

# MONOSSIALOGLANGLIOSÍDEO TRANSDÉRMICO COM LASER NO TRATAMENTO DE LESÃO MEDULAR ESPINAL DE RATOS

TRANSDERMAL MONOSSIALOGLANGLIOSIDE WITH LASER IN THE TREATMENT OF SPINAL CORD LESION IN RATS

FABIANO INÁCIO DE SOUZA<sup>1</sup>, ALEXANDRE FOGAÇA CRISTANTE<sup>1</sup>, RAPHAEL MARTUS MARCON<sup>1</sup>, RICARDO FERREIRA<sup>1</sup>, GUSTAVO BISPO DOS SANTOS<sup>1</sup>, TARCÍSIO ELOY PESSOA DE BARROS FILHO<sup>1</sup>

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar os efeitos de monossialogangliosídeos (GM1) administrados com laser por via transdérmica na recuperação da lesão da medula espinal de ratos. **Métodos:** Quarenta ratos Wistar machos foram submetidos a contusão da medula espinal usando NYU Impactor. No Grupo 1, os ratos receberam 0,2 ml de solução salina diária por via intraperitoneal; no Grupo 2, GM1 foi administrada intraperitonealmente em concentração de 30 mg/kg por dia; no Grupo 3, os ratos foram tratados diariamente com o laser a baixa temperatura sobre a pele, e no Grupo 4, a sessão de laser diária também continha GM1. Todos os grupos foram tratados durante 42 dias. Os animais foram avaliados pela escala funcional de Basso, Baettie e Bresnahan (BBB) nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a lesão, e por histopatologia e potencial motor evocado 42 dias depois da lesão. **Resultados:** Os animais do Grupo 4 apresentaram escores BBB mais elevados em comparação com os outros grupos. Não houve diferenças entre os grupos ou nas comparações ao longo do tempo. A avaliação histológica não mostrou diferenças, e tampouco foram encontradas diferenças significativas no potencial evocado. **Conclusão:** A GM1 associada ao uso de laser a baixa temperatura não mostra resultados superiores no tratamento de lesões da medula espinal de ratos. **Nível de Evidência I, Experimental, Estudo Controlado de Animais.**

**Descritores:** Traumatismos da medula espinal. Contusões. Gangliosídeo G(M1). Laser.

## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate the effects of monossialoganglioside (GM1) administered transdermally with laser in the recovery of spinal cord injury in rats. **Methods:** Forty male Wistar rats underwent spinal cord contusion using the NYU Impactor. In Group 1, the rats received 0,2 ml of saline intraperitoneally daily; in Group 2, GM1 was administered intraperitoneally at a concentration of 30 mg/kg per day; in Group 3, rats were treated daily with laser at low temperature on the skin, and in Group 4, the daily laser session also contained GM1. All the groups were treated for 42 days. The animals were evaluated by the Basso, Baettie and Bresnahan (BBB) functional scale on days 7, 14, 21, 28, 35 and 42 after the injury, and by histopathology and motor evoked potential after 42 days of injury. **Results:** The animals in Group 4 had higher BBB scores compared with the other groups. There were no differences between the groups, or in the comparisons over time. Histological evaluation showed no differences, and no differences were found in the motor evoked potential tests either. **Conclusion:** GM1 associated with the use of low-temperature laser shows no superior functional, neurological or histological results in the treatment of spinal cord lesions in rats. **Evidence Level I, Experimental, Controlled, Animal Study.**

**Keywords:** Spinal cord injuries. Contusions. G(M1) ganglioside. Lasers.

**Citação:** Souza FI, Cristante AF, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB, Barros Filho TE. Monossialogangliosídeo transdérmico com laser no tratamento de lesão medular espinal de ratos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(2):87-91. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

**Citation:** Souza FI, Cristante AF, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB, Barros Filho TE. Transdermal monossialoganglioside with laser in the treatment of spinal cord lesion in rats. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(2):87-91. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

## INTRODUÇÃO

Existem poucos métodos para o tratamento das lesões de medula espinal e não há um tratamento realmente eficaz.<sup>1</sup> O tratamento cirúrgico para estabilização mecânica e descompressão pode ser realizado nos casos de fraturas instáveis com lesão de medula, e

o uso de medicamentos para tratar essas lesões foi extensamente estudado. As experiências com uso de substâncias químicas são realizadas visando principalmente a promoção de regeneração nervosa e na tentativa de desativar ou reduzir a cascata de eventos secundários que segue as lesões de medula espinal. Contudo,

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Department of Orthopaedics and Traumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Trabalho realizado no LIM 41 – Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo Esquelético do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, São Paulo, SP, Brasil.  
Correspondência: Alexandre Fogaça Cristante. Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 333. CEP. 05403-010. São Paulo. SP. Brasil. [aacristante@uol.com.br](mailto:aacristante@uol.com.br)

Artigo recebido em 23/07/2012, aprovado em 09/10/2012.

apenas dois desses medicamentos já são usados na clínica: monossialogangliosídeo (GM1) e metilprednisolona,<sup>2</sup> embora não exista consenso quanto aos benefícios de sua indicação.<sup>3</sup>

O GM1 é um agente antineurotóxico, anti-inflamatório e neuroprotetor, essencial para a excitabilidade neuronal das fibras mielinizadas e não-mielinizadas. Também promove desenvolvimento, crescimento, diferenciação e amadurecimento neuronal e reduz a intensidade da degeneração Walleriana.<sup>4</sup>

Muitos pesquisadores também defendem o uso de meios físicos no tratamento das lesões da medula, na tentativa de obter melhores resultados. A hipotermia é uma dessas alternativas; reduz o metabolismo e o consumo de energia pós-traumático, reduzindo a intensidade das lesões secundárias, a hipóxia e a isquemia, assim como a apoptose de neurônios e células gliais.<sup>5-7</sup>

Recentemente, foi desenvolvido na Itália um novo tipo de laser usado para administração de medicamentos, (Laser Ice Med). O laser permite penetração transcutânea de partículas misturadas em gel em baixa temperatura, por meio de raios paralelos de comprimento de onda de 635 nm e 50 mW de potência. Santos *et al.*<sup>8</sup> apresentou, no Congresso Europeu de Neurociência, sua pesquisa sobre os efeitos do laser com GM1 sobre lesão nervosa periférica da medula espinal associada a trauma em ratos Wistar. O GM1, administrado diariamente por via transdérmica durante 60 dias, resultou em regeneração superior à do grupo controle nas avaliações histológica e funcional dos nervos isquiáticos e na medula.<sup>8</sup> Os resultados de cada terapia com GM1 e "laser ice", porém, ainda não são satisfatórios, o que nos induziu a estudar a possível sinergia entre eles. A possibilidade de a baixa temperatura melhorar os resultados da medicação, como ocorre em outros campos da medicina, deve ser investigada como uma oportunidade para tratar as lesões da medula espinal. O objetivo deste estudo foi, portanto, avaliar os efeitos do monossialogangliosídeo (GM1) administrado por via transdérmica e do laser a baixas temperaturas sobre a recuperação funcional e histológica das lesões medulares em ratos.

## MÉTODOS

### Desenho do estudo e ética

Neste estudo experimental controlado por placebo, foram seguidas todas as regulamentações institucionais e governamentais sobre o uso ético de animais. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição e os procedimentos estão de acordo com os protocolos de pesquisa. Os animais do estudo, uma vez anestesiados, foram submetidos a laminectomia e a um modelo de lesão experimental da medula espinal, seguidos pela terapia com monossialo-tetra-hexosil gangliosídeo (GM1) e laser em baixa temperatura ou ambas. Foram, a seguir, comparados com um grupo controle que recebeu placebo, sendo avaliados em termos funcionais e por potencial evocado somatossensorial, quanto aos efeitos do tratamento sobre a recuperação da lesão da medula espinal.

### Animais e procedimento anestésico

Foram usados quarenta ratos Wistar machos com idade entre 20 e 21 semanas, pesando 300 a 340 gramas neste estudo. Os ratos que morreram em qualquer momento depois da lesão experimental da medula foram excluídos. Os animais que apresentaram anomalias medulares macroscópicas (malformações) detectadas durante o procedimento cirúrgico ou os que ainda apresentavam movimento normal depois da lesão (ausência de paraplegia) também foram excluídos. Os ratos foram anestesiados antes dos procedimentos de laminectomia e lesão medular com uma dose de 55 to 75 mg/kg de peso corporal de pentobarbital sódico por via intraperitoneal. O efeito anestésico foi obtido em cinco minutos e durou pelo menos 60 mi-

nutos. No final da experiência, os ratos foram pesados e submetidos a eutanásia com dose letal de pentobarbital (140 mg/kg), por via intraperitoneal. Todos os ratos foram examinados macroscopicamente e realizou-se análise histopatológica.

### Laminectomia e lesão da medula espinal

O método da laminectomia já foi descrito.<sup>9,10</sup> O processo espinhoso e as lâminas das vértebras T8 e T11 foram removidos para expor a medula espinal, de modo a se proceder à lesão.

Adotou-se o protocolo multicêntrico de lesão de medula espinal MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), padronizado para ratos Wistar.<sup>9-11</sup> A lesão foi produzida com o dispositivo NYU Impactor (New York University Spinal Cord Contusion System), com um peso de queda de 10 g, que comprime a medula espinal por 15 segundos. A altura foi padronizada em 25 mm.<sup>12,13</sup> O dispositivo foi ajustado para produzir impacto entre a margem superior de T9 e a margem inferior de T10.

Os animais receberam cefalotina profilática por via subcutânea (25 mg/kg de peso corporal) imediatamente e, a seguir, uma vez por dia nos sete dias seguintes, para evitar infecção da ferida ou do trato urinário. Assim que se recuperaram da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas com grupos de cinco, com acesso a alimentação e água *ad libitum*.

### Grupos e tratamentos

Os animais foram divididos manualmente em quatro grupos, com dez animais cada um:

O grupo 1 recebeu apenas solução salina intraperitoneal (0,2 ml por dia) e foi considerado o grupo controle;

O grupo 2 recebeu 30 mg/kg de peso corporal de GM1 (TRB Pharma, Campinas, São Paulo, Brasil) diluídos em 0,2 ml de solução salina, administrado por via intraperitoneal diariamente;

O grupo 3 recebeu apenas terapia com laser, sem GM1, durante três minutos por dia;

O grupo 4 recebeu laser durante três minutos por dia com GM1 na concentração de 30 mg/kg.

Todos os grupos foram tratados por 42 dias. A dose de 30 mg/kg por dia de GM1 foi calculada de acordo com a dissolução do gel contido no tubo do laser e com o número de animais tratados em cada tubo.<sup>14,15</sup>

O dispositivo do laser liga-se a um tubo cheio de gel à base de água congelado, que causa hipotermia local. No grupo 4, o GM1 foi misturado com o gel no dia anterior à administração.

### Avaliação funcional

A recuperação da lesão da medula espinal foi avaliada pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), que varia de 0 a 21 pontos de cada lado.<sup>11</sup> A avaliação foi realizada simultaneamente por dois observadores treinados, que não conheciam o código de randomização do procedimento administrada a cada rato. A avaliação foi realizada nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 depois da cirurgia. No caso de discordância, registrava-se o valor mais baixo. Cada avaliação demorou quatro a cinco minutos por animal.

Os animais foram anestesiados novamente para a avaliação do potencial evocado, conforme descrição de Ferreira *et al.*<sup>16</sup>

### Necropsia e análise histológica

O segmento da coluna de T8 a T12 (osso e partes moles) foi removido dos ratos e se realizou uma avaliação visual macroscópica da medula espinal no local da contusão para verificar qualquer anomalia. A medula foi então removida e enviada para análise microscópica. Os cortes histológicos transversais foram feitos no plano axial do segmento da medula, com 2 mm de espessura e 1 cm a partir do centro da lesão, proximal e distalmente. Esse material foi processado e incluído em parafina.

Foram feitos cortes histológicos de cinco micra de espessura, 5 mm acima e abaixo da área central da lesão. O material foi então fixado em lâminas, corado com hematoxilina-eosina, sendo três lâminas para cada medula espinal: uma da região proximal à lesão, uma central e uma da região distal à lesão, representando, portanto toda a área danificada.

As variáveis avaliadas foram: necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração de substância nervosa (degeneração cística) e infiltração celular. Foram avaliadas como ausentes (0), leves (1), moderadas (2) e intensas (3), gerando um escore entre 0 e 15.<sup>13,17</sup> o exame anatomopatológico foi realizado por um único patologista que não conhecia o código de randomização dos grupos.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os escores BBB médios foram comparados usando-se modelo de efeitos mistos com dois fatores: grupo e semana de avaliação, considerando-se as medidas repetidas durante as semanas. O efeito de interação entre esses fatores também foi avaliado. O modelo de efeitos mistos foi adaptado, considerando-se matrizes de covariâncias iguais nos diferentes grupos e um formulário não estruturado. Inicialmente, as distribuições das medidas de amplitude e latência do teste de potencial evocado nos quatro grupos do estudo foram comparados usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A análise de variância (ANOVA) foi então usada para comparar as amplitudes e latências médias dos diferentes grupos.

A associação entre o nível de escore e os grupos foi avaliada com o teste exato de Fisher. Os valores de  $p$  inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## RESULTADOS

Durante o período do estudo, ocorreram nove mortes. A causa da morte foi identificada como autofagia em seis casos e indeterminada em três. Portanto, o estudo foi concluído com 31 animais: oito no grupo 1, sete no grupo 2, sete no grupo 3 e nove no grupo 4. Não houve associação entre as mortes e a alocação nos grupos ( $p = 1,000$ , teste exato de Fisher). O peso médio dos animais foi 347 g, variando de 311 g a 402 g no final da experiência.

### Avaliação funcional

A Tabela 1 mostra as medidas descritivas do escore BBB para cada grupo do estudo e semana de avaliação, com ampla variação dos dados no decorrer de várias semanas. Esse fenômeno foi observado em todos os grupos e, no geral, o escore BBB médio (e o desvio padrão) aumentou de 0,9 (1,4) na primeira semana para 12,7 (4,4) na sexta semana de observação. O grupo 4 teve valores médios mais altos da segunda à quinta semana. Na sexta semana, o grupo 1 se destacou dos demais, com a maior média observada no estudo (14,8).

O ajuste do modelo indicou efeito de interação significativa entre grupo e semana, com  $p < 0,001$ . Portanto, a comparação entre grupos teve de ser feita em cada semana, e a comparação no decorrer das semanas teve de ser feita em cada grupo. Os resultados dessas comparações são apresentados na Tabela 2, e mostram que: (I) para cada semana da avaliação, não houve evidências de diferenças significantes entre os valores médios dos grupos (todas as comparações com  $p \geq 0,215$ ), (II) para todos os grupos, as médias das semanas foram significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ). Assim, não houve diferença na comparação de um tratamento com outro, mas houve diferença significativa nas médias no decorrer do tempo.

Com base nesses resultados, a análise continuou visando comparar os aumentos semanais médios de cada grupo, como mostra a Tabela 3.

**Tabela 1.** Medidas descritivas para o escore BBB, de acordo com o grupo e a semana de avaliação.

Grupo		Semana de avaliação					
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Grupo 1 (N = 8)	Média	1,3	1,8	5,8	7,5	9,8	14,8
	Desvio padrão	1,6	1,7	2,3	2,4	3,2	4,2
	Mediana	0,5	2,0	5,0	7,0	9,5	15,0
	Mínimo	0	1	4	7	8	7
	Máximo	4	4	11	13	15	20
Grupo 2 (N = 7)	Média	0,7	2,3	5,4	7,4	9,0	12,3
	Desvio padrão	1,5	2,3	1,9	3,3	4,4	4,2
	Mediana	0,0	3,0	6,0	7,0	9,0	13,0
	Mínimo	0	0	3	3	4	5
	Máximo	4	5	8	13	15	17
Grupo 3 (N = 7)	Média	0,6	2,7	5,1	7,3	7,7	11,4
	Desvio padrão	1,5	2,0	2,6	3,3	4,5	4,9
	Mediana	0,0	3,0	6,0	6,0	6,0	13,0
	Mínimo	0	0	0	3	2	4
	Máximo	4	5	8	11	14	18
Grupo 4 (N = 9)	Média	0,9	4,1	7,7	9,6	10,8	12,1
	Desvio padrão	1,4	3,1	3,4	3,9	4,4	4,6
	Mediana	0,0	3,0	7,0	9,0	11,0	12,0
	Mínimo	0	0	3	5	6	7
	Máximo	3	9	13	16	19	19
Total (N = 31)	Média	0,9	2,8	6,1	8,0	9,4	12,7
	Desvio padrão	1,4	2,4	2,7	3,3	4,1	4,4
	Mediana	0,0	3,0	6,0	7,0	9,0	13,0
	Mínimo	0	0	0	3	2	4
	Máximo	4	9	13	16	19	20

**Tabela 2.** Valores de  $p$  para a comparação entre semanas em cada grupo e entre grupos em cada semana.

	Valor de $p$	
Comparação entre grupos	Na 1ª semana de avaliação	0,829
	Na 2ª semana de avaliação	0,215
	Na 3ª semana de avaliação	0,448
	Na 4ª semana de avaliação	0,448
	Na 5ª semana de avaliação	0,530
	Na 6ª semana de avaliação	0,492
Comparação entre semanas	No grupo 1	< 0,001
	No grupo 2	< 0,001
	No grupo 3	< 0,001
	No grupo 4	< 0,001

Valores de  $p$  obtidos do modelo de efeitos mistos.

**Tabela 3.** Valores de  $p$  que correspondem à comparação entre duas semanas consecutivas em cada grupo.

Grupo	Comparação de duas semanas consecutivas	Diferença média	Valor de $p$
Grupo 1	2ª semana - 1ª semana	0,5	0,492
	3ª semana - 2ª semana	4,0	< 0,001
	4ª semana - 3ª semana	1,8	< 0,001
	5ª semana - 4ª semana	2,3	< 0,001
	6ª semana - 5ª semana	5,0	< 0,001
Grupo 2	2ª semana - 1ª semana	1,6	0,043
	3ª semana - 2ª semana	3,1	< 0,001
	4ª semana - 3ª semana	2,0	< 0,001
	5ª semana - 4ª semana	1,6	0,025
	6ª semana - 5ª semana	3,3	< 0,001
Grupo 3	2ª semana - 1ª semana	2,1	0,006
	3ª semana - 2ª semana	2,4	< 0,001
	4ª semana - 3ª semana	2,1	< 0,001
	5ª semana - 4ª semana	0,4	0,540
	6ª semana - 5ª semana	3,7	< 0,001
Grupo 4	2ª semana - 1ª semana	3,2	< 0,001
	3ª semana - 2ª semana	3,6	< 0,001
	4ª semana - 3ª semana	1,9	< 0,001
	5ª semana - 4ª semana	1,2	0,048
	6ª semana - 5ª semana	1,3	0,086

Valores de  $p$  obtidos do modelo de efeitos mistos.

## Potencial evocado: latência e amplitude

A Tabela 4 apresenta as medidas descritivas para as variáveis amplitude e latência no exame do potencial evocado, de acordo com os grupos de estudo. O valor da latência extremamente alto (10,95) observado no grupo 1 (caso nº 2, cujos valores originais para a esquerda e a direita são 11,8 e 10,1, respectivamente), corresponde ao mesmo caso que apresentou valor extremamente baixo de amplitude (81,0, valores originais para a esquerda e a direita de 89,0 e 73,0, respectivamente).

A análise não indicou diferenças significantes entre as latências médias dos quatro grupos ( $p = 0,335$ ). No entanto, a análise dos residuais indicou um ajuste razoável dos dados, com variâncias desiguais entre grupos. Isso se deveu a uma grande variabilidade no grupo 1 em comparação com os outros grupos. Esse achado continuou o mesmo depois das tentativas de transformar os dados. A análise residual mostrou dois casos que exigem investigação meticulosa, correspondendo aos dois valores extremos do grupo 1, caso nº 1 (3,30) e nº 2 (10,95). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significantes entre os distribuidores dos quatro grupos, tanto para as medidas de amplitude ( $p = 0,884$ ) quanto para as de latência ( $p = 0,118$ ).

O modelo ANOVA para os dados de amplitude não indicou diferenças significantes entre as médias dos quatro grupos, com  $p = 0,921$ . Realizou-se uma análise dos residuais do modelo, e foram detectados dois pontos que requerem investigação meticulosa, que correspondem aos valores extremos do grupo 3 (caso nº 1, amplitude de 3140,5) e 4 (caso nº 7, amplitude de 2848,0), como assinalado anteriormente. Assim, foram feitas novas definições no modelo ANOVA, que rejeitou cada um desses pontos e também rejeitou os dois pontos simultaneamente. Excluindo-se o caso nº 1, a média e o desvio padrão do grupo 3 foram reduzidos para 275,0 e 70,6. No grupo 4, excluindo-se o caso nº 7, esses valores caem para 277,7 e 158,2. Em todos esses testes, não houve indicação de diferenças significantes entre os grupos (Tabela 5,  $p > 0,5$ ).

**Tabela 4.** Medidas descritivas de amplitude e latência de acordo com grupos e análise de variância (ANOVA).

Potencial evocado	Grupos	N	Mediana	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
Amplitude $p = 0,921$	Grupo 1	8	544,6	596,2	243,5	81,0	1840,0
	Grupo 2	7	392,9	442,5	270,5	120,0	1384,5
	Grupo 3	7	684,4	1085,0	270,0	187,5	3140,5
	Grupo 4	9	563,3	869,5	262,5	150,0	2848,0
	Total	31	547,3	754,4	262,5	81,0	3140,5
Latência $p = 0,335$	Grupo 1	8	6,7	2,2	6,2	3,30	10,95
	Grupo 2	7	6,0	0,4	6,1	5,30	6,35
	Grupo 3	7	6,1	0,3	6,1	5,50	6,50
	Grupo 4	9	5,6	0,6	5,4	4,85	6,85
	Total	31	6,1	1,2	6,0	3,30	10,95

DP: Desvio padrão.

**Tabela 5.** Valores de  $p$  para o teste de comparação das amplitudes e latências médias nos quatro grupos de estudo por análise de variância (ANOVA).

Modelo	Total de casos considerados	Valor de $p$
<b>Amplitudes</b>		
sem caso nº 1, Grupo 3	30	0,791
sem caso nº 7, Grupo 4	30	0,647
sem os dois casos acima	29	0,509
<b>Latências</b>		
sem caso nº 1, Grupo 1	30	0,034
sem caso nº 2, Grupo 1	30	0,530
sem os dois casos acima	29	0,044

Os resultados da análise, excluindo-se esses pontos, também são apresentados na Tabela 5. Note que a remoção do valor extremamente alto (Modelo B) não altera as conclusões, porque não indica diferenças significantes entre os grupos ( $p = 0,530$ ). A não ser que se afirme o contrário, excluindo-se o valor mínimo (Modelos A e C) o resultado são modelos que indicam diferenças significantes entre os grupos. Ao investigar quais grupos foram diferentes, os dois modelos indicaram que as latências médias dos Grupos 1 e 4 são diferentes, porém não são diferentes de outros grupos considerados.

## Resultados histológicos

A análise histológica, expressa em escores para as variáveis ausentes, leves, moderadas e graves, de acordo com os grupos de estudo e o local da lesão, não mostraram diferenças significantes entre os grupos, exceto para a variável necrose na região central da lesão ( $p < 0,001$ , Tabela 6) e hiperemia, também obtida para a região central ( $p = 0,015$ , ver Tabela 6). A variável hemorragia não apresentou diferença entre os grupos ou períodos ( $p > 0,20$ ) nem a degeneração da substância neural ( $p > 0,66$ ) ou mesmo com infiltração celular ( $p > 0,11$ ).

**Tabela 6.** Distribuição dos escores de necrose e hiperemia, de acordo com o grupo e a região da medula espinal, e diferenças de acordo com o teste exato de Fisher.

Escore de necrose N		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Proximal $p = 0,186$	Ausente	6	75,0	4	57,1	2	28,6	6	66,7
	Discreto	2	25,0	3	42,9	2	28,6	3	33,3
	Moderado	0	0,0	0	0,0	3	42,9	0	0,0
Central $p < 0,001$	Ausente	3	37,5	0	0,0	1	14,3	0	0,0
	Discreto	5	62,5	2	28,6	0	0,0	6	66,7
	Moderada	0	0,0	5	71,4	6	85,7	3	33,3
Distal $p = 0,282$	Ausente	5	62,5	1	14 (3)	3	42,9	3	33,3
	Discreto	3	37,5	2	28,6	3	42,9	3	33,3
	Moderada	0	0,0	4	57,1	1	14 (3)	3	33,3
	Total	8	100%	7	100%	7	100%	9	100%
Escore de hiperemia N		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Proximal $p = 0,132$	Ausente	2	25,0	0	0,0	0	0,0	2	22,2
	Discreto	4	50,0	7	100,0	5	71,4	3	33,3
	Moderado	2	25,0	0	0,0	2	28,6	4	44,4
Central $p = 0,015$	Ausente	1	12,5	0	0,0	1	14,3	0	0,0
	Discreto	7	87,5	2	28,6	1	14,3	4	44,4
	Moderado	0	0,0	4	57,1	5	71,4	5	55,6
	Intenso	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0
Distal $p = 0,390$	Ausente	1	12,5	0	0,0	0	0,0	1	11,1
	Discreto	6	75,0	3	42,9	6	85,7	5	55,6
	Moderado	1	12,5	4	57,1	1	14,3	3	33,3
	Total	8	100%	7	100%	7	100%	9	100%

## DISCUSSÃO

Ainda que longe de ser assunto de consenso na comunidade científica, o GM1 é uma opção terapêutica promissora, em especial quando se obtêm resultados favoráveis com a ampliação de sua ação por outros meios, como físicos, químicos ou biológicos. O GM1 tem sido usado em vários estudos clínicos em pacientes com lesão de medula espinal, e sua segurança foi confirmada, com poucas complicações e com resultados promissores, mostrando melhora da recuperação motora.<sup>4,18</sup>

O laser pode promover absorção transdérmica de proteínas, peptídeos e outras moléculas, o que o torna uma boa alternativa como via de administração de medicamentos.<sup>19-21</sup> Santos *et al.*<sup>8</sup> apresentaram resultados preliminares em favor do uso de laser

em baixa temperatura associado a GM1 nas lesões da medula espinal e de nervos periféricos. Seguindo essa linha de pesquisa, realizamos este estudo com ratos, acrescentando a análise por potencial evocado, uma avaliação que pode ser considerada mais objetiva que o escore BBB isolado.

O potencial evocado parece ser um teste confiável em todos os casos de lesão de medula espinal. No entanto, neste estudo, não apresentou diferenças significantes entre grupos ou entre períodos, mesmo para os dois casos que estavam bem acima da média. Possivelmente, a avaliação patológica por coloração imuno-histoquímica poderia revelar evidências de regeneração neuronal que não foram vistas com os métodos empregados por nós neste estudo. Contudo, nossa equipe já está seguindo essa linha de pesquisa.

Na análise histológica depois de seis semanas da lesão, havia concentração expressivamente superior dos escores moderados de necrose nos ratos tratamento com GM1 ou laser, porém, sem qualquer correlação com outros itens avaliados ou com os resultados histológicos e funcionais. Pode ser que a falta de significância estatística entre os grupos na análise histológica deva-se à técnica utilizada.<sup>10</sup> Outras análises da histologia da medula óssea com microscopia eletrônica e métodos específicos de coloração de nervos podem produzir

resultados mais significantes.

A observação dos resultados descritivos das avaliações funcionais revela um ligeiro aumento da função motora em ratos de todos os grupos no decorrer do tempo. Porém, a análise estatística não mostrou diferenças significantes. Seria interessante reavaliá-las com amostra maior.

É possível supor que, na lesão de medula espinal aguda e subaguda, existe uma sinergia entre laser, hipotermia e GM1. Depois de um determinado período, essa combinação teria um efeito contrário, mas essa hipótese precisa ser testada em estudos específicos.

## CONCLUSÕES

Não se constatou diferença estaticamente significativa nas avaliações funcional, histológica ou de potenciais evocado motores entre ratos com lesão moderada de medula espinal tratados com GM1, laser ou combinação de ambos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem TRB Pharma, Brasil, pela doação do monossialotetrahexosil gangliosídeo (GM1) usado neste estudo experimental.

## REFERÊNCIAS

1. Fouad K, Krajacic A, Tetzlaff W. Spinal cord injury and plasticity: opportunities and challenges. *Brain Res Bull.* 2011;84(4-5):337-42.
2. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J Neurotrauma.* 2001;18(5):533-43.
3. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx.* 2004;1(1):80-100.
4. Chinnock P, Roberts I. Gangliosides for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(2):CD004444.
5. Ha KY, Kim YH. Neuroprotective effect of moderate epidural hypothermia after spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33(19):2059-65.
6. Kwon BK, Mann C, Sohn HM, Hillibrand AS, Phillips FM, Wang JC, et al. NASS Section on Biologics. Hypothermia for spinal cord injury. *Spine J.* 2008;8(6):859-74.
7. Levi AD, Green BA, Wang MY, Dietrich WD, Brindle T, Vanni S, et al. Clinical application of modest hypothermia after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2009;26(3):407-15.
8. Santos GB, Barros Filho TE, Cristante AF, Silva CF, Marcon RM, Souza FI, et al. Local application of Ganglioside GM1 with lasermed by the criopass therapy method improves peripheral nerve and spinal cord regeneration in rats. *FENS (Annals).* 2010;5:040,19. [Abstract 040,19]. Available from: [http://fens2010.neurosciences.asso.fr/abstracts/r2/a040\\_19.html](http://fens2010.neurosciences.asso.fr/abstracts/r2/a040_19.html). Accessed in 2012 (Jun 5).
9. 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.
10. Marcon RM, Cristante AF, de Barros Filho TE, de Oliveira RP, dos Santos GB. Potentializing the effects of GM1 by hyperbaric oxygen therapy in acute experimental spinal cord lesion in rats. *Spinal Cord.* 2010;48(11):808-13.
11. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma.* 1996;13(7): 343-59.
12. Cristante AF, Damasceno ML, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TLP. Viabilidade de células do sistema nervoso central fetal no tratamento da lesão de medula em ratos. *Acta Ortop Bras.* 2010;18(5):284-90.
13. Cristante AF, Barros Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR, et al. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2009;47(6):458-63.
14. Goettl VM, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Sciatic nerve axotomy in aged rats: response of motoneurons and the effect of GM1 ganglioside treatment. *Brain Res.* 2003; 968(1):44-53.
15. 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.
16. Ferreira R, Oliveira AR, Barros Filho TEP. Padronização da técnica para captação do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(3):112-4.
17. Galvão PEC, Cristante AF, Jorge HMH, Damasceno ML, Marcon RM, Oliveira RP, et al. Avaliação funcional e histológica da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(1):10-6.
18. Barros Filho TEP, Silva Filho C. Titulação de anticorpos anti-gangliosídeo no soro de pacientes com lesão medular crônica e precedendo tratamento com gangliosídeo GM1. *Acta Ortop Bras.* 2003;11(2):69-71.
19. Benson HA, Namjoshi S. Proteins and peptides: strategies for delivery to and across the skin. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3591-610.
20. Bachhav YG, Summer S, Heinrich A, Bragagna T, Böhrer C, Kalia YN. Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin. *J Control Release.* 2010;146(1):31-6.
21. Bachhav YG, Heinrich A, Kalia YN. Using laser microporation to improve transdermal delivery of diclofenac: Increasing bioavailability and the range of therapeutic applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(3):408-14.