
RATO 8	1	1	2	2	3	4	4	4	7	7	6	5	7	6	6	354	366	3.39%
RATO 9	0	0	1	1	2	3	4	4	4	6	6	7	8	9	8	298	312	4.70%
RATO 10	1	2	2	2	3	4	5	4	4	4	4	5	6	5	7	267	288	7.82%

CF + GM1 30 mg/kg

Grupo 2	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	0	0	0	0	2	2	3	2	3	3	5	5	8	8	8	305	333	9.18%
RATO 2	0	0	1	1	3	3	3	3	6	6	8	8	10	10	10	324	354	9.26%
RATO 3	0	0	2	2	2	2	4	4	6	6	8	8	11	11	11	300	321	7.00%
RATO 4	0	0	1	1	3	3	6	6	8	8	8	8	11	12	12	309	321	3.88%
RATO 5	0	0	0	0	3	3	5	5	5	5	8	8	9	10	9	267	303	13.48%
RATO 6	0	1	1	2	2	2	4	4	4	6	8	8	9	9	9	312	334	7.05%
RATO 7	1	1	2	2	4	4	6	6	8	8	12	12	12	12	12	298	356	19.46%
RATO 8	1	1	3	2	4	4	6	6	6	6	8	8	10	11	10	332	342	3.01%
RATO 9	0	0	0	0	2	3	4	4	6	6	8	8	10	9	9	311	328	5.47%
RATO 10	0	0	2	2	5	5	6	6	8	8	8	8	10	10	10	288	305	5.90%

CF + GM1 40 mg/kg

Grupo 3	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	0	0	0	1	4	4	8	8	9	7	9	8	10	10	10	302	324	7.28%
RATO 2	2	2	0	1	5	5	7	6	8	8	8	8	15	14	15	255	277	8.63%
RATO 3	0	0	0	0	4	3	7	4	8	8	8	9	12	11	12	288	305	5.90%
RATO 4	1	1	1	1	4	4	4	4	6	5	8	8	14	15	14	267	290	8.61%
RATO 5	0	0	1	0	2	4	6	6	6	6	7	8	12	12	12	305	332	8.85%
RATO 6	1	0	1	1	2	2	8	8	8	9	9	9	10	10	10	322	340	5.59%
RATO 7	0	0	0	0	3	3	5	5	8	7	9	9	14	12	13	277	295	6.50%
RATO 8	1	2	2	1	5	4	4	4	9	9	11	10	12	12	12	323	355	9.91%
RATO 9	0	0	1	1	5	3	6	6	8	8	9	9	11	12	12	330	350	6.06%
RATO 10	0	0	0	1	3	3	7	7	10	11	11	11	12	11	11	278	300	7.91%

CF + GM1 50 mg/kg

Grupo 4	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	0	0	0	1	4	4	8	8	9	7	9	8	9	9	9	276	312	13.04%
RATO 2	2	2	0	1	5	5	7	6	8	8	8	8	12	14	13	256	277	8.20%
RATO 3	0	0	0	0	4	3	7	4	8	8	8	9	10	10	10	298	312	4.70%
RATO 4	1	1	1	1	4	4	4	4	6	5	6	6	8	8	8	288	310	7.64%
RATO 5	0	0	1	0	2	4	6	6	6	6	7	8	9	9	9	266	321	20.68%
RATO 6	1	0	1	1	2	2	8	8	8	9	9	9	10	10	10	298	332	11.41%
RATO 7	0	0	0	0	3	3	5	5	8	7	9	9	9	9	9	335	356	6.27%
RATO 8	1	2	2	1	5	4	4	4	9	9	11	10	12	12	12	324	353	8.95%
RATO 9	0	0	1	1	5	3	6	6	8	8	9	9	9	10	9	287	325	13.24%
RATO 10	0	0	0	1	3	3	7	7	10	11	11	11	12	13	10	304	325	-6.91%

Sham

Grupo 5	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	297	345	16.16%
RATO 2	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	301	355	17.94%
RATO 3	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	288	324	12.50%
RATO 4	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	295	332	12.54%
RATO 5	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	312	342	9.62%
RATO 6	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	322	365	13.35%
RATO 7	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	288	322	11.81%
RATO 8	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	304	365	20.07%
RATO 9	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	312	354	13.46%
RATO 10	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	314	358	14.01%

ANEXO C – Resultados do plano horizontal

PRÉ-OPERATÓRIO									
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR 1 - 1	48	47	1	0	GR2 - 1	45	45	0	0
GR 1 - 2	43	43	0	0	GR 2 - 2	44	44	0	0
GR1 - 3	48	48	0	0	GR2 - 3	47	45	2	0
GR1 - 4	45	45	0	0	GR2 - 4	47	45	1	1
GR1 - 5	46	44	2	0	GR2 - 5	48	47	1	0
GR1 - 6	48	47	1	0	GR2 - 6	49	47	2	0
GR1 - 7	45	44	1	0	GR2 - 7	47	45	1	1
GR1 - 8	48	47	1	0	GR2 - 8	45	45	0	0
GR1 - 9	46	46	0	0	GR2 - 9	46	44	2	0
GR1-10	44	43	1	0	GR2 - 10	48	47	1	0
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR3 - 1	49	48	1	0	GR4 - 1	45	44	1	0
GR3 - 2	48	46	2	0	GR4 - 2	47	44	2	1
GR3 - 3	46	45	1	0	GR4 - 3	48	47	1	0
GR3 - 4	45	45	0	0	GR4 - 4	45	44	1	0
GR3 - 5	48	47	1	0	GR4 - 5	46	46	0	0
GR3 - 6	47	45	2	0	GR4 - 6	47	45	1	1
GR3 - 7	48	46	1	1	GR4 - 7	48	45	2	1
GR3 - 8	43	43	0	0	GR4 - 8	46	45	1	0
GR3 - 9	44	42	1	1	GR4 - 9	47	46	1	0
GR3- 10	45	44	1	0	GR4 - 10	48	46	1	1
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS					
GR5 - 1	43	40	1	2					
GR5 - 2	45	43	1	1					
GR5 - 3	44	44	0	0					
GR5 - 4	46	45	1	0					
GR5 - 5	44	42	1	1					
GR5 - 6	43	42	0	1					
GR5 - 7	47	45	1	1					
GR5 - 8	46	43	2	1					
GR5 - 9	45	43	1	1					
GR5 - 10	44	44	0	0					

SEMANA 3									
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR 1 - 1	X	X	X	X	GR 2 - 1	X	X	X	X
GR 1 - 2	X	X	X	X	GR 2 - 2	X	X	X	X
GR1 - 3	X	X	X	X	GR2 - 3	X	X	X	X
GR1 - 4	X	X	X	X	GR2 - 4	X	X	X	X
GR1 - 5	X	X	X	X	GR2 - 5	X	X	X	X
GR1 - 6	X	X	X	X	GR2 - 6	X	X	X	X
GR1 - 7	X	X	X	X	GR2 - 7	X	X	X	X
GR1 - 8	X	X	X	X	GR2 - 8	X	X	X	X
GR1 - 9	X	X	X	X	GR2 - 9	X	X	X	X
GR1 - 10	x	x	x	x	GR2 - 10	x	x	x	x
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR3 - 1	X	X	X	X	GR4 - 1	X	X	X	X
GR3 - 2	X	X	X	X	GR4 - 2	X	X	X	X
GR3 - 3	X	X	X	X	GR4 - 3	X	X	X	X
GR3 - 4	X	X	X	X	GR4 - 4	X	X	X	X
GR3 - 5	X	X	X	X	GR4 - 5	X	X	X	X
GR3 - 6	X	X	X	X	GR4 - 6	X	X	X	X
GR3 - 7	X	X	X	X	GR4 - 7	X	X	X	X
GR3 - 8	X	X	X	X	GR4 - 8	X	X	X	X
GR3 - 9	X	X	X	X	GR4 - 9	X	X	X	X
GR3- 10	x	x	x	x	GR4 - 10	x	x	x	x
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS					
GR5 - 1	43	40	1	2					
GR5 - 2	45	43	1	1					
GR5 - 3	44	44	0	0					
GR5 - 4	46	45	1	0					
GR5 - 5	44	42	1	1					
GR5 - 6	43	42	0	1					
GR5 - 7	47	45	1	1					
GR5 - 8	46	43	2	1					
GR5 - 9	45	43	1	1					
GR5 - 10	44	44	0	0					

SEMANA 4									
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR 1 - 1	x	x	x	x	GR2 - 1	2	1	1	0
GR 1 - 2	x	x	x	x	GR 2 - 2	X	X	X	X
GR1 - 3	0	0	0	0	GR2 - 3	4	2	1	1
GR1 - 4	0	0	0	0	GR2 - 4	X	X	X	X
GR1 - 5	x	x	x	x	GR2 - 5	4	3	1	0
GR1 - 6	4	3	1	0	GR2 - 6	X	X	X	X
GR1 - 7	X	X	X	X	GR2 - 7	5	3	1	1
GR1 - 8	5	4	1	0	GR2 - 8	X	X	X	X
GR1 - 9	X	X	X	X	GR2 - 9	3	1	1	1
GR1 - 10	X	X	X	X	GR2 - 10	x	x	x	x
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR3 - 1	4	2	1	1	GR4 - 1	4	3	1	0
GR3 - 2	5	4	3	1	GR4 - 2	5	4	3	1
GR3 - 3	X	X	X	X	GR4 - 3	4	3	1	0
GR3 - 4	2	1	1	0	GR4 - 4	3	2	1	0
GR3 - 5	4	2	1	1	GR4 - 5	6	3	2	1
GR3 - 6	3	2	1	0	GR4 - 6	6	4	1	1
GR3 - 7	4	2	1	1	GR4 - 7	5	4	1	0
GR3 - 8	6	4	1	1	GR4 - 8	3	2	0	1
GR3 - 9	5	3	1	1	GR4 - 9	X	X	X	X
GR3- 10	2	1	1	0	GR4 - 10	4	3	1	2
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS					
GR5 - 1	47	45	2	0					
GR5 - 2	45	43	1	1					
GR5 - 3	48	46	1	1					
GR5 - 4	47	47	0	0					
GR5 - 5	44	43	1	0					
GR5 - 6	47	45	1	1					
GR5 - 7	49	48	1	0					
GR5 - 8	50	48	1	1					
GR5 - 9	47	45	1	1					
GR5 - 10	45	45	0	0					

SEMANA 5									
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR 1 - 1	3	2	1	0	GR 2 - 1	4	3	1	0
GR 1 - 2	4	2	2	0	GR 2 - 2	3	2	1	0
GR1 - 3	5	3	1	1	GR2 - 3	6	4	1	1
GR1 - 4	4	2	1	1	GR2 - 4	5	3	1	1
GR1 - 5	6	4	1	1	GR2 - 5	6	5	1	0
GR1 - 6	6	4	1	1	GR2 - 6	3	1	1	1
GR1 - 7	3	2	1	0	GR2 - 7	5	3	1	1
GR1 - 8	7	6	1	0	GR2 - 8	3	2	1	0
GR1 - 9	2	1	1	0	GR2 - 9	5	2	2	3
GR1 - 10	3	2	1	0	GR2 - 10	x	x	x	x
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR3 - 1	6	5	1	0	GR4 - 1	6	5	1	0
GR3 - 2	12	11	1	0	GR4 - 2	7	6	1	0
GR3 - 3	8	6	1	1	GR4 - 3	8	7	1	0
GR3 - 4	10	9	1	0	GR4 - 4	6	5	0	1
GR3 - 5	5	2	1	2	GR4 - 5	8	6	1	1
GR3 - 6	7	5	1	1	GR4 - 6	10	8	1	1
GR3 - 7	8	7	1	0	GR4 - 7	6	4	1	0
GR3 - 8	8	6	1	1	GR4 - 8	8	6	1	1
GR3 - 9	10	7	2	1	GR4 - 9	9	8	1	0
GR3- 10	11	10	1	0	GR4 - 10	10	8	1	1
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS					
GR5 - 1	46	44	1	1					
GR5 - 2	48	45	2	1					
GR5 - 3	45	43	1	1					
GR5 - 4	47	47	0	0					
GR5 - 5	46	44	1	1					
GR5 - 6	43	41	1	1					
GR5 - 7	48	48	0	0					
GR5 - 8	45	44	1	0					
GR5 - 9	44	43	1	0					
GR5 - 10	47	46	0	1					

SEMANA 6									
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR 1 - 1	6	5	1	0	GR2 - 1	8	6	1	1
GR 1 - 2	8	6	2	0	GR 2 - 2	6	4	1	1
GR1 - 3	6	5	1	0	GR2 - 3	8	7	1	0
GR1 - 4	8	7	1	0	GR2 - 4	6	5	1	0
GR1 - 5	8	6	1	1	GR2 - 5	10	8	2	0
GR1 - 6	7	5	1	0	GR2 - 6	6	5	0	1
GR1 - 7	6	5	1	0	GR2 - 7	8	5	1	0
GR1 - 8	7	6	1	0	GR2 - 8	11	8	2	1
GR1 - 9	6	5	1	0	GR2 - 9	10	9	1	0
GR1 - 10	6	4	1	1	GR2 - 10	8	5	2	1
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS		PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS
GR3 - 1	10	8	1	1	GR4 - 1	12	11	1	0
GR3 - 2	14	13	1	0	GR4 - 2	8	7	1	0
GR3 - 3	10	9	1	0	GR4 - 3	12	11	0	1
GR3 - 4	15	14	1	0	GR4 - 4	11	10	X	1
GR3 - 5	14	13	1	0	GR4 - 5	8	6	2	0
GR3 - 6	12	11	1	0	GR4 - 6	11	8	1	2
GR3 - 7	12	11	1	0	GR4 - 7	13	12	1	0
GR3 - 8	10	8	1	1	GR4 - 8	14	12	1	1
GR3 - 9	14	13	1	0	GR4 - 9	12	10	1	1
GR3- 10	12	11	1	0	GR4 - 10	15	14	1	0
	PASSOS	ACERTOS	ESCORRE	ERROS					
GR5 - 1	45	44	1	0					
GR5 - 2	44	43	0	1					
GR5 - 3	47	45	2	0					
GR5 - 4	45	44	1	0					
GR5 - 5	47	46	0	1					
GR5 - 6	45	45	0	0					
GR5 - 7	49	48	1	0					
GR5 - 8	50	47	2	1					
GR5 - 9	48	48	0	0					
GR5 - 10	44	44	0	0					

ANEXO D – Resultados da histologia

Variáveis			Escore: 0 - 3	
Necrose				
Hemorragia			0 - Ausente	
Hiperemia			1 - Discreto	
Degeneração Da Subst. Neural			2 - Moderado	
Infiltrado Celular			3 - intenso	
Grupo 1			Grupo 1	
1 - HE			6 - HE	
Necrose	1		Necrose	2
Hemorragia	2		Hemorragia	1
Hiperemia	2		Hiperemia	2
Degeneração	2		Degeneração	2
Infiltrado Celular	1		Infiltrado Celular	0
Grupo 1			Grupo 1	
2 - HE			7 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	2
Hiperemia	1		Hiperemia	0
Degeneração	1		Degeneração	2
Infiltrado Celular	2		Infiltrado Celular	0
Grupo 1			Grupo 1	
3 - HE			8 - HE	
Necrose	2		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	2
Hiperemia	2		Hiperemia	3
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	2
Grupo 1			Grupo 1	
4 - HE			9 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	2
Hiperemia	2		Hiperemia	2
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	2		Infiltrado Celular	0
Grupo 1			Grupo 1	
5 - HE			10 - HE	
	2			
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	3		Hiperemia	2
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	2		Infiltrado Celular	1

Grupo 2			Grupo 2	
1 - HE			6 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	2		Hiperemia	2
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	2
Grupo 2			Grupo 2	
2 - HE			7 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	0		Hemorragia	1
Hiperemia	0		Hiperemia	1
Degeneração	1		Degeneração	2
Infiltrado Celular	2		Infiltrado Celular	0
Grupo 2			Grupo 2	
3 - HE			8 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	1		Hiperemia	0
Degeneração	1		Degeneração	2
Infiltrado Celular	2		Infiltrado Celular	1
Grupo 2			Grupo 2	
4 - HE			9 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	2
Hiperemia	1		Hiperemia	0
Degeneração	2		Degeneração	1
Infiltrado Celular	1		Infiltrado Celular	0
Grupo 2			Grupo 2	
5 - HE			10 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	3
Hiperemia	2		Hiperemia	2
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	1

Grupo 3			Grupo 3	
1 - HE			6 - HE	
Necrose	2		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	1		Hiperemia	2
Degeneração	2		Degeneração	2
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	1
Grupo 3			Grupo 3	
2 - HE			7 - HE	
Necrose	1		Necrose	2
Hemorragia	2		Hemorragia	1
Hiperemia	1		Hiperemia	1
Degeneração	0		Degeneração	2
Infiltrado Celular	1		Infiltrado Celular	1
Grupo 3			Grupo 3	
3 - HE			8 - HE	
Necrose	2		Necrose	1
Hemorragia	1		Hemorragia	2
Hiperemia	2		Hiperemia	1
Degeneração	0		Degeneração	1
Infiltrado Celular	1		Infiltrado Celular	0
Grupo 3			Grupo 3	
4 - HE			9 - HE	
Necrose	0		Necrose	2
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	0		Hiperemia	0
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	1		Infiltrado Celular	0
Grupo 3			Grupo 3	
5 - HE			10 - HE	
Necrose	2		Necrose	2
Hemorragia	1		Hemorragia	0
Hiperemia	1		Hiperemia	1
Degeneração	1		Degeneração	0
Infiltrado Celular	1		Infiltrado Celular	0

Grupo 4			Grupo 4	
1 - HE			6 - HE	
Necrose	1		Necrose	0
Hemorragia	0		Hemorragia	1
Hiperemia	1		Hiperemia	0
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0
Grupo 4			Grupo 4	
2 - HE			7 - HE	
Necrose	2		Necrose	0
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	2		Hiperemia	1
Degeneração	0		Degeneração	1
Infiltrado Celular	1		Infiltrado Celular	0
Grupo 4			Grupo 4	
3 - HE			8 - HE	
Necrose	1		Necrose	0
Hemorragia	0		Hemorragia	0
Hiperemia	0		Hiperemia	1
Degeneração	1		Degeneração	1
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0
Grupo 4			Grupo 4	
4 - HE			9 - HE	
Necrose	1		Necrose	0
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	0		Hiperemia	1
Degeneração	1		Degeneração	2
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0
Grupo 4			Grupo 4	
5 - HE			10 - HE	
Necrose	1		Necrose	1
Hemorragia	2		Hemorragia	1
Hiperemia	1		Hiperemia	1
Degeneração	1		Degeneração	0
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	2

Grupo 5			Grupo 5	
1 - HE			6 - HE	
Necrose	0		Necrose	0
Hemorragia	0		Hemorragia	1
Hiperemia	1		Hiperemia	0
Degeneração	0		Degeneração	0
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0
Grupo 5			Grupo 5	
2 - HE			7 - HE	
Necrose	0		Necrose	0
Hemorragia	0		Hemorragia	0
Hiperemia	1		Hiperemia	0
Degeneração	0		Degeneração	0
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0
Grupo 5			Grupo 5	
3 - HE			8 - HE	
Necrose	0		Necrose	0
Hemorragia	0		Hemorragia	0
Hiperemia	0		Hiperemia	1
Degeneração	0		Degeneração	0
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0
Grupo 5			Grupo 5	
4 - HE			9 - HE	
Necrose	0		Necrose	0
Hemorragia	1		Hemorragia	1
Hiperemia	0		Hiperemia	0
Degeneração	0		Degeneração	0
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0
Grupo 5			Grupo 5	
5 - HE			10 - HE	
Necrose	0		Necrose	0
Hemorragia	0		Hemorragia	0
Hiperemia	0		Hiperemia	1
Degeneração	0		Degeneração	0
Infiltrado Celular	0		Infiltrado Celular	0

ANEXO E – Resultados da imuno-histoquímica

Dados de avaliação de cada amostra:

Amostra 1-1:

- TECIDO MEDULAR COM ÁREA DE HEMORRAGIA NA SUBSTÂNCIA BRANCA.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 30% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 40% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 1-2:

- TECIDO MEDULAR SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 60% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 50% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 1-9:

- TECIDO MEDULAR SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 50% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 42% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 2-1:

- TECIDO MEDULAR COM PRESENÇA DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIO, SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 76% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 50% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 2-5:

- TECIDO MEDULAR COM ÁREA DE HEMORRAGIA CENTRAL.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 40% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 30% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 2-10:

- TECIDO MEDULAR SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 70% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 50% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 3-4:

- TECIDO MEDULAR SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 70% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 50% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 3-6:

- TECIDO MEDULAR SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 60% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 40% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 3-8:

- TECIDO MEDULAR SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 70% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 40% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 4-1:

- TECIDO MEDULAR COM ÁREA DE HEMORRAGIA NA SUBSTÂNCIA BRANCA.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 30% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 40% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 4-7:

- TECIDO MEDULAR COM PRESENÇA DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIO, SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
Olig2	POSITIVO EM 60% DAS CÉLULAS (nuclear).
GFAP	POSITIVO EM 40% DAS CÉLULAS (citoplasmático).

Amostra 4-8:

- TECIDO MEDULAR SEM PARTICULARIDADES HISTOLÓGICAS.

Antígeno (imuno-histoquímica)	Resultado
GFAP	POSITIVO EM 70% DAS CÉLULAS (citoplasmático).
Olig2	POSITIVO EM 30% DAS CÉLULAS (nuclear).

ANEXO F – Resultados da bexiga neurogênica

Identif	Rato	Grupo	Tempo de bexiga neurogênica (dias)
1	RATO 1	1	35
2	RATO 2	1	42
3	RATO 3	1	35
4	RATO 4	1	35
5	RATO 5	1	35
6	RATO 6	1	28
7	RATO 7	1	35
8	RATO 8	1	35
9	RATO 9	1	35
10	RATO 10	1	35
11	RATO 1	2	35
12	RATO 2	2	35
13	RATO 3	2	14
14	RATO 4	2	14
15	RATO 5	2	35
16	RATO 6	2	35
17	RATO 7	2	7
18	RATO 8	2	28
19	RATO 9	2	35
20	RATO 10	2	28
21	RATO 1	3	14
22	RATO 2	3	14
23	RATO 3	3	28
24	RATO 4	3	28
25	RATO 5	3	28
26	RATO 6	3	28
27	RATO 7	3	7
28	RATO 8	3	14
29	RATO 9	3	7
30	RATO 10	3	28
31	RATO 1	4	28
32	RATO 2	4	28
33	RATO 3	4	28
34	RATO 4	4	21
35	RATO 5	4	28
36	RATO 6	4	28
37	RATO 7	4	28
38	RATO 8	4	21
39	RATO 9	4	28
40	RATO 10	4	28
41	RATO 1	5	0
42	RATO 2	5	0
43	RATO 3	5	0
44	RATO 4	5	0
45	RATO 5	5	0
46	RATO 6	5	0
47	RATO 7	5	0
48	RATO 8	5	0
49	RATO 9	5	0
50	RATO 10	5	0