

Taisa Amoroso Bortolato Miranda

**Análise da reorganização cortical sensório-motora
induzida pela atividade física em modelo experimental
de lesão medular**

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

Programa de Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Prof Dr Tarcisio Eloy Pessoa
de Barros Filho

São Paulo

2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Gustavo, por ter sido compreensivo e paciente nas horas em que mais precisei de seu apoio. Eu sei o quão difícil foram alguns momentos em que não pude ficar com você. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, Renato e Aida, por sempre me incentivarem e mostrarem a importância do que eu faço. Obrigada por acreditarem que as coisas sempre irão dar certo. Obrigada por me oferecerem oportunidades na vida para que esse doutorado pudesse ter sido realizado. Muito obrigada pelo carinho e amor.

Aos meus irmãos, Renato, Vanessa, Paulo e Daniela, com os quais eu compartilho momentos de diversão, alegria, tristeza, amor, discussão, enfim, com os quais eu aprendo todos os dias.

À minha segunda mãe, Nice, pelo carinho, atenção e suporte emocional sempre que necessário.

À minha mais nova família (agora de fato), Cirilo, Fátima, Paulo, Claudia, Laura e Victor, por preencherem as minhas horas vagas de maneira alegre e divertida e por me apoiarem nas minhas decisões.

A todos os meus familiares e amigos, pela convivência e suporte nos momentos necessários.

Ao Prof. Dr. Tarcisio Eloy Pessoa de Barros Filho, por tornar a realização deste trabalho viável e pelo incentivo à pesquisa.

Ao Dr. Alexandre Fogaça Cristante, por ter influenciado diretamente na minha escolha de seguir em frente na pesquisa e realizar este trabalho. Obrigada pela disponibilidade e auxílio sempre que precisei.

Ao Edgard Morya, por me acompanhar a muito tempo nesta trajetória acadêmica, confiar em mim e no meu trabalho, além do empenho, muita dedicação e co-orientação.

Aos responsáveis e equipes dos Laboratórios de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos (LETRAN) - IOT/HC e de Neurociências, 'Prof. Dr. César Timo-laria' – IEP/HSL, por toda a infra-estrutura disponibilizada para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto do Laboratório de Neurobiologia Celular – ICB/USP e ao seu grupo, por estarem sempre de portas abertas, pela disponibilização de materiais e equipamentos para realização da análise imunohistoquímica. Ao Prof Britto, por todas as conversas e sugestões pertinentes ao trabalho. E ao Adilson Silva Alves, pela paciência e por ter acompanhado diretamente todas as etapas realizadas.

À Dra. Rosana de Lima Pagano do Laboratório de Neuromodulação e Dor Experimental – IEP/HSL, pelas conversas e palavras de incentivo.

Aos meus pacientes, por darem sentido ao meu trabalho.

À Agência Financiadora: CAPES, pela concessão de bolsa de estudos para o desenvolvimento do projeto.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed for Medline 2007; National Library of Medicine – National Institutes of Health*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| ABC | Complexo avidina-biotina-peroxidase |
| AL | Ântero-Lateral |
| ANOVA | Análise de Variância |
| <i>BDNF</i> | <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> |
| CDLM | Coluna Dorsal-Lemnisco Medial |
| <i>CPG</i> | <i>Central Pattern Generators</i> |
| CTL | Controle |
| DOI | Densida óptica integrada |
| dPO | Dia pós-operatório |
| ECoG | Eletrocorticograma |
| EEG | Eletroencefalograma |
| EMG | Eletromiografia |
| <i>et al</i> | e outros |
| EUA | Estados Unidos da América |
| <i>fMRI</i> | <i>Functional Magnetic Resonance Imaging</i> |
| FMUSP | Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| <i>GFAP</i> | <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> |
| HC | Hospital das Clínicas |
| HSL | Hospital Sírio-Libanês |
| ICM | Interface cérebro-máquina |
| IEP | Instituto de Ensino e Pesquisa |
| IL | Interleucina |
| Ip | Intraperitonealmente |
| <i>LED</i> | <i>Light-Emitting Diode</i> |
| LETRAN | Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos |
| <i>LFP</i> | <i>Local Field Potential</i> |
| LM | Lesão Medular |
| M1 | Motor Primário |
| <i>MAP2</i> | <i>Microtubule Associated Protein 2</i> |
| <i>MATLAB</i> | <i>Matrix Laboratory</i> |
| ME | Medula Espinhal |
| MEG | Magnetoencefalograma |
| MMPP | Membros Posteriores |
| NF | Neurofilamento |
| NIRS | <i>Near Infrared Spectroscopy</i> |
| NT-3 | Neurotrofina-3 |
| <i>NYU</i> | <i>New York University</i> |

| | |
|-------------|--|
| <i>PB</i> | <i>Phosphate Buffer</i> |
| POI | Pós-operatório de Implante |
| Sml | Somatossensorial Primário |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| <i>SPSS</i> | <i>Statistical Package for Social Sciences</i> |
| <i>SYP</i> | <i>Synaptophysin</i> |
| <i>SYS</i> | <i>Synapsin</i> |
| <i>TNF</i> | <i>Tumour Necrosis Factor</i> |
| TR | Treinado |
| <i>TTL</i> | <i>Transistor-Transistor Logic</i> |
| T8 | 8ª Vértebra Torácica |
| T9 | 9ª Vértebra Torácica |
| T10 | 10ª Vértebra Torácica |
| T11 | 11ª Vértebra Torácica |
| L1 | 1ª Vértebra Lombar |
| L3 | 3ª Vértebra Lombar |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 - Eventos patofisiológicos da lesão medular | 36 |
| Figura 2 - Medula espinhal intacta e medula espinhal lesada | 38 |
| Figura 3 - Tipos de crescimento axonal pós lesão | 43 |
| Figura 4 - Estratégias de intervenção terapêutica para recuperação funcional | 44 |
| Figura 5 - Tipos de sinais elétricos e suas resoluções espacial e temporal | 64 |
| Figura 6 - Desenho esquemático sobre funcionamento de neuropróteses | 68 |
| Figura 7 - Linha do tempo do experimento | 70 |
| Figura 8 - Imagens de cortes coronais corticais correspondentes as coordenadas estereotáxicas | 72 |
| Figura 9 - Sequência de fotos da construção da matriz de micro-eletrodos..... | 74 |
| Figura 10 - Sequência de fotos da cirurgia de implante | 79 |
| Figura 11 - Equipamento de lesão medular – <i>NYU-Impactor</i> | 81 |
| Figura 12 - Sequência de fotos da cirurgia de lesão medular | 83 |
| Figura 13 - Esteira motorizada para ratos | 85 |
| Figura 14 - Dispositivo auxiliar para o treinamento na esteira..... | 85 |
| Figura 15 - Rato posicionado no dispositivo auxiliar | 86 |
| Figura 16 - Aparato para registro do sinal eletrofisiológico | 87 |
| Figura 17 - Registro eletrofisiológico durante o treinamento na esteira | 88 |
| Figura 18 - Foto do animal lesado medular | 98 |
| Figura 19 - Imagem gerada pelo programa de registro eletrofisiológico | 100 |
| Figura 20 - Imagem de sincronização do sinal de disparo neuronal com a marcha do animal lesado | 102 |
| Figura 21 - Imagem de sincronização do sinal de disparo neuronal e a eletromiografia do animal sham | 103 |
| Figura 22 - Histogramas de disparos neuronais de neurônios relacionados ou não ao movimento..... | 104 |
| Figura 23 - Imagens ilustrativas da atividade de campo local do córtex sensório-motor e da atividade eletromiográfica..... | 105 |
| Figura 24 - Imagens de cortes coronais do córtex motor de um animal de cada grupo imunoreagidos com NFs e <i>SYP</i> , e seus gráficos | 108 |
| Figura 25 - Imagens de cortes coronais do estriado de um animal de cada grupo imunoreagidos com NFs e <i>SYP</i> , e seus gráficos | 109 |
| Figura 26 - Imagens de cortes coronais do córtex somatossensorial de um animal de cada grupo imunoreagidos com NFs e <i>SYP</i> , e seus gráficos..... | 110 |
| Figura 27 - Imagens de cortes coronais da substância negra de um animal de cada grupo imunoreagidos com NFs e <i>SYP</i> , e seus gráficos | 111 |
| Figura 28 - Imagens de cortes transversais da medula espinhal de um animal de cada grupo imunoreagidos com <i>MAP2</i> | 115 |
| Figura 29 - Imagens de cortes transversais da medula espinhal de um animal de cada grupo imunoreagidos com <i>SYS</i> | 116 |
| Figura 30 - Imagens de cortes transversais da medula espinhal de um animal de cada grupo imunoreagidos com <i>GFAP</i> | 117 |
| Figura 31 - Imagens de cortes transversais da medula espinhal de um animal de cada grupo imunoreagidos com <i>OX-42</i> | 118 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|-----|
| Gráfico 1 - Número de neurônios registrados ao longo do experimento | 101 |
| Gráfico 2 - Número de neurônios registrados ao longo do experimento que disparam em relação ao movimento | 104 |
| Gráfico 3 - Densidade óptica integrada de <i>MAP2</i> na medula espinhal | 115 |
| Gráfico 4 - Densidade óptica integrada de <i>SYS</i> na medula espinhal..... | 116 |
| Gráfico 5 - Densidade óptica integrada de <i>GFAP</i> na medula espinhal | 117 |
| Gráfico 6 - Densidade óptica integrada de <i>OX-42</i> na medula espinhal..... | 118 |

RESUMO

Miranda, TAB. *Análise da reorganização cortical sensório-motora induzida pela atividade física em modelo experimental de lesão medular* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2016.

A lesão medular (LM) promove uma condição devastadora que resulta em comprometimentos sensorial e motor, impedindo o desempenho funcional do indivíduo. O entendimento sobre os mecanismos envolvidos na reorganização cortical após uma eficiente estratégia terapêutica pode fornecer informações relevantes para o aprimoramento de tecnologias assistivas, como neuropróteses. Este trabalho teve como objetivos investigar as alterações funcionais e estruturais no córtex sensório-motor de ratos *Wistar* submetidos à atividade física na esteira após a lesão medular contusa. O objetivo secundário foi investigar a reorganização de outras áreas relacionadas ao comportamento motor, como o estriado, a substância negra e a medula espinhal. 17 ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos: treinado (TR, n = 6), controle (CTL, n = 7) e sham (n = 4). Todos os animais receberam um implante de matriz de micro-eletrodos no córtex sensório-motor. Os animais dos grupos TR e CTL foram submetidos à LM contusa e os do grupo sham somente ao procedimento cirúrgico sem a LM. Foi realizada a avaliação eletrofisiológica antes da LM e nos 1^o, 3^o, 5^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o, 42^o, 49^o e 56^o dias pós-operatórios (dPO) da lesão. O grupo TR realizou treinamento motor em uma esteira com velocidade controlada, tendo início no 5^o dPO e foi realizado por 15 minutos, cinco vezes na semana. Os outros dois grupos ficaram sem treinamento. No 57^o dPO, os animais foram sacrificados, e as medulas espinhais e os encéfalos foram coletados para análise imunohistoquímica. Os resultados eletrofisiológicos mostraram que houve uma diminuição significativa do número de neurônios corticais registrados ao longo do tempo para os animais com LM; existem neurônios que disparam em função do movimento mesmo após a LM, sendo o número desses neurônios significativamente menor nos animais controles; observou-se um padrão de atividade de potencial de campo local do córtex sensório-motor que antecede a ativação muscular. A análise imunohistoquímica do encéfalo mostrou diminuição significativa da imunoreatividade para o marcador de neurofilamentos no córtex motor do grupo CTL e no estriado para os grupos CTL e TR; no córtex somatossensorial houve aumento significativo desta marcação para o grupo TR; não houve diferença da imunoreatividade entre os grupos para o marcador de neurofilamentos na substância negra e nem para a proteína de vesícula, sinaptofisina, nas diferentes áreas encefálicas. Na medula espinhal verificou-se, na região rostral à lesão, aumento significativo da imunoreatividade para os marcadores de proteína associada ao microtúbulo 2 (*MAP2*), da sinapsina (*SYS*) e da proteína glial fibrilar ácida (*GFAP*) para o grupo TR e diminuição significativa da *SYS* para o grupo CTL; no segmento central à lesão, houve diminuição significativa da imunoreatividade para os marcadores *MAP2* e *SYS* e aumento significativo para *GFAP* e *OX-42* para os grupos CTL e TR; no segmento caudal à lesão houve diminuição significativa da imunoreatividade para os marcadores *GFAP*, *SYS*, *MAP2* e *OX-42* para o grupo CTL e aumento significativo do marcador *MAP2* para o grupo TR. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a atividade física realizada na esteira após a LM é capaz de promover reorganização cortical sensório-motora e medular por meio da neuroproteção e neuroregeneração.

Descritores: lesão medular, reorganização cortical, atividade física, áreas sensório-motoras, neuroproteção, plasticidade.

ABSTRACT

Miranda, TAB. *Sensorimotor cortical reorganization analysis induced by physical activity in spinal cord injury experimental model* [Thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2016.

Spinal cord injury (SCI) results in a devastating condition, which leads to motor and sensory deficits that impair the injured person functional performance. The understanding about the mechanisms involved in cortical reorganization after an efficient therapeutic strategy can provide relevant information for the improvement of assistive technology, such as neuroprosthesis. This work aimed to investigate the functional and structural changes in the sensorimotor cortex of spinal cord injured *Wistar* rats, which were submitted to treadmill training. A secondary objective was to investigate the reorganization of other areas related to the movement, such as striatum, substantia nigra and spinal cord. 17 rats were randomly divided into three groups: trained (TR, n = 6), control (CTL, n = 7) and sham (n = 4). All animals received a microelectrodes array in the sensorimotor cortex. Control and trained animals were submitted to contusive SCI and the sham group only to the surgical procedure without the contusion. Electrophysiological assessments were accomplished before SCI and on the 1st, 3rd, 5th, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th, 42nd, 49th and 56th post-operative days (POd). The TR group performed the motor training on a treadmill with controlled speed, starting on the 5th POd and it was done for 15 minutes, five times per week. The other two groups did not receive any training. On the 57th POd, the animals were sacrificed and the spinal cords and brains were collected for immunohistochemistry analysis. Electrophysiological data revealed that there was a significant decrease of the cortical neurons number with time for the injured animals; there was neurons that fire in function of the movement even after the SCI, but the number of these neurons was significant smaller in CTL group; it was observed a pattern of sensorimotor local field potential activation before the muscular activation. Brain immunohistochemistry data showed immunoreactivity significant decrease for neurofilament staining of the CTL motor cortex and CTL and TR striatum; the somatosensory cortex had a significant increase of this maker for TR group; there was no difference between groups for the neurofilament maker in the substantia nigra and neither to the vesicle protein maker, synaptophysin, in the different brain areas. In the spinal cord rostral to the lesion there were significant increase of the immunoreactivity for the microtubule associated protein 2 (MAP2), synapsin (SYS) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) for the TR group and significant decrease of SYS for the CTL group; central to the lesion, there were immunoreactivity significant decrease for the MAP2 and SYS makers and a significant increase for the GFAP and OX-42 makers in CTL and TR groups; and caudal to the lesion, there were immunoreactivity significant decrease for the GFAP, SYS, MAP2 and OX-42 for the CTL group and significant increase of MAP2 maker for the TR group. Together these findings show that the physical activity on a treadmill after spinal cord injury is capable of producing sensorimotor cortex and spinal cord reorganization throughout the neuroprotection and neuroregeneration.

Descriptors: spinal cord injury, cortical reorganization, physical activity, sensorimotor areas, neuroprotection, plasticity.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 9 |
| 3.1. Caracterização Anátomo-Funcional..... | 9 |
| 3.1.1. Córtex Motor | 10 |
| 3.1.2. Córtex Somatossensorial..... | 14 |
| 3.1.3. Núcleos da base: foco em estriado e substância negra..... | 17 |
| 3.1.4. Medula Espinhal | 20 |
| 3.2. Lesão medular e suas implicações..... | 27 |
| 3.2.1. Patofisiologia..... | 35 |
| 3.3. Abordagens Terapêuticas..... | 42 |
| 3.4. Reabilitação e Neuroplaticidade | 48 |
| 3.4.1. Marcadores de Plasticidade..... | 54 |
| 3.4.1.1. Neurofilamento..... | 54 |
| 3.4.1.2. Sinaptofisina | 55 |
| 3.4.1.3. Sinapsina | 57 |
| 3.4.1.4. Proteína associada ao microtúbulo 2..... | 58 |
| 3.4.1.5. Proteína glial fibrilar ácida..... | 59 |
| 3.4.1.6. OX-42..... | 60 |
| 3.5. Reorganização Cortical, Eletrofisiologia e Neuroprótese..... | 61 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 69 |
| 4.1. Análise de risco..... | 71 |
| 4.2. Confeção da matriz de micro-eletrodos | 71 |
| 4.3. Procedimento cirúrgico para implante crônico da matriz de micro-eletrodos..... | 75 |
| 4.4. Procedimento cirúrgico de lesão medular por contusão | 80 |
| 4.5. Atividade física realizada na esteira..... | 84 |
| 4.6. Avaliação comportamental eletrofisiológica | 86 |
| 4.7. Perfusão e Análise Imunohistoquímica..... | 90 |
| 4.7.1. Encéfalo..... | 90 |
| 4.7.1.1. Protocolo de imunohistoquímica: <i>SYP</i> e <i>NFs</i> | 91 |
| 4.7.2. Medula espinhal..... | 92 |
| 4.7.2.1. Protocolo de imunohistoquímica: <i>OX-42</i> , <i>GFAP</i> , <i>MAP2</i> e <i>SYS</i> | 93 |
| 4.7.3. Análise de Densidade Óptica Integrada..... | 95 |
| 4.8. Análise estatística | 96 |

| | |
|--|------------|
| 5. RESULTADOS | 97 |
| 5.1. Aspectos Gerais..... | 97 |
| 5.2. Avaliação Eletrofisiológica | 99 |
| 5.3. Análise Imunohistoquímica | 106 |
| 5.3.1. Encéfalo | 106 |
| 5.3.2. Medula espinhal..... | 112 |
| | |
| 6. DISCUSSÃO..... | 119 |
| | |
| 7. CONCLUSÕES..... | 140 |
| | |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 141 |

Apêndice A - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

Reverter a paralisia após uma lesão medular (LM) é uma das questões mais desafiadoras dentro da pesquisa em neurociência. Apesar de vários anos de pesquisa nesta área, a cura para a paralisia ainda permanece distante (Fouad e Pearson, 2004; Rowland *et al.*, 2008). Melhorias significativas têm sido feitas na administração de medicamentos (esteroides, como a metilprednisolona) e na realização de procedimentos cirúrgicos agudamente após LM, na tentativa de minimizar o edema medular e a cascata de eventos secundários decorrentes da lesão inicial (Rowland *et al.*, 2008; Dasari *et al.*, 2014). Todavia, ainda não existem tratamentos eficazes para reverter as consequências neurológicas negativas causadas pela LM (Dasari *et al.*, 2014).

A lesão medular é uma condição devastadora para os indivíduos afetados e suas famílias, em diversos aspectos: físico, emocional, psicológico, social e financeiro (Thuret *et al.*, 2006; Gomez-Pinilla *et al.*, 2012). Esta lesão impede que o indivíduo realize atividades de maneira funcional, devido à interrupção parcial ou completa das vias sensoriais ascendentes e vias motoras descendentes (Hulsebosch, 2002; Lu *et al.*, 2005). A LM faz com que centros superiores (como por exemplo, o córtex) fiquem desconectados de circuitos medulares abaixo do nível da lesão, inclusive dos geradores centrais de padrão (*central pattern generators, CPG*), que são responsáveis por coordenar a atividade locomotora (Bradbury e McMahon, 2006; Moritz *et al.*, 2008).

De acordo com o *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (2014) é estimado que a incidência anual de LM seja de 40 casos por um milhão de habitantes nos Estados Unidos da América (EUA), com aproximadamente 12 mil casos novos por ano. Estimou-se que 273 mil pessoas viviam com a lesão medular em 2013 nos EUA. Este centro de estatística também informa que as causas da LM se devem principalmente a acidentes automobilísticos (36,5%), seguido por quedas (28,5%), violência (14,3%), esportes (9,2%) e causas desconhecidas e/ou outras (11,4%). No Brasil, não existem estudos epidemiológicos multicêntricos realizados recentemente referentes à lesão medular, mas de acordo com Masini estimava-se que, em 2001, 180 mil indivíduos viviam com a lesão medular.

Diversas pesquisas têm direcionado esforços para promover a recuperação funcional de indivíduos lesados medulares, sendo que hoje, os estudos têm como foco, principalmente, quatro grandes áreas: neuroproteção, regeneração, transplantes de diferentes tipos celulares e reabilitação (Craig *et al.*, 2002). Dentre as estratégias de tratamento após lesão do sistema nervoso central (SNC), a reabilitação é vista como uma parte extremamente importante. “Usar o que ainda restou de função do indivíduo” deixou de ser a prioridade dos programas de fisioterapia e outras práticas de cuidados à saúde, que hoje têm enfoque em estratégias para restaurar as funções perdidas (Craig *et al.*, 2002; Lim e Tow, 2007). Desta forma, é necessário que as pesquisas desenvolvam procedimentos que possam ser aplicados de forma segura e efetiva em humanos (Fouad e Pearson, 2004).

Atividade física realizada na esteira após contusão da medula espinhal (ME) tem sido cada vez mais utilizada como estratégia terapêutica por

potencializar a melhora dos comportamentos sensoriais e motores, como demonstrado em estudos tanto em humanos (Behrman e Harkema, 2000; Dobkin *et al.*, 2003; Hutchinson *et al.*, 2004; Giangregorio *et al.*, 2005; Dietz, 2009), como em modelos experimentais (Ahn *et al.*, 2006; Bigbee *et al.*, 2007; Barriere *et al.*, 2008; Miranda, 2011; Ichiyama *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015).

De acordo com Cotman *et al.* (2007), o exercício físico aumenta a plasticidade sináptica por atuar diretamente na estrutura sináptica e potencializar à sua força, além de reforçar os sistemas subjacentes que oferecem suporte a plasticidade, incluindo a neurogênese e as funções vascular e metabólica. Essas mudanças estruturais e funcionais induzidas pelo exercício ocorrem em múltiplos níveis do sistema nervoso. A atividade física influi nas complexas interrelações das estruturas do SNC responsáveis por elaborar e controlar o comportamento motor, tais como córtex cerebral, tálamo, núcleos da base, cerebelo e circuitos neuronais espinhais (CPG) (Dietz e Harkema, 2004; Winchester *et al.*, 2005; Hubli e Dietz, 2013; Nardone e Trinka, 2015).

Muitos autores relatam que ocorre uma reorganização na medula espinhal após uma estratégia terapêutica realizada em modelos experimentais de lesão medular (Zhou e Shine, 2003; Frassen *et al.*, 2007; Berrocal *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008; Fortun *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). No entanto, pouco se sabe o que ocorre com centros superiores que ficam desconectados dos circuitos medulares, após a LM e o tratamento. Estudos demonstram uma reorganização cortical sensório-motora imediatamente após a lesão medular e continuamente no decorrer do tempo (Jain *et al.*, 1997; Lotze *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Fouad e Tse, 2008; Bareyre, 2008).

Na LM, a informação sensorial aferente da medula espinhal ao córtex é reduzida devido ao trauma direto na medula, que resulta na morte de diversos neurônios no foco de lesão e ao redor dela (Bradbury e McMahon, 2006). Essa deafferentação associada à reorganização das estruturas espinhais leva a mudanças das funções sensório-motoras do cérebro (Christensen e Hulsebosh, 1997). Também já foi demonstrado que a LM gera mudanças estruturais no encéfalo, tais como alterações sinápticas com o aumento do diâmetro e do comprimento de dendritos, fornecendo novas oportunidades de conexões (Kokotilo *et al.*, 2009). Todavia, os mecanismos envolvidos na reorganização cortical após um procedimento de reabilitação ainda não foram bem explorados.

Estudos realizados com gatos submetidos à transecção medular no nível torácico baixo e ao treino locomotor por meio da esteira mostraram uma melhora significativa na capacidade de andar (Hodgson *et al.*, 1994; De Leon *et al.*, 1998). Os autores sugeriram que a melhora observada possa ter ocorrido por uma mudança na probabilidade de neurônios apropriados serem ativados no tempo certo. A eletrofisiologia é uma ferramenta potente para se estudar a atividade elétrica de estruturas encefálicas, permitindo a identificação de mudanças nos padrões normais de ativação neuronal após uma lesão e também após uma intervenção terapêutica (Herbert *et al.*, 2007). Deste modo, o uso desta ferramenta pode auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na recuperação funcional após a lesão medular e o procedimento de reabilitação utilizado.

Recentemente, um trabalho realizado pelo nosso grupo identificou, por meio de registros eletrofisiológicos, que a atividade física

realizada na esteira é capaz de promover alterações na atividade cortical sensório-motora após a lesão medular (Miranda, 2011). Neste trabalho, uma importante relação da oscilação *beta* com a melhora do comportamento motor e da oscilação *delta* com a recuperação limitada do comportamento motor foi demonstrada a partir do registro de potencial de campo local do córtex sensório-motor. Os dados iniciais demonstrados sugerem que uma análise mais detalhada sobre a atividade cortical, como por exemplo, dos disparos unitários de células, possa esclarecer outros aspectos envolvidos na reabilitação de animais lesados medulares. Além disso, de acordo com Gourab e Schmit (2010), a compreensão das mudanças dos sinais eletrofisiológicos associadas à recuperação funcional é de extrema relevância, devido ao potencial desses sinais como controladores de comando para interfaces cérebro-máquina (ICM).

Neuropróteses com base em interface cérebro-máquina são promissoras na restauração da mobilidade corporal de pacientes com paralisia (Kipke *et al.*, 2008; Bensmaia e Miller, 2014). As ICM podem conectar áreas do cérebro, particularmente o córtex motor, diretamente a dispositivos protéticos (por exemplo, membros robóticos ou exoesqueleto do corpo inteiro). A ideia principal das ICM é usar a atividade de áreas cerebrais motoras intactas, que nos casos de paralisia devido à lesão medular permanecem capazes de gerar comandos motores mesmo estando desconectadas dos órgãos efetores, com o objetivo de controlar ferramentas artificiais que restaurem a mobilidade do paciente, como as próteses (Lebedev *et al.*, 2011; McFarland e Wolpaw, 2011).

Diferentes modelos matemáticos têm sido propostos para decodificar os disparos celulares unitários do córtex motor, com o objetivo de

encontrar relações entre a atividade cortical e os comportamentos motores (Lawhern *et al.*, 2010). O registro da atividade celular unitária de diversos neurônios pode ajudar na compreensão de como os neurônios cooperam para gerar determinadas funções, assim como o movimento (Stark *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). O presente trabalho visa elucidar como isto ocorre ao longo da recuperação do movimento de ratos lesados medulares devido à atividade física realizada na esteira.

Além da identificação de mudanças na atividade cortical por meio de registros eletrofisiológicos, alterações estruturais de outras áreas motoras (por exemplo, o estriado, a substância negra e a medula espinhal), demonstradas por meio de análises imunohistoquímicas também podem contribuir para o conhecimento de como a atividade física pode induzir plasticidade no sistema nervoso central, necessária para a promoção da recuperação funcional. Ferreira *et al.* (2010) mostraram aumento dos níveis protéicos de sinapsinas, sinaptofisinas e neurofilamentos em áreas motoras do encéfalo de ratos saudáveis submetidos à atividade física na esteira, sugerindo que esta atividade gera ajustes na eficiência sináptica e remodelamento neuronal relacionados à plasticidade. Esses dados foram encontrados após um curto período de exercício (até duas semanas). Identificar mudanças neste padrão de plasticidade encontrado por Ferreira e colaboradores (2010) em animais lesados medulares treinados por um longo período de tempo (dois meses), pode indicar como o encéfalo se reorganiza na ausência de aferências sensoriais adequadas, mas frente aos estímulos fornecidos pelo treino na esteira.

O entendimento sobre os mecanismos envolvidos na reorganização cortical após uma eficiente estratégia terapêutica pode fornecer informações relevantes para o aprimoramento de tecnologias assistivas, como neuropróteses, que têm se mostrado cada vez mais como uma medida promissora na restauração do movimento após a lesão medular.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos investigar as alterações funcionais, por meio da eletrofisiologia, e estruturais, por meio da imunohistoquímica, do córtex sensório-motor de ratos *Wistar* submetidos à atividade física na esteira após a lesão medular contusa.

Um objetivo secundário é investigar a reorganização, por meio da imunohistoquímica, de outras áreas relacionadas ao comportamento motor, como a medula espinhal, a substância negra e o estriado, após o protocolo de atividade física proposto e relacionar estes dados com aqueles obtidos da região cortical.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Caracterização Anátomo-Funcional

Os sistemas motor e somatossensorial são constituídos por diversas estruturas do sistema nervoso central, sistema nervoso periférico e sistema muscular, que estão interconectadas por diferentes vias descendentes (sistema motor) e vias ascendentes (sistema sensorial). Estes sistemas estão intimamente relacionados. A informação sensorial somática é essencial para coordenar os movimentos, que, por sua vez, são essenciais para nos proteger de estímulos sensoriais aversivos.

Dentre as estruturas que participam de alguma forma dos comportamentos motor e somatossensorial encontram-se: áreas corticais pré-motoras (córtex pré-motor ventral e dorsal, área motora suplementar, córtex cingulado motor ventral, dorsal e caudal), lobo parietal (áreas sensoriais somáticas primária e secundária), córtex motor primário, núcleos da base (estriado, globo pálido, substância negra e núcleos subtalâmicos), cerebelo, medula espinhal, motoneurônios inferiores e músculos (Wolpaw, 2007; Kokotilo *et al.*, 2009).

As vias motoras descendentes são compostas pelos: trato córtico-espinhal lateral e anterior; trato córtico-bulbar; trato rubro-espinhal; tratos retículo-espinhal pontino e bulbar; trato tecto-espinhal e tratos vestibulo-espinhal medial e lateral. Os três primeiros tratos iniciam na camada V do

córtex cerebral, enquanto que os outros seis tratos têm origem em núcleos subtalâmicos (Lundy-Ekman, 2004).

As vias sensoriais ascendentes podem ser divididas em dois grandes sistemas: coluna dorsal-lemnisco medial (CDLM, veicula as sensações epicríticas) e ântero-lateral (AL, veicula as sensações protopáticas). O sistema CDLM é composto pelos fascículos grácil e cuneiforme. O sistema AL é composto pelos tratos espino-talâmico lateral e ventral e espino-mesencefálico. Ainda fazem parte destas vias os tratos espino-cerebelares dorsal e ventral, que também são importantes para o controle motor (Bear *et al.*, 2008).

Nos próximos itens serão abordadas estruturas do sistema nervoso central, com o objetivo de propiciar um melhor entendimento sobre suas composições e funções e sobre como estas estruturas são importantes para a atividade sensório-motora, que é objeto de estudo desta pesquisa. As áreas a serem descritas, que serão investigadas neste trabalho, são: córtex motor, córtex somatossensorial, estriado, substância negra e medula espinhal.

3.1.1. Córtex Motor

O córtex motor primário (M1) está localizado na parte caudal do giro pré-central, e se estende do sulco lateral à superfície medial do hemisfério cerebral. Penfield e Boldrey mostraram, em um estudo feito em 1937, que esta região é a área do córtex que gera movimento com a menor intensidade de estímulo elétrico, e por isso foi denominada de córtex motor primário. Neste trabalho, os pesquisadores estimularam diversas áreas cerebrais e concluíram que o movimento possui uma representação cortical proporcionalmente maior

na região anterior à fissura central e que a sensação está representada também de forma proporcionalmente maior posteriormente. Também pode ser evidenciado que as áreas motoras e sensoriais se sobrepõem consistentemente e correspondem uma a outra horizontalmente.

Anatomicamente, o córtex M1 corresponde à área citoarquitetônica 4 de Brodmann. Korbinian Brodmann foi um neurocientista alemão que ficou conhecido por seu extenso estudo feito, no início dos anos 1900, para definir e numerar as áreas corticais, com base em suas organizações citoarquitetônicas, identificadas a partir da coloração de Nissl. Esta divisão do córtex em áreas é utilizada até hoje para designar funções corticais, apesar de se saber que a classificação de Brodmann não está completamente correta (Ziles e Amunts, 2010).

Após o estudo de citoarquitetura feito por Brodmann, seis camadas corticais também foram classificadas de acordo com os tipos de neurônios presentes. A camada I contém principalmente dendritos de neurônios de camadas mais profundas. As diversas conexões intracorticais (inter ou intra-hemisféricas) existentes ocorrem, predominantemente, a partir das camadas II e III que são, portanto, consideradas camadas associativas. A camada IV recebe a maioria das aferências, inclusive as talâmicas, sendo bem desenvolvida nos córtices sensoriais. Por outro lado, a camada V é predominantemente responsável pelas eferências, projetando para diferentes estruturas subcorticais. Nos córtices motores, esta camada é mais espessa. E, por fim, a maioria dos neurônios que projetam seus axônios ao tálamo possui os seus corpos na camada cortical VI (Pearce, 2005; Guyton e Hall, 2006).

A espessa camada V do córtex motor primário é composta por diferentes tipos celulares. Entre toda população neuronal existente no córtex motor, certo tipo de neurônio que merece destaque devido as suas habilidades e funções únicas, sendo ele conhecido como célula de Betz nos humanos. Esses neurônios são caracterizados por: um grande corpo celular piramidal; um único dendrito apical que se prolonga em direção à camada I, onde exhibe ramificações e arborização, especialmente para as camadas II e III; numerosos dendritos basais que surgem da superfície basolateral; e um longo axônio que se projeta para alvos na medula espinhal (Molnár e Cheung, 2006; Peruzzotti-Jametti *et al.*, 2014).

Os neurônios piramidais são fortemente modulados por uma circuitaria neuronal local e por neurônios de projeção de distância longa, incluindo os neurônios tálamo-corticais e neurônios de projeção ao corpo caloso (Molyneaux *et al.*, 2007; Humanes-Valera *et al.*, 2013). Estudos anatômicos sugerem que grande parte das aferências excitatórias a estes neurônios motores é proveniente das camadas II, III e V do córtex motor. Neurônios tálamo-corticais são importantes para levar informações cognitivas e sensoriais aos motoneurônios superiores, por meio de redes neuronais que envolvem o cerebelo e núcleos da base (Molnár e Cheung, 2006; Peruzzotti-Jametti *et al.*, 2014).

Os motoneurônios córtico-espinhais constituem uma população neuronal especial do córtex cerebral, pois eles são capazes de coletar, integrar, traduzir e transmitir eferências excitatórias e inibitórias como um único impulso para alvos distantes localizados na medula espinhal. Sem os motoneurônios superiores, especialmente em humanos, a conexão entre o córtex e a medula

fica gravemente comprometida (Peruzzotti-Jametti *et al.*, 2014). Axônios das regiões corticais motora primária e pré-motora fazem sinapse com os motoneurônios no corno ventral (lâminas VIII a IX) e com os interneurônios na zona intermediária (lâmina VII) da medula espinhal (Wolpert *et al.*, 2001; Lemon e Griffiths, 2005; Rathelot e Strick, 2006).

O córtex motor controla a sinergia muscular e a retroalimentação, facilitando os movimentos de forma integral. Quando há mudanças na demanda de uma determinada tarefa, o córtex M1 é responsável por coordenar a ativação dos músculos sinergistas representados corticalmente, juntamente com estruturas que residem na medula espinhal, com o objetivo de que o ato motor seja realizado com precisão (Oza e Giszter, 2014).

A força muscular que gera o movimento, o controle da rigidez e do torque articular, a cinemática do movimento (que pode ser entendida como a trajetória do movimento de um segmento corporal no espaço, incluindo a sua direção e velocidade em qualquer ponto no tempo), a impedância dos membros (capacidade de precisar a quantidade de força que precisa ser exercida para pegar objetos de diferentes pesos, por meio da co-contracção muscular) são comportamentos motores que estão representados no córtex M1 e podem ser previstos por registros eletrofisiológicos (Bensmaia e Miller, 2014).

O desenvolvimento de redes corticais e vias motoras descendentes está associado à habilidade de desempenhar movimentos cada vez mais complexos. Particularmente, o surgimento de projeções corticais diretas a motoneurônios da medula espinhal está relacionado com a capacidade de oponência do polegar dos seres humanos (Lemon, 2008; Borton

et al., 2014). A interrupção destas projeções afeta diretamente o controle motor fino dos dedos das mãos de humanos (Courtine *et al.*, 2005; Guyton e Hall, 2006). Por outro lado, lesões do trato córtico-espinhal de roedores não afetam muito a capacidade de desenvolver passos, indicando que projeções diretas do córtex motor à medula espinhal não são essenciais para a modulação da sinergia muscular que geram a locomoção em ratos e camundongos (Muir e Whishaw, 1999).

Turner e colaboradores (2001) mostraram, a partir de um estudo feito com ressonância magnética funcional, que existe mudança na representação dos membros no córtex motor após a LM. Indivíduos lesados medulares apresentaram alterações no padrão de atividade cortical quando tentavam movimentar o membro abaixo do nível de lesão, como uma maior tendência em ativar áreas parietais posteriores e também uma dependência excessiva de áreas cerebelares.

Em resumo, o córtex M1 recebe aferências das áreas pré-motoras, do lobo parietal, dos núcleos talâmicos, do cerebelo, dos núcleos da base e do aparelho vestibular, que são extremamente relevantes para a organização do movimento que será executado após a conexão de suas projeções com níveis mais baixos do sistema motor, incluindo a medula espinhal (Martin, 2003; Guyton e Hall, 2006; Bear *et al.*, 2008).

3.1.2. Córtex Somatossensorial

O córtex somatossensorial primário (Sml) corresponde às áreas citoarquitetônicas 1, 2, 3a e 3b de Brodmann e está localizado no giro

pós-central, no lobo parietal. Além da organização em camadas horizontais que existe em todo o manto cortical, sendo a camada IV mais espessa do córtex Sml (como mencionado anteriormente), os neurônios desta área estão organizados verticalmente em colunas que se estendem pelas camadas horizontais. Cada coluna recebe aferências de uma modalidade sensorial específica, que teve como início um local específico, isto é, axônios que têm origem em um determinado núcleo talâmico seguem para a mesma coluna no córtex Sml. Além disso, colunas adjacentes correspondem a um mesmo local de origem, porém recebem um estímulo sensorial diferente (térmico, doloroso, mecânico, tátil). Deste modo, é formado um módulo de colunas de uma determinada região do corpo, sendo que cada uma delas responderá a um tipo de estímulo sensorial diferente. E, por fim, módulos de colunas adjacentes respondem a estímulos originados em regiões adjacentes da superfície corporal (Martin, 2003; Guyton e Hall, 2006; Bear *et al.*, 2008).

O córtex Sml, assim como o córtex somatossensorial secundário e outras áreas do lobo parietal, exercem influências diretas no córtex motor primário, que recebe densas e extensas projeções originadas nas porções posteriores do lobo parietal superior (porção lateral do giro pós-central e da margem dorsal do sulco intraparietal) (Wise *et al.*, 1997). Existem diferentes circuitos parieto-frontais, estando cada um deles relacionado com um tipo de transformação sensório-motora necessária para gerar o movimento (Wise *et al.*, 1997; Luppino e Rizzolatti, 2000).

As áreas 1 e 2 são responsáveis pela maior quantidade de projeções do córtex Sml, estando envolvidas com o processamento tardio da informação aferente proprioceptiva e cutânea em comparação com as

projeções vindas das áreas 3b, que estão relacionadas com o estágio precoce de processamento (Martin, 2003). A área 3a recebe aferências proeminentes de fibras sensoriais do tipo Ia que envolvem os fusos musculares e possui projeções substanciais ao córtex, estando envolvida com o controle eferente das informações proprioceptivas ascendentes aos centros superiores (Rathelot e Strick, 2006).

O córtex somatossensorial, assim como o córtex visual, envia eferências ao córtex parietal posterior. A interação destas projeções no córtex parietal posterior é extremamente importante para o controle motor, pois dá base ao processamento da percepção do espaço e do esquema corporal. Pode-se dizer, portanto, que o córtex Sml está envolvido com aspectos de ordem superior do controle motor, uma vez que atua na interação da ação e percepção (Fogassi e Lupino, 2005; Bensmaia e Miller, 2014). Além disso, axônios provenientes do córtex Sml possuem projeções diretas ao corno dorsal da medula espinhal (lâminas I a VI). Estas projeções estão relacionadas com o processamento sensorial e podem modular o fluxo de informação sensorial ascendente (Lemon e Griffiths, 2005; Rathelot e Strick, 2006).

A perda da sensação somática, incluindo toque e propriocepção, tem um efeito devastador nas habilidades motoras. Sinais das aferências mecanoreceptivas da pele levam informações sobre o local do contato e sobre a força exercida na pele quando um objeto é alcançado, por exemplo. Aferências cutâneas também sinalizam quando um objeto está escorregando de nossas mãos. Como esperado, estudos mostram que anestesia cutânea da mão faz com que fique impossível manipular objetos

pequenos, mostrando a importância da propriocepção para o controle motor (Bensmaia e Miller, 2014).

Lesão ou inativação do córtex somatossensorial primário de macacos resulta em movimentos descoordenados dos dedos, e comportamentos exagerados e grosseiros ao pegar um objeto. A perda da propriocepção elimina a habilidade de planejar a dinâmica dos movimentos dos membros (Sainburg *et al.*, 1995). Pavlides e colaboradores (1993) também mostraram a importância do Sml no aprendizado de novas tarefas motoras, após verificarem, em um estudo experimental feito também em macacos, que a lesão desta estrutura prejudica de forma significativa o aprendizado.

Recentemente, Kambi e colaboradores (2014) mostraram, por meio de registros eletrofisiológicos multiunitários, que após lesão crônica da coluna dorsal da medula espinhal de macacos ocorre uma grande reorganização da área 3b do córtex Sml. Eles identificaram que a reorganização se deve, principalmente, a mudanças na ativação de um núcleo específico do tronco encefálico (cuneiforme) e não devido a mecanismos corticais.

3.1.3. Núcleos da base: foco em estriado e substância negra

Os núcleos da base consistem em quatro estruturas subcorticais: estriado (caudado, putamen e núcleo *accumbens*), globo pálido (interno e externo), substância negra (compacta e reticulada) e núcleos subtalâmicos (Kandel *et al.*, 2000; Bear *et al.*, 2008). Estas estruturas estão conectadas reciprocamente com o sistema motor cortical. Desta forma, os

núcleos da base exercem uma importante influência regulatória sobre o comportamento motor, participando do planejamento, aprendizado, início e execução de novas habilidades motoras e movimentos automáticos, mesmo não possuindo projeções diretas para os motoneurônios localizados na medula espinhal (Hoover e Strick, 1999; Doyon *et al.*, 2009).

Os componentes dos núcleos da base podem ser divididos em três grupos de núcleos: aferentes, intrínsecos e eferentes. O estriado recebe a maioria das aferências aos núcleos da base, vindas principalmente do córtex cerebral (M1, Sml, áreas associativas parietal e frontal), mas também de núcleos intralaminares do tálamo e da substância negra compacta (Grillner *et al.*, 2005). Mais especificamente, o estriado dorso-lateral recebe aferências do córtex sensório-motor e é ativado, principalmente, nas aquisições de comportamentos motores habituais e automáticos, sendo chamado também de estriado sensório-motor (Yin, 2010). A substância negra compacta, os núcleos subtalâmicos e o globo pálido externo fazem parte dos núcleos intrínsecos, ou seja, fazem conexões com os núcleos da base aferentes e eferentes (Martin, 2003).

O estriado envia eferências ao globo pálido interno e substância negra reticulada, que são as estruturas responsáveis pela maioria das eferências dos núcleos da base, sendo chamados núcleos palidais. As projeções mais densas são para o núcleo ventral anterior do tálamo, mas há também projeções ao núcleo centromediano do tálamo. Do núcleo ventral anterior há projeções diretas ou indiretas ao córtex M1, por meio de conexões com a área motora suplementar, predominantemente. Essa via é importante

para o controle dos movimentos da face, membros e tronco (Sakai *et al.*, 2000; Akkal *et al.*, 2007).

Os núcleos da base regulam o córtex M1 por meio de dois circuitos de retroalimentação: via tálamo-cortical e via córtico-cortical. A participação dos núcleos da base no movimento pode ocorrer a partir da memória, experiência do ato motor (aferências corticais), uma vez que eles recebem aferências corticais e enviam eferências talâmicas e corticais também (alça de retroalimentação negativa). Desta forma, as estruturas subcorticais podem influenciar no movimento antes mesmo de ele ser iniciado (Kandel *et al.*, 2000; Bear *et al.*, 2008).

A substância negra é composta por dois tipos principais de neurônios, dopaminérgicos e GABAérgicos, que caracterizam as regiões compacta (densa em neurônios) e reticulada, respectivamente. Os neurônios desta região são caracterizados por corpos celulares de tamanho médio a grande e com formato irregular, e apresentam de dois a quatro dendritos principais que se ramificam. A substância negra recebe aferências excitatórias do núcleo subtalâmico e inibitórias do estriado e do globo pálido lateral. Em roedores, as principais projeções eferentes da substância negra são para o tálamo ventro-medial (Paxinos, 2004).

O grande envolvimento dos núcleos da base com o movimento foi evidenciado a partir de estudos em que essas estruturas eram lesadas. Após a lesão destes núcleos, diferentes distúrbios do movimento puderam ser notados, como a hipercinesia e hipocinesia. A hipercinesia é caracterizada por movimentos espontâneos involuntários e a hipocinesia é caracterizada pela

falta de movimentos espontâneos e uma lentificação do movimento voluntário (Kandel *et al.*, 2000).

Os núcleos da base estão intimamente relacionados com outra estrutura do SNC, extremamente relevante para o controle do movimento, o cerebelo. O estriado recebe projeções dissinápticas do núcleo denteado do cerebelo, enquanto que o córtex cerebelar recebe projeções dissinápticas do núcleo subtalâmico. Essas duas vias de comunicação entre o cerebelo e os núcleos da base formam uma rede funcional integrada (Hoshi *et al.*, 2005; Bostan *et al.*, 2010).

3.1.4. Medula Espinhal

A medula espinhal é uma estrutura crucial para comunicação do cérebro com o restante do corpo. Ela é envolvida por três meninges, que são membranas conjuntivas: a dura-máter, a aracnóide e a pia-máter. A dura-máter (mãe resistente do latim) é espessa e resistente, formada por tecido conjuntivo muito rico em fibras colágenas; contém grandes vasos e nervos. Essa meninge possui a função de atuar no combate aos agentes patológicos infectantes e doenças malignas. A aracnóide (possui este nome por se assemelhar a uma teia de aranha) apresenta duas partes, uma em contato com a dura-máter sob a forma de membrana, e outra constituída por traves que a conecta com a pia-máter. A aracnóide é formada por tecido conjuntivo sem vasos sanguíneos. A pia-máter (mãe macia do latim) é a meninge mais profunda, que recebe os prolongamentos de astrócitos, que são células da glia consideradas de sustentação; essa meninge dá resistência aos órgãos do

sistema nervoso, que possuem uma consistência mole, uma vez que ela está acoplada a todas as curvaturas dos tecidos. A pia-máter é atravessada por vasos sanguíneos que vão do cérebro à medula espinhal e, seus capilares são responsáveis pela nutrição destas estruturas (Paxinos, 2004; Guyton e Hall, 2006; Bear *et al.*, 2008).

Os corpos das células neuronais da ME residem na substância cinzenta, que possui um formato de “borboleta” e constitui a parte central da medula. As fibras axonais dos tratos ascendentes e descendentes estão localizadas ao redor da substância cinzenta, em uma área denominada substância branca. Ela possui este nome, pois os axônios são envolvidos por bainha de mielina, que é um material isolador branco. Ambas as regiões são compostas também por células da glia, que ajudam na sobrevivência e sustentação dos neurônios. Células da glia incluem os astrócitos (com forma de estrela), microglia (células pequenas que apresentam componentes do sistema imune) e oligodendrócitos, que produzem a mielina no SNC (cada oligodendrócito é capaz de mielinizar 40 axônios diferentes simultaneamente) (McDonald, 1999; Martin, 2003).

A substância cinzenta pode ser dividida em duas regiões funcionalmente distintas, os cornos ventrais e dorsais. O corno dorsal corresponde à porção sensorial, ou receptiva, e o corno ventral corresponde à porção responsável pela função motora esquelética. Essas duas regiões são conectadas por uma zona intermediária, que possui no seu centro o canal epidurário, uma estrutura do sistema ventricular. Anatomicamente, a substância cinzenta é dividida em X lâminas de acordo com as suas estruturas celulares. O corno dorsal é composto pelas lâminas I a VI, a zona intermediária

pela lâmina VII, o corno ventral pelas lâminas VII e IX e a lâmina X se encontra ao redor do canal epidural (Sarikcioglu e Ozsoy, 2008).

A quantidade de substância cinzenta varia entre os segmentos medulares, principalmente de acordo com a riqueza da inervação periférica. Deste modo, nos segmentos medulares das intumescências cervical e lombossacral, a quantidade de substância cinzenta é maior, devido à inervação dos músculos dos membros superiores e inferiores, respectivamente. Os níveis torácico e lombar superior, responsáveis pela inervação de grupos musculares do tronco e abdômen, apresentam uma quantidade menor de substância cinzenta (Guyton e Hall, 2006).

Dentro da ME existem dois grandes sistemas neuronais que constituem os tratos descendentes e ascendentes. Os tratos ascendentes correspondem às vias sensoriais, que transmitem os sinais sensoriais recebidos na superfície corporal e/ou dos órgãos (receptores periféricos) para segmentos específicos da medula espinhal e, em seguida, para núcleos no tronco encefálico, tálamo e córtex. Esses sinais originam-se em células “transdutoras” especializadas, assim como sensores presentes na pele, que detectam mudanças no ambiente ou em células que monitoram o estado interno dos órgãos (McDonald, 1999).

Os principais sistemas neurais implicados na transmissão das informações somestésicas ao córtex cerebral são o sistema coluna dorsal-lemnisco medial e o sistema ântero-lateral. Mas também há vias ascendentes importantes que envolvem o cerebelo, que utilizam as informações aferentes para regular o movimento e os nervos cranianos responsáveis pelas sensações somáticas da face (Bear *et al.*, 2008).

Resumidamente, o sistema CDLM veicula as sensações epicríticas a partir dos proprioceptores e mecanoreceptores cutâneos que estão localizados nos músculos, tendões, articulações e nas extremidades distais de nervos periféricos. A informação sensorial é transmitida por axônios de grande calibre (fibras de condução rápida $A\alpha$ e $A\beta$), que entram na medula espinhal pelo corno dorsal a partir das lâminas III e IV e fletem-se medialmente para substância branca. As fibras deste sistema ascendem pela coluna dorsal, composta por dois fascículos: cuneiforme (leva informações provenientes dos membros superiores, tronco superior e parte posterior da cabeça) e grácil (leva informações dos membros inferiores e tronco inferior) (Martin, 2003).

Os axônios de primeira ordem ascendem por estes fascículos até os núcleos cuneiforme e grácil, respectivamente, onde estão localizados os corpos dos neurônios de segunda ordem. Os axônios destes neurônios decussam no bulbo para se dirigirem até o núcleo ventro-pósterolateral do tálamo por meio de um trato conspícuo de substância branca, chamado lemnisco medial. A decussação das fibras no bulbo faz com que a sensação epicrítica originada no lado esquerdo do corpo esteja relacionada com o lado direito do encéfalo. No núcleo ventro-pósterolateral do tálamo encontram-se os corpos dos neurônios de terceira ordem, cujos axônios seguem em direção ao córtex somatosensorial primário. Desta estrutura, a informação é encaminhada para as áreas sensoriais de ordem superior (Martin, 2003).

O sistema AL veicula as informações protopáticas, tendo início em quimioceptores, nociceptores e termoreceptores. Os receptores estão ligados a fibras do tipo $A\delta$ e C, de pequeno diâmetro, muito pouco mielinizadas ou amielínicas respectivamente, levando a uma condução lenta da informação. O

neurônio de primeira ordem entra pelo trato de Lissauer no corno dorsal da medula espinhal e faz sinapse com o neurônio de segunda ordem nas porções profundas da lâmina I e superficiais da lâmina II da ME. As fibras A δ penetram ainda na lâmina V, estando esta projeção relacionada com as informações nociceptivas viscerais e musculares (Lundy-Ekman, 2004).

Os axônios de segunda ordem fletem-se, decussam na comissura branca anterior e seguem para região ântero-lateral da medula espinhal, ascendendo para diversos núcleos, nos quais são feitas sinapses com os neurônios de terceira ordem em múltiplos níveis neurais. Devido à característica de conexões em diferentes níveis, o sistema ântero-lateral é dividido em tratos distintos: espino-reticular, espino-mesencefálico, espino-talâmico e espino-hipotalâmico. Os neurônios de terceira ordem também podem atingir diferentes áreas corticais e não somente o córtex Sml, tais como córtex cingulado e córtex insular (Lundy-Ekman, 2004).

O outro sistema de neurônios da ME corresponde às vias de controle motor descendentes, tanto dos músculos lisos dos órgãos internos, como dos músculos estriados. Eles também ajudam a modular as ações do sistema nervoso autonômico, que regulam as alterações na pressão arterial, temperatura e circulação corporal em situações de estresse. Os sistemas descendentes iniciam nos neurônios localizados no encéfalo, os quais mandam sinais elétricos para níveis ou segmentos específicos da medula espinhal. Neurônios deste segmento convertem então o estímulo recebido em impulsos que são enviados para fora da medula (McDonald, 1999).

De maneira geral, as vias descendentes dorsolaterais (tratos córtico-espinhal lateral, rubro-espinhal e retículo-espinhal bulbar) estão

relacionadas, principalmente, com o controle dos músculos distais, participando de movimentos de punhos e mãos direcionados a um alvo específico. Estes tratos descendem pela região dorsolateral da substância branca e terminam nos motoneurônios e interneurônios em múltiplos segmentos medulares, localizados na porção lateral do corno ventral e zona intermediária (Drew *et al.*, 2002; Lemon, 2008; Darian-Smith, 2009).

Por outro lado, as vias ventromediais (tratos córtico-espinhal anterior, tecto-espinhal, retículo-espinhal pontino e vestibulos-espinhais medial e lateral) participam do controle dos músculos axiais e proximais, tendo ação nos ajustes posturais, uma vez que integram informações somatossensoriais visuais e vestibulares. Estes tratos descendem ao longo da substância branca pela região ventromedial e terminam em motoneurônios e interneurônios localizados na porção medial do corno ventral e zona intermediária. Ainda existe o trato córtico-bulbar, que é responsável pelo controle dos músculos da cabeça e face e termina em neurônios motores e interneurônios localizados no núcleo motor de nervos craniais e na formação reticular, respectivamente (Drew *et al.*, 2002; Lemon, 2008; Darian-Smith 2009).

O axônio de um neurônio de projeção descendente pode fazer conexões monossinápticas (entre neurônio sensorial primário e neurônio motor, movimento reflexo), dissinápticas e polissinápticas (entre neurônios de projeção, interneurônios e motoneurônios). Existem dois tipos de interneurônios: segmentar (possuem um axônio curto que distribui dendritos que fazem sinapse com neurônios motores dentro de um segmento espinhal) e proprioespinal (possuem axônio longo que se projeta para múltiplos segmentos espinhais antes de fazerem sinapse com os motoneurônios; atuam

na coordenação dos movimentos entre membros) (Alstermark *et al.*, 2007; Lemon, 2008; Darian-Smith, 2009).

A medula espinhal possui ainda circuitos neuronais (assim como aqueles envolvidos no reflexo e em alguns aspectos da marcha, *CPG*) que podem ser ativados por sinais sensoriais sem aferências do cérebro, embora estes circuitos possam ser influenciados por mensagens enviadas do cérebro (Borton *et al.*, 2014). Os *CPGs* locomotores relacionados aos membros posteriores de roedores estão localizados principalmente nos segmentos lombares de L1 a L3, e compreendem células da parte ventromedial das lâminas VII, VIII e IX; enquanto que nas regiões dos cornos dorsais parecem fornecer somente aferências modulatórias ao funcionamento dos *CPGs* (Kuzhandaivel *et al.*, 2011). Em roedores, a geração de padrões locomotores ocorre no segmento tóraco-lombar da medula espinhal, sendo que as regiões mais caudais estão relacionadas com ritmicidade dos movimentos (Bertrand e Cazalets, 2002; Fouad e Pearson, 2004).

Estudos mostraram que a medula espinhal é capaz de gerar comportamentos motores, como a locomoção, mesmo quando é desconectada do tronco encefálico e encéfalo, devido à presença dos *CPGs* (Grillner, 2006; Edgerton *et al.*, 2008; Dietz, 2009). Desta forma, as informações sensoriais ascendentes e motoras descendentes interagem com a circuitaria da ME para modular o movimento, incluindo a sua velocidade, direção, coordenação e amplitude (Rossignol, 2006).

3.2. Lesão medular e suas implicações

A lesão medular traumática pode ser heterogênea tanto em causa como em desfecho, podendo resultar de: contusão (comum em acidentes automobilísticos e quedas; caracterizada principalmente por áreas de hemorragia com expansão da necrose e cavitação, mas não rompimento da superfície da medula espinhal); penetração/laceração (por armas brancas ou de fogo; caracterizada por um claro rompimento da superfície da medula espinhal, sendo que a lesão é preenchida, na maioria das vezes, por tecido conectivo rico em colágeno); ou compressão/maceração (por presença de tumores, herniações discais, múltiplas fraturas; o epicentro da lesão é muitas vezes preenchido por tecido conectivo e por fragmentos das raízes nervosas) (Norenberg *et al.*, 2004; Thuret *et al.*, 2006; Dasari *et al.*, 2014).

Todo o sistema nervoso deve ser investigado quando um indivíduo sofre a LM, pois lesão cerebral traumática, principalmente as formas mais leves, acompanha quase 50% das lesões traumáticas da medula espinhal. Além disso, mais de um nível da medula espinhal também pode estar lesionado. Portanto, a avaliação deve incluir o estado mental, os nervos cranianos, os sistemas motor, sensorial e autonômico, a coordenação e a marcha (McDonald e Sadowsky, 2002; Winter e Pattani, 2011).

De acordo com Grossman *et al.* (2012), insuficiência respiratória, derrame pleural, grave bradicardia, parada cardíaca e choque estão entre as complicações mais frequentes, que causam risco de vida aos indivíduos lesados medulares no período inicial da hospitalização. Já na fase crônica é necessário atentar às alterações do sistema imunológico, uma vez

que os indivíduos ficam mais susceptíveis às infecções, como pneumonia, pancreatite e infecção urinária. Estudos feitos com pacientes e também com animais mostram supressão do sistema imunológico dias após a LM, com diminuição dos monócitos e linfócitos circulantes (Riegger *et al.*, 2007; Riegger *et al.*, 2009; Popovich e McTigue, 2009).

O choque medular ocorre devido à ampla interrupção de fibras córtico-espinhais, córtico-pontinas e córtico-reticulares, sendo caracterizado por uma série de sinais clínicos, tais como paralisia flácida, diminuição de reflexos musculares e do tônus abaixo do nível de lesão (Lyalka *et al.*, 2005; Elbasiouny *et al.*, 2010; Leech *et al.*, 2014). Estes sinais são característicos de lesão ou morte de motoneurônios inferiores segmentares localizados na substância cinzenta central na área de lesão e em vários segmentos acima e abaixo (McDonald e Sadowsky, 2002).

No entanto, a maioria das lesões medulares envolve a região da substância branca, afetando os longos tratos ascendentes e descendentes, o que acarreta no surgimento de sinais de dano ao motoneurônio superior abaixo do nível de lesão. Em todas as lesões, exceto nas transecções completas, uma pequena borda de substância branca permanece no foco de lesão. Esta substância branca residual permite que alguns axônios permaneçam intactos, mas muitos deixam de funcionar adequadamente por causa da desmielinização segmentar. Deste modo, os sinais clínicos característicos desta lesão normalmente não aparecem em período agudo, mas sim com o tempo, conforme a lesão vai se estendendo pelo sistema nervoso. Entre os sinais estão a hiperreflexia, o aumento do tônus muscular e a

presença de reflexos patológicos (reflexo de Babinski) (McDonald e Sadowsky, 2002; Wilkinson e Lennox, 2005).

Quando a lesão fica confinada à substância cinzenta, prejuízos motores e sensoriais ocorrem nas áreas que são inervadas por aquele nível (por exemplo, lesão na sexta vértebra cervical afeta as funções da mão) sem afetar as funções muito abaixo daquele segmento (como o andar e a função urinária). Por outro lado, se há destruição da substância branca no mesmo nível, mesmo que haja substância cinzenta residual, o indivíduo fica tetraplégico e sem controle dos esfíncteres, por exemplo (McDonald e Sadowsky, 2002).

Outra classificação da LM está relacionada com a sua extensão, podendo ser completa ou incompleta. Uma lesão completa resulta em total ausência de funções motora e sensorial abaixo do nível de lesão. O nível neurológico é dado como sendo o nível mais baixo, no qual ainda é encontrada alguma evidência de função ou sensação muscular, sem preservação, no entanto, da funcionalidade da área sacral (Kandel *et al.*, 2000; Lundy-Ekman, 2004).

Na lesão incompleta há preservação parcial da função neurológica em mais de um segmento abaixo do nível de lesão, e isso inclui a parte mais inferior do segmento sacral. Uma profunda sensação anal é característica desse tipo de lesão e a contração voluntária da musculatura do esfíncter anal é utilizada para demonstrar se a função está preservada ou não (Kandel *et al.*, 2000; McDonald e Sadowsky, 2002; Wilkinson e Lennox, 2005).

Indivíduos com lesão medular podem ser tetraplégicos ou paraplégicos de acordo com a altura da lesão. A paraplegia é caracterizada por

diminuição ou perda da função motora e sensorial dos segmentos torácicos, lombares ou sacrais, devido à perda de componentes neurais da medula espinhal decorrente da lesão. Nestes casos, a função dos membros superiores está preservada, mas dependendo do nível de lesão as funções do tronco, dos órgãos pélvicos e dos membros inferiores podem ser afetadas (Wilkinson e Lennox, 2005).

Indivíduos tetraplégicos apresentam diminuição ou perda da função sensorial e motora nos segmentos cervicais da medula espinhal, devido a danos aos elementos neurais dentro do canal medular. A tetraplegia resulta em diminuição funcional dos membros superiores assim como do tronco, dos órgãos pélvicos e dos membros inferiores. Pessoas com lesões acima de C4 não conseguem respirar independentemente, porque o diafragma é innervado pelo nervo frênico (C3 a C5), e os músculos abdominais e intercostais são innervados por nervos torácicos (Lundy-Ekman, 2004).

A Associação Americana de Lesão Espinhal (*American Spinal Injury Association*) desenvolveu uma escala de incapacidade para graduar a gravidade da lesão medular e esta escala é amplamente utilizada no mundo. Ela possui cinco níveis: A (lesão completa, sem a preservação das funções motora e sensorial no segmento sacral S4-S5), B (lesão incompleta, com preservação da função sensorial, mas não motora abaixo do nível neurológico e estendendo para o segmento sacral S4-S5), C (lesão incompleta, com preservação da função motora abaixo do nível neurológico; a maioria dos músculos possui grau de força menor do que três), D (lesão incompleta, com preservação da função motora abaixo do nível neurológico; a maioria dos

músculos possui grau de força maior do que três) e E (funções motora e sensorial normais) (McDonald e Sadowsky, 2002; Thuret *et al.*, 2006).

Como descrito, a LM pode ocorrer devido a diferentes causas e possui diversas classificações de acordo com o tipo de motoneurônio afetado, sua extensão, nível afetado e gravidade. Porém, independentemente destes fatores, a lesão medular afeta a condução de informações sensoriais e motoras, por um rompimento dos tratos espinhais ascendentes e descendentes, respectivamente. Isso leva à perda da percepção adequada dos estímulos sensoriais (sensações epicríticas e protopáticas) e à imprecisão na organização do comportamento motor (movimentação ativa abaixo do nível de lesão) (Lu *et al.*, 2005).

O comportamento motor, como mencionado anteriormente, sofre consequências facilmente identificáveis imediatamente após a LM, na fase de choque medular, caracterizada pela paralisia flácida. Poucas semanas após a lesão, mudanças estruturais na medula espinhal acarretam em má regulação da excitabilidade dos motoneurônios e má responsividade às aferências sensoriais e aos comandos descendentes residuais. Essas mudanças podem contribuir para o desenvolvimento de comportamentos motores espásticos tanto em animais como em humanos (Gorassini *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2010; Elbasiouny *et al.*, 2010).

De acordo com Leech *et al.* (2014), o comportamento motor espástico em humanos com LM consiste em hipertonia espástica, que inclui tanto a espasticidade (aumento da velocidade da excitabilidade do reflexo de estiramento e reflexo patelar exagerado), como os espasmos (manifestados quando há ativação muscular multi-articular involuntária e mantida em resposta

a múltiplos estímulos sensoriais). A espasticidade pode impactar negativamente na recuperação da função locomotora devido à ativação anormal da musculatura durante o andar, estando presente em aproximadamente 70% dos indivíduos com lesões torácicas e cervicais com um ano de lesão (Adams *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos mostram que a presença da espasticidade pode promover a recuperação da atividade motora ao usar funcionalmente esse mecanismo involuntário e reflexo durante a locomoção como forma de compensação da falta de ação voluntária (Gorgey *et al.*, 2010; Fouad *et al.*, 2010; Leech *et al.*, 2014).

Segundo Harkema (2008), a presença de clônus (sintoma muitas vezes presente após a LM) e de espasticidade pode ser considerada como um indicativo de que as redes neurais estão ativas e têm o potencial de promover a recuperação funcional, ao invés de ser uma consequência da perda das aferências supra-espinhais que proíbe a recuperação da função motora. E, portanto, estes sintomas não devem ser eliminados por intervenções cirúrgicas ou farmacológicas.

A espasticidade proporciona uma tensão periódica, que pode proteger os indivíduos lesados medulares contra a inativação dos músculos esqueléticos abaixo do nível de lesão, e conseqüentemente, pode promover descarga de peso nos membros afetados (Castro *et al.*, 1999; Gerrits *et al.*, 1999; Dupont-Versteegden *et al.*, 2000; Giangregorio e McCartney, 2006; Grumbles *et al.*, 2009). Este fato é extremamente importante, uma vez que a descarga de peso fornece benefícios aos músculos (manutenção da área seccional do músculo) e aos ossos (manutenção da densidade óssea), diminuindo as chances de fratura que ocorrem mais facilmente em indivíduos

lesados em simples atividades diárias, como nas transferências posturais (Giangregorio e McCartney, 2006; Dudley-Javoroski e Shields, 2008). Em modelos experimentais de lesão medular também já foram identificadas alterações musculares como hipotrofia muscular (diminuição da área seccional das miofibrilas), devido a alterações nas propriedades contráteis dos músculos (Biering-Sorensen *et al.*, 2009; Ilha *et al.*, 2011).

Em relação ao comportamento sensorial, as sensações de pressão, tato, vibração e dor são extremamente afetadas quando as colunas dorsais da medula espinhal são atingidas. O indivíduo se torna incapaz de discriminar as diferentes sensações e suas características (frequência, duração e intensidade), o que prejudica diretamente o controle motor que depende da retroalimentação sensorial (Kaas *et al.*, 2008).

As consequências relacionadas ao comportamento de dor são preocupantes, uma vez que se estima que dois terços dos indivíduos com lesão medular apresentam algum tipo de dor e um terço desenvolve dor neuropática central difusa no nível da lesão (Gustin *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2014). Ela pode estar presente tanto em lesões completas como incompletas (Hutchinson *et al.*, 2004; Hains e Waxman, 2006).

A dor neuropática é causada por disfunções no sistema nervoso central ou periférico e pode estar localizada acima, abaixo ou no nível da lesão. Ela pode se manifestar como hiperalgesia mecânica e/ou térmica (resposta dolorosa exagerada a estímulos nocivos mecânicos e/ou térmicos), mas a sua forma mais comum é como alodínea (resposta dolorosa a estímulos não nocivos) (Gwak *et al.*, 2006; Defrin *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2014; M'Dahoma *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2014).

Recentemente, M'Dahoma e colaboradores (2014) mostraram que ratos submetidos a transecção da medula espinhal desenvolvem dor neuropática central no nível da lesão e sugerem que as alterações neuroinflamatórias induzidas pela lesão reforçam a ideia de que tanto a microglia como os astrócitos reativos contribuem para geração da dor neuropática. Uma série de mecanismos de sinalização intracelular contribui para o desenvolvimento da dor neuropática crônica (Hulsebosh *et al.*, 2009).

A dor não é por si só um fator incapacitante, mas também interfere na participação do paciente nos programas de reabilitação, levando a outras complicações, como disfunções cognitivas e emocionais, piorando a qualidade de vida destes indivíduos (Jang *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2014). Outras disfunções que impactam diretamente na qualidade de vida de lesados medulares estão relacionadas com os sistemas urinário e sexual (Thuret *et al.*, 2006).

Os sintomas apresentados por indivíduos que apresentam comprometimento dos sistemas urinário e sexual podem ser diversos: disfunção no armazenamento e na eliminação da urina, infecções urinárias recorrentes, diminuição ou ausência de lubrificação, ereção e ejaculação, infertilidade (McDonald e Sadowsky, 2002; Vodusek, 2014). Em modelo experimental, também foram identificadas mudanças na composição da urina (níveis proteicos) na LM crônica, mostrando que mudanças patológicas na bexiga podem persistir por um longo período de tempo (Herrera *et al.*, 2010).

De acordo com Ward e colaboradores (2014), as complicações do trato urinário são responsáveis pela maioria das internações hospitalares dos indivíduos LM, que são 11 vezes mais susceptíveis a morrer de doenças

do sistema urinário do que indivíduos sem lesão. Manipulação diária e frequente da bexiga é necessária para evitar e controlar incontinência, dilatação da bexiga, refluxo vesico-uretral, pielonefrite, infecções do trato urinário inferior, cistite e disreflexia autonômica.

As complicações da LM, como dor neuropática, espasticidade, hiperreflexia, disfunções urinárias e sensações anormais são consequência de uma série de eventos que ocorrem após a lesão, como por exemplo, a liberação de mediadores tóxicos, que são produtos de processos inflamatórios e excitotoxicidade (Yeziarski, 2005). Um pré-requisito para o desenvolvimento de terapias eficientes para LM (estratégias neuroprotetoras e prevenção de sequelas) é entender detalhadamente os processos patofisiológicos que ocorrem durante a lesão e como os vários componentes envolvidos interagem para resultar nos déficits funcionais mencionados anteriormente (Rowland *et al.*, 2008; Kuzhandaivel *et al.*, 2011). Grandes esforços têm sido empregados a fim de se entender estas mudanças patofisiológicas, que serão descritas no próximo item.

3.2.1. Patofisiologia

A patofisiologia da lesão medular é caracterizada por duas fases: primária e secundária. A fase primária envolve a lesão mecânica inicial, na qual a deformidade da coluna espinhal (fratura e/ou deslocamento) impacta diretamente na medula espinhal, rompendo axônios, vasos sanguíneos e membranas celulares. Estes danos são seguidos pelo início retardado dos eventos secundários da lesão que englobam: disfunção vascular, edema,

isquemia, excitotoxicidade, mudanças eletrolíticas, produção de radicais livres, inflamação e morte celular por apoptose (Figuras 1 e 2) (McDonald e Sadowsky, 2002; Rowland *et al.*, 2008; Kuzhandaivel *et al.*, 2011; Dasari *et al.*, 2014). Enquanto os déficits neurológicos estão presentes imediatamente após a lesão inicial, a fase secundária resulta em um período prolongado de destruição tecidual (Thuret *et al.*, 2006).

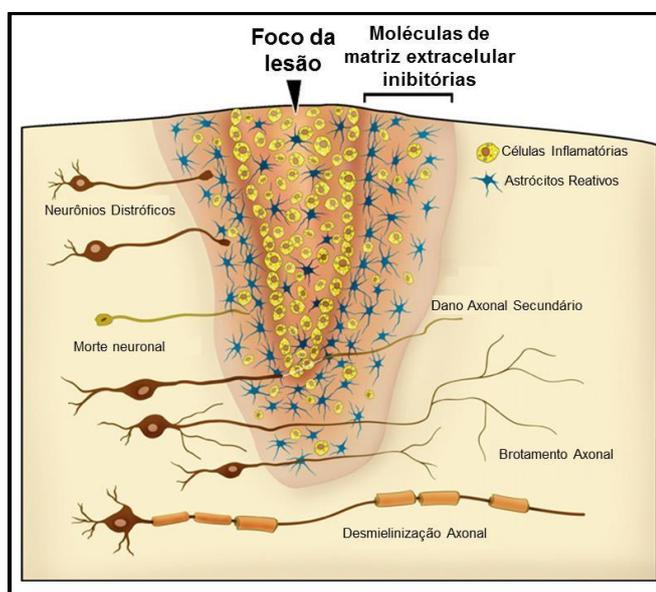


Figura 1 - Imagem ilustrativa dos eventos patofisiológicos da lesão medular. O foco de lesão no SNC expande conforme as células inflamatórias interagem com os astrócitos reativos e outras células da glia reativas ao redor da cavidade de lesão. Essa região é associada à regulação de moléculas de matriz extracelular inibitórias, como proteoglicanas, que estão distribuídas em grande concentração do foco de lesão para a área de penumbra. Um ambiente não permissivo para regeneração é formado, com morte neuronal, desmielinização e presença de neurônios distróficos. Fonte: modificado de Fitch *et al.* (2008).

Os eventos primários acontecem de maneira localizada, restritos à área do segmento medular lesionado e são caracterizados por isquemia e hemorragia (Zhang *et al.*, 2012). Lesões microvasculares imediatas ocorrem com hemorragia da substância cinzenta e rompimento da membrana celular e da barreira sanguínea da medula espinhal, levando a infiltração local de neutrófilos. A quantidade de hemorragia e edema após a lesão está

diretamente relacionada com o grau de comprometimento neurológico do paciente (McDonald e Sadowsky, 2002; Losey *et al.*, 2014).

O rompimento traumático dos axônios e a morte imediata de neurônios e células da glia são responsáveis pelo fenômeno do choque medular, que resulta em perda instantânea de função no próprio nível de lesão e abaixo dele nas lesões completas (Rowland *et al.*, 2008). Nas primeiras horas podem ser identificadas diversas substâncias prejudiciais, inibitórias no foco de lesão, assim como as células de fator de necrose tumoral (*tumour necrosis factor, TNF*) positivas e a interleucina-6 (IL-6) (Afshari *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Essas substâncias potencializam a morte neuronal mediada por glutamato, diminuem a quantidade de macrófagos e microglia ativa. Outras interleucinas (IL-1 α e IL-18) também são potentes agentes inflamatórios, que iniciam ou amplificam uma grande variedade de efeitos associados com a imunidade inata, as respostas locais de lesão tecidual e a invasão microbiana (Dasari *et al.*, 2014; Peruzzotti-Jametti *et al.*, 2014).

Subsequentemente, uma cascata de eventos secundários é desencadeada, ocorrendo necrose e apoptose que são fatores deletérios aos neurônios sobreviventes ao redor, reduzindo as chances de regeneração dos neurônios existentes na área de penumbra, podendo impedir ou limitar qualquer recuperação funcional possível. Com a morte dos neurônios e células da glia, cavidades e cistos, que interrompem os tratos axonais ascendentes e descendentes, são formados (McDonald e Sadowsky, 2002; Thuret *et al.*, 2006; Afshari *et al.*, 2009; Figura 2). Processos patofisiológicos que ocorrem na fase secundária são responsáveis por exarcebar os danos iniciais, podendo expandir a lesão para segmentos adjacentes e criar um ambiente inibitório que

é hostil para os esforços endógenos de reparação, regeneração e remielinização (Dasari *et al.*, 2014).

A resposta inflamatória pós-trauma exerce um papel crítico na fase secundária pós LM por meio de modulação de uma série de complexos celulares e interações moleculares. A ativação e o recrutamento de células inflamatórias periféricas, incluindo células da microglia, astrócitos, monócitos, linfócitos-T e neutrófilos, promovem o desenvolvimento dos danos secundários, que podem ser subdivididos em: fase aguda (de duas horas a dois dias), fase subaguda (dias-semanas), e a fase crônica (meses-anos); cada uma com processos patofisiológicos distintos (Rowland *et al.*, 2008; Dasari *et al.*, 2014).

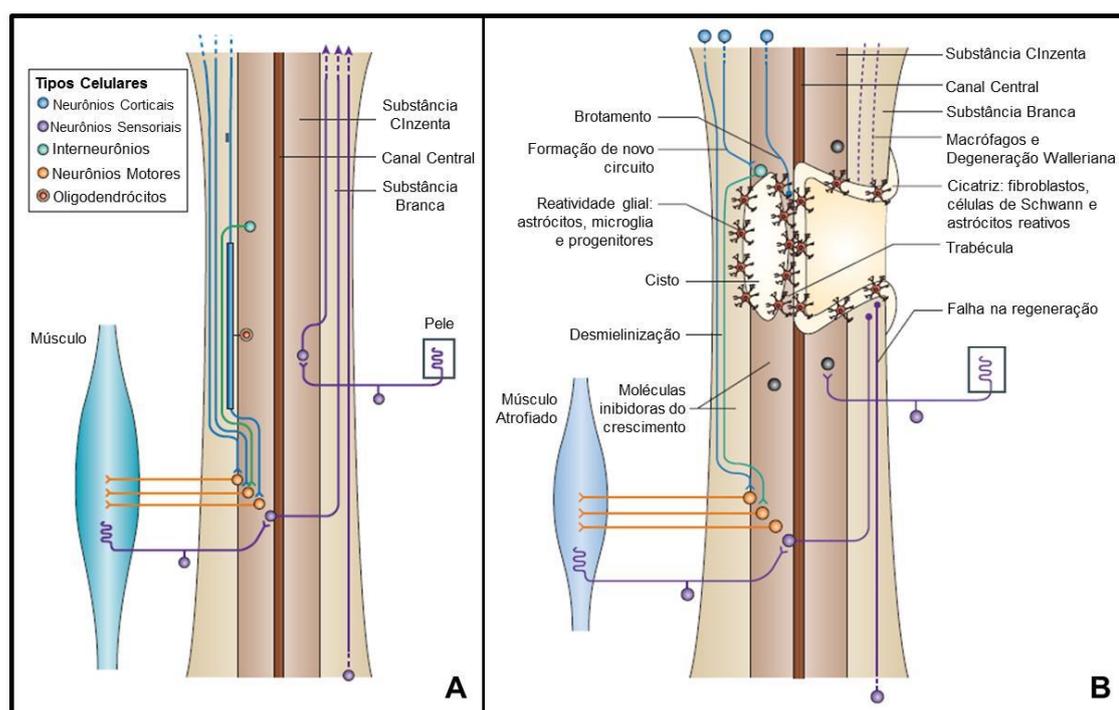


Figura 2 - Imagem ilustrativa da medula espinal intacta em uma vista sagital, com demonstração dos: tratos ascendentes (roxo) e descendentes (azul) na substância branca; neurônios sensoriais de primeira ordem localizados na pele que entram pela substância cinzenta na ME; oligodendrócitos que mielinizam os axônios (A). Medula espinal após a LM, com demonstração de: interrupção dos tratos ascendentes e descendentes, que falham em regenerar longas distâncias; formação de cistos; invasão de células do sistema nervoso periférico, como as células de Schwann; reatividade glial; presença de moléculas inibitórias; atrofia muscular (B). Fonte: modificado de Thuret *et al.* (2006).

A fase aguda é caracterizada por continuação da hemorragia, edema crescente, inflamação e marcos do início de processos adicionais da lesão secundária, tais como produção de radicais livres, excitotoxicidade mediada por glutamato, e neurotoxicidade associada às respostas imunes que contribuem para lesão axonal e morte neuronal adicional. O rompimento da microvascularização, a perda de mecanismos autoregulatórios normais, a hipotensão global e o aumento da pressão intersticial são base para a hipoperfusão prolongada vista após a LM. A isquemia resulta em edema celular citotóxico que afeta neurônios e células da glia. A perda significativa de oligodendrócitos associado ao edema axonal levam ao bloqueio de potenciais de ação, por afetarem diretamente a bainha de mielina dos neurônios (Zai e Wrathall, 2005; Rowland *et al.*, 2008; Kuzhandaivel *et al.*, 2011).

A fase subaguda é caracterizada por maturação da cicatriz glial, um processo multifatorial que envolve astrócitos reativos, progenitores gliais, microglia, macrófagos, fibroblastos e células de Schwann. A cicatriz é frequentemente orientada perpendicularmente ao neuraxis e parece impenetrável. Ela também contém inibidores moleculares de transmembrana de crescimento axonal (Zai e Wrathall, 2005; Thuret *et al.*, 2006; Rowland *et al.*, 2008).

O término de mudanças pós LM (fase crônica) é identificado como um fenômeno patofisiológico com sólida formação de cicatriz glial e apoptose neuronal, resultando em diminuição da função neuronal como um todo (Thuret *et al.*, 2006). O processo de degeneração walleriana dos axônios danificados continua acontecendo e pode durar anos até que os axônios

danificados e seus corpos celulares sejam completamente removidos (Rowland *et al.*, 2008; Kuzhandaivel *et al.*, 2011).

Embora haja alguns casos de melhora da função neurológica muitos anos após a lesão, pode ser considerado que dentro de aproximadamente um a dois anos, os déficits neurológicos estejam estabilizados e a lesão é completamente maturada (Rowland *et al.*, 2008).

No entanto, reparo endógeno e mecanismos regenerativos também ocorrem durante a fase secundária. Células inflamatórias invasoras ou locais (incluindo neutrófilos, microglia, macrófagos e células T) podem ter uma variação de papéis destrutivos e reparativos. Essas células agem de maneira a tentar minimizar a extensão da lesão (por meio de astrogliose), reorganizar o suprimento sanguíneo por meio de angiogênese, limpar os *debris* celulares, unir/remodelar circuitos neuronais danificados e, com isso, oferecer alvos exploráveis para intervenção terapêutica (Afshari *et al.*, 2009; Dasari *et al.*, 2014).

Em contraste com os eventos destrutivos, características patológicas comumente observadas indicam que possa haver alguma recuperação espontânea após a LM. Ao passo que existe pouca ou nenhuma neurogênese na medula espinhal lesionada, proliferação no canal ependimário e peri-ependimário gera células precursoras novas que se diferenciam exclusivamente em células da glia (Thuret *et al.*, 2006). Apesar de estas células serem responsáveis pela formação da cicatriz glial, que é uma barreira física para o brotamento axonal, elas podem também exercer um potente papel preventivo da resposta inflamatória (Peruzzotti-Jametti *et al.*, 2014).

A cicatriz glial restringe o extravasamento de leucócitos para as áreas perivasculares e, portanto, reduz a infiltração prejudicial de células do sistema imunológico no parênquima adjacente do SNC, inibindo a desgranulação de neutrófilos. Além disso, os astrócitos podem reparar diretamente a barreira sanguínea (Peruzzotti-Jametti *et al.*, 2014). No entanto, poucos axônios são capazes de regenerarem por longas distâncias de volta para os alvos de origem por causa dos fatores inibitórios presentes na lesão e da barreira física formada pela cicatriz. Várias formas de plasticidade espinhal, do tronco encefálico e cortical ocorrem e podem contribuir para a recuperação compensatória limitada (Thuret *et al.*, 2006; Bradbury e McMahon, 2006; Afshari *et al.*, 2009).

Após a LM, novos circuitos espinhais podem atravessar a lesão, incluindo a presença de brotamento de axônios corticoespinhais lesionados em direção aos tratos propioespinhais descendentes longos remanescentes, que aumentam conectividade com neurônios motores lombares (importantes para os CPGs). Áreas sensório-motoras corticais e em nível subcortical podem rearranjar funcionalmente; o sistema rubrospinal pode reorganizar e compensar parte da função perdida após lesão córtico-espinhal (Thuret *et al.*, 2006; Bradbury e McMahon, 2006). Desta forma, apesar de existir alguma recuperação espontânea após lesão do SNC, ela é incompleta. Recuperação adicional da função requer a combinação de intervenções terapêuticas seguras e eficazes, sendo este tema abordado no próximo item.

3.3. Abordagens Terapêuticas

Ainda não se sabe ao certo qual é o melhor intervalo de tempo para se iniciar um tratamento adequado após a LM, com o objetivo de limitar ou até prevenir os danos secundários à lesão, cuja extensão está diretamente relacionada com a recuperação funcional (Rowland *et al.*, 2008; Kuzhandaivel *et al.*, 2011). No entanto, o primeiro tratamento farmacológico para LM foi introduzido nos anos 90, após um estudo clínico multicêntrico mostrar que altas doses do esteroide metilprednisolona reduzia os déficits quando administrado dentro de oito horas após o trauma (Bracken *et al.*, 1990). Acredita-se que metilprednisolona possa participar na redução do edema, da inflamação, da liberação de glutamato e do acúmulo de radicais livres (McDonald e Sadowsky, 2002).

De acordo com Tohda e Kuboyama (2011), a metilprednisolona possui efeitos neuroprotetores por apresentar efeitos antioxidantes, melhorar a circulação sanguínea na medula espinhal, reduzir o influxo de cálcio, reduzir a degeneração walleriana e atenuar a peroxidização lipídica. Apesar de este tratamento farmacológico promover bons resultados em relação à neuroproteção tanto na ME como no cérebro (Hulsebosch, 2002; Craig *et al.*, 2002; Lim e Tow, 2007; Chang *et al.*, 2009), ele tem falhado em produzir uma recuperação funcional em modelos experimentais (Takami *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2009).

Existem evidências de que terapias que promovam a sobrevivência, por meio do brotamento neuronal de fibras residuais, do brotamento neuronal de fibras lesadas ou da regeneração (Figura 3), mesmo

que de poucas fibras, são eficientes na promoção da reabilitação de animais lesados e podem ser promissoras para humanos com LM (Kaas *et al.*, 2008, Dietz e Fouad, 2014). A capacidade que os neurônios têm de reorganizar os circuitos ainda não é bem compreendida, mas sabe-se que este processo pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo: regeneração de múltiplas populações axonais, formação de padrões originais de reinervação, formação de sinapses aberrantes e competição por conectividade sináptica com interneurônios e neurônios de projeção (Lin *et al.*, 2014).

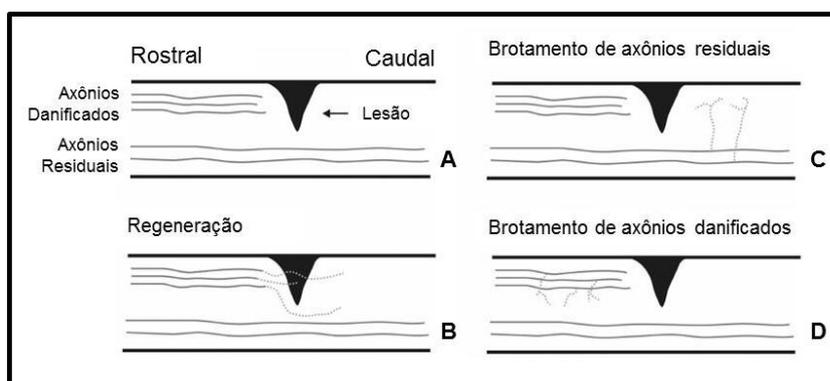


Figura 3 - Imagem ilustrativa do que acontece com os axônios após a LM (A) e os seus mecanismos de regeneração (crescimento das extremidades dos axônios, que pode ocorrer ao redor da lesão; B), brotamento de axônios residuais (normalmente, ocorre em áreas denervadas; C) e brotamento de axônios danificados (ocorre na área íntegra do axônio que está danificado em direção a axônios intactos presentes, próximo à lesão; D). Fonte: modificado de Fouad e Dietz (2014).

Nos dias de hoje, existem diferentes abordagens terapêuticas que podem ser adotadas de acordo com a fase da lesão de maneira a otimizar os resultados obtidos. Essas abordagens concentram-se em quatro grandes áreas: limitação da morte neuronal imediatamente após a lesão (neuroproteção); promoção de regeneração celular; reposição de células perdidas (transplantes); e, por fim, reabilitação (Craig *et al.*, 2002; McDonald e Sadowsky, 2002; Rowland *et al.*, 2008). A seguir serão descritos, de maneira

resumida, quais técnicas estão envolvidas nas três primeiras abordagens, que também podem ser visualizadas na figura 4.

Em relação à prevenção da progressão da lesão secundária, as mortes celulares apoptótica e por necrose podem ser prevenidas com uso de agentes anti-excitotóxicos (bloqueio de receptores de glutamato) e tratamentos anti-apoptóticos (com fatores de crescimento como o neurotrofina-3, NT-3; fator neurotrófico derivado do encéfalo, *brain derived neurotrophic factor* *BDNF*; fator de crescimento de nervo). Uma estratégia para compensar a desmielinização pode ser a administração de substâncias químicas que favorecem a propagação dos potenciais de ação em áreas desmielinizadas (prevenindo o bloqueio da condução do impulso nervoso), e de agentes que encorajam a sobrevivência de oligodendrócitos que remielinizam os axônios (como as células embainhantes olfatórias) (McDonald e Sadowsky, 2002; Gorrie *et al.*, 2010).

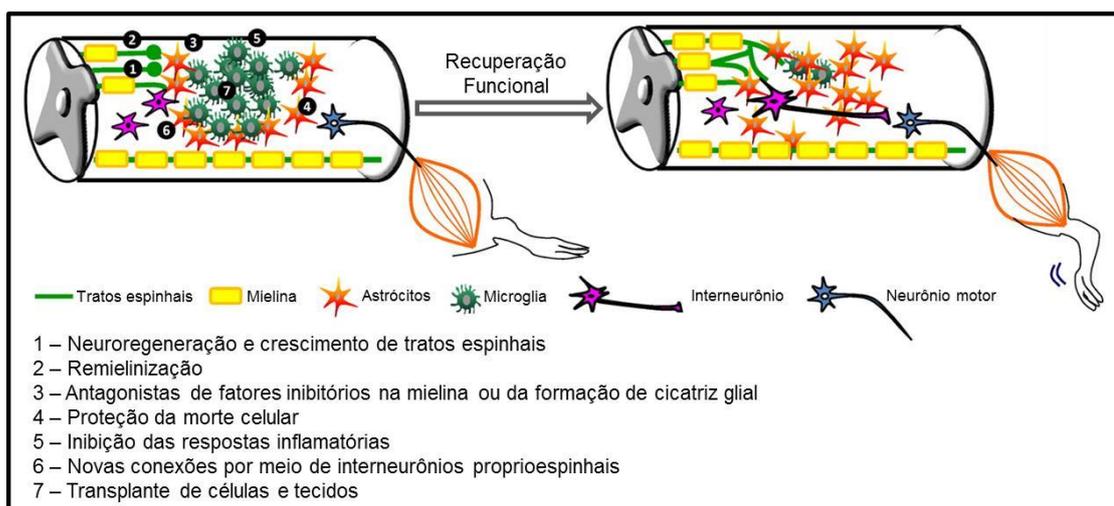


Figura 4 - Representação de possíveis estratégias de intervenção para melhorar a recuperação funcional, que estão apontadas na imagem pelos itens de um a sete. Fonte: modificado de Tohda e Kuboyama (2011).

Para a diminuição ou remoção da inibição no foco de lesão, agentes que bloqueiam a ação de inibidores naturais de regeneração ou que regulam a expressão de proteínas inibitórias podem ser fornecidos, assim como os bloqueadores de receptores N-metil-D-aspartato de glutamato, inibidores de agentes pró-inflamatórios como a inibição de receptores de interleucina-1 β , e degradadores de moléculas inibitórias de matriz celular como as condroitinases. Essas substâncias mostraram ser eficazes na diminuição da cascata de eventos secundários (Craig *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005; Kaas *et al.*, 2008; Bradbury e Carter, 2011).

Com o objetivo de promover regeneração axonal, fatores de crescimento que promovem brotamento de novos axônios podem ser fornecidos, como os fatores neurotróficos que são pequenas proteínas secretadas por diversos tipos de célula. Estimuladores de síntese dos fatores NT-3 e *BDNF* têm sido introduzidos por meio de administração oral ou intraperitoneal, e resultados benéficos foram notados na indução de crescimento neuronal, tanto proximal como distalmente ao corpo do neurônio, reduzindo a atrofia dos neurônios que se projetam para a ME e, portanto, promovendo regeneração (Murakami *et al.*, 2002; Zhou e Shine, 2003; Brown *et al.*, 2004).

Segundo Zhou e Shine (2003), o *BDNF* é um potente regulador de moléculas de crescimento neuronal, potencializa a capacidade de regeneração e previne morte induzida de axônios dos neurônios do trato córtico-espinhal. Estes fatos foram constatados após os pesquisadores verificarem um crescimento significativo da quantidade de prolongamentos

axonais rostral ao foco de lesão quando o *BDNF* foi introduzido, continuamente, no córtex motor de ratos após lesão do trato córtico-espinhal.

Ianotti e colaboradores (2004) estudaram os efeitos do fator neurotrófico derivado da linhagem de célula glial na lesão medular realizada em ratos. Os autores identificaram que esta neurotrofina possui um papel importante na preservação e regeneração de axônios de neurônios proprioespinais e supraespinais na substância branca, sendo capaz de promover a recuperação funcional dos animais. Além disso, de acordo com Zai e Wrathall (2005), o aumento de fatores neurotróficos serve como uma nova fonte celular de oligodendrócitos e, conseqüentemente, de mielinização, uma vez que induz uma reativação mitótica nas células precursoras de oligodendrócitos.

O transplante celular após a LM tem diversos objetivos, tais como: criar pontes que unam segmentos interrompidos por cistos e cavidades; substituir células mortas (por exemplo, fornecer neurônios ou células da glia); introduzir células que são capazes de gerar todos os tipos celulares (por exemplo, células tronco); e criar um ambiente favorável para o crescimento axonal (McDonald e Sadowsky, 2002; Thuret *et al.*, 2006; Bradbury e McMahon, 2006). Células transplantadas podem induzir plasticidade por promover crescimento axonal, brotamento colateral, remielinização, formação de novas sinapses e redução da degeneração axonal retrógrada (Ruff *et al.*, 2012).

Os transplantes mais estudados têm sido: nervo periférico, células de Schwann, células do sistema nervoso olfatório, células embrionárias do SNC, células tronco (embrionárias humanas, neurais, mesenquimais,

endógenas e progenitoras), fibroblastos, macrófagos ativos, células estromais da matriz óssea (Craig *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005; Rowland *et al.*, 2008; Tohda e Kuboyama, 2011; Ruff *et al.*, 2012; Dietz e Fouad, 2014).

Lu e colaboradores (2012) investigaram se a combinação de tratamentos poderia promover a regeneração de axônios motores para o foco e além da lesão após ratos terem sido submetidos à transecção da medula espinhal. Os pesquisadores administraram injeções do nucleotídeo adenosina-monofosfato-cíclico nos motoneurônios do tronco encefálico reticular para estimular o seu estado de crescimento endógeno, transplantaram células estromais da matriz óssea no foco de lesão para fornecer matriz permissiva ao crescimento axonal e colocaram ao longo da lesão o *BDNF* para estimular o crescimento distal dos axônios motores. O tratamento se mostrou eficaz em formar novas sinapses abaixo do nível de lesão, mas o comportamento motor não apresentou melhoras.

De acordo com Oudega *et al.* (2012) é lógico pensar que a combinação de tratamentos individuais implementados na ordem e no tempo certo deve ser necessária para reparar a medula espinhal pós lesão. No entanto, a combinação destes tratamentos deve ser escolhida com precaução, uma vez que muitos dos resultados obtidos com cada um deles podem ou não serem sinérgicos. Alguns tratamentos podem desencadear certos efeitos e efeitos colaterais, que podem diminuir o potencial de reparação, ou de outros componentes da terapia, ou até mesmo da terapia combinatória como um todo. Para desenhar uma combinação de terapias é necessário levar em consideração a natureza, o tempo e o método corretos de introdução da mesma.

Os dados expostos até o momento mostram a complexidade da reparação da medula espinhal e a necessidade de se desenvolverem técnicas que controlem melhor os fatores neuroprotetores e neuroregenerativos após a lesão medular, a fim de se promover recuperação funcional de indivíduos lesados medulares. Neste sentido, a reabilitação, item a ser apresentado a seguir, pode trazer grandes benefícios.

3.4. Reabilitação e Neuroplasticidade

A restauração da função motora após a lesão medular tem sido interpretada como a necessidade de regenerar fibras gravemente lesionadas em direção aos seus alvos originais. No entanto, a disfunção neuronal progressiva observada em indivíduos lesados enfatiza que a recuperação de capacidades sensório-motoras úteis após a LM depende da habilidade de desenhar intervenções que irão preservar a integridade de redes neuronais caudais à lesão (Beauparlant *et al.*, 2013).

A plasticidade, habilidade de mudar e adaptar, não é mais considerada como um fator impossível de ser atingido no SNC de adultos. Existem muitos trabalhos que mostram os mecanismos envolvidos com a recuperação e evidenciam que a reorganização espontânea da circuitaria espinhal local e que a formação de novas vias que podem atravessar a lesão são responsáveis por parte da melhora funcional (Bareyre, 2008; Ghosh *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2010). Todavia, a recuperação espontânea é limitada e isso levou à busca incansável por estratégias que potencializem os processos

de plasticidade que ocorrem espontaneamente na tentativa de maximizar o potencial de recuperação (Fouad e Tetzlaff, 2012).

A terapia reabilitativa é essencial para maximizar a recuperação neurológica em pacientes com LM. Diversos tipos de intervenções têm sido investigados em modelos experimentais de lesão medular na tentativa de promover a restauração das funções motoras e sensoriais, entre eles: estimulação elétrica funcional (Mangold *et al.*, 2005; Fouad e Tetzlaff, 2012); estimulação epidural (Gerasimenko *et al.*, 2007); estimulação magnética (Ahmed e Wieraszko, 2008; Ahmed *et al.*, 2011); enriquecimento ambiental (Erschbamer *et al.*, 2006; Berrocal *et al.*, 2007); natação (Magnunson *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

Uma área particularmente promissora da reabilitação pós LM, que será o foco deste item, é o treinamento motor na esteira, que envolve o desenvolvimento de técnicas para estimular redes de motoneurônios abaixo do nível de lesão (Rowland *et al.*, 2008). O treino locomotor tem se destacado como uma terapia segura e eficaz para restauração das funções motoras após a LM. Ele foi desenvolvido com base em estudos feitos primeiramente com animais, que executavam tarefas específicas de dar passos após transecção da medula espinhal, indicando que a ME de mamíferos é capaz de desempenhar tarefas motoras a partir da interpretação de aferências sensoriais mesmo com ausência do controle supraespinhal (Fouad e Tetzlaff, 2012; Dietz e Fouad, 2014).

Um trabalho pioneiro de Grillner (1975) identificou redes neuronais intrínsecas na medula espinhal, *CPG*, que medeiam as saídas locomotoras, inclusive o andar em vertebrados. Com base no trabalho de

Grillner, Chau e colaboradores (1998) demonstraram que esses geradores centrais de padrão da medula podem ser ativados tanto farmacologicamente com clonidina, como por aferências sensoriais por meio de treinamento na esteira para resultar em locomoção funcional com descarga de peso total, mesmo após transecção da medula espinhal. Por isso, programas de reabilitação devem ser desenhados para melhorar aspectos voluntários e involuntários do controle motor para maximizar a recuperação funcional após a LM (Thuret *et al.*, 2006; Rowland *et al.*, 2008)

Tais experimentos são de grande relevância para estabelecer empiricamente quais os tipos de treinos locomotores e reabilitação são ótimos para recuperação da função. Estudos mostram que o treinamento locomotor potencializa a habilidade dos humanos com LM completa a andar em uma esteira, especialmente quando o suporte de peso é fornecido, apesar de a reabilitação ainda não permitir que pacientes com LM completa andem sem assistência alguma (Thuret *et al.*, 2006).

Estudos com treino locomotor têm focado na mensuração do desempenho motor, por meio de eletromiografia, análise de marcha, cinemática, equilíbrio, propriocepção, entre outros (Ward *et al.*, 2014). Outros benefícios deste treinamento que não estão diretamente relacionados com o movimento funcional demonstram a necessidade de maior desenvolvimento nesta área. Mesmo em casos de a recuperação sensório-motora não ser significativa, mudanças benéficas na função cardiovascular, no sistema respiratório, na composição do metabolismo muscular, na densidade óssea, na massa muscular, na depressão e na qualidade de vida como um todo, podem ser consideráveis com o treino locomotor após a LM (Harkema *et al.*, 2012).

Interessantemente, em um estudo feito por Barriere e colaboradores (2008) identificou-se em gatos lesados medulares, que os circuitos espinhais, incluindo as vias sensoriais aferentes, são capazes de aprender e reter a informação aprendida após reabilitação na esteira. Os autores mostraram que os gatos se recuperaram após uma hemiseccção torácica e depois, ao receberem uma transecção completa caudal à primeira lesão, os animais treinados recuperaram muito mais rápido do que os animais que só receberam a lesão completa. Isso demonstra que, após a primeira lesão, a medula espinhal lombar passou por mudanças adaptativas que foram retidas após a segunda lesão. Essas adaptações não dependeram dos estímulos descendentes supraespinhais, o que sugere que a medula espinhal possa possuir “memória”.

Por outro lado, se os circuitos neuronais não forem ativados adequadamente em um determinado período de tempo após a lesão, pode ser desenvolvida uma disfunção neuronal. Portanto, o objetivo da reabilitação deve ser concentrado em promover um bom desempenho funcional a partir da exploração de centros neuronais de plasticidade, e não na correção de sinais clínicos isolados (Dietz, 2012).

A atividade física realizada na esteira é capaz de aumentar o brotamento de fibras e o número de fibras residuais que contribuem para recuperação funcional. Crescimento colateral dos axônios ocorre, podendo surgir conexões com novos alvos que circundam o local de lesão. Outro mecanismo pelo qual o treinamento locomotor induz a melhora da locomoção está relacionado com a sua capacidade de reduzir a inibição de *CPGs* na

medula espinhal e, portanto, melhorar a excitabilidade desta rede neuronal (Bradbury, 2012).

A reabilitação na esteira também facilita a recuperação por mudar as propriedades dos motoneurônios abaixo do nível de lesão, que perdem não somente as aferências glutamatérgicas do encéfalo, mas também a condução neuromodulatória do tronco encefálico, deixando-os inativos. Estudos apontam alterações na condutância iônica e aumento da amplitude do potencial de ação após a hiperpolarização e o estímulo sináptico entre os efeitos benéficos do exercício aos motoneurônios (Gardiner *et al.*, 2006; Petruska *et al.*, 2007; Beaumont *et al.*, 2008).

Hutchinson e colaboradores (2004) avaliaram a influência de três paradigmas de treinamento (esteira, ficar em pé e natação) no comportamento de dor. Somente o treinamento na esteira foi capaz de diminuir a hiperalgesia abaixo do nível de lesão, que provavelmente ocorreu devido ao retorno da expressão normal de *BDNF* na medula espinhal e normalização ou aumento da expressão de *NT-3* na medula espinhal e no músculo sóleo dos ratos treinados. Portanto, o exercício na esteira influencia também na melhora do comportamento somatossensorial.

Dietz e colaboradores (2002) verificaram benefícios na marcha de pacientes lesados medulares, paraplégicos completos e incompletos, treinados na esteira com suporte de peso, entre eles: aumento da amplitude da atividade eletromiográfica dos extensores da perna durante a fase de apoio e diminuição da ativação inapropriada do músculo tibial anterior, favorecendo uma maior descarga de peso nos membros. A melhora da habilidade de gerar torque isométrico sobre as articulações do joelho e tornozelo também foi

evidenciada, por Jayaraman *et al.* (2008), em indivíduos com LM incompleta treinados, sendo este fato fundamental não só para uma maior descarga de peso, mas também para geração de força propulsora durante a marcha.

Os mecanismos pelos quais a fisioterapia ou reabilitação melhoram a função após a LM devem ser mais bem entendidos, porque eles podem permitir uma melhora efetiva da terapia. Pessoas com LM apresentam respostas fisiológicas atípicas frente ao exercício (por exemplo, frequência cardíaca anormal), que podem limitar a sua habilidade de sustentar um exercício intenso. Exercícios inapropriados podem também ser prejudiciais após a LM. Além disso, a reabilitação é um potente fator de confusão em experimentos clínicos, visto que é difícil de ser controlada (Thuret *et al.*, 2006). Para melhorar a efetividade do (re)aprendizado ou da reabilitação, é necessário identificar o tempo certo e a organização da prática, do tipo e da precisão da retroalimentação a ser oferecida para execução de uma tarefa específica (Musienko *et al.*, 2012).

Atualmente, o treinamento motor é visto como uma ferramenta que potencializa os resultados obtidos por meio de tratamentos farmacológicos de promoção da regeneração e plasticidade, uma vez que faz com que as conexões existentes sejam mantidas e reforçadas, fazendo sentido para a recuperação funcional. No entanto, ainda é necessária uma melhor compreensão dos aspectos envolvidos na reabilitação de forma que terapias eficientes sejam desenvolvidas para pacientes lesados medulares (Fouad e Tetzlaff, 2012; Dietz e Fouad, 2014).

Neste item foi apontado como o treinamento na esteira é capaz de atuar na lesão medular tanto em aspectos microscópicos da medula

espinhal, como em sinais clínicos. Porém, uma área pouco explorada, mas que pode acrescentar dados interessantes ao conhecimento da plasticidade neuronal após a lesão medular e a aplicação de uma estratégia terapêutica, diz respeito ao estudo da atividade neuronal do córtex sensório-motor. E a eletrofisiologia, tema que será abordado adiante, é uma ferramenta bastante sensível para isso. Outra forma de se estudar as alterações decorrentes da LM e do treinamento motor é por meio de marcadores de plasticidade, sendo alguns deles (importantes para este trabalho), descritos a seguir.

3.4.1. Marcadores de Plasticidade

3.4.1.1. Neurofilamento

O citoesqueleto é composto por três tipos de filamentos interconectados, classificados de acordo com o seu diâmetro e componentes proteicos, sendo eles: os microtúbulos (~24 nm), filamentos intermediários (~10 nm) e microfilamento (~6-8 nm). Os neurofilamentos (NFs) são filamentos intermediários dos neurônios que fornecem rigidez, força de tensão e possivelmente guiam o transporte intracelular aos axônios e dendritos. Eles são expressos exclusivamente em neurônios e são membros da família de proteínas de citoesqueleto, que agem para formar e manter a estrutura celular e facilitar o transporte de partículas e organelas dentro do citoplasma (Liu *et al.*, 2004).

Os NFs são compostos por um filamento central, de onde se estendem lateralmente finos filamentos. Eles possuem três tipos de

polipetídeos com pesos moleculares baixo, médio e alto: NF-L ou NF68, NF-M ou NF160 e NF-H ou NF200, respectivamente. Uma vez lesada esta estrutura ou danificada a proteína que liga o neurofilamento ao microtúbulo e ao filamento de actina do axônio, uma desorganização axonal ou eventual degeneração pode ocorrer, devido ao suporte estrutural que os NFs deixariam de fornecer (Alberts *et al.*, 2002).

Alterações tanto nos neurofilamentos fosforilados como nos não fosforilados foram encontradas no epicentro da lesão, com redução de 50% já no primeiro dia de lesão na medula espinhal. O aumento da expressão de NF está relacionado com a recuperação funcional após a LM (Shi *et al.*, 2014). Já foi demonstrado também que exercício moderado realizado na esteira por animais sem lesão é capaz de promover um aumento dos níveis proteicos de NFs em um curto período de tempo em áreas motoras do sistema nervoso, como córtex motor, cerebelo, substância negra, estriado e formação reticular. Este dado sugere que o exercício pode desencadear plasticidade em regiões do cérebro que estão relacionadas com o movimento e que frequentemente são afetadas por desordens neurodegenerativas (Ferreira *et al.*, 2010).

3.4.1.2. Sinaptofisina

As sinaptofisinas (*synaptophysin*, *SYP*), apesar de serem abundantes no sistema nervoso, pouco se sabe sobre as suas funções. Elas são proteínas associadas a vesículas, que são fosforiladas em tirosina. As sinaptofisinas parecem estar envolvidas no resgate de proteínas da vesícula

sináptica por endocitose e reciclagem de vesículas sinápticas (revisado por Evans e Cousin, 2005). De acordo com Lodish e colaboradores (2000), esta proteína pode formar parte do poro de fusão entre a membrana plasmática e a vesícula sináptica.

A endocitose de vesículas sinápticas é essencial para a manutenção da neurotransmissão nos terminais nervosos centrais, uma vez que a endocitose recupera as vesículas sinápticas da membrana plasmática, o que permite que elas fiquem livres para exocitose após a sua reciclagem e, subsequentemente, para preenchimento de neurônios. A fim de garantir a eficiência do processo de recuperação, a endocitose e a exocitose estão acopladas temporalmente e espacialmente nos terminais nervosos (Smillie *et al.*, 2005).

Vaynman *et al.* (2006) identificaram que alterações nos níveis de tanto da sinaptofisina, como da sinapsina I (marcador que será descrito a seguir), podem ser um indicativo de que ocorram mudanças funcionais e estruturais da circuitaria sináptica durante a realização de exercício. A expressão aumentada de sinaptofisina após o exercício já foi observada no neocórtex, hipocampo, estriado, cerebelo e córtex fronto-parietal. O aumento de sinaptofisina indica que vesículas sinápticas são formadas, devido ao aumento do número de sinapses ou ao aumento do número de vesículas existentes em um terminal sináptico (Lambert *et al.*, 2005; Vaynman *et al.*, 2006).

3.4.1.3. Sinapsina

A sinapsina (*synapsin*, *SYS*) pertence à família de fosfoproteínas específicas das terminações nervosas, sendo composta por dez proteínas homólogas: sinapsinas Ia e Ib (chamadas de sinapsina I), sinapsinas IIa e IIb e sinapsinas IIIa-IIIc (Cesca *et al.*, 2010). Esta proteína está relacionada com a liberação de neurotransmissores, crescimento axonal, formação de novas sinapses e manutenção dos contatos sinápticos (Gomez-Pinilla *et al.*, 2012). A inibição da sinapsina I reduz tanto a reserva de vesículas sinápticas como a liberação de neurotransmissores. A sinapsina I, a mais abundante e que será objeto de estudo neste trabalho, fixa vesículas sinápticas umas às outras e também à rede de actina do citoesqueleto, funcionando para manter uma reserva de vesículas nas proximidades da zona ativa, necessárias para a transmissão sináptica adequada. Essa reserva ajuda a prevenir o esgotamento de vesículas durante os estímulos de alta frequência (Vaynman *et al.*, 2006; Cesca *et al.*, 2010).

De acordo com Ying e colaboradores (2005), o *BDNF* está relacionado com a síntese e a fosforilação da sinapsina I, o que resulta em aumento da liberação de neurotransmissores, mostrando que esta fosfoproteína pode ser usada como um marcador para avaliar o papel do *BDNF* na adaptação e função sináptica. Neste trabalho, os autores mostraram um aumento dos níveis de sinapsina I na medula espinhal de ratos lesados medulares após serem submetidos a exercício na roda de atividade, mostrando um possível papel desta proteína na plasticidade após a lesão.

Em um estudo feito com roedores observou-se que o aumento dos níveis protéicos da sinapsina I é proporcional à quantidade de exercício realizado. Os autores sugerem que o aumento da expressão desta proteína talvez seja necessário para manutenção da liberação de neurotransmissores durante altos níveis de atividade (como imposto pelo exercício), que requerem um grande gasto energético nas sinapses (Vaynman *et al.*, 2006).

3.4.1.4. Proteína associada ao microtúbulo 2

A proteína associada ao microtúbulo 2 (*microtubule associated protein 2, MAP2*) existe em grande quantidade em neurônios, mas também está presente em células não neuronais como os oligodencrócitos. No SNC adulto, *MAP2* está localizada nos dendritos e nos corpos de células neuronais, tendo múltiplas funções, tais como: nucleação e estabilização de microtúbulos e possíveis microfilamentos, transporte de organelas para dentro dos axônios e dendritos e fixação de proteínas reguladoras como as quinases (importante para a transdução de sinal) (Sanchez *et al.*, 2000).

A prevalência da *MAP2* na substância cinzenta da medula espinhal faz com que esta proteína seja particularmente vulnerável às lesões medulares, uma vez que a isquemia secundária ocorre principalmente na substância cinzenta com grande entrada de cálcio nas células (efeito excitotóxico) (Zhang *et al.*, 2000). Ward e colaboradores (2014) mostraram, recentemente, que o evento precoce de interrupção do citoesqueleto neuronal dentro da ME é marcado por uma rápida e drástica perda de neurofilamentos e também por degradação da *MAP2*. A diminuição da imunoreatividade desta

proteína ocorre em uma variedade de condições patológicas em que ela é exposta ao excesso de influxo de cálcio, à ativação de calpaína, à ativação dos receptores N-metil-D-Aspartato, ao estresse oxidativo e à desfosforilação (González *et al.*, 2009).

O nível de *MAP2* está altamente correlacionado com a gravidade de uma lesão, sendo um marcador sensível para estudos que envolvem lesão na medula (Zhang *et al.*, 2000). Intervenções que previnem a perda de *MAP2* resultam em melhora do comportamento motor. Wang *et al.* (2015) mostraram que o treinamento realizado na esteira após LM é capaz de prevenir a atrofia de dendritos.

3.4.1.5. Proteína glial fibrilar ácida

A proteína glial fibrilar ácida (*glial fibrillary acidic protein, GFAP*) é uma proteína de filamento intermediário III exclusivamente encontrada nos astrócitos do SNC, em células Schwann não mielinizantes no sistema nervoso periférico e em células gliais entéricas. Ela é uma proteína responsável pela estrutura citoesquelética das células gliais, pela modulação da motilidade dos astrócitos e pela manutenção de sua força mecânica, assim como, o suporte de seus neurônios vizinhos e da barreira hemato-encefálica (Eng *et al.*, 2000; Yang e Wang, 2015).

Células astrogliais respondem a condições que afetam o sistema neural por passar por um processo de astrogliose reativa, no qual células astrogliais sofrem hipertrofia celular (aumento do tamanho e da expressão da *GFAP*) e proliferação (aumento do número de células gliais)

(Yang e Wang, 2015). A astrogliose reativa inicia com astrócitos que estão adjacentes a lesão, com rápida síntese de *GFAP* (Eng *et al*, 2000).

De acordo com García-Alvarez e colaboradores (2015), após a LM, uma série de processos celulares ocorre nas áreas afetadas. Enquanto os fagócitos sanguíneos removem *debris* celulares e a morte neuronal secundária progride, os astrócitos próximos à zona danificada proliferam, aumentam seus processos fibrosos e formam uma barreira com o objetivo de recriar um limite entre o SNC e o resto do organismo. Essa barreira é denominada barreira glial, podendo ser identificada com o aumento da expressão de *GFAP*. Os fibroblastos de tecidos conectivos adjacentes se dividem e sobrepõem a barreira de astrócito fibroso com colágeno, completando a formação de uma nova barreira ao SNC, a cicatriz glial.

As células que formam a cicatriz glial, principalmente os astrócitos reativos, a microglia reativa, os fibroblastos e a matriz extracelular, constituem um ambiente hostil para o crescimento axonal (García-Alvarez *et al.*, 2015). Por outro lado, a cicatriz também representa uma limitação molecular e física contra a liberação de agentes inflamatórios após a lesão. Possivelmente, subpopulações astrogliais reativas exercem ainda uma função de sustentação para guiar o crescimento axonal (Silver *et al.*, 2015).

3.4.1.6. OX-42

O OX-42 é um marcador de células microgliais, mais especificamente de macrófagos meningeiais. A marcação com OX-42 é evidente nos pequenos corpos celulares e nas ramificações dos processos

(Csuka *et al.*, 2000). Microglias são células inatas do sistema imunológico que medeiam respostas a patógenos e a lesão. Essas células fornecem sustentação, supressão de sinapse e atividades imunológicas (limpeza de *debris*) dentro do SNC. Hoje está claro que a microglia está ativamente envolvida com a manutenção da homeostase no SNC, tendo um papel importante no desenvolvimento de cérebro (Norden *et al.*, 2015).

Quando há uma lesão, a microglia se torna ativa e funciona como mediador celular inflamatório, fazendo a propagação e a interpretação dos sinais inflamatórios que são iniciados periféricamente. Microglia ativada também passa por mudanças citoesqueléticas que alteram o padrão de expressão de receptores e produzem citocinas inflamatórias (Norden *et al.*, 2015). Ainda como parte da resposta inflamatória ao trauma do SNC, a microglia ativada é recrutada para zona de lesão por astrócitos reativos, e a gliose reativa toma espaço em companhia de outros tipos celulares (Garcia-Álvarez *et al.*, 2015). A microglia ativada possui um papel importante na limpeza de tecidos danificados e em degeneração, contribuindo para a regeneração neuronal e recuperação funcional (Zhou *et al.*, 2014).

3.5. Reorganização Cortical, Eletrofisiologia e Neuroprótese

A reorganização cortical sensório-motora decorrente da LM já foi demonstrada em diversos estudos, por meio de diferentes ferramentas, tais como: ressonância magnética funcional (*functional magnetic resonance imaging, fMRI*), oxigenação sanguínea nível dependente, estimulação magnética transcraniana, estimulação intracortical, tomografia por emissão de

póstron (Jain *et al.*, 1997; Lotze *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Fouad e Tse, 2008; Bareyre, 2008; Kokotilo *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2010). Também já foi provado extensivamente pelo grupo de Kleim (1998; 2002a; 2002b; 2004) que o aprendizado motor é capaz de promover reorganização cortical. Nos últimos dez anos, estudos têm reforçado a ideia de que o treinamento motor induz plasticidade cortical após a LM (Winchester *et al.*, 2005; Cramer *et al.*, 2007; Kao *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009).

As mudanças plásticas no córtex podem surgir espontaneamente após a lesão ou pode depender do uso e da habilidade motora. O exercício prolongado aumenta o fluxo sanguíneo ao córtex, induz a neurogênese e resulta na regulação positiva de fatores neurotróficos, e isso pode promover a sobrevivência e a diferenciação celular no córtex (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005). Kao e colaboradores (2009) mostraram que a estimulação sensório-motora promovida pela esteira é capaz de induzir mudanças no mapa somatotópico do córtex somatossensorial de ratos com transecção da medula espinhal.

Os mapas sensório-motores corticais mudam de maneira uso-dependente. Os mapas diminuem no caso da lesão medular, devido aos graves danos das funções motora e sensorial. Infelizmente, a contribuição do mapa motor para as mudanças da recuperação funcional e os mecanismos envolvidos neste fenômeno ainda permanecem obscuros. Imediatamente após a lesão, os mapas motores diminuem e depois parecem expandir com o tempo. Essa expansão pode ser facilitada por treinamento reabilitativo (Fouad e Tetzlaff, 2012). A expansão dos mapas motores para áreas do córtex deaferentadas pode ser atribuída, em um curto período de tempo, à redução da

inibição GABAérgica de conexões intracorticais latentes. Com o passar do tempo, a plasticidade pode ocorrer devido à potenciação de longo prazo, ao crescimento de novas conexões e à sinaptogênese (Oza e Giszter, 2014).

Com a eletrofisiologia mudanças plásticas no córtex sensório-motor podem ser indentificadas, uma vez que este método permite compreender tanto as propriedades de um único canal iônico até fenômenos mais complexos, assim como a atividade de centenas de células integradas em redes neurais. A eletrofisiologia consiste no estudo de sinais elétricos, que estão associados às mudanças de voltagens das membranas neuronais. (Scanziani e Häusser, 2009).

O monitoramento da atividade cerebral de humanos e animais pode ser realizado por meio de diferentes métodos eletrofisiológicos, tais como magnetoencefalograma (MEG), eletroencefalograma (EEG), eletrocorticograma (ECoG) e registros extracelulares (Bear *et al.*, 2008; Mitra e Bokil, 2008). O MEG consiste no registro de minúsculos sinais magnéticos gerados pelas correntes elétricas cerebrais, por meio de detectores magnéticos sensíveis (Trindade, 2004). O EEG e o ECoG consistem no registro da atividade elétrica por meio de eletrodos posicionados no escalpo e na superfície cortical, respectivamente (MacKay, 2005).

Os ritmos neurofisiológicos podem ser registrados por eletrodos localizados dentro e fora do cérebro. Diferentes sinais têm sido propostos para controlar dispositivos externos. Esses sinais podem ser extraídos de diferentes registros eletrofisiológicos, incluindo: as oscilações do EEG de 4 a 200 Hz (principalmente o ritmo *mu* ou ritmo sensório-motor e seus harmônicos, que vão de 8 a 30 Hz); as oscilações do ECoG, usando

frequências de 1 a 200 Hz captadas por macro-eletrodos; os sinais de potencial evocado relacionado a eventos, principalmente o P300, potenciais corticais lentos e potenciais subcorticiais de curta latência; os trens de disparos neuronais unitários captados por micro-eletrodos; a resposta do oxigênio sanguíneo nível dependente pela *fMRI*; e a oxigenação sanguínea por meio de espectroscopia infravermelha funcional (*near infrared spectroscopy, NIRS*) (Birbaumer e Cohen, 2007). A estratégia para o desenho dos sistemas de interfaces corticoespinhais depende da quantidade de informação que pode ser extraída do cérebro tanto temporal como espacialmente, como demonstrado na figura 5 (Borton *et al.*, 2014).

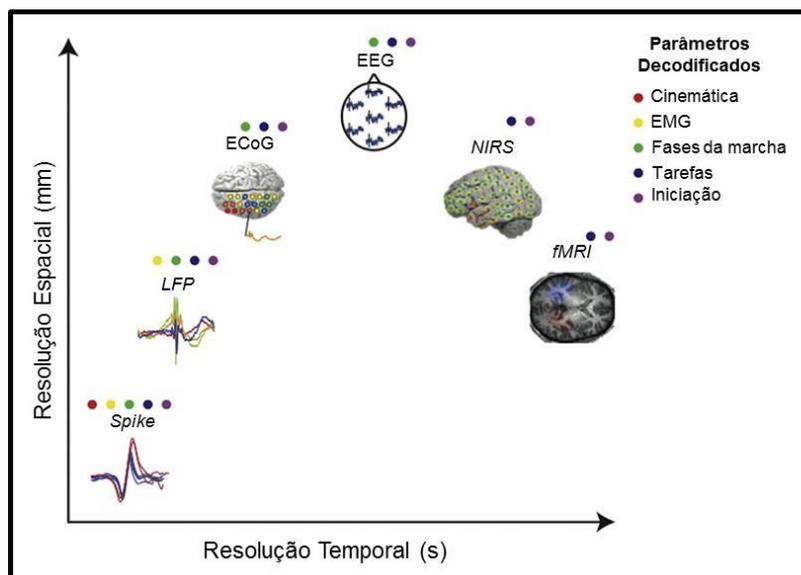


Figura 5 - Sinais elétricos relacionados com a sua entrada neural e o com o seu uso na decodificação de parâmetros motores (representados pelos círculos coloridos à direita). O gráfico mostra as resoluções espaciais e temporais, nas quais cada sinal eletrofisiológico se encontra. Fonte: modificado de Borton *et al.* (2014).

O registro extracelular é um método invasivo, no qual micro-eletrodos são introduzidos no espaço extracelular do tecido cerebral. Nesta metodologia podem ser registrados tanto potenciais de campo local (*local field potentials, LFP*), como potenciais unitários (*spikes*), isto é, potenciais de ação

de neurônios individuais. Os *LFPs* consistem em correntes sinápticas (potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios) moduladas pelo comportamento e codificam tanto propriedades de redes locais como aspectos globais da dinâmica cerebral (Mitra e Bokil, 2008; Sauseng e Klimesch, 2008; Stamoulis e Richardson, 2010).

Os neurônios emitem potenciais de ação (*spikes*), que são eventos discretos, cuja frequência e tempo de disparo carregam informação. O processo de decodificação neuronal envolve tipicamente o desenvolvimento de uma série de funções (normalmente lineares) que convertem sequências de potenciais de ação, registradas de muitos neurônios, em um número pequeno de sinais contínuos. Essas funções podem ser utilizadas para controlar, por exemplo, o movimento de um cursor na tela de computador ou membros robóticos (Bensmaia e Miller, 2014).

Estudos mostram que as células do córtex motor e de várias áreas pré-motoras disparam durante a execução do movimento voluntário de modo relativamente específico, isto é, a atividade dos neurônios motores corticais foi associada a diferentes parâmetros motores, como: força; torque articular; posição, direção e velocidade de movimento de uma articulação (Fetz, 2007; Stark *et al.*, 2008).

Aguilar *et al.* (2010) e Yague *et al.* (2011) foram os primeiros autores a relatarem mudanças na atividade cerebral após a lesão medular, identificada por meio de registros extracelulares. As novas evidências indicam que a perda das aferências da medula espinhal é capaz de promover profundas mudanças em centros cerebrais. Porém, o registro foi feito com os animais anestesiados, imediatamente após a lesão.

Não existem trabalhos que mostrem alterações crônicas nos disparos unitários de células após a LM associada a um programa de reabilitação, o que faz com que esta área de pesquisa seja de extrema importância para investigação da reorganização cortical relacionada à recuperação funcional. Novas informações sobre este tema podem contribuir para elaboração de estratégias terapêuticas mais eficazes aos pacientes lesados medulares, visando uma melhor qualidade de vida destes indivíduos. Dentro desta área, as neuropróteses têm sido um grande alvo das pesquisas na área da neurociência (Gourab e Schmit, 2010; Lawhern *et al.*, 2010; McFarland e Wolpaw, 2011; Lebedev *et al.*, 2011; Mikolajewska e Mikolajewski, 2012; Borton *et al.*, 2014; Bensmaia e Miller, 2014).

O desenvolvimento de neuropróteses foi possível devido aos avanços no entendimento da fisiologia do cérebro humano e desenvolvimento de *software* e *hardware*. Uma maior atenção tem sido fornecida às neuropróteses desenvolvidas para pacientes com paralisia, com desordens de comunicação e amputados (Mikolajewska e Mikolajewski, 2012).

Os ritmos sensório-motores são ritmos eletroencefalográficos que mudam com o movimento ou com a imaginação do movimento e são espontâneos no sentido de que eles não requerem nenhum estímulo específico para a sua ocorrência. Os sistemas de interface cérebro-máquina atuais, que operam utilizando a atividade cerebral, podem promover opções de controle e comunicação que são de valor prático principalmente para pessoas que estão gravemente limitadas em suas habilidades motoras (McFarland e Wolpaw, 2011).

Pfurtscheller e colaboradores (2005) foram os primeiros a usarem os ritmos sensório-motores na ICM para um paciente com lesão medular alta. O paciente aprendeu a controlar a estimulação elétrica enviada para os músculos do braço e mão, usando aumento e diminuição dos ritmos sensório-motores. Essa aplicação permitiu que o paciente pegasse um copo de vidro e o levasse em direção a sua boca com sucessivas ativações da eletroestimulação dos músculos do membro superior. No entanto, o paciente usou esta ICM somente com o propósito de demonstração e não para as atividades de vida diária.

As ICM utilizam os registros dos sinais corticais com o objetivo de gerar interação com o mundo externo, por meio de controle de membros artificiais, de dispositivos robóticos ou de interfaces para comunicação. A extração de informações confiáveis de sinais neurais disponíveis é muito importante, e o sinal eferente produzido deve ser útil para as atividades de vida diárias (Mikolajewska e Mikolajewski, 2012).

As neuropróteses, que controlam os músculos paralisados, podem teoricamente preencher a lacuna entre a intenção motora codificada nos sinais corticais (motoneurônios superiores) e a estrutura locomotora abaixo da lesão (motoneurônios inferiores) (Figura 6; Borton *et al.*, 2014). Uma vez que esse processo de controle motor difere dos processos fisiológicos, cada paciente precisa aprender a controlar as ICM. Esse aprendizado se dá pela neuroplasticidade do encéfalo. O ponto chave deste aprendizado é o treinamento do paciente a imaginar a realização de uma atividade motora específica (Mikolajewska e Mikolajewski, 2012).

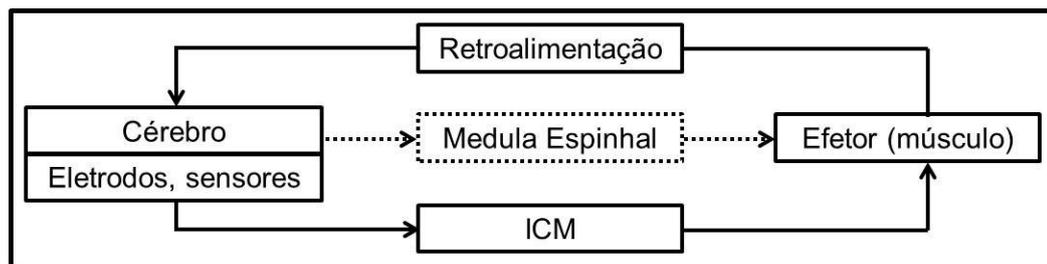


Figura 6 - Desenho esquemático de como funcionam as neuropróteses, como as ICM, no controle de músculos paralisados após a LM. As ICM fazem o papel das conexões ascendentes e descendentes dos motoneurônios da medula espinhal. Fonte: modificado de Mikolajewska e Mikolajewski (2012).

As interfaces cérebro-máquina podem permitir que os pacientes exerçam controle voluntário de uma prótese ou membro robótico, induzindo contrações elétricas dos músculos paralisados. O recente desenvolvimento de algoritmos que decodificam a intenção motora da atividade neuronal e suas abordagens para transformar a retroalimentação sensorial por neurônios eletricamente estimulados têm mostrado serem promissores como interfaces invasivas no córtex sensório-motor, apesar de ainda existirem desafios nesta área (Bensmaia e Miller, 2014).

A falta da retroalimentação somatossensorial pode contribuir substancialmente para a qualidade relativamente baixa das ICM. Interfaces aferentes têm sido desenvolvidas para restaurar a sensação do toque e do movimento dos membros aos pacientes, por meio de estimulação elétrica fornecida por eletrodos implantados no córtex somatossensorial. No entanto, estas ICM ainda estão pouco desenvolvidas em comparação com as ICM motoras. O desenvolvimento das futuras interfaces cérebro-máquina deve ser concentrado na condução das informações nos dois sentidos, com o objetivo de promover a restauração das funções somatossensoriais e motoras, que é o maior alvo dentro da reabilitação de pacientes lesados medulares (Bensmaia e Miller, 2014).

4. MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em 18 de abril de 2012 (APÊNDICE A). A pesquisa foi realizada em três laboratórios. No Laboratório de Neurociências, 'Prof. Dr. César Timóteo' - Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês (IEP/HSL) foram realizadas as cirurgias de implante de matriz e perfusão, as avaliações eletrofisiológicas e as análises estatísticas dos dados. No Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos (LETRAN) - Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas (IOT/HC) foram realizadas as cirurgias de lesão medular contusa. E no Laboratório de Neurobiologia Celular - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) foram realizadas as reações imunohistoquímicas e suas análises.

Para este estudo foram selecionados 18 ratos *Wistar*, de peso entre 350 e 400 g com quatro meses de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: treinado (TR, n=7), controle (CTL, n=7) e sham (n=4). Os animais do grupo controle e sham ficaram acomodados em caixas individuais sem qualquer treinamento, mas foram avaliados com a mesma periodicidade do grupo treinado. Os grupos treinado e controle foram submetidos à lesão medular e o grupo sham foi submetido a todo procedimento cirúrgico de lesão medular, sem a lesão propriamente dita.

Todos os animais ficaram acomodados em caixas individuais, sendo água e comida oferecidas *ad libitum*. Antes de ser realizado qualquer procedimento experimental, eles foram manipulados pela experimentadora por 10 minutos em dois dias consecutivos, com o objetivo deles se acostumarem com a experimentadora.

Uma linha do tempo (Figura 7) foi desenhada com o objetivo de demonstrar em que ordem os eventos experimentais ocorreram. Todos os eventos estão descritos em detalhes ao longo dos métodos. Os procedimentos iniciais consistiram em: manipulação do animal; habituação aos equipamentos da avaliação eletrofisiológica; habituação e aprendizado da tarefa no equipamento de treinamento para os animais treinados; e confecção das matrizes de micro-eletrodos.



Figura 7 - Linha do tempo mostra os diferentes procedimentos realizados ao longo do experimento. A abreviação POI significa dia pós-operatório de implante da matriz de micro-eletrodos e dPO significa dia pós-operatório de lesão medular. Essas abreviações serão utilizadas no decorrer do texto também.

4.1. Análise de risco

O risco fornecido pela experimentação ao pesquisador foi mínimo. Todas as medidas de precaução foram tomadas durante os procedimentos experimentais, entre elas a utilização de máscara cirúrgica, a fim de não se inalar urina ou pêlos do sujeito experimental, que poderiam, eventualmente, vir a desencadear uma reação alérgica no pesquisador; e a utilização de luvas durante todos os procedimentos experimentais para minimizar o risco de infecção pós-procedimentos cirúrgicos de implante de matriz de micro-eletrodos e de lesão medular.

4.2. Confeção da matriz de micro-eletrodos

Para a construção das matrizes de micro-eletrodos foram utilizados fios de tungstênio revestidos com Teflon (*California Fine Wire Company*), de 50 μm de diâmetro para registro da atividade cortical (n=31) e de 75 μm de diâmetro para registro da atividade muscular (n=1). Os fios para registro cortical foram estendidos sobre uma madeira com fenda para encaixe de uma das lâminas da tesoura e segurando as duas pontas firmemente, eles foram cuidadosamente cortados, um a um, formando um ângulo agudo para formação de uma ponta semelhante a um bisel de agulha. Posteriormente, foi construído um molde em papel perfurado de acordo com planejamento realizado para a estrutura anatômica do córtex sensório-motor do rato *Wistar*, utilizando o atlas de Paxinos e Watson (2007; Figura 8).

Para a construção do molde foi utilizado equipamento específico, constituído por uma base fixa transladável, com dois eixos de precisão micrométrica (*XY Translation Stage Model 401*, Newport, Irvine, Califórnia) e uma furadeira de alta precisão (*Servo Products Company Model 7000*) com broca de cobalto de 0,7 mm de diâmetro na ponta (*Titex Plus*, Alemanha).

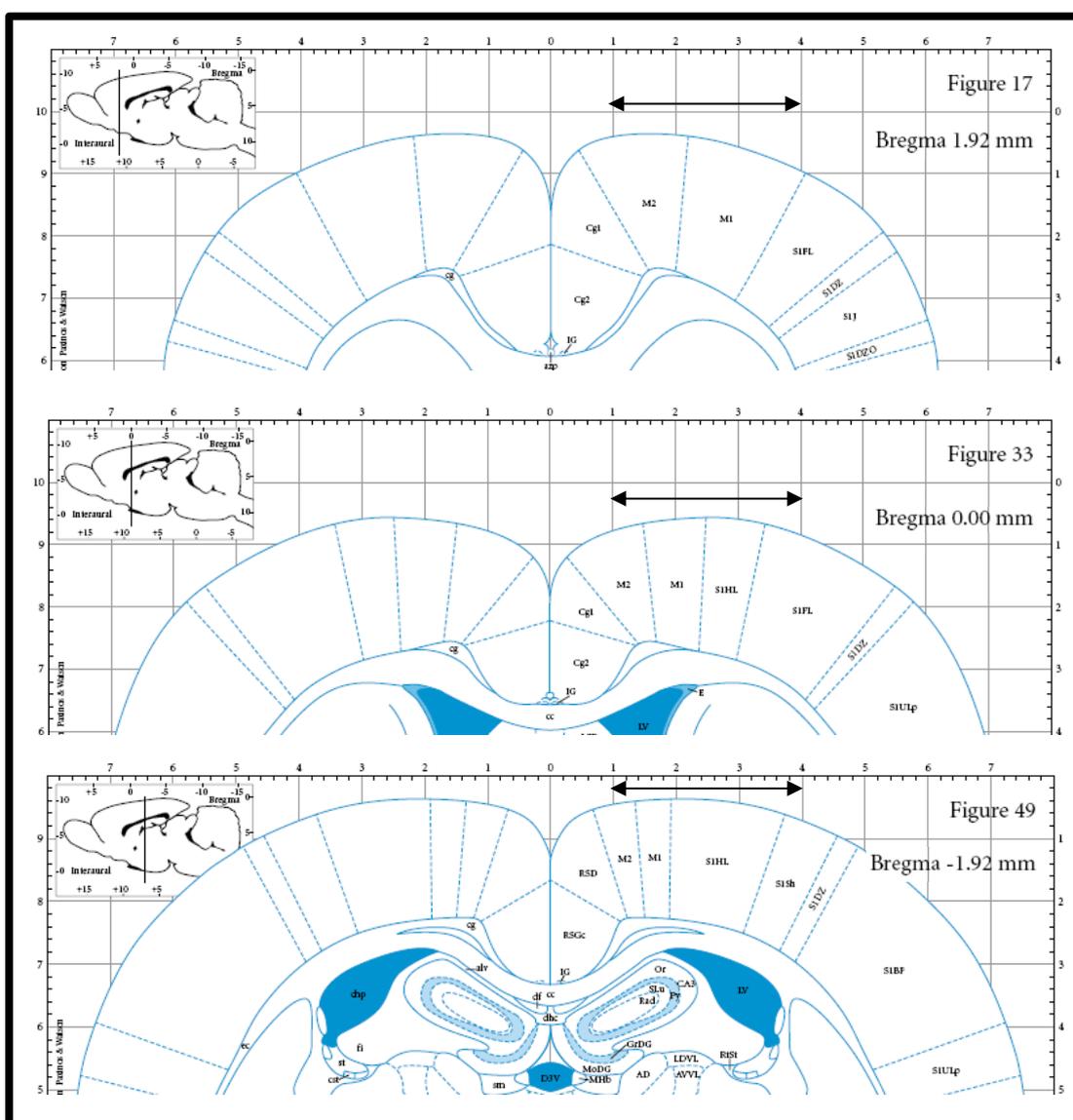


Figura 8 - Três imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007) mostrando cortes coronais da região cortical no sentido rostro-caudal (de cima para baixo). As coordenadas em relação ao bregma estão apontadas no canto superior direito de cada imagem, correspondendo à área de implante da matriz de micro-eletrodos no sentido rostro-caudal e também no sentido látero-lateral, apontado pelas setas.

Uma placa plástica com trilhas metálicas condutivas para 32 fios, feitas sob encomenda (*Printed Circuit Boards - PCBs*) foi soldada a um micro-conector (*Omnetics*[®]) a ser fixado na cabeça do animal (Nicolelis *et al.*, 1995; Figura 9A). Cada um dos 32 pontos de solda foi testado com auxílio de um multímetro, para confirmar a passagem de corrente em todos e a inexistência de curto-circuito entre quaisquer pontos.

Paralelamente, os fios foram então colocados no molde, passando-os por duas folhas de papel perfuradas, mantidas paralelas entre si (Figura 9B). Após o ajuste de todos os 31 fios em suas posições, o feixe foi colado com cola epóxi (*5 Minute Epoxy, Devcon*[®], *Scientific Yet Simple*), tornando-se firme e estável sem que os fios pudessem mover-se entre si (Figura 9C). Este feixe foi, então, cuidadosamente posicionado sobre a placa plástica, onde foi colado na posição desejada com cola epóxi e sob visualização no microscópio, cada um dos fios foi inserido em seu respectivo local da placa (Figura 9D). Além disso, o fio a ser implantado na região anterior do músculo quadríceps da pata posterior direita foi soldado na placa plástica em um local correspondente a um dos canais de registro (Figura 9E). A matriz recebeu ainda o fio terra, que foi soldado no local adequado da placa plástica, onde se situa sua trilha metálica (Figura 9E).

Depois de passados todos os fios, um lado da matriz foi finalizado com o revestimento de cola epóxi (Figura 9F). No outro lado da matriz, todos os fios foram então cortados e desencapados um a um na ponta a ser conectada à placa com tinta metálica condutiva (*High Purity Silver Paint, SPI Supplies*; Figuras 9G e 9H), criando um circuito condutivo desde as pontas a serem implantadas no córtex e no músculo e os 32 pontos machos do

conector a ser fixado na cabeça do animal, que puderam então ser conectados ao cabo durante as sessões de registro, ficando o animal livre nos demais momentos.

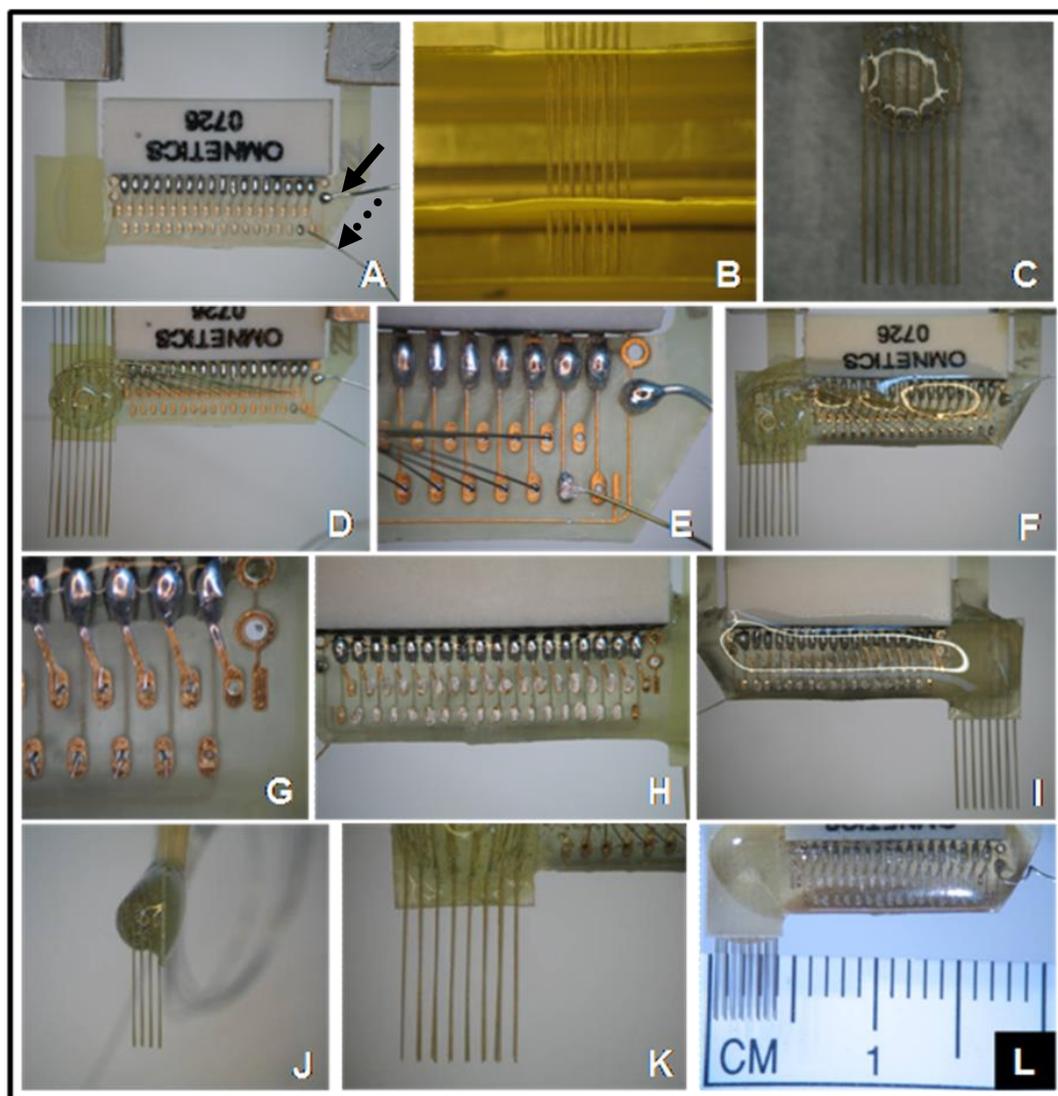


Figura 9 - Sequência de fotos da construção de matriz de micro-eletrodos. Placa com trilha metálica soldada ao conector da *Omnetics*[®], fio terra apontado por \rightarrow e eletrodo para registrar a atividade muscular apontado por $\bullet\bullet\blacktriangleright$, soldados a trilha metálica da placa amarela (A). Fios passados por duas folhas de papel perfuradas como molde da matriz de eletrodos (B). Fios fixados entre si pela cola epóxi (C). Fios colados na placa amarela também com cola epóxi e os 16 primeiros fios passados nos seus respectivos furos (primeira fileira; D). Detalhe de alguns fios de micro-eletrodos, passados pelos buracos e os fios do eletromiograma e terra passados e soldados (E). Finalização do lado anterior da matriz, sendo que todos os fios passados foram recobertos com cola epóxi (F). Vista posterior da matriz com os fios que foram passados para este lado cortados, descascados e dobrados para fazerem contato físico com a trilha metálica (G). O contato elétrico entre os fios e a placa amarela foi feito com o *silver paint* mostrado na imagem por pontos em prata (H). Finalização do lado posterior da matriz com cola epóxi (I). Vista lateral da matriz finalizada, mostrando as quatro fileiras de micro-eletrodos no sentido látero-lateral (J). Oito fileiras de micro-eletrodos no sentido céfalo-caudal (K). Tamanho (em centímetros) ântero-posterior da região da matriz que foi introduzida na camada V do córtex sensório-motor dos ratos (aproximadamente 0,4 cm; L).

Depois de montada e conectada à placa com tinta condutiva, a passagem de corrente por cada um dos 32 fios da matriz foi verificada, inserindo-se os fios em água e passando-se corrente, canal por canal, a partir do respectivo pino macho do conector. Pequenas bolhas de ar ao redor da ponta do fio ligado ao respectivo canal do conector puderam ser observadas. Este processo permitiu conferir se todos os fios estavam conectados aos canais planejados e se não havia curto-circuito na matriz. Após o teste em água, a matriz foi toda selada e protegida com cola epóxi, restando exposta apenas a pequena parte a ser inserida no córtex e o fio a ser inserido no músculo durante a cirurgia (Figuras 9I a 9L). A impedância final de cada eletrodo foi de cerca de $1,0\text{ M}\Omega$ a $1,0\text{ kHz}$.

4.3. Procedimento cirúrgico para implante crônico da matriz de micro-eletrodos

O procedimento cirúrgico e o registro multi-unitário de neurônios do córtex sensório-motor primário seguiram uma metodologia intensivamente publicada (Shin e Chapin, 1990; Nicolelis *et al.*, 1993; Nicolelis *et al.*, 1995; Chapin e Nicolelis, 1996; Nicolelis *et al.*, 1997; Chapin *et al.*, 1999; Nicolelis e Chapin, 2002). A matriz de micro-eletrodos foi implantada na camada V do córtex sensório-motor primário, correspondente aos membros anteriores e posteriores direitos, de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007). Durante a cirurgia para implante da matriz de 32 eletrodos, o nível de anestesia foi periodicamente verificado e doses

suplementares foram fornecidas quando necessárias. A duração da cirurgia (aproximadamente de 5 a 7 horas) variou de acordo com o animal.

O animal foi pesado e anestesiado com 100 mg/kg de ketamina (cloridrato de S(+) cetamina, Ketamin–S(+)[®], Cristália) e 5 mg/kg de xilazina (cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Vetbrands) intraperitonealmente (ip), após uma prévia indução anestésica com halotano 5%. A área de interesse foi tricotomizada e o animal foi posicionado no estereotáxico (*Kopf Instruments, Model 900*; Figura 10A).

Em seguida foi realizada a limpeza da pele na região da cabeça com iodopovidona degermante (Riodeine[®], Bioquímica) e álcool 70%, seguido de injeção subcutânea de anestésico local e vasoconstritor, cloridrato de lidocaína com epinefrina (Xylestesin[®], 2%, Cristália). A proteção ocular foi feita com pomada oftálmica estéril (Epitezan[®], Allergan), com posterior cobertura com gaze no rosto (Figura 10B). Depois foram feitos: incisão na pele, da altura dos olhos até o final do crânio, retirada do periósteo e leve raspagem do crânio. Sempre que necessário foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9% para limpeza do local cirúrgico.

Após o alinhamento do crânio pelo bregma e lambda (Figura 10C), as marcações da janela para implante da matriz no córtex sensório-motor foram realizadas utilizando-se as coordenadas estereotáxicas definidas na construção das matrizes, sendo estas: 1 mm para o lado esquerdo em relação ao bregma, a partir deste ponto 2 mm para frente e 2 mm para trás e 3 mm para o lado esquerdo (Figura 10D). Com uma broca dental foram realizados quatro pequenos orifícios para fixação dos parafusos de sustentação em lugares pré-determinados (dois frontais e dois occipitais) e também foi feita a

abertura da janela para implante da matriz de micro-eletrodos no córtex (Figuras 10E a 10G).

A matriz foi posicionada corretamente para a inserção, utilizando o manipulador estereotáxico e introduzida lentamente em coordenadas precisas para minimizar danos cerebrais e sangramento (Figuras 10H e 10I). Um fio de prata para servir de referência (“terra”) foi enrolado em torno dos quatro parafusos e em seguida foi feito o contato com tinta metálica condutiva (Figura 10J). A atividade celular foi monitorada durante o implante para auxiliar na localização da matriz de eletrodos em relação a sua profundidade, variando entre 1700 a 1800 μm , com o objetivo de atingir a camada V do córtex sensório-motor.

Finalizado o implante, a janela com a matriz implantada foi coberta por gelatina absorvível (*Gelfoam*[®], Pharmacia) para proteção da superfície cortical e uma camada de supercola instantânea de cianoacrilato foi aplicada ao redor da matriz e dos parafusos para criar uma capa fixada ao crânio. Um catalisador (*cyanoacrylate accelerator, Flashtac*[™], NHP Co., Inc.) para supercola foi usado para acelerar o endurecimento da cola e assim diminuir o tempo de cirurgia (Figura 10K). A pele da área com a incisão foi limpa e aplicou-se uma camada de antibiótico em gel.

Em seguida, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico para realizar a passagem do eletrodo muscular, que foi inserido na região anterior do músculo quadríceps direito. Para isto, os procedimentos realizados foram: assepsia do local com povidine e álcool 70%; anestesia local com cloridrato de lidocaína com epinefrina; abertura de aproximadamente 1,5 cm, realizada com o bisturi; divulsionamento da pele da região com tesoura para

facilitar a entrada de uma agulha com um tubo guia, que atravessou o corpo do animal com o objetivo de realizar a passagem do eletrodo muscular (Figuras 10L e 10M). Uma vez passado o fio e retirado o tubo guia, ele foi inserido uma vez na musculatura anterior da coxa do animal para ficar fixado e em seguida, a região do eletrodo que deveria ficar em contato direto com o músculo era descascada (retirada a camada isoladora de Teflon). Mais duas laçadas do fio para dentro do músculo foram realizadas e no fim da ponta do eletrodo um pequeno nó foi dado, para tentar minimizar as chances do mesmo sair do lugar.

Após a limpeza do local, foram dados três pontos na pele com fio de sutura monofilamento 4.0 e após nova limpeza do local, foi aplicada a pomada Fibrase[®] (Pfizer) na região da cicatriz (Figura 10N). A pele da cabeça com a incisão também foi limpa e dois ou três pontos foram dados com fio de sutura 4.0 na região posterior ao implante, de onde o eletrodo muscular saía e após a limpeza final, uma camada de Fibrase[®] foi aplicada ao redor de todo o implante.

Ao término da cirurgia de implante, o animal foi colocado em uma gaiola individual limpa sob uma lâmpada de aquecimento, sendo observado até plena recuperação (Figura 10O). Ração e água foram oferecidos logo que o animal ficava totalmente acordado, assim como Tylenol[®] (15-20 mg/kg) via oral para alívio da dor. No dia seguinte, também foi dado o Tylenol[®]. Se a cicatriz cirúrgica apresentasse sangramento, secreção ou sujeira, o animal era sedado com halotano (5%) e a cicatriz cirúrgica era limpa com solução de cloreto de sódio 0,9% e uma nova camada de Fibrase[®] era aplicada.

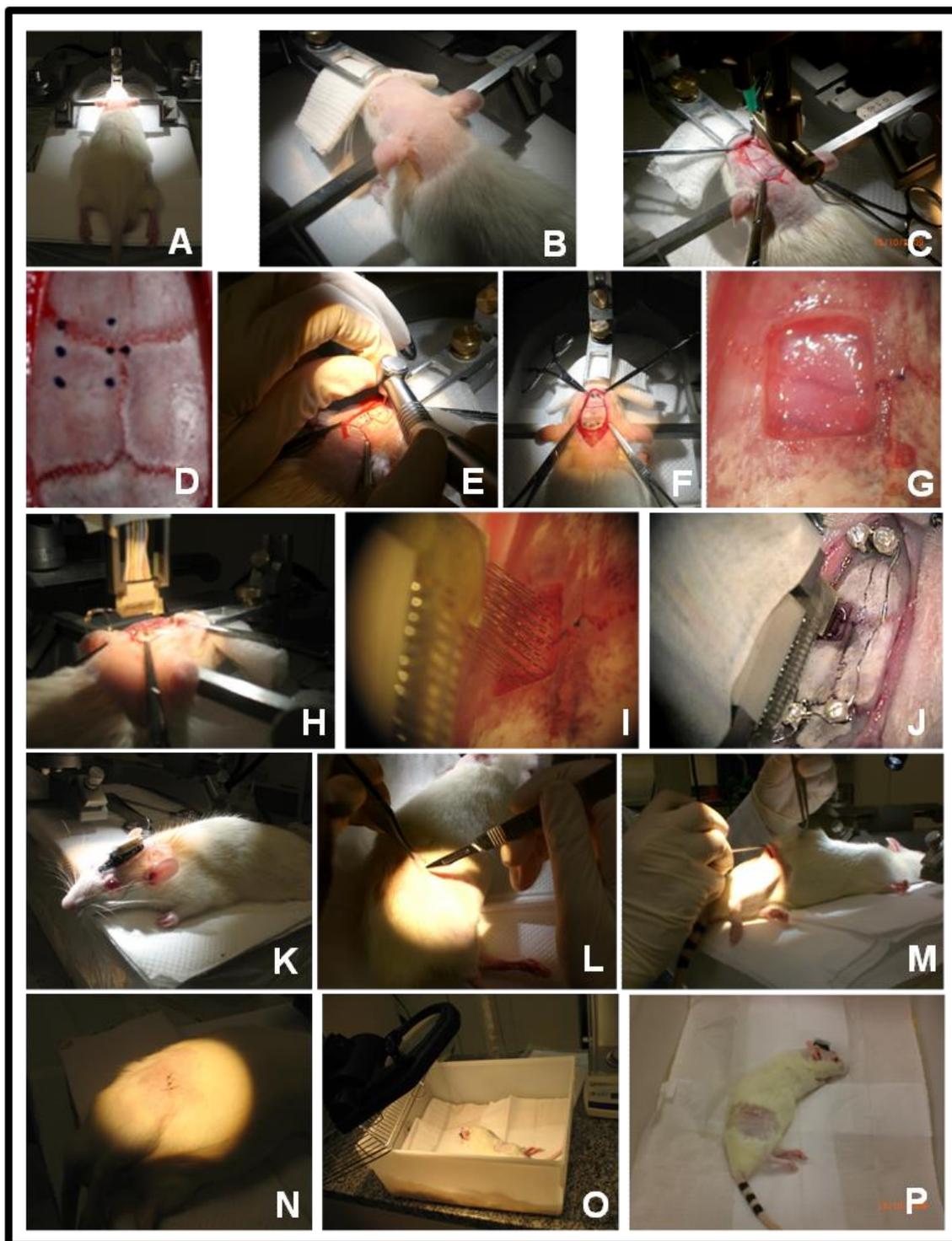


Figura 10 - Sequência de fotos da cirurgia de implante de micro-eletrodos. Animal posicionado no aparelho estereotáxico (A). Proteção ocular com pomada oftálmica e do rosto e vibrissas com gaze (B). Alinhamento do crânio feito a partir da medição do bregma e lambda com a torre móvel do aparelho estereotáxico (C). Marcações da janela que foi aberta para implante da matriz de micro-eletrodos (D). Utilização da broca dentária para realizar os furos de colocação dos parafusos (E). Animal já com os quatro parafusos fixados no crânio, antes de ser realizada a craniotomia (F). Janela de implante da matriz de micro-eletrodos aberta, com exposição da dura-máter (G). Introdução da matriz de micro-eletrodos nas camadas corticais (H). Visualização dos micro-fios sendo inseridos no córtex após a retirada da dura-máter (I). Fio terra ligando os quatro parafusos, sendo feito o contato com a tinta metálica condutiva (J). Finalizado o implante que é fixado com a cola de cianoacrilato (em preto), o animal é retirado

do aparelho estereotáxico para início da inserção do eletrodo muscular (K). Incisão na pele da região anterior da coxa da pata posterior direita (L). Entrada de uma agulha com um tubo guia, que atravessava o corpo do animal para realizar a passagem do eletrodo muscular (M). Três pontos simples dados para aproximar a pele com incisão (N). Animal na caixa moradia, com luz para aquecimento durante as primeiras horas após a cirurgia (O). Aspecto final do animal com o implante de matriz de micro-eletrodos (P).

4.4. Procedimento cirúrgico de lesão medular por contusão

O modelo experimental de lesão medular adotado foi o de contusão padronizado para ratos *Wistar* por meio do equipamento *New York University (NYU) Spinal Cord Contusion – Impactor (NYU-Impactor)*, Figura 11), de acordo com as normas do *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*. Os ratos foram anestesiados com 100 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina, ip. Para anestesia local utilizou-se o cloridrato de lidocaína com epinefrina, subcutaneamente. O plano anestésico profundo era confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda.

Após tricotomia (Figura 12A), realizou-se uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral, da 8ª (T8) à 11ª (T11) vértebra torácica (Figura 12B). Os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas da 9ª (T9) à 10ª (T10) vértebra torácica foram divulsionados e desinseridos. Os processos espinhosos destas vértebras foram removidos com micro saca-bocado, até expor totalmente a face dorsal da medula espinhal (Figura 12C) e permitir o contato pleno da ponta da haste do *NYU-Impactor*.

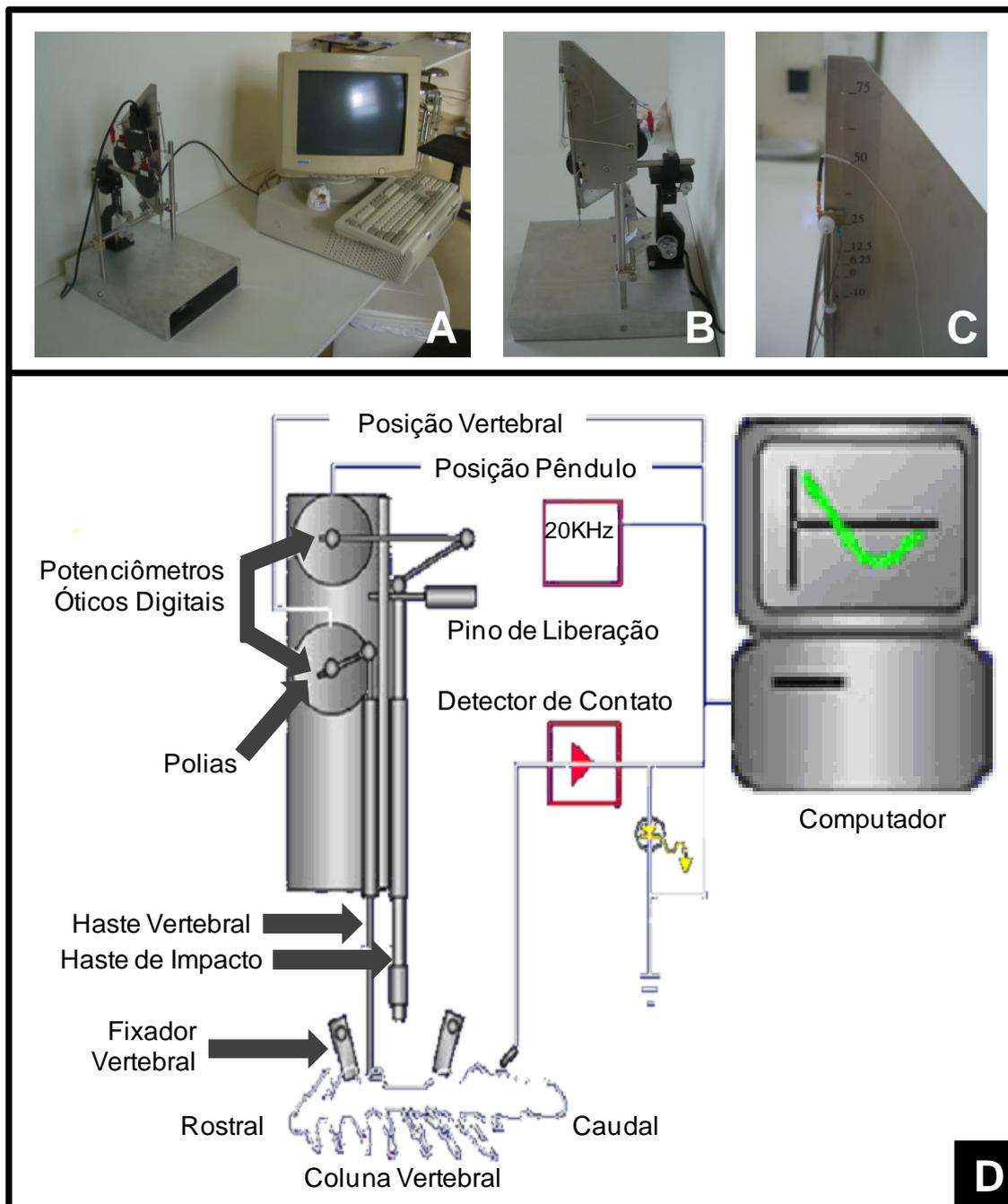


Figura 11 - Imagens do equipamento de lesão, *NYU-Impactor*. O aparelho estava conectado ao computador que armazena os parâmetros da lesão (A). Vista lateral do equipamento (B). Vista lateral do equipamento com aproximação para mostrar a altura pré-determinada de 25 mm (indicada pela seta), para a queda do peso (C). Desenho esquemático do *NYU-Impactor* com as suas estruturas apontadas e nomeadas (D).

Duas garras reguláveis foram ajustadas, para a fixação da coluna vertebral, presas aos processos espinhosos das vértebras T8 e T11. As garras tinham como objetivo diminuir as deformações do corpo do rato e,

consequentemente, o movimento da coluna, que poderia causar uma lesão inconsistente (Figura 12D). O modelo de lesão por impacto consiste na queda de uma haste de impacto de 10 g de peso de uma altura pré-determinada de 25 mm (lesão moderada; Basso *et al.*, 1995) entre a ponta da haste e a superfície da medula espinhal, por meio de um tubo guia, de maneira a reduzir os fatores de imprecisão. O aparelho foi construído de modo a produzir um impacto direto de alto rendimento, reduzir atritos e a resistência do ar, causando uma contusão reproduzível.

Após a contusão, o local foi inspecionado e em seguida, lavado com solução de cloreto de sódio 0,9%, em temperatura ambiente. A aproximação dos planos teciduais musculares e fasciais foi realizada com sutura de dois pontos Donati com fio de nylon monofilamento 4.0 (Figura 12E). Depois, a sutura cutânea foi realizada com pontos simples separados, também com fio de nylon monofilamento 4.0, sendo realizados em média sete pontos (Figura 12F). Após a limpeza da cicatriz cirúrgica foi aplicada uma camada da pomada Fibrase[®].

Os animais foram submetidos à antibioticoterapia para prevenir e/ou reduzir a infecção na ferida cirúrgica e nas vias urinárias. Administrou-se intraperitonealmente, cefazolina sódica (Cefazolin[®], AB Farma), com dose de 5 mg/kg, imediatamente após a lesão e uma vez ao dia durante os três dias seguintes. Caso a infecção persistisse, o uso do antibiótico era prolongado. Ração e água foram oferecidos logo que o animal ficou totalmente acordado, assim como Tylenol[®] (15-20 mg/kg) via oral para alívio da dor. No dia seguinte, ao da cirurgia, também era dado o Tylenol[®]. Esses medicamentos também

foram dados aos animais do grupo sham pelo mesmo período de tempo para que não houvesse viés nas avaliações comportamentais.

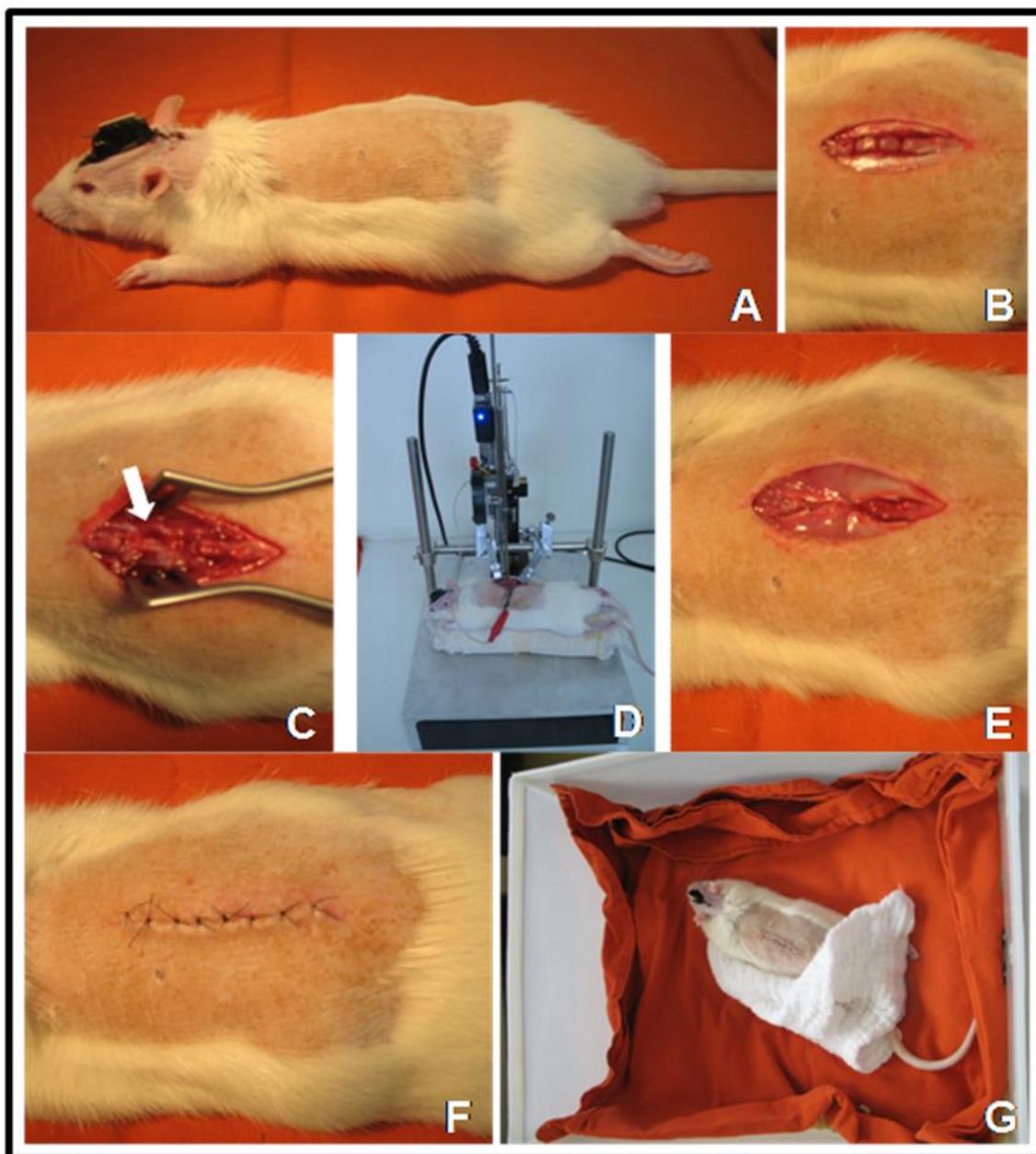


Figura 12 - Sequência de fotos da cirurgia de lesão medular. Animal anestesiado, com a região dorsal tricotomizada (A). Abertura da região de interesse para realizar a LM, sendo separadas as vértebras T9 e T10 (B). Musculatura afastada e processos espinhosos das vértebras T9 e T10 retirados, com exposição total da medula espinhal em uma extensão suficiente para permitir o contato da haste de impacto (indicada pela seta; C). Animal posicionado no *NYU-Impactor* (D). Aproximação da musculatura com dois pontos Donati (E). Aproximação da pele com oito pontos simples separados (F). Aspecto final do animal após a cirurgia de lesão, posicionado na caixa moradia (G).

Após a lesão medular, os animais perdem o reflexo de urinar, sendo necessário realizar o esvaziamento da bexiga. Este procedimento foi realizado por meio de uma manobra manual na região vesical, em uma frequência de acordo com as necessidades individuais de cada animal, sendo realizado no mínimo duas vezes por dia durante os três primeiros dias pós-operatórios. O esvaziamento foi realizado até que o animal recuperasse a função de urinar espontaneamente.

4.5. Atividade física realizada na esteira

Os animais do grupo treinado foram submetidos à atividade física na esteira com controle de velocidade (Figura 13), antes e após a lesão medular. Três treinos anteriores à lesão foram realizados por 15 minutos com os objetivos de adaptar o animal ao ambiente de treinamento, ensinar a tarefa que seria realizada e obter dados sobre a atividade cortical do animal sem lesão durante e após o exercício.

Os treinos posteriores à lesão foram iniciados no 5º dia pós-operatório e se estenderam por oito semanas. Eles foram realizados com uma frequência de cinco vezes na semana, durante 15 minutos cada, até o final do experimento. Devido à ausência de movimentos dos membros posteriores (MMPP) nos primeiros dias após a LM, um dispositivo auxiliar (Figura 14) foi utilizado para que o treinamento fosse realizado de maneira eficaz.

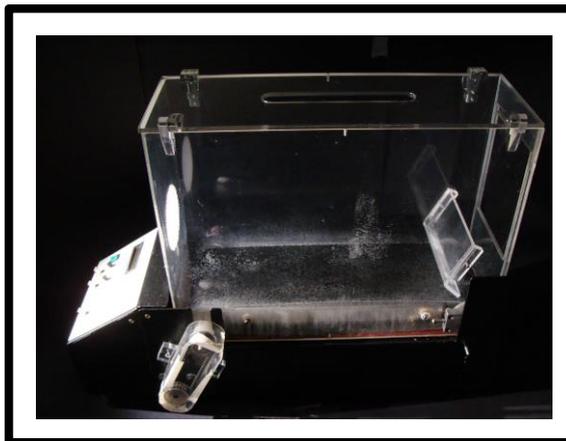


Figura 13 - Esteira motorizada controlada por velocidade utilizada para o treinamento motor dos ratos lesados do grupo treinado.

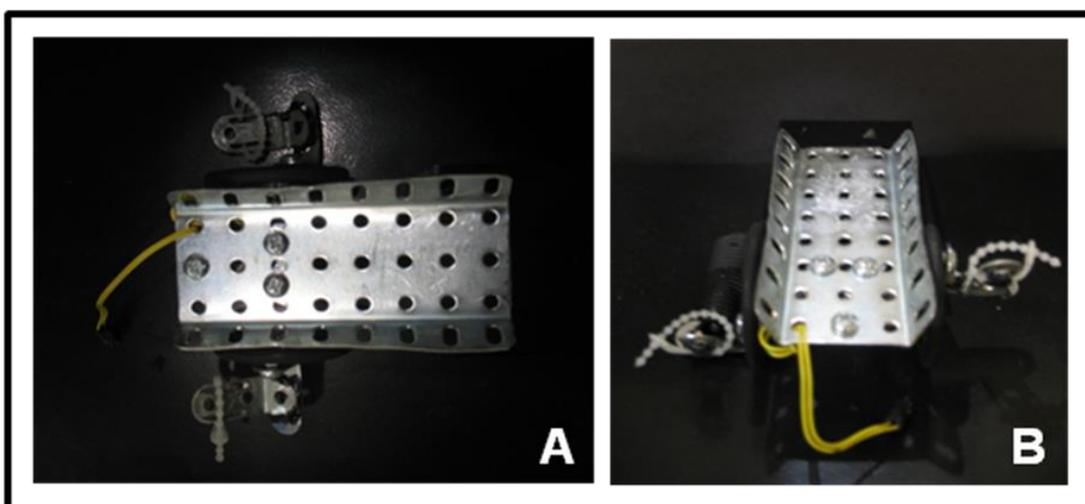


Figura 14 - Vista superior do dispositivo auxiliar, sendo possível observar a superfície plana na qual o abdômen do animal era apoiado e os pedais onde as patas eram posicionadas (A). Vista posterior do dispositivo permite visualizar que quando um pedal está para cima (direito), o outro está para baixo (esquerdo), permitindo que os “passos” passivos dos membros posteriores fossem realizados de forma alternada e rítmica, simulando a marcha (B).

Os animais foram colocados neste dispositivo, de forma que o abdômen ficasse apoiado em uma superfície plana, os MMPP presos nos pedais, e o tronco preso por uma fita de velcro (Figura 15). Além disso, foi utilizada uma coleira para o suporte de peso do animal, de forma que o dispositivo ficasse somente com suas rodas apoiadas na esteira e o movimento dos membros anteriores do animal pudesse ser realizado livremente.



Figura 15 - Animal posicionado no dispositivo desenvolvido para auxiliar no movimento dos membros posteriores no período agudo da lesão medular. As fotos mostram uma sequência de “passos” realizada passivamente.

Quando os animais começaram a apresentar movimentos dos MMPP, o dispositivo não era mais usado, porém era fornecido auxílio manual para que o movimento das articulações dos MMPP fosse realizado de maneira mais adequada. Os animais foram treinados a andar na esteira inicialmente com velocidade de 4,5 metros/minuto (m/min) e conforme eles apresentassem movimento extenso das articulações dos MMPP, a velocidade era aumentada até 8,5 m/min (metodologia adaptada de Bigbee *et al.*, 2007). Quando sinais de estresse, tal como aumento da defecação, fossem notados, a velocidade era diminuída (Hutchinson *et al.*, 2004).

4.6. Avaliação comportamental eletrofisiológica

A primeira avaliação eletrofisiológica foi realizada no 9º dia após cirurgia de implante com o objetivo de verificar as condições basais de cada animal, isto é, antes da cirurgia de lesão medular que foi realizada no 10º dia pós-cirúrgico de implante. Após a lesão medular, as avaliações foram realizadas no 1º, 3º, 5º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º e 56º dias pós-operatórios.

O animal foi primeiramente colocado em uma câmara com halotano (5%) para promover uma leve sedação e permitir um correto e firme acoplamento do conector do cabo com o soquete implantado na cabeça. Após este procedimento, que durava em torno de cinco minutos, o animal era colocado de volta na gaiola até se recuperar dos efeitos do halotano antes do início das sessões de registro (Nishikawa e Maciver, 2000). Em seguida, o animal era colocado dentro de uma caixa de madeira, posicionada dentro de uma câmara de registro isolada eletricamente (gaiola de *Faraday*), e o lado livre do cabo era conectado ao equipamento de aquisição (*Multichannel Acquisition Processor – Plexon Inc.*, Figura 16).

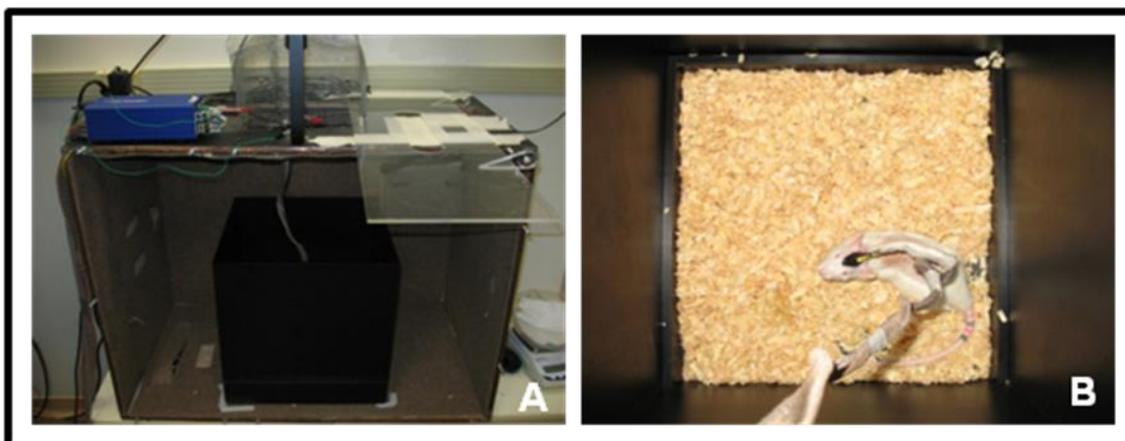


Figura 16 - Caixa preta posicionada dentro da gaiola de *Faraday*, local onde eram realizados os registros dos animais. A caixa azul, em cima da gaiola de *Faraday*, é o pré-amplificador ao qual o cabo de registro era conectado e o pré-amplificador, por sua vez, era conectado ao sistema de aquisição da *Plexon Inc.* (A). Animal com o cabo de registro conectado, dentro da caixa preta (B).

Entre o cabo de registro e o capacete do animal foi utilizado um pré-amplificador (*Plexon Headstage 0.8 Hz VLSI AC Coupled*, com impedância de entrada 22 M Ω a 1 kHz). Os sinais foram, então, amplificados e filtrados em cada canal de aquisição, sendo que continuamente eram armazenados no

computador com o *software Rasputin* (Plexon Inc.) e a interface de aquisição *Multichannel Acquisition Processor (MAP[®], Plexon Inc.,* Figura 17). Os dados registrados foram analisados posteriormente em outro computador com o *software Matrix Laboratory (MATLAB)* e *Neuroexplorer (Plexon Inc.)*.

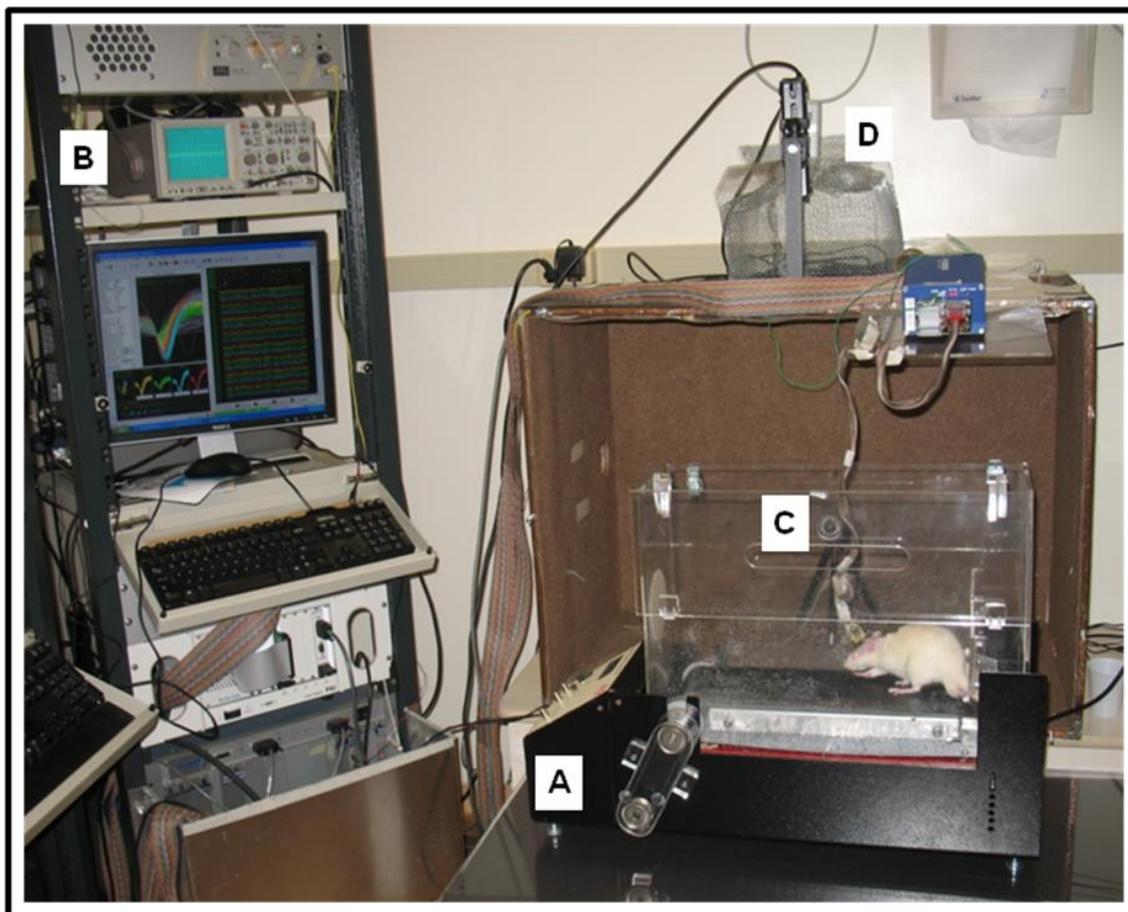


Figura 17 - Animal sendo registrado durante o treinamento na esteira, no 9POI (A). Equipamento de aquisição do sinal eletrofisiológico (B). Câmera de vídeo para filmar animal sendo treinado, posicionada dentro da gaiola de *Faraday* (C). Câmera de vídeo para filmar animal quando o registro era realizado dentro da caixa preta (D).

A primeira sessão de registro iniciou-se com a discriminação da atividade celular do córtex sensório-motor. Nesta fase, com duração de duas horas, um grande número de sinais eletrofisiológicos de neurônios foram reconhecidos e marcados no *software* do sistema de registro. Uma vez que

todos os sinais relevantes fossem identificados, o aparato era organizado para registrar tais sinais de forma contínua durante as avaliações comportamentais.

Os animais foram filmados por câmera de vídeo durante toda a duração dos registros (Figura 17). Um *Light-Emitting Diode (LED)* vermelho posicionado no canto da caixa comportamental era acionado manualmente, enviando simultaneamente pulsos *Transistor-Transistor Logic (TTL)* para o sistema de registro eletrofisiológico, permitindo sincronizar os sinais registrados ao vídeo comportamental.

Os registros eletrofisiológicos de todos os animais foram coletados inicialmente durante o comportamento livre dentro da caixa preta por 15 minutos. Em seguida, os animais foram colocados em um campo aberto, e ao mesmo tempo, a atividade cortical foi registrada por sete minutos. Logo após, os animais treinados realizaram atividade física na esteira, durante a qual também foi feito o registro eletrofisiológico por 15 minutos (Figura 17). E por fim, os animais treinados foram colocados de volta na caixa preta para serem registrados por mais 15 minutos.

Os animais controles e sham, após o registro no campo aberto, foram colocados diretamente de volta na caixa preta, onde foi feito o registro da atividade cortical por 15 minutos também. Em resumo, os animais controles e sham foram registrados por 37 minutos e os treinados por 52 minutos em todos os dias de avaliação (exceto nos 1º e 3º dPO, quando o treinamento não era realizado, sendo registrados pela mesma duração de tempo que os animais controles e sham).

4.7. Perfusão e Análise Imunohistoquímica

Todos os animais foram eutanasiados por meio do procedimento de perfusão transcardíaca no 57^o dia pós-operatório. Antes do procedimento, os animais foram colocados em uma câmara com halotano e oxigênio para promover uma leve sedação, em seguida foram anestesiados com 100 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina, ip. Durante a perfusão, foram utilizadas as soluções salina tamponada e paraformaldeído 4% tamponado (fixador), em pH fisiológico. Dois níveis acima e dois níveis abaixo do foco de lesão da medula espinhal e os encéfalos dos animais foram cuidadosamente extraídos. Estas estruturas permaneceram no mesmo fixador por 24 horas, sendo “crioprotégidas” por mais 24 horas em solução de sacarose a 20% em tampão fosfato, e em seguida, congeladas para análise subsequente. Todos os materiais biológicos utilizados neste projeto foram encaminhados e descartados pelo Centro de Material Biológico da Universidade de São Paulo.

4.7.1. Encéfalo

Os encéfalos foram cortados no micrótomo deslizante de congelamento (*Leica SM2000R*), sendo realizados cortes transversais de 30 µm de espessura, que foram coletados em placa de cultivo de seis unidades com solução fosfato tamponada 0,1 M (*phosphate buffer, PB*). A análise desta estrutura foi realizada para verificar a reorganização sináptica e estrutural de áreas envolvidas no comportamento sensório-motor, como o córtex motor,

córtex sensorial, estriado e substância negra. Foram investigadas proteínas consideradas como marcadores de densidade sináptica, como a sinaptofisina (*SYP*), e marcadores neuronais estruturais, como os neurofilamentos (NFs).

4.7.1.1. Protocolo de imunohistoquímica: *SYP* e NFs

Após três lavagens (de 10 minutos cada) em *PB*, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho dirigido contra a proteína *SYP* (concentração 1:1000 - DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) e anticorpo monoclonal de camundongo dirigido contra NFs (concentração 1:1000 - Zymed Laboratories, San Francisco, CA, EUA). O anticorpo dirigido contra NFs reconhece a região homóloga dos três neurofilamentos (68 kDa, 160 kDa e 200 kDa). Os anticorpos primários foram diluídos em *PB* contendo 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de burro (*normal donkey serum*).

As incubações com os anticorpos primários foram por um período de 14 a 20 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos em *PB*, os cortes foram incubados com os respectivos anticorpos secundários (anti-coelho obtido em burro para o anti-*SYP*, anti-camundongo obtido em burro para o anti-NFs) diluídos em *PB* contendo 0,3% de Triton X-100 por 2 horas à temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados, novamente em *PB* por três vezes de dez minutos e incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite Kit, Vector Labs) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, após três lavagens de *PB* de dez minutos cada, foi feita a reação com 0,05% de 3-3' diaminobenzidina (Sigma-Aldrich,

Saint Louis, MO, EUA) e uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03% em *PB*.

Atingida a marcação, foram realizadas mais seis lavagens em *PB* (de cinco minutos cada) e os cortes foram montados em lâminas histológicas gelatinizadas. As lâminas foram intensificadas por 0,05% de tetróxido de ósmio 0,05% diluído em água por 30 segundos. Após a contra-coloração, foi realizada a desidratação das lâminas em álcool 70%, 90%, 100% e 100%, por cinco minutos cada. Por fim, as lâminas foram colocadas no xilol I (por dez minutos) e II, sendo que permaneceram no último até a montagem. Para finalizar o procedimento foi realizada montagem com lamínulas fixadas com *Permount*[®] (Fisher).

O material foi posteriormente analisado em microscópio óptico (Nikon, Eclipse E1000), pelo qual imagens digitais das áreas de interesse (córtex motor, córtex somatossensorial, estriado e substância negra) foram coletadas com o programa Nikon ACT-1. As imagens foram analisadas pelo programa *ImageJ* (*National Institute of Health*, EUA).

4.7.2. Medula espinhal

Todas as medulas espinhais foram emblocadas em *Tissue Tek*[®] *OCT*[™] *Compound* (Sakura) para serem cortadas no criostato (*Leica* CM3050). Cortes transversais das medulas espinhais, de 14 µm de espessura, foram realizados no criostato (*Leica* CM3050) e coletados em lâminas histológicas gelatinizadas. Os cortes coletados foram distribuídos em 20 lâminas de maneira que em cada lâmina houvesse cortes representativos dos

segmentos rostral à lesão, da lesão propriamente dita (central) e caudal à lesão. A cada 20 cortes coletados (cada um posicionado em uma lâmina histológica), eram descartados 30 cortes. Deste modo, cada lâmina histológica ficou com aproximadamente 36 cortes. Após coletados todos os cortes, as lâminas foram colocadas em uma placa quente (37° C) para melhor fixação do tecido na lâmina por 24 horas, antes de serem guardadas no freezer - 20° C, onde permaneceram até serem coradas.

Reações imunohistoquímicas foram realizadas com quatro marcadores, sendo eles o OX-42 (marcador para microglia) e proteína glial fibrilar ácida (*GFAP*, marcador para astrócitos), por determinarem a morfologia dos astrócitos e oligodendrócitos, estes marcadores podem indicar alterações destas células em um tecido lesado, mostrando a contribuição delas para formação de cicatriz glial (Gwak e Hulsebosch, 2009; Hu *et al.*, 2010); proteína associada ao microtúbulo 2 (*MAP2*, marcador para microtúbulos - participam do crescimento e arborização dendrítica, remodelamento dendrítico pós lesão e estabelecimento e manutenção da sinaptogênese; Ferreira, 2011); e a sinapsina (*SYS*, com o objetivo de verificar a modulação da liberação de neurotransmissores pelos terminais pré-sinápticos, uma vez que estas proteínas controlam a disponibilidade de vesículas sinápticas por ancorá-las ao citoesqueleto do terminal nervoso (revisado por Cesca *et al.*, 2010)).

4.7.2.1. Protocolo de imunohistoquímica: OX-42, GFAP, MAP2 e SYS

As lâminas histológicas, retiradas do freezer - 20°C (uma lâmina de cada animal para cada anticorpo utilizado) foram colocadas na placa

quente por uma hora antes de serem iniciados os procedimentos da imunohistoquímica. Primeiramente foram realizadas duas lavagens das lâminas histológicas, de 10 minutos cada, com solução tampão (*PB*) 0,1 M. Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo primário monoclonal obtido em camundongo contra a proteína OX-42 (1:1000 - Pharmigen, San Diego, CA, EUA), anticorpo primário monoclonal obtido em camundongo contra a proteína *GFAP* (1:1000 - Sigma Aldrich, Saint Louis, MO EUA), anticorpo monoclonal obtido em camundongo contra a proteína *MAP2* (1:1000 - Chemicon, Temecula, CA, EUA), e anticorpo policlonal obtido em coelho contra a proteína *SYS* (1:1000 - Chemicon, Temecula, CA, EUA). Estes anticorpos foram diluídos em *PB*, contendo 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de burro. A incubação foi conduzida por 20 a 24 horas à temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas três vezes de 10 minutos cada com *PB* e depois incubadas com o anticorpo secundário biotilado. Os anticorpos secundários biotilados utilizados foram anti-coelho feito em burro para o anti-*SYS* e anti-camundongo obtido em burro para o anti-*MAP2*, o anti-*OX-42* e o anti-*GFAP* (Jackson Immuno Research Lab., West Grove, Pennsylvania, EUA), contendo 0,3% de Triton X-100, por duas horas à temperatura ambiente.

As lâminas foram então lavadas novamente em *PB* (três vezes de 10 minutos cada) e incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (*ABC, Elite Kit, Vector Labs*) diluído em *PB* contendo 0,3% de Triton X-100 *ABC*, por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, após três lavagens em *PB* de 10 minutos, foi feita a reação com 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03% em *PB*. Nesta etapa da imunohistoquímica, as

lâminas foram colocadas nesta solução por cinco minutos e, em seguida, a reação foi “interrompida” pelo *PB* e a marcação foi verificada em um microscópio. Caso a marcação não estivesse evidente, as lâminas eram novamente colocadas na solução de 3-3'-diaminobenzidina. Esse procedimento foi repetido até atingir uma boa marcação do anticorpo.

Atingida a marcação, mais seis lavagens em *PB* (de cinco minutos cada) foram realizadas e as lâminas foram colocadas por cinco minutos na água destilada para retirar os resíduos restantes. Depois foi feita a intensificação e fixação da coloração no tetróxido de ósmio 0,05% diluído em água, por 30 segundos. Novamente, as lâminas foram colocadas na água destilada por cinco minutos antes de iniciar a desidratação à temperatura ambiente. Os procedimentos de desidratação foram cinco minutos em cada concentração de álcool: 70%, 95%, 100% e 100%. Em seguida, as lâminas foram colocadas em duas cubas de xilol por 10 minutos cada. E por fim, foi feita a montagem com lamínulas, utilizando *Permount*[®] (Fisher).

O material foi posteriormente analisado em microscópio óptico (Nikon, Eclipse E1000), pelo qual imagens digitais das áreas de interesse (cornos ventrais da medula espinhal) foram coletadas por meio do programa Nikon ACT-1. As imagens foram analisadas pelo programa *ImageJ* (*National Institute of Health*, EUA).

4.7.3. Análise de Densidade Óptica Integrada

Com a imunohistoquímica foi possível realizar uma análise dos tipos e localização das estruturas imunorreativas e uma análise subjetiva de

intensidade de marcação, como o aumento ou diminuição. As imagens capturadas do encéfalo e da medula espinhal foram analisadas pelo programa *ImageJ*. Para análise das estruturas encefálicas foram selecionados de cinco a sete cortes de cada área para cada animal. Nos córtices foi selecionada uma grande área (com o tamanho de 46669 mm²) por corte para quantificação da densidade óptica integrada (DOI). As camadas corticais IV e V foram analisadas nos córtices somatossensorial e motor, respectivamente. Para o estriado e substância negra foram selecionadas de cinco a sete áreas menores (com o tamanho de 728 mm² e 8824 mm², respectivamente) por corte para a quantificação da densidade óptica integrada.

Para a análise da medula espinhal também foram selecionados de cinco a sete cortes para três regiões: cefálico à lesão, central à lesão e caudal à lesão para cada animal. Em cada um dos cortes foi selecionada uma grande área (com o tamanho de 42048 mm²) no corno ventral para a quantificação da DOI para cada um dos marcadores.

4.8. Análise estatística

Os dados resultantes das avaliações comportamentais foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) para investigar significância entre atividade neural, controle/reabilitação motora, alterações estruturais das áreas encefálicas e da medula espinhal. Os programas utilizados foram *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)* 15.0 e *Matrix Laboratory (MATLAB)* 7.6. Nível de significância utilizado foi de 0,05. Quando necessário foi utilizado teste *post hoc* Bonferroni de comparações múltiplas.

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos Gerais

Neste trabalho foram utilizados ratos *Wistar* submetidos a treinamento na esteira para avaliar a plasticidade cortical sensório-motora após a lesão medular torácica. Após o período de habituação e manipulação inicial dos animais, a primeira intervenção experimental deste trabalho foi a realização da cirurgia de implante de micro-eletrodos para analisar a plasticidade cortical, por meio dos registros eletrofisiológicos. Para este procedimento, todas as matrizes de micro-eletrodos foram igualmente confeccionadas e os 18 animais foram submetidos à cirurgia de implante de micro-eletrodos. Nenhum deles apresentou complicações pós-cirúrgicas.

O modelo de lesão utilizado foi o de contusão, por meio do equipamento *NYU-Impactor*, que causa lesões medulares consistentes e reproduzíveis, o que é fundamental para que os resultados da influência da intervenção terapêutica nas alterações corticais possam ser comparados entre os grupos experimentais. Todos os animais foram submetidos à lesão medular (grupos treinado e controle) ou ao procedimento cirúrgico sem lesão medular (grupo sham). Dos 14 animais que sofreram a contusão da medula espinhal, um foi a óbito após a cirurgia de lesão, restando seis animais no grupo treinado e sete no grupo controle.

Logo após a LM, todos os animais apresentaram paralisia flácida abaixo do nível de lesão, conforme pode ser visualizado na figura 18. O

padrão postural apresentado pelos animais no 1º dPO foi abdômen arrastado, apoio dorsal das patas posteriores e cauda baixa. Todos apresentaram ausência total dos movimentos de quadril, joelho e tornozelo. Por outro lado, os animais do grupo sham não apresentaram qualquer comprometimento motor, indicando que os comprometimentos observados nos grupos lesados são decorrentes da contusão da ME e não do procedimento cirúrgico.



Figura 18 - Foto de um animal com lesão medular no 1º dPO, apresentando abdômen arrastado, apoio dorsal da pata posterior e cauda baixa.

Logo após a LM, os animais perderam o reflexo de urinar, sendo realizado diariamente o esvaziamento vesical até que eles recuperassem o controle voluntário deste comportamento. Dentre os cuidados pós-operatórios administrou-se antibiótico, a fim de se prevenir o surgimento de infecção urinária. Este tratamento foi feito por quatro a cinco dias pós-lesão, de acordo com a cor da urina de cada animal.

Os 17 animais que completaram o estudo tiveram a atividade cortical sensório-motora avaliada com a mesma periodicidade por meio dos registros eletrofisiológicos. A avaliação foi feita um dia antes da cirurgia de lesão medular ou só do procedimento cirúrgico sem lesão no 9º POI; e depois no 1º, 3º, 5º, 7º dPO e semanalmente até completar oito semanas. Portanto, foram coletados 12 registros do córtex sensório-motor.

Os animais do grupo treinado foram submetidos ao treinamento cinco vezes na semana por 15 minutos, sendo completadas ao final do

experimento, 38 sessões de treinamento. Devido à paralisia flácida decorrente da lesão, os primeiros treinamentos foram realizados com o auxílio do dispositivo, que foi mantido em média por 10 dias após a LM, pois este foi o período em que os animais não apresentavam mobilidade suficiente para iniciar o treinamento somente com o auxílio manual. Assim que foi adquirida certa movimentação dos membros posteriores, foi iniciado o auxílio manual por meio do movimento das patas posteriores pelo experimentador ou segurando a cauda do animal. A maioria dos animais precisou deste tipo de auxílio até o 28^o dPO. Com o passar do tempo, maior controle motor era atingido e os treinamentos passaram a ser feitos com o uso de uma cinta (sem controle exato do suporte de peso) até que os animais conseguissem desempenhar a tarefa de maneira totalmente independente. Somente um dos animais treinados precisou usar o cinto até o final do experimento.

Todos os animais foram perfundidos no 57^o dPO e os seus encéfalos e medulas espinhais foram coletados para análise imunohistoquímica. Os encéfalos foram imunoreagidos com os anticorpos sinaptofisina e neurofilamentos e as medulas com os anticorpos *GFAP*, *MAP2*, *OX-42* e sinapsina.

5.2. Avaliação Eletrofisiológica

No registro basal da atividade cortical sensório-motora, realizado no 9^o POI, foram identificados os neurônios de cada um dos 31 canais de registro de cada animal. O sistema de registro utilizado da *Plexon Inc.* permite que em cada canal até quatro neurônios sejam selecionados de

acordo com o formato dos potenciais de ação (*spikes*) e os seus *clusters*, como pode ser visualizado na figura 19.

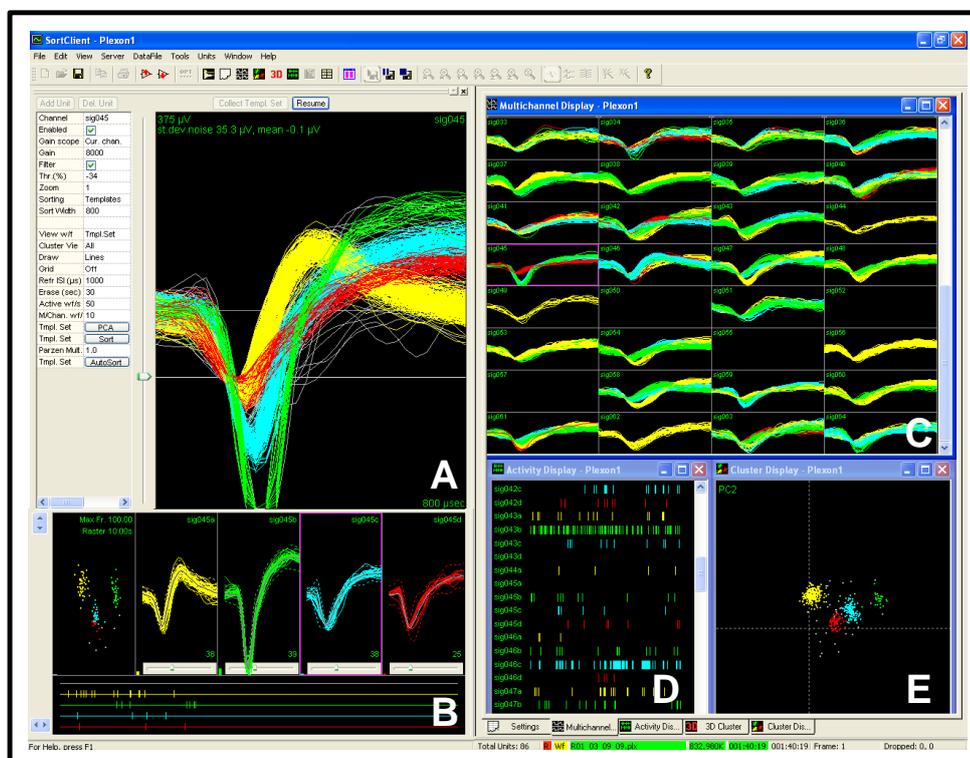


Figura 19 - Imagem retirada do programa de aquisição dos sinais eletrofisiológicos. Quatro neurônios marcados com cores diferentes de acordo com o seu formato podem ser observados em A. *Spikes* mostrados individualmente de cada um dos neurônios selecionados (B). 32 canais de registro com os *spikes* de seus neurônios (C). Frequência de disparo de cada um dos neurônios selecionados (D). *Clusters* formados pelo os disparos dos quatro neurônios que estão demonstrados em A (E).

Uma análise do número de neurônios registrados foi feita ao longo do tempo. A ANOVA mostrou diferença significativa do número de neurônios entre os dias ($F_{11,132} = 15,44$, $p < 0,05$) e interação entre dias e grupo ($F_{22,132} = 2,813$, $p < 0,05$), mas não evidenciou diferença significativa entre os grupos. Uma análise *post hoc* SNK mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os quatro primeiros dias de registros e os quatro últimos dias de registros para os grupos lesados, CTL e TR (Gráfico 1). Portanto, pode-se dizer que houve diminuição significativa do número de neurônios em função do tempo nos grupos com lesão medular, enquanto o grupo sham apresentou uma

tendência a manter a quantidade de neurônios identificada no início do experimento, não mostrando diferença significativa.

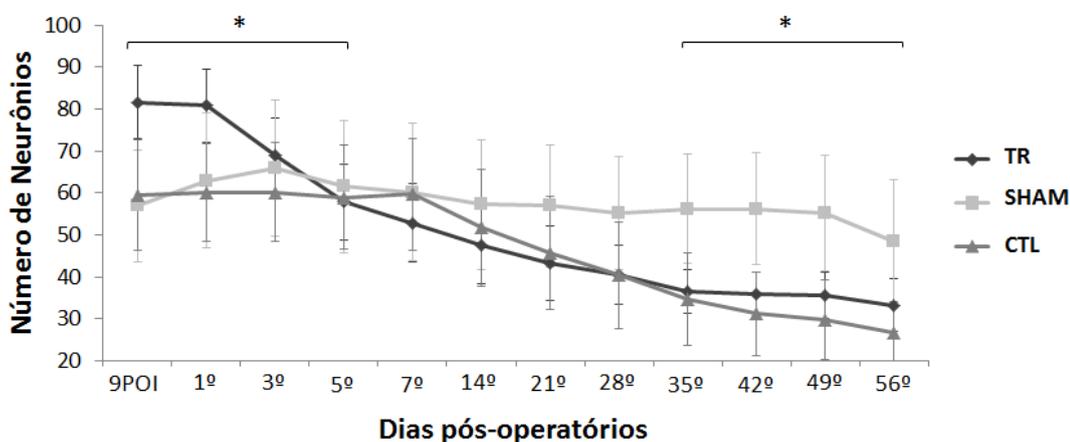


Gráfico 1 - Número de neurônios registrados ao longo do experimento. Houve uma diminuição significativa do número de neurônios quando comparados os quatro primeiros dias de registro com os quatro últimos dias para os grupos treinado e controle (* $p < 0,05$).

Outra análise foi realizada a partir dos registros eletrofisiológicos para verificar se existiam neurônios que disparavam de maneira específica em função da atividade motora. Para esta análise foram selecionados neurônios relacionados ao movimento dos animais treinados. A partir dos vídeos realizados durante o treinamento na esteira foram selecionados trechos dos ciclos de marcha. Isto quer dizer que, nos primeiros dias de treinamento, a seleção foi feita a partir de uma volta completa da roda do dispositivo auxiliar utilizado e, depois, os ciclos de marcha correspondiam ao contato inicial, balanço e contato final da pata do animal na esteira. Cada ciclo durava um segundo. A frequência de disparo dos neurônios selecionados foi analisada em vários trechos do ciclo de marcha (de 1 s cada). Foi possível observar, como demonstrado na figura 20, neurônios no córtex sensório-motor que aumentam ou diminuem a taxa de disparo em função do movimento, mesmo com lesão medular.

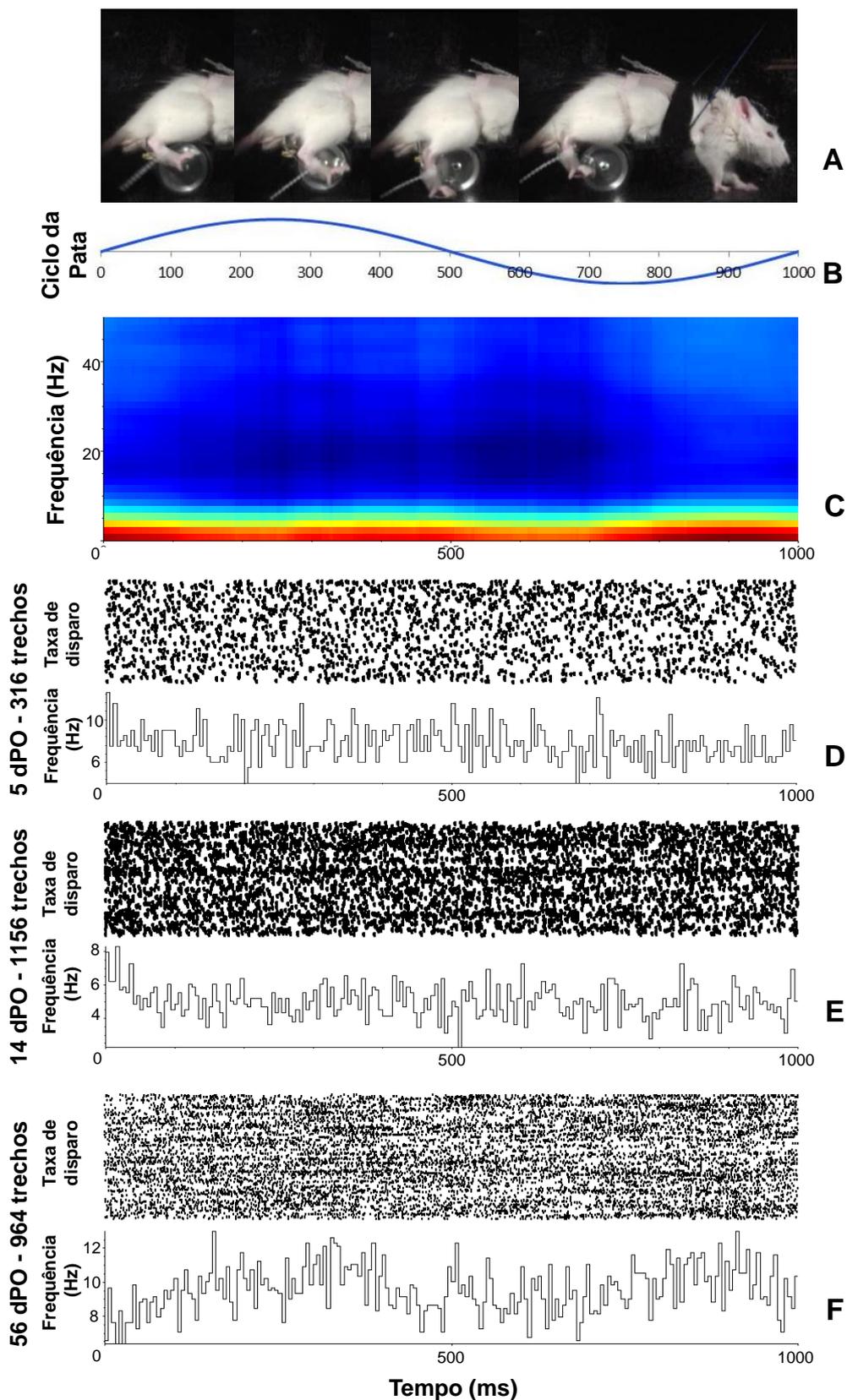


Figura 20 - As imagens mostram, em um segundo, movimento da pata do animal treinando na esteira (A), o ciclo da pata (B), espectrograma do neurônio selecionado para a análise (C), a sua taxa de disparo e o seu histograma em 316 trechos no 5^o dPO (D), em 1156 trechos no 14^o dPO (E) e em 964 trechos no 56^o dPO (F).

Esta mesma análise foi feita para animais do grupo CTL, quando estes apresentavam movimento da pata posterior e animais do grupo sham. Os trechos dos ciclos de marcha destes animais foram selecionados a partir das imagens dos vídeos feitos com os animais no campo aberto. O canal de registro da atividade muscular (quadríceps da pata posterior direita) também foi utilizado para ajudar na sincronização do sinal cortical e o movimento dos animais do grupo sham (Figura 21).

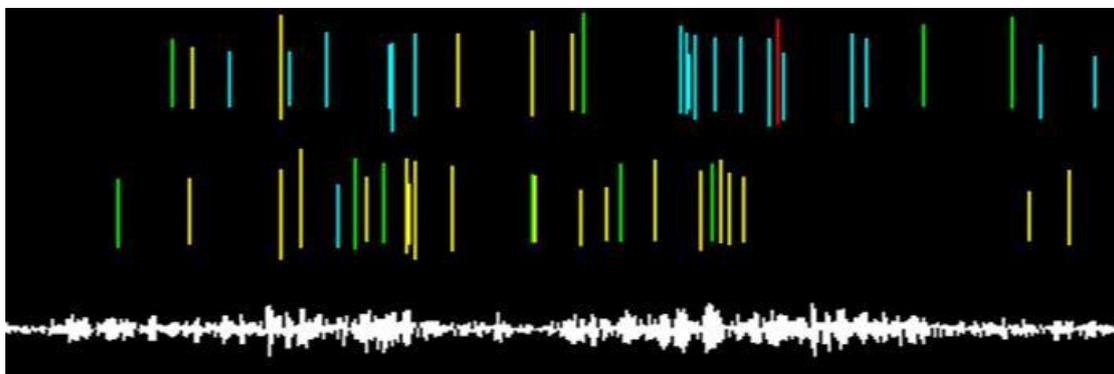


Figura 21 - *Spikes* (representados traços em verde amarelo, azul e vermelho) de dois canais de registros eletrofisiológicos (primeira e segunda linhas), sincronizados com o sinal do eletrodo muscular (terceira linha), de um animal sham, em um trecho de um segundo.

Uma vez identificada a existência de neurônios que disparam em relação ao movimento, foi feita uma análise de trechos selecionados somente em que os animais estivessem andando no campo aberto para classificação destes neurônios, por meio de histogramas como demonstrado na figura 22, considerando como intervalo de confiança 75%. A partir desta classificação, o número de neurônios que disparam em relação ao movimento pode ser comparado entre grupos ao longo do tempo. A ANOVA mostrou diferença significativa do número de neurônios relacionados ao movimento entre os grupos ($F_{2,132} = 27,5$, $p < 0,001$), entre os dias ($F_{10,132} = 83,15$, $p < 0,001$) e interação entre dias e grupo ($F_{20,132} = 2,615$, $p < 0,001$). Uma análise *post hoc*

Bonferroni mostrou diferença significativa entre o grupo CTL e os grupos sham e TR nos 35^o, 42^o, 49^o e 56^o dPO ($p < 0,001$), sendo o número de neurônios que disparam em relação ao movimento nos grupos treinados e sham maior do que no grupo controle (Gráfico 2).

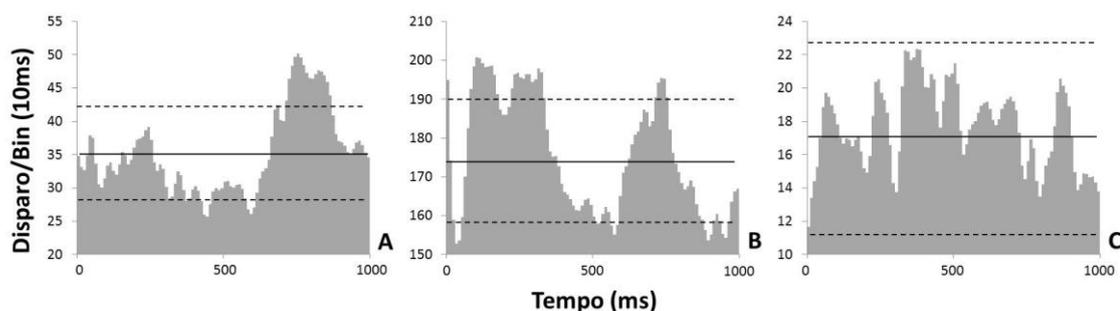


Figura 22 - Perievento histograma de três neurônios, sendo em A e B considerados como relacionados ao movimento, e em C não relacionado ao movimento. Linha central representa disparo médio e linhas tracejadas superior e inferior representam o intervalo de confiança de 75%, tamanho bin 10ms.

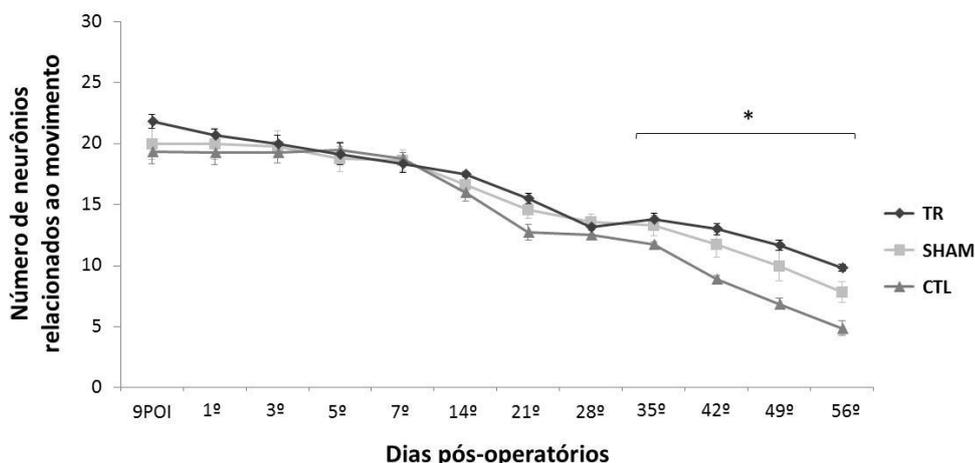


Gráfico 2 - Número de neurônios que disparam em relação ao movimento ao longo do tempo para os grupos treinado, controle e sham. Existe um número significativamente maior de neurônios que disparam em relação ao movimento para os grupos treinado e sham quando comparados com o controle nos 35^o, 42^o, 49^o e 56^o dPO ($*p < 0,001$).

Além da análise dos disparos unitários, a partir de seleção de trechos de um segundo da atividade de potencial de campo local (*LFP*) do córtex sensório-motor e da atividade eletromiográfica (EMG) do músculo quadríceps pôde-se observar frequentemente um padrão de ativação cortical que antecede a ativação muscular mesmo após a lesão medular, como é possível verificar na figura 23.

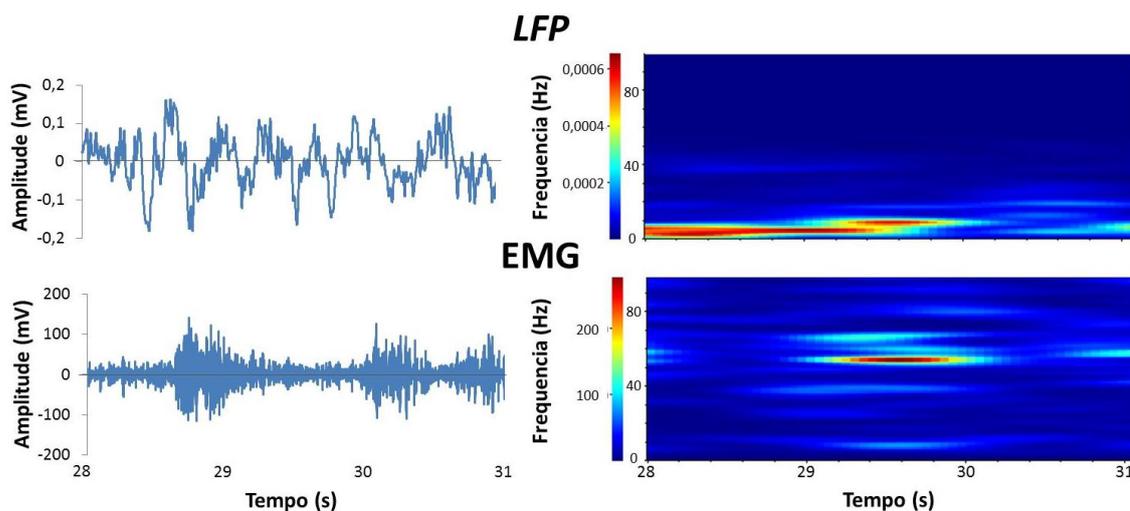


Figura 23 - Imagens ilustrativas da atividade de campo local (*LFP*) do córtex sensório-motor (à esquerda) e seu respectivo espectrograma (à direita), em cima; e na parte de baixo, a atividade eletromiográfica (*EMG*) do músculo quadríceps referente ao mesmo trecho do *LFP* (à esquerda) e seu respectivo espectrograma (à direita). Note que atividade cortical antecede a atividade muscular.

Estes dados mostram nos registros eletrofisiológicos: presença de neurônios do córtex sensório-motor relacionados com a atividade motora realizada na ausência da integridade dos tratos ascendentes e descendentes; mesmo se os animais não são estimulados (pelo treinamento motor na esteira) após a lesão, seus neurônios corticais são capazes de disparar em função do movimento; a relação entre a taxa de disparo e o movimento ocorre mesmo quando o movimento não é voluntário, nos casos dos movimentos passivos das patas posteriores realizados por meio do dispositivo auxiliar nos primeiros dias de treinamento; apesar da diminuição de neurônios registrados em ambos os grupos lesados com o passar do tempo, os animais do grupo treinado apresentaram maior número de neurônios que dispararam em relação ao movimento; e existe um aumento da atividade de potencial campo local do córtex sensório-motor imediatamente antes de haver atividade muscular, mesmo após a lesão.

5.3. Análise Imunohistoquímica

5.3.1. Encéfalo

Áreas sensório-motoras do encéfalo (córtex motor, estriado, córtex somatossensorial e substância negra) foram escolhidas para se estudar os efeitos da lesão medular e do treinamento na esteira sobre a proteína de vesícula sinaptofisina e sobre os neurofilamentos. Nas figuras 24, 25, 26 e 27 são mostradas imagens digitais representativas de cada área sensório-motora de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle), para NFs e *SYP*. De uma maneira geral, o padrão de marcação imunohistoquímica para os NFs foi mais visível ao longo dos axônios e nos corpos celulares. E em relação à *SYP*, o padrão de marcação imunohistoquímica observado foi mais difuso, citoplasmático e puntiforme-granular em regiões de maior densidade sináptica.

No córtex motor, a marcação para NFs se apresentou ao longo dos processos e dos corpos celulares de forma mais intensa na camada V (Figura 24A). Houve uma diminuição significativa ($F_{2,13} = 8,23$, $p = 0,008$) da densidade óptica integrada deste marcador para o grupo CTL quando comparado aos grupos sham e TR, como é possível observar na figura 24C. Em relação à *SYP*, houve uma marcação citoplasmática mais difusa (Figura 24B). Não houve diferença significativa da DOI deste marcador entre os grupos ($F_{2,9} = 2,09$, $p = 0,17$; Figura 24D).

Para o estriado foi escolhida a região dorso-lateral para ser analisada. A proteína para NFs apresentou uma marcação de forma pontilhada e agrupada em regiões que coincidem com a passagem de feixes nervosos

(Figura 25A). Houve uma diminuição significativa ($F_{2,9} = 4,39$, $p = 0,047$) da DOI deste marcador para os grupos lesados, TR e CTL, quando comparados ao grupo sham (Figura 25C). Nesta região, o padrão de marcação observado para proteína de vesícula *SYP* também foi bastante difuso e puntiforme por todo estriado (Figura 25B). Não houve diferença significativa da densidade óptica integrada deste marcador entre os grupos ($F_{2,9} = 1,69$, $p = 0,238$; Figura 25D).

No córtex somatossensorial, assim como no córtex motor, a marcação para NFs se apresentou ao longo dos processos e dos corpos celulares, porém de forma mais intensa na camada IV (Figura 26A). Houve um aumento significativo ($F_{2,10} = 6,72$, $p = 0,014$) da DOI deste marcador para o grupo TR, quando comparado ao grupo CTL, mas não quando comparado ao grupo sham (Figura 26C). O grupo CTL também não diferiu em relação ao grupo sham. Para a proteína de vesícula *SYP*, houve uma marcação citoplasmática difusa (Figura 26B), não havendo diferença significativa da DOI deste marcador entre os grupos ($F_{2,9} = 0,61$, $p = 0,565$; Figura 26D).

Na substância negra, o padrão para os NFs formou uma densa malha de processos (Figura 27A), enquanto que para a *SYP* pôde-se observar a prevalência de um padrão de marcação citoplasmático (Figura 27B). Não houve diferença significativa da densidade óptica integrada de ambos os marcadores entre os grupos ($F_{2,10} = 1,96$, $p = 0,19$ e $F_{2,9} = 0,52$, $p = 0,613$; Figuras 27C e 27D, respectivamente).

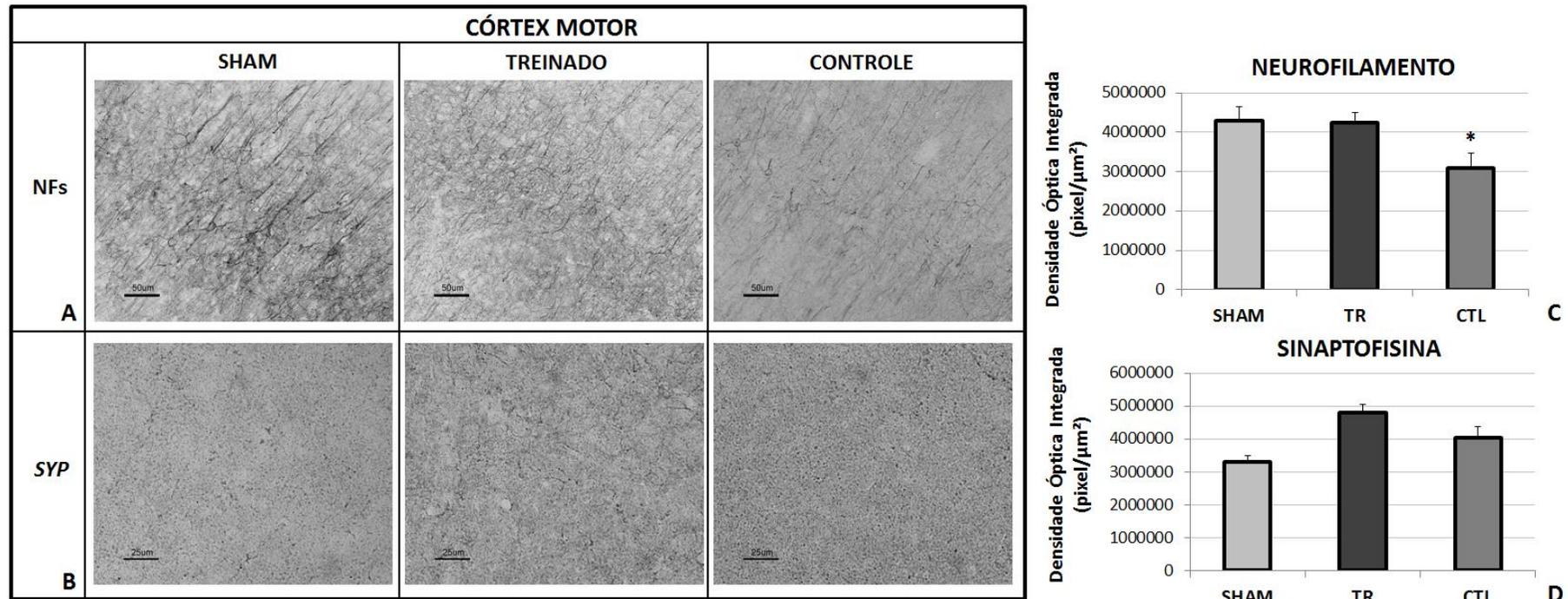


Figura 24 - Imagens de cortes coronais (30 μm de espessura) do córtex motor representativos de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle), ilustrando o padrão de marcação para neurofilamentos (imagens de cima; barra de escala 50 μm) e sinaptofisina (imagens de baixo; barra de escala 50 μm). Houve menor imunorreatividade para NFs do grupo CTL comparado aos grupos sham e TR, que apresentaram intensa marcação ao longo dos processos (A). Não houve diferença entre os grupos em relação à imunorreatividade para SYP (B). Gráfico da densidade óptica integrada de NFs no córtex motor para os grupos sham, treinado e controle. Houve uma diminuição significativa da DOI deste marcador para o grupo CTL (* $p = 0,008$) (C). Gráfico da densidade óptica integrada de SYP no córtex motor para os grupos sham, treinado e controle. Não houve diferença da DOI deste marcador entre os grupos ($p = 0,17$) (D).

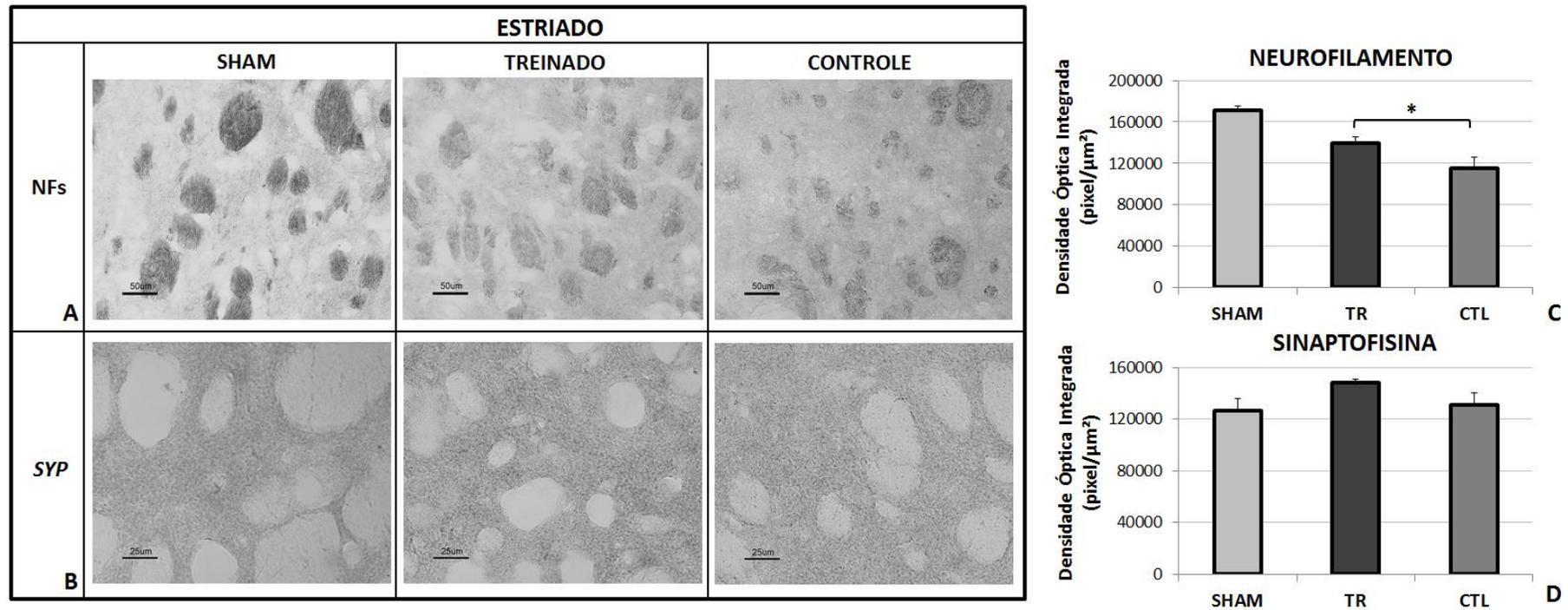


Figura 25 - Imagens de cortes coronais (30 μm de espessura) do estriado representativos de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle), ilustrando o padrão de marcação para neurofilamentos (imagens de cima; barra de escala 50 μm) e sinaptofisina (imagens de baixo; barra de escala 50 μm). Houve menor imunorreatividade para NFs dos grupos lesados (TR e CTL) com discreta marcação comparada ao grupo sham, que apresentou intensa marcação de forma agrupada em regiões por onde passam os feixes nervosos (A). Não houve diferença entre os grupos em relação à imunorreatividade para *SYP* (B). Gráfico da densidade óptica integrada de NFs no estriado para os grupos sham, treinado e controle. Houve uma diminuição significativa da DOI deste marcador para os grupos treinado e controle (* $p = 0,047$) (C). Gráfico da densidade óptica integrada de *SYP* no estriado para os grupos sham, treinado e controle. Não houve diferença da DOI deste marcador entre os grupos ($p = 0,238$) (D).

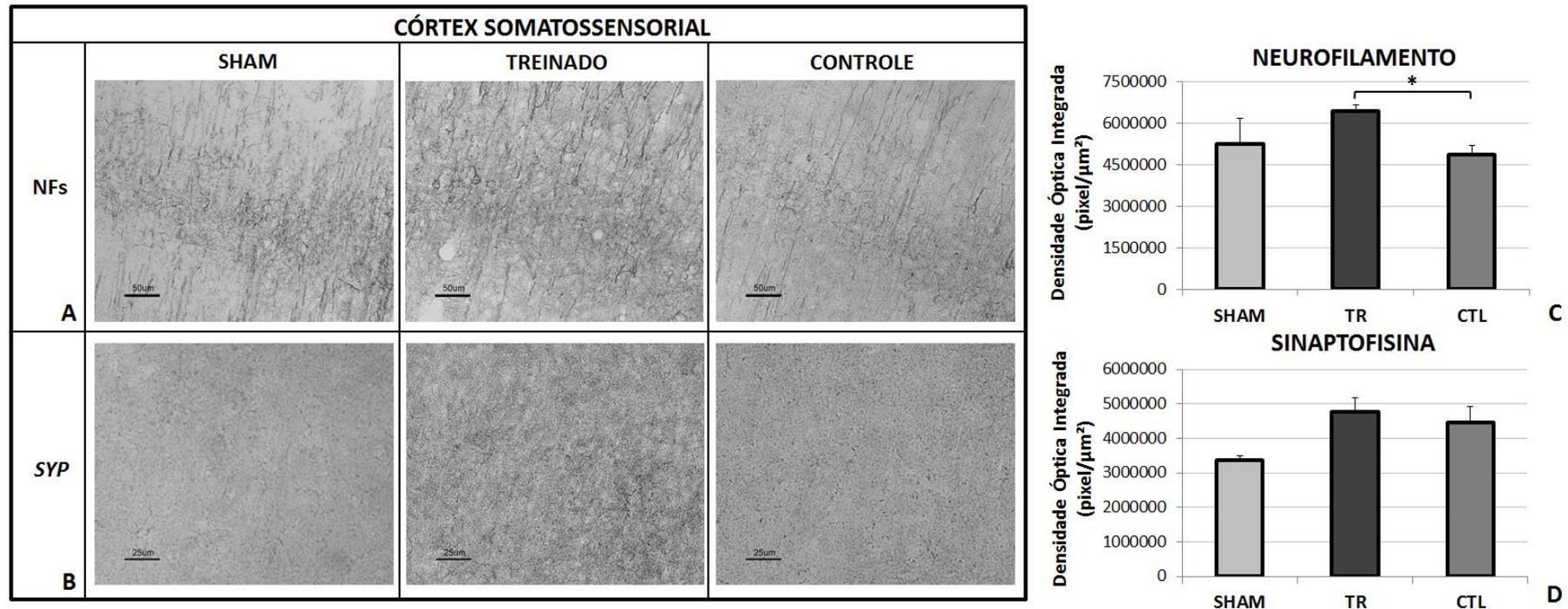


Figura 26 - Imagens de cortes coronais (30 µm de espessura) do córtex somatossensorial representativos de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle), ilustrando o padrão de marcação para neurofilamentos (imagens de cima; barra de escala 50 µm) e sinaptofisina (imagens de baixo; barra de escala 25 µm). Houve aumento da imunorreatividade para NFs do grupo TR, com intensa marcação ao longo dos processos, quando comparado ao grupo CTL, mas não quando comparado ao grupo sham (A). Não houve diferença entre os grupos em relação à imunorreatividade para SYP (B). Gráfico da densidade óptica integrada de NFs no córtex somatossensorial para os grupos sham, treinado e controle. Houve um aumento significativo da DOI deste marcador para o grupo treinado (*p = 0,014) (C). Gráfico da densidade óptica integrada de SYP no córtex somatossensorial para os grupos sham, treinado e controle. Não houve diferença da DOI deste marcador entre os grupos (p = 0.565) (D).

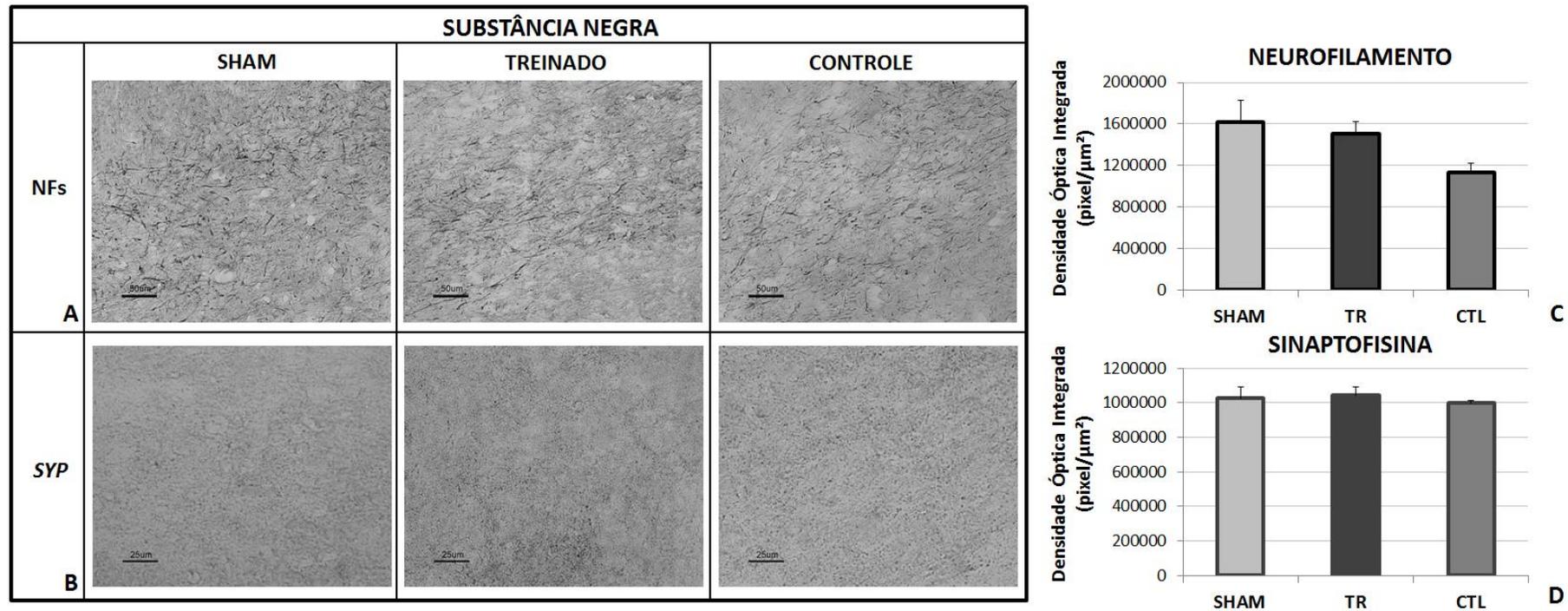


Figura 27 - Imagens de cortes coronais (30 μm de espessura) da substância negra representativos de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle), ilustrando o padrão de marcação para neurofilamentos (imagens de cima; barra de escala 50 μm) e sinaptofisina (imagens de baixo; barra de escala 25 μm). Não houve diferença entre os grupos em relação à imunorreatividade tanto para NFs (A), como para SYP (B). Gráfico da densidade óptica integrada de NFs na substância negra para os grupos sham, treinado e controle. Não houve diferença da DOI deste marcador entre os grupos ($p = 0,19$) (C). Gráfico da densidade óptica integrada de SYP na substância negra para os grupos sham, treinado e controle. Não houve diferença da DOI deste marcador entre os grupos ($p = 0,613$) (D).

5.3.2. Medula espinhal

Na medula espinhal, os marcadores *MAP2*, *SYS*, *GFAP* e *OX-42* foram escolhidos para se estudar as alterações na arborização dendrítica, eficiência sináptica, reação astrocitária e microglial, respectivamente, após a lesão medular e o procedimento de reabilitação realizado na esteira. De maneira geral, foi possível notar uma grande alteração na conformação da medula espinhal dos animais dos grupos treinado e controle. Tanto a substância cinzenta, como a substância branca foram drasticamente afetadas pela lesão por contusão, podendo ser observados diversos cistos e cavidades.

A imunoreatividade produzida pelo anticorpo *MAP2* se apresentou ao longo das neurópilas (densa malha de processos) de forma difusa e mais intensa na substância cinzenta. A sinapsina, assim como a sinaptofisina utilizada como marcador no encéfalo, apresentou uma marcação puntiforme-granular mais difusa no citoplasma em regiões de maior densidade sináptica. O *GFAP* marcou principalmente os processos e os corpos de astrócitos. O *OX-42* apresentou marcação nos processos e nos corpos das células microgliais.

Nas figuras 28, 29, 30 e 31 são mostradas imagens digitais representativas de cortes transversais do corno ventral da medula espinhal de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle) para cada segmento da medula em relação à lesão (rostral, central e caudal) imunoreagidos com os anticorpos *MAP2*, *SYS*, *GFAP* e *OX-42*, respectivamente.

Para *MAP2*, na região rostral à lesão houve aumento significativo ($F_{2,13} = 4,46$, $p = 0,033$) da imunoreatividade no grupo TR, com

intensa marcação quando comparado ao grupo CTL, mas não quando comparado com o grupo sham. O grupo CTL também não diferiu em relação ao grupo sham. Na região central à lesão houve diminuição significativa ($F_{2,13} = 29,38$, $p < 0,001$) da imunoreatividade para este marcador nos grupos lesados (TR e CTL), com discreta marcação, quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve diminuição significativa da imunoreatividade para este marcador no grupo CTL (com discreta marcação) e aumento significativo da imunoreatividade no grupo TR (com intensificação da marcação), quando comparados ao grupo sham ($F_{2,13} = 21,01$, $p < 0,001$). Estes dados podem ser visualizados na figura 28 e no gráfico 3.

Para *SYS*, na região rostral à lesão houve um aumento significativo da imunoreatividade no grupo TR (com intensificação da marcação) e diminuição significativa da imunoreatividade no grupo CTL, quando comparados com o grupo sham ($F_{2,14} = 25,49$, $p < 0,001$). Na região central à lesão houve diminuição significativa ($F_{2,14} = 8,51$, $p = 0,004$) da imunoreatividade para este marcador nos grupos lesados (TR e CTL), com marcação discreta, quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve diminuição significativa ($F_{2,14} = 4,4$, $p = 0,033$) da imunoreatividade para este marcador no grupo CTL, com discreta marcação, quando comparado aos grupos sham e TR. Estes dados podem ser visualizados na figura 29 e no gráfico 4.

Para *GFAP*, na região rostral à lesão houve aumento significativo ($F_{2,13} = 9,16$, $p = 0,003$) da imunoreatividade no grupo TR, com intensificação da marcação, quando comparado aos grupos CTL e sham. Na região central à lesão houve aumento significativo ($F_{2,13} = 35,91$, $p < 0,001$) da

imunoreatividade para este marcador nos grupos lesados (TR e CTL), com intensificação da marcação, quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve diminuição significativa ($F_{2,13} = 9,17$, $p = 0,003$) da imunoreatividade para este marcador no grupo CTL, com discreta marcação, quando comparado aos grupos sham e TR. Estes dados podem ser visualizados na figura 30 e no gráfico 5.

Para o OX-42, a região rostral à lesão não houve diferença da imunoreatividade entre os grupos ($F_{2,14} = 5,15$, $p = 0,24$). Na região central à lesão houve aumento significativo ($F_{2,12} = 54,68$, $p < 0,001$) da imunoreatividade para este marcador nos grupos lesados (TR e CTL), com intensificação da marcação, quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve diminuição significativa ($F_{2,12} = 23,68$, $p < 0,001$) da imunoreatividade para este marcador no grupo CTL, com discreta marcação, quando comparado ao grupo TR, mas não em relação ao grupo sham. O grupo TR também não difere em relação ao grupo sham. Estes dados podem ser visualizados na figura 31 e no gráfico 6.

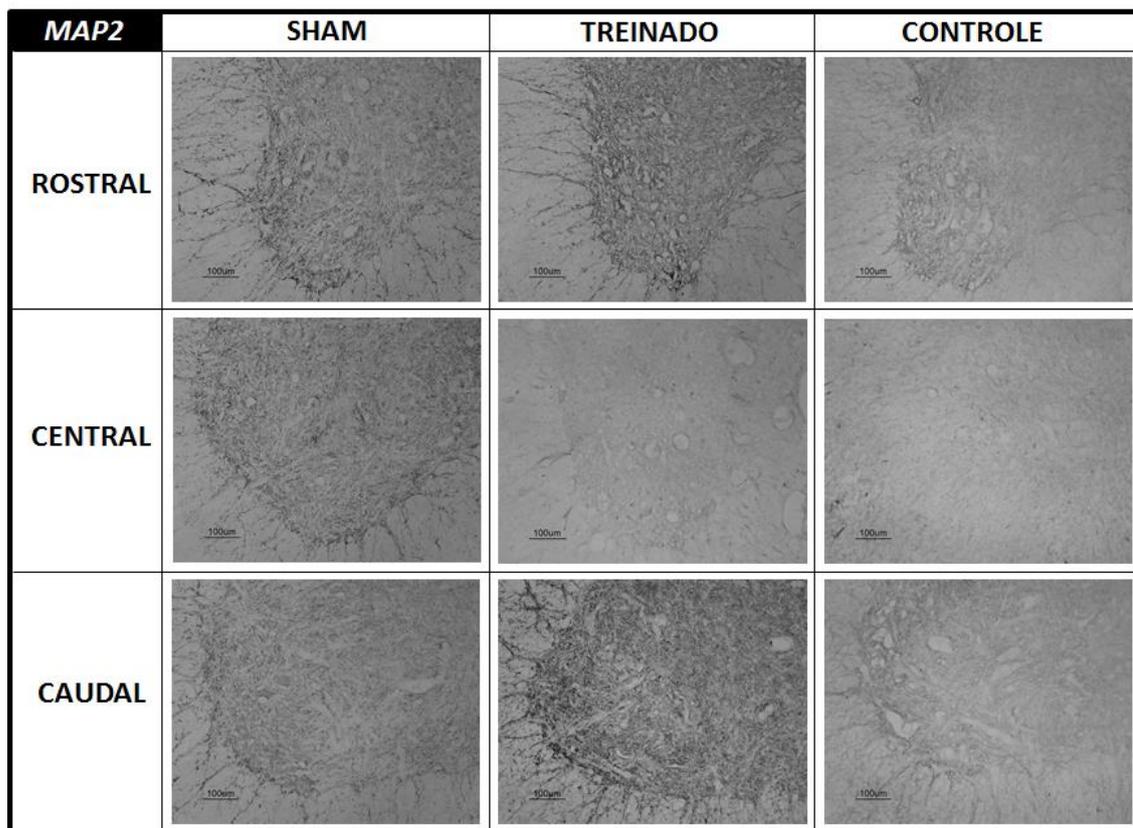


Figura 28 - Imagens de cortes transversais do corno ventral da medula espinhal (14 µm de espessura) representativos de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle nas colunas) para cada segmento da medula em relação ao local de lesão (rostral, central e caudal nas linhas), ilustrando o padrão de marcação para *MAP2* (barra de escala 100 µm). Na região rostral à lesão houve maior imunoreatividade no grupo TR, com intensificação da marcação quando comparado ao grupo CTL, mas não quando comparado ao grupo sham (que apresentou marcação parecida ao grupo CTL). Na região central à lesão houve menor imunoreatividade nos grupos lesados (TR e CTL), com discreta marcação, quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve menor imunoreatividade para o grupo CTL (com discreta marcação) e maior imunoreatividade no grupo TR (com intensificação da marcação), quando comparados ao grupo sham.

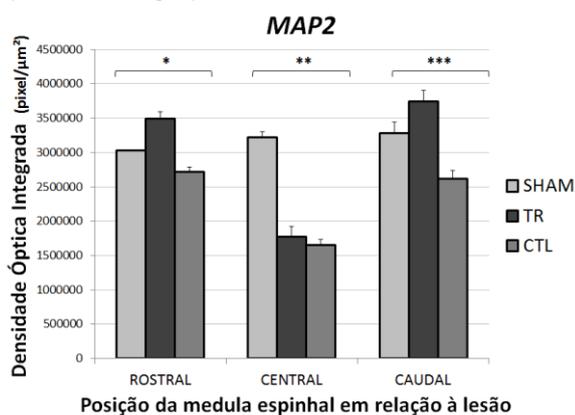


Gráfico 3 - Densidade óptica integrada da proteína *MAP2* no corno ventral de acordo com o segmento da medula espinhal em relação à lesão medular. No segmento rostral à lesão houve diminuição da DOI no corno ventral do grupo CTL, quando comparado aos grupos sham e TR (* $p = 0,033$). Houve diminuição significativa da DOI na região central da lesão para os grupos TR e CTL quando comparados ao grupo sham (** $p < 0,001$). E no segmento caudal à lesão houve uma diminuição significativa da DOI para o grupo CTL em relação aos grupos TR e sham (** $p < 0,001$).

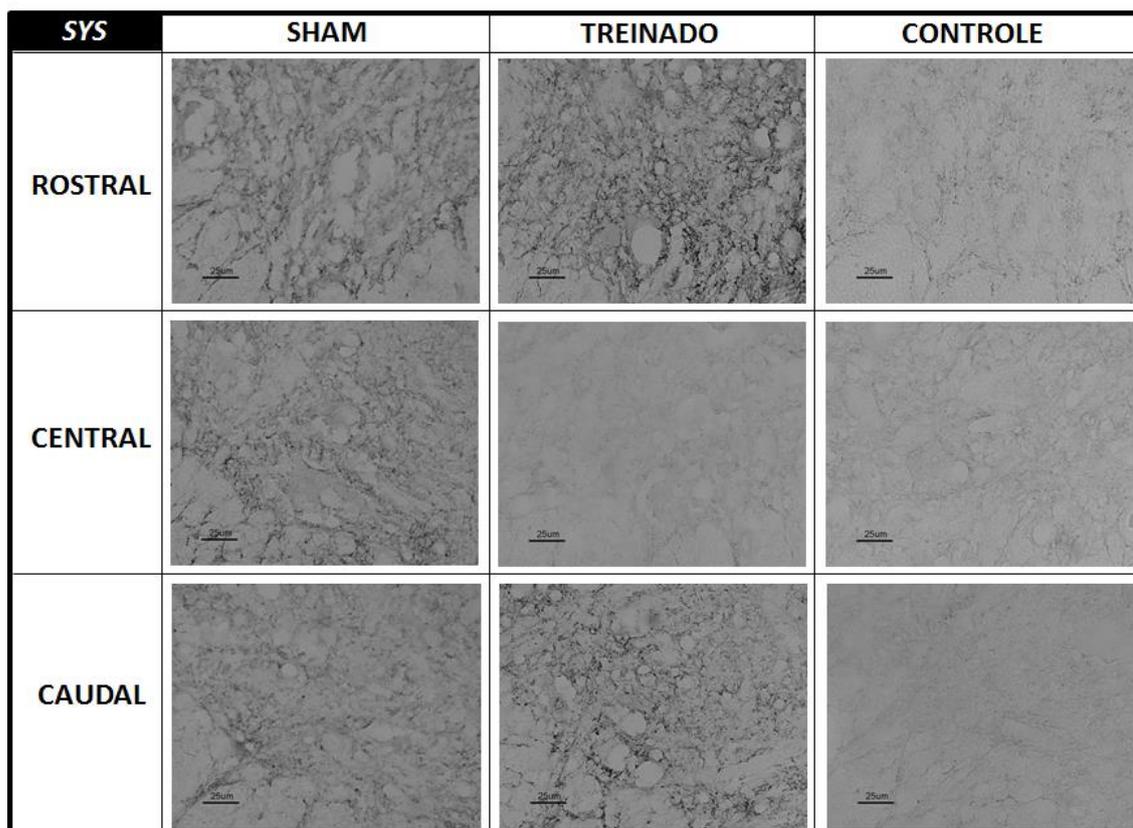


Figura 29 - Imagens de cortes transversais do corno ventral da medula espinhal (14 μm de espessura) representativos de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle nas colunas) para cada segmento da medula em relação ao local de lesão (rostral, central e caudal nas linhas), ilustrando o padrão de marcação para SYS (barra de escala 25 μm). Na região rostral à lesão houve maior imunoreatividade no grupo TR (com intensificação da marcação) e menor imunoreatividade no grupo CTL, quando comparados com o grupo sham. Na região central à lesão houve menor imunoreatividade com discreta marcação nos grupos lesados (TR e CTL), quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve menor imunoreatividade com discreta marcação no grupo CTL, quando comparado aos grupos sham e TR.

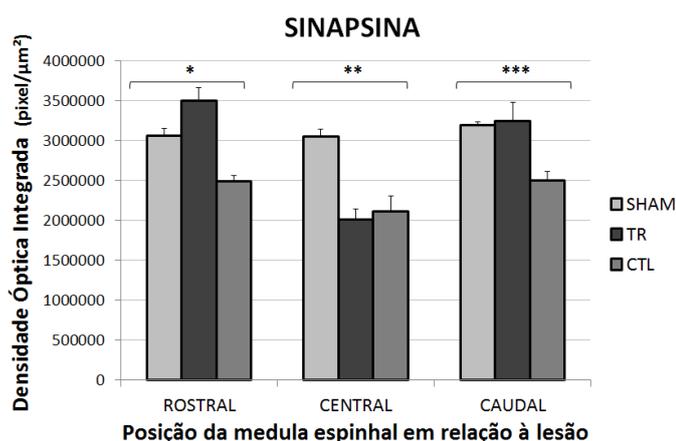


Gráfico 4 - Densidade óptica integrada da proteína SYS no corno ventral de acordo com o segmento da medula espinhal em relação à lesão medular. No segmento rostral à lesão houve aumento da DOI no corno ventral do grupo TR, quando comparado aos grupos sham e CTL (* $p < 0,001$). Houve diminuição significativa da DOI na região central da lesão para os grupos TR e CTL quando comparados ao grupo sham (** $p = 0,004$). E no segmento caudal à lesão houve uma diminuição significativa da DOI para o grupo CTL em relação aos grupos sham e TR (** $p = 0,033$).

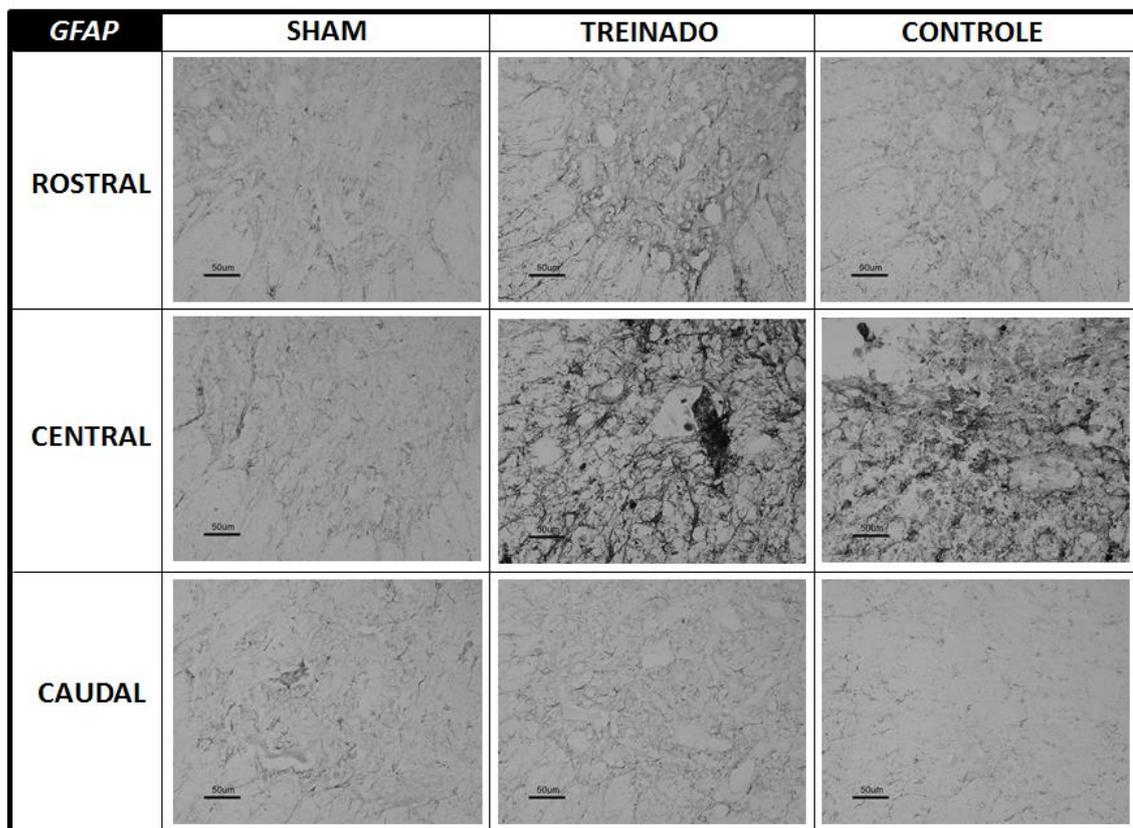


Figura 30 - Imagens de cortes transversais do corno ventral da medula espinhal (14 μm de espessura) representativas de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle nas colunas) para cada segmento da medula em relação ao local de lesão (rostral, central e caudal nas linhas), ilustrando o padrão de marcação para *GFAP* (barra de escala 50 μm). Na região rostral à lesão houve maior imunoreatividade no grupo TR, com intensificação da marcação, quando comparado aos grupos CTL e sham. Na região central à lesão houve maior imunoreatividade nos grupos lesados (TR e CTL), com intensificação da marcação, quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve menor imunoreatividade no grupo CTL, com discreta marcação, quando comparado aos grupos sham e TR.

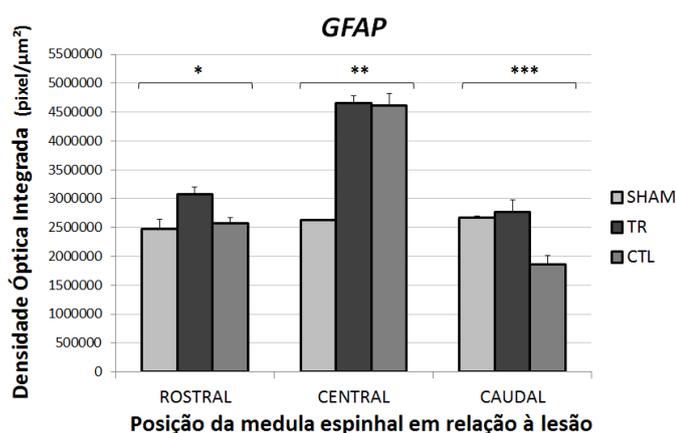


Gráfico 5 - Densidade óptica integrada da proteína *GFAP* no corno ventral de acordo com o segmento da medula espinhal em relação à lesão medular. No segmento rostral à lesão houve aumento da DOI no corno ventral do grupo TR, quando comparado aos grupos sham e CTL (* $p = 0,003$). Houve aumento significativo da DOI na região central da lesão para os grupos TR e CTL quando comparados ao grupo sham (** $p < 0,001$). E no segmento caudal à lesão houve uma diminuição significativa da DOI para o grupo CTL em relação aos grupos sham e TR (** $p = 0,003$).

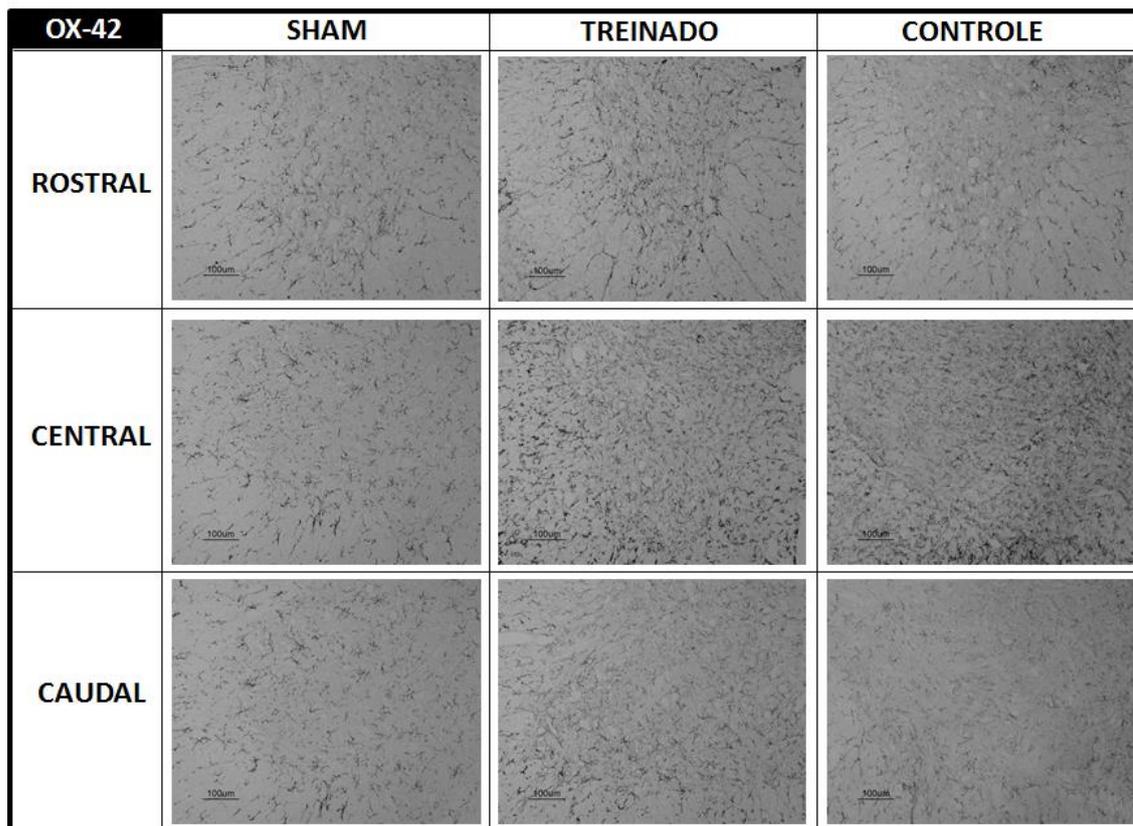


Figura 31 - Imagens de cortes transversais do corno ventral da medula espinhal (14 μm de espessura) representativas de um animal de cada grupo (sham, treinado e controle nas colunas) para cada segmento da medula em relação ao local de lesão (rostral, central e caudal nas linhas), ilustrando o padrão de marcação para OX-42 (barra de escala 100 μm). Na região rostral à lesão não houve diferença da imunoreatividade para este marcador entre os grupos. Na região central à lesão houve maior imunoreatividade nos grupos lesados (TR e CTL), com intensificação da marcação, quando comparados ao grupo sham. Na região caudal à lesão houve menor imunoreatividade para este marcador no grupo CTL, com discreta marcação, quando comparado ao grupo TR, mas não em relação ao grupo sham. O grupo TR também não difere do grupo sham.

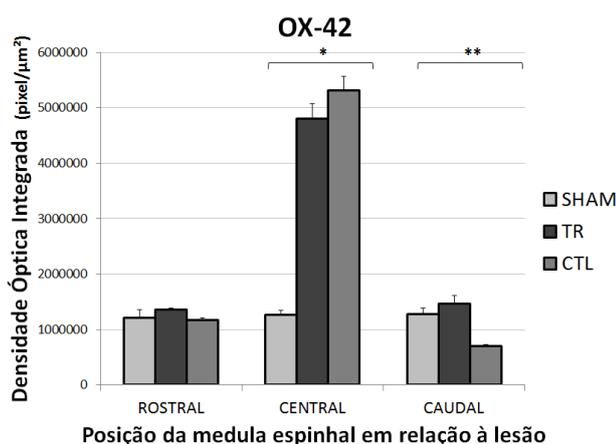


Gráfico 6 - Densidade óptica integrada da proteína OX-42 no corno ventral de acordo com o segmento da medula espinhal em relação à lesão medular. Na região central à lesão houve aumento significativo da DOI para os grupos TR e CTL quando comparados ao grupo sham (* $p < 0,001$). E no segmento caudal à lesão houve uma diminuição significativa da DOI para o grupo CTL em relação ao grupo TR (** $p < 0,001$), mas não em relação ao grupo sham.

6. DISCUSSÃO

“O objetivo de qualquer intervenção reabilitativa é treinar habilidades no âmbito clínico que possam ser transferidas para as atividades de vida diária...” (Marsh *et al.*, 2011). Apesar dos avanços tecnológicos nos últimos anos, a recuperação funcional do indivíduo lesado medular, com retorno para as suas atividades de vida diária, ainda é um desafio na área da reabilitação. Estudos com modelos animais de lesão medular, que ajudem a entender os processos envolvidos na plasticidade cortical e da ME após um programa de reabilitação, são relevantes para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas.

O modelo de lesão medular utilizado neste trabalho foi o de contusão, uma vez que ele é clinicamente pertinente por ser o tipo de lesão mais comum em seres humanos. Além disso, de acordo com Ianotti e colaboradores (2004), a lesão medular contusa em animais produz um padrão previsível de lesão progressiva, resultando em morte neuronal e de células da glia, lesão vascular, destruição axonal e desmielinização que é análoga à lesão medular contusa em humanos. Deste modo, os achados em modelos experimentais nos permitem fazer inferências sobre o que se pode esperar de algumas intervenções que eventualmente possam ser utilizadas em humanos.

Neste estudo, o treinamento na esteira foi escolhido como o procedimento de reabilitação para os animais com lesão medular. Este tipo de reabilitação é amplamente estudado em pesquisas com animais e pacientes que apresentem LM (Behrman e Harkema, 2000; Dobkin *et al.*, 2003;

Hutchinson *et al.*, 2004; Giangregorio *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006; Bigbee *et al.*, 2007; Barriere *et al.*, 2008; Dietz, 2009; Ichiyama *et al.*, 2011). Quando iniciar o treinamento motor é um assunto debatido na literatura (Coumans *et al.*, 2001; Norrie *et al.*, 2005; Winchester *et al.*, 2005; Kuzhandaivel *et al.*, 2011).

Ao se tratar de humanos, o tempo de início depende da condição geral do paciente que precisa estar estável após o trauma, mas é necessário estar atento à “janela de oportunidade” para que o treinamento reabilitativo seja mais eficaz. Os animais treinados neste trabalho iniciaram as atividades na esteira em um curto período de tempo pós LM, no 5º dPO. De acordo com Fouad e Tetzlaff (2012) existem diversas explicações para o declínio da resposta benéfica ao treinamento reabilitativo com o tempo, tais como: redução da expressão de genes associados à plasticidade e ao crescimento neuronal; degradação das funções neuronais e musculares; e aumento de fatores inibitórios, como as proteoglicanas.

Desta forma, a fim de se favorecer de um ambiente mais permissivo a regeneração, os treinamentos na esteira foram iniciados de maneira precoce neste estudo. Para que isso acontecesse, foi necessário desenvolver um dispositivo para o auxílio do movimento dos membros posteriores, que ficaram paralisados após a LM. Segundo Lee e colaboradores (2011), um treinamento que executa padrões de movimentos rígidos dos membros pode ser vantajoso na geração de padrões precisos de aferência sensorial, necessários para o aprendizado da locomoção após a LM. O dispositivo auxiliar permitiu que movimentos passivos rítmicos, coordenados e contínuos fossem realizados durante o treinamento.

O auxílio manual foi oferecido em uma fase mais avançada da recuperação, quando algum movimento era realizado pelos animais lesados medulares. Este tipo de auxílio também é utilizado no treinamento de marcha de humanos com LM (Duschau-Wicke *et al.*, 2010; Field-Fote e Roach, 2011; Harkema *et al.*, 2012), com o objetivo de incentivar o indivíduo a fazer um esforço maior para gerar a marcha quando comparado com o uso de um auxílio robótico. O aprendizado motor também pode ocorrer a partir do treinamento com assistência manual devido à variabilidade do movimento a cada ciclo de marcha e à participação ativa do paciente. A utilização destes auxílios na reabilitação dos animais lesados deste trabalho se mostrou eficaz na recuperação motora, visto que, ao final do experimento, o treinamento na esteira pôde ser realizado de maneira independente.

No entanto, após a lesão medular incompleta, em humanos e em modelos animais, uma recuperação espontânea moderada é frequentemente observada, mesmo sem qualquer intervenção reabilitativa ou farmacológica (Kim *et al.*, 2006). Este fato também foi observado nos animais do grupo controle que recuperaram alguns movimentos dos membros posteriores após LM, inclusive, de forma a permitir que o movimento destes animais pudesse ser correlacionado com a atividade cortical sensório-motora. Para Fouad e Tetzlaff (2012), essa recuperação espontânea deve-se à plasticidade temporal e variações entre propriedades neuronais, desde mudanças anatômicas como o crescimento colateral acima e abaixo do nível de lesão, até mudanças complexas nas redes neuronais nos mapas corticais ou nos *CPGs* da medula espinhal.

Neste trabalho, a camada V do córtex sensório-motor foi escolhida para o registro eletrofisiológico. De acordo com Humanes-Valera *et al.* (2013), o córtex infragranular é particularmente apropriado para se investigar mudanças em redes de nível cortical após a deafferentação por ser uma camada que expressa máxima convergência de aferências excitatórias e inibitórias, tanto locais como de longa distância, assim como é o local de origem de maior quantidade de eferências corticais.

O córtex sensório-motor do rato é uma área de sobreposição sensório-motora. Deste modo, a atividade neural durante o andar indica também o processamento da informação sensorial. A partir do registro de campo local pôde-se observar uma ativação do córtex sensório-motor antes da realização do movimento, identificado pelo registro eletromiográfico. Segundo Rigosa e colaboradores (2015), o aumento da atividade cortical pode representar sinais de planejamento motor ou de execução motora, do sistema nervoso central para a periferia, e não somente a representação da informação sensorial.

Os resultados eletrofisiológicos deste trabalho mostraram ainda que existem neurônios corticais que continuam disparando ao longo do tempo de acordo com o movimento mesmo após terem sido desconectados parcialmente de seus circuitos medulares e não serem estimulados por alguma atividade externa. Isto indica que, provavelmente, uma remodelação compensatória cortical pode ser um dos fatores que contribui para a recuperação espontânea dos animais do grupo controle.

De acordo com Putrino e colaboradores (2010), os disparos neuronais no córtex motor formam redes neurais relacionadas à associação e

formação de aspectos do movimento. Estudos investigaram as interações dos *spikes* no córtex M1 e relacionaram-nas com envolvimento nas tarefas motoras, nos parâmetros do movimento (por exemplo, direção, amplitude, velocidade), na preparação do movimento, no aprendizado motor e em outros contextos comportamentais motores (Stark *et al.*, 2008; Lawhern *et al.*, 2010; Putrino *et al.*, 2010; Denker *et al.*, 2010). Além disso, esses estudos mostram que estas interações entre os neurônios são dinâmicas em relação a sua natureza, ocorrendo em estágios específicos da tarefa motora (por exemplo, antecipação ao estímulo, preparação, execução).

Os dados coletados sobre a atividade cortical mostraram que houve uma diminuição significativa do número de neurônios com o tempo, que é decorrente da lesão, uma vez que os animais do grupo sham, apresentaram uma tendência a manter este número. De acordo com o Moxon *et al.* (2014), a diminuição da atividade cortical relacionada a deafferentação pode ser decorrente, primeiramente, da diminuição da atividade de estruturas sensório-motoras primárias como as conexões tálamo-corticais e, em seguida, por diminuição da atividade de estruturas secundárias que regulam a sincronização cortical e o “despertar” do tálamo e do tronco encefálico, provavelmente, envolvendo uma depressão do sistema colinérgico.

No entanto, apesar de existir esta diminuição do número de neurônios registrados, foram identificados neurônios no córtex sensório-motor que continuam disparando de maneira específica em relação ao movimento após a lesão medular. Dados preliminares de Rigosa *et al.* (2015) vão de encontro com os nossos resultados, mostrando que uma grande parte de neurônios registrados permanecem ativos alguns dias após uma hemiseção

da medula espinhal no nível de T10, porém por serem observações preliminares estes dados ainda não foram publicados pelo grupo de pesquisadores. Os autores sugerem que os neurônios que permanecem ativos podem ser particularmente úteis para a decodificação da informação motora e esta informação é suficiente para guiar um sistema neuroprotético com base na detecção *online* dos eventos da marcha (fase de apoio e balanço).

No presente trabalho, entretanto, pôde-se observar que o número de neurônios que disparam em relação ao movimento nos animais do grupo controle foi menor quando comparado com os grupos treinado e sham. Além disso, na análise imunohistoquímica verificou-se um maior número de neurofilamentos no córtex motor e somatossensorial no grupo treinado comparado ao grupo controle. Estes dados nos ajudam a compreender melhor como as redes corticais atuam para compensar a perda neuronal após a lesão medular e permitem que o movimento seja aprimorado quando os animais são submetidos ao procedimento de reabilitação.

Para Nardone e colaboradores (2015), alterações funcionais e estruturais na conectividade intra-cortical podem resultar de processos degenerativos que afetam os neurônios córtico-espinhais, como a diminuição do tamanho dos corpos das células piramidais e a degeneração de seus axônios. Este fato está de acordo com os dados encontrados para o grupo controle deste trabalho, que apresentou diminuição da densidade integrada para o marcador de neurofilamentos nos córtices motor e somatossensorial.

A partir de uma análise funcional, eletrofisiológica e neuromorfológica da circuitaria abaixo do nível de lesão, incluindo sua densidade sináptica e de filamentos, Beauparlant e colaboradores (2013)

mostraram que a interrupção das vias supraespinhais induz uma extensa conexão entre os segmentos espinhais denervados, que podem levar a formação de circuitos sensório-motores desordenados em um estágio crônico da lesão. Eles acreditam que as novas conexões estabelecidas dificultam a informação neural nos circuitos espinhais durante a execução da marcha, que leva a disfunção neuronal em ratos lesados medulares e, provavelmente, em humanos com LM que não deambulam.

Por outro lado, segundo Van Den Brand e colaboradores (2012), a ativação repetida de certas vias sensoriais e motoras a partir de uma tarefa específica (como no caso deste trabalho por meio do treinamento na esteira), pode recrutar e reforçar os circuitos e suas conexões de forma que a habilidade de desempenhar o movimento praticado seja melhorada de maneira significativa. Este fato pôde ser observado nos animais treinados, uma vez que eles melhoraram a capacidade de andar na esteira ao longo do tempo com os treinamentos, precisando de cada vez menos auxílios (dispositivo auxiliar, auxílio manual nas patas ou na cauda e cinto para suporte de peso).

Humanes-Valera *et al.* (2014) sugerem que diversos mecanismos podem contribuir para a reorganização cortical após a deafferentação, incluindo o crescimento de novas conexões devido ao brotamento axonal, “reativação” de conexões latentes devido à redução da inibição intra-cortical ou mudanças nas propriedades intrínsecas neuronais. Estes dados podem explicar o que foi encontrado nos animais do grupo treinado deste trabalho, que apresentaram um maior número de neurônios que dispararam em relação ao movimento e à manutenção da densidade óptica

integrada para o marcador de neurofilamentos nos córtices motor e somatossensorial.

Para Hajela e colaboradores (2013), duas possíveis explicações para as mudanças após a lesão medular e uma estratégia terapêutica são que as conexões supraespinhais intactas podem ser reorganizadas e/ou que novas conexões supraespinhais com redes espinhais podem ser formadas com o treino locomotor, como resultado de mecanismos dependentes da atividade desencadeados por dicas sensoriais específicas da tarefa. Essas dicas sensoriais incluem alteração de carga e posicionamento de pernas com a cinemática dos quadris, joelhos e pés sincronizados com o ciclo da marcha por meio de um padrão fisiológico pré-determinado por um sistema de exoesqueleto robótico. Da mesma forma, os treinamentos na esteira realizados pelos animais do presente trabalho também proporcionaram alterações dos estímulos sensoriais conforme os auxílios fornecidos eram mudados ao longo do tempo. A plasticidade dependente de atividade envolve tanto mudanças fisiológicas como mudanças estruturais que alteram a conectividade anatômica de neurônios.

De acordo com Graziano *et al.* (2013), o aumento da resposta neural em relação ao exercício, pode ser mediada não somente por brotamento axonal, mas também por alteração do equilíbrio dinâmico dos espinhos dendríticos e dos botões axonais entre os interneurônios e neurônios piramidais, possivelmente como um processo compensatório para manter o equilíbrio cortical fino entre inibição e excitação, ou ainda, por uma alteração de propriedades mais intrínsecas dos neurônios corticais. Humanes-Valera *et al.* (2014) afirmam ainda que parte da reorganização observada no nível cortical

pode ser reflexo de uma reorganização que ocorre em níveis subcorticais. Kokotilo e colaboradores (2009), em uma revisão sistemática sobre a reorganização e preservação do controle encefálico do comportamento motor após a LM, verificaram que existem alterações na eficiência sináptica (com aumento do diâmetro e do comprimento de dendritos) em áreas corticais, o que fornece oportunidade de novas conexões.

O uso da proteína considerada como marcador de densidade sináptica, a sinaptofisina, teve como objetivo poder verificar os fatos propostos pelos autores citados no parágrafo anterior. No entanto, neste trabalho não foram identificadas mudanças na densidade integrada da proteína de vesícula sinaptofisina em nenhuma das áreas estudadas do encéfalo entre os grupos. E também quando analisada a densidade integrada de neurofilamentos e sinaptofisina em estruturas subcorticais como o estriado e substância negra, não foram encontradas diferenças entre os grupos lesados. O exercício realizado na esteira, após a interrupção das vias sensoriais ascendentes e motoras descendentes, não se mostrou, portanto, ser uma atividade capaz de promover alterações nos processos neuronais e na eficiência sináptica em áreas relacionadas ao movimento, como o estriado e substância negra, identificadas por meio de imunohistoquímica.

Diferentemente dos nossos resultados, remodelamento neuronal e ajustes na eficiência sináptica de áreas motoras do encéfalo foram apontados no estudo de Ferreira *et al.* (2010), que aplicaram um protocolo de curta duração de atividade física na esteira em animais sem comprometimento motor. Os autores sugerem que o exercício foi capaz de induzir uma reorganização funcional dos circuitos motores, uma vez que encontraram

alterações na densidade da proteína de vesícula no estriado, na substância negra e no córtex motor após aproximadamente sete dias de exercício. No entanto, algumas dessas alterações não foram mantidas por um longo período de tempo (alguns dados mostraram retorno aos valores iniciais no 15º dia de exercício) e, além disso, as medidas de quantificação utilizadas não foram somente a densidade óptica integrada, mas também *Western Blotting* e *Real-time PCR*. Essas medidas são mais precisas para quantificar a expressão de proteínas, sendo uma área de investigação científica que deve ser explorada para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à plasticidade pós LM e uma intervenção terapêutica.

Outras ferramentas também são capazes de identificar alterações estriatais após lesão do SNC. Nishimura e colaboradores (2011) identificaram, por exemplo, um aumento da conexão funcional entre o córtex M1 e o estriado, por meio de tomografia por emissão de pósitron, durante a recuperação da destreza dos dedos de macaco com lesão medular parcial. Os autores inferem que o fortalecimento progressivo desta conexão possui um papel importante na regulação dos aspectos motivacionais relacionados ao aprendizado motor, necessária para a recuperação funcional após a LM. O fato de não terem sido encontradas alterações no estriado em relação à imunohistoquímica também pode ser devido o estriado ser uma área responsável pelo aprendizado da sequência motora e automatização do movimento (Holschneider *et al.*, 2007; Doyon *et al.*, 2009), que são comportamentos motores que ocorrem logo após a lesão medular. A análise imunohistoquímica dos animais deste estudo só foi feita após 57 dias de lesão

medular, quando, possivelmente, as alterações estriatais já estivessem adaptadas à condição motora adotada pelos animais.

Uma pesquisa mais recente realizada com quatro macacos lesados medulares mostrou que existe relação do estriado com o controle motor durante tarefa de destreza manual (Sawada *et al.*, 2015). Todavia, os autores também sugerem que o estriado, mais precisamente o núcleo *accumbens*, contribui diretamente para o desempenho motor nos estágios precoces após a LM. Uma relação entre a atividade estriatal com os aspectos motivacionais do desempenho motor também foi encontrada, uma vez que ao final do experimento, quando os animais já haviam aprendido a tarefa motora, a ativação desta área era menor. Mais uma vez, estes dados mostram que possivelmente não foi encontrada uma alteração no estriado dos animais deste estudo, pois a análise só foi feita ao término do experimento e não em uma fase precoce de aprendizado motor.

A substância negra foi outra área encefálica escolhida para se estudar neste trabalho por se tratar de uma região que está relacionada com as funções motoras, e também com aspectos cognitivos e de memória que estão envolvidos no aprendizado de uma tarefa motora (Doyon *et al.*, 2009). Porém, não foram identificadas alterações estruturais (neurofilamentos) e funcionais (sinaptofisina) por meio da imunohistoquímica na substância negra dos animais deste trabalho. Na literatura, até o momento, não há relatos de alterações nesta região após a lesão medular e um procedimento de reabilitação demonstrada imunohistoquimicamente, mas existem pesquisas que mostram efeitos benéficos da atividade física exercidos sobre a substância negra de

animais com outros tipos de lesões, tais como doença de Parkinson e Alzheimer (Lau *et al.*, 2011; Paillard *et al.*, 2015).

De acordo com Filli e Schwab (2015), apesar de ser necessário o aporte supraespinhal para executar algumas tarefas motoras específicas, a restauração do andar pode ocorrer com a total ausência de projeções supraespinhais diretas em roedores. As lesões parciais são seguidas de uma recuperação considerável de andar estereotipado de roedores adultos. Para os autores, essa recuperação motora é alcançada por meio de desvio de neurônios proprioespinais que fazem um novo caminho para os comandos supraespinhais interrompidos ao redor da lesão. Neste processo, os tratos descendentes lesionados reconectam com neurônios proprioespinais localizados acima da lesão, projetando os axônios para parte denervada da ME. Talvez essa reconexão possa estar refletida nos disparos de neurônios corticais observados nos animais controles deste trabalho.

Apesar dos animais controles terem apresentado certa recuperação motora, ela foi limitada quando comparada com os animais do grupo treinado. Dietz e Curt (2006) sugerem que a limitação da recuperação pode ser devido à habilidade limitada de restabelecimento de conexões neuronais funcionais. As alterações estruturais, encontradas por meio da imunohistoquímica na medula espinhal dos animais do grupo controle, podem nos ajudar a entender a recuperação limitada apresentada por estes animais. De maneira geral, houve diminuição de células da glia, de microglia e diminuição da arborização dendrítica acima e abaixo do nível de lesão. Além disso, observou-se uma diminuição da eficiência sináptica, representada por

menor densidade óptica integrada do marcador de vesícula sinapsina, também acima e abaixo do epicentro de lesão.

Por outro lado, o treinamento na esteira parece ter exercido um papel neuroprotetor e neuroregenerativo na medula espinhal dos animais do grupo treinado. Alterações nos diferentes segmentos da ME puderam ser identificadas com a análise imunohistoquímica. Nas porções rostral e caudal à lesão, o grupo treinado apresentou de maneira geral aumento significativo da arborização dendrítica, da eficiência sináptica, do número de células gliais e microgliais. Na porção central à lesão, os resultados encontrados para o grupo treinado foram iguais aos do grupo controle, o que mostra que o treinamento na esteira não é capaz de mudar as mudanças estruturais e funcionais no foco de lesão. Estas alterações foram diminuição significativa da arborização dendrítica, da eficiência sináptica, e aumento significativo do número de células gliais e microgliais.

A medula espinhal não é uma estrutura somente de conexão entre o cérebro e os músculos. Ela possui uma circuitaria complexa, capaz de se adaptar após a lesão, de forma a permitir ajustes das saídas motoras quando retroalimentação sensorial é fornecida (Fouad e Tetzlaff, 2012; Harkema *et al.*, 2012). A lesão por contusão afetou tanto a substância branca, como a substância cinzenta da medula espinhal dos sujeitos experimentais deste trabalho. Já está bem estabelecido na literatura que a quantidade de substância branca residual está diretamente relacionada com a melhora funcional após a LM (Basso *et al.*, 2002; Loy *et al.*, 2002; Hutchinson *et al.*, 2004; Zai e Wrathall, 2005). A formação de cavidades císticas, descrita nesses

trabalhos, também pôde ser observada na medula espinhal dos animais lesados medulares deste estudo.

Estudos anatômicos em modelos animais de LM incompleta mostram que tanto axônios intactos como danificados ao redor da lesão brotam para formar circuitos intraespinhais. De forma mais importante, esse novo brotamento tem a capacidade de reconectar com os seus alvos denervados originais. Notavelmente, o período de plasticidade anatômica é paralelo à recuperação espontânea da função que ocorre em semanas e meses após a LM. Por isso, os dados existentes sugerem que a recuperação espontânea da função em modelos animais de LM incompleta ocorre dentro de circuitos pré-existentes e recentemente formados via reorganização anatômica de axônios e suas sinapses (Rank *et al.*, 2015).

Takeoka *et al.* (2014) acreditam que o movimento repetitivo durante um treinamento reabilitativo potencializa a retroalimentação sensorial via os gânglios das raízes dorsais glutamatérgicos, que constituem a principal fonte extrínseca de entrada excitatória na medula espinhal abaixo do nível de lesão. O treinamento na esteira promove além de estímulos motores, estímulos proprioceptivos. Os neurônios sensoriais proprioceptivos inervam os fusos musculares, que transmitem por sua vez a informação para a ME sobre a contração muscular. As aferências dos fusos musculares são, portanto, importantes para o fornecimento de sinais excitatórios aos circuitos espinhais relevantes para a regulação do comportamento motor, especialmente em condições de interrupção de estímulos descendentes.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o sistema de retroalimentação parece ser estimulado por meio do treinamento na esteira, da

mesma forma proposta por Takeoka e colaboradores (2014), uma vez que aumento da densidade óptica integrada de sinapsina pôde ser observado no segmento rostral à lesão e manutenção da densidade desta proteína de vesícula sináptica foi encontrada no segmento caudal à lesão.

Por outro lado, de acordo com De Luca *et al.* (2016), axônios de motoneurônios danificados reinervam e regeneram parcialmente as suas conexões sinápticas, mas as sinapses excitatórias dos fusos musculares nunca recuperam os níveis basais mesmo quando os fusos musculares e os músculos são corretamente reinervados. Porém, segundo os autores, na ME após a LM, o circuito sináptico ativo pode mudar devido tanto por modificação na força sináptica (plasticidade funcional), como por adição de novos botões sinápticos por meio de remodelamento anatômico e brotamento de ramos axonais e dendríticos. O brotamento de fibras de sistemas não afetados e formação de circuitos colaterais com vias indiretas estão atualmente se mostrando mecanismos cruciais para promover a recuperação funcional, mesmo quando a integridade anatômica é permanentemente comprometida.

Zhang e colaboradores (2000) observaram logo após uma hora da lesão medular uma drástica redução da imunoreatividade dos processos dendríticos para *MAP2*, dentro de 3 a 4 mm de distância do epicentro de lesão tanto na direção rostral como caudal. Os dendritos residuais apresentaram uma aparência de degeneração. Os animais do grupo controle deste trabalho também apresentaram diminuição significativa da imunoreatividade para *MAP2* no segmento caudal à lesão. No entanto, diferentemente dos dados encontrados por Zhang *et al.* (2000), no segmento rostral não houve diferença da densidade óptica integrada dos marcadores de microtúbulos nos animais

lesados medulares não submetidos ao treinamento na esteira quando comparados com o grupo sham deste trabalho. Talvez essa diferença dos resultados se deva ao fato do estudo imunohistoquímico do presente estudo ter sido realizado 57 dias após a LM, e não em um curto período de tempo como dos autores mencionados. De alguma forma, a medula apresentou uma reorganização da arborização dendrítica no segmento rostral à lesão, que pode estar relacionada à recuperação espontânea dos animais controles.

Rank e colaboradores (2015) verificaram uma diminuição progressiva do número de dendritos e de seus tamanhos logo após a LM (uma a duas semanas) dos motoneurônios de ratos. Este fenômeno é rapidamente seguido por uma expansão da arborização dendrítica, que começa em 14 dias após a lesão inicial. Essa expansão parece persistir e chegar próximo aos limites normais de dendritos em 60 a 90 dias após a LM, no entanto, alterações nos padrões de arborização podem persistir em estágios mais avançados da recuperação. Em algumas formas de recuperação espontânea, o tamanho da arborização dendrítica de motoneurônios realmente aumenta, comparado com motoneurônios intactos, logo após o dano inicial (11 a 17 semanas).

Os nossos dados vão de encontro com os de Wang e colaboradores (2015) que mostraram um aumento do crescimento dendrítico após o exercício, assim como aumento da densidade sináptica em redes de motoneurônios lombares de animais lesados medulares no nível torácico. De acordo com os autores, o treinamento na esteira fornece novos focos de formação sináptica e reinervação de axônios residuais descendentes e/ou de fibras ascendentes segmentares após LM contusa. O grupo treinado na esteira mostrou inclusive um aumento da densidade óptica integrada de dendritos em

relação ao grupo sham no segmento caudal à lesão, mostrando que a atividade física exerceu um papel neuroregenerativo na medula espinhal.

Segundo Zhou e colaboradores (2014), hoje existe um consenso de que a inflamação tem efeitos benéficos e prejudiciais ao tecido. A inflamação causa atividades destrutivas como a exacerbação do dano celular e a deterioração da matrix extracelular, criando um microambiente hostil para vários tratamentos da LM. Respostas inflamatórias locais e sistêmicas não resultam somente em patogênese de eventos neurodegenerativos durante as fases agudas e crônicas da LM, mas também subsequentemente levam a morte de células da glia e neurônios, formando cicatriz glial e cavidade no parênquima espinhal (Okano *et al.*, 2003; Sinescu *et al.*, 2010). Por outro lado, estudo recente mostra que a inflamação beneficia a regeneração neuronal e recuperação funcional (Greenhalgh e David, 2014). Macrófagos ativados/microglia possuem um papel importante na limpeza de tecidos danificados e em degeneração.

Também de acordo com Zhou e colaboradores (2014), após a lesão, os macrófagos derivados de medula óssea migram para o epicentro da lesão, enquanto que a microglia se localiza nas bordas da lesão. Essas duas populações de macrófagos possuem diferentes funções. Células da microglia residentes formam um limite que parece selar a lesão e bloquear o aumento da lesão. Em contraste, os macrófagos derivados da medula óssea entram no epicentro da lesão e fagocitam as células apoptóticas e necróticas, limpando os *debris* teciduais, como os *debris* de mielina. No presente trabalho houve uma diminuição da densidade óptica integrada de células microgliais no segmento caudal à lesão para o grupo controle, que não foi observada no grupo

submetido ao treinamento na esteira. Neste sentido, o treinamento parece ter exercido um papel neuroprotetor na medula espinhal.

Além de as células da microglia serem importantes para a “limpeza” do SNC, segundo Bhatt e colaboradores (2014), elas são, cada vez mais, reconhecidas pelo papel significativo no início do desenvolvimento neural. Neste período, a microglia controla o número de neurônios e sinapses, mas o seu envolvimento com o desenvolvimento de oligodendrócitos e de mielinização não estão claros. Já foi mostrado que, em um meio de cultura, a microglia fornece grande suporte para a sobrevivência de células precursoras de oligodendrócitos e também potencializa a diferenciação destas células, assim como o processo de mielinização *in vitro* (Pang *et al.*, 2013).

Shin e colaboradores (2014) mostraram que após o treinamento na esteira, animais lesados medulares apresentaram aumento da ativação microglial na substância cinzenta próxima aos neurônios motores no corno ventral e em seus processos dendríticos, dados que corroboram os achados deste trabalho. Os autores especulam que células da microglia ativadas próximas aos neurônios motores após a LM devem participar do remodelamento das estruturas sinápticas, uma vez que o número de pontos sinápticos colocalizados com o marcador de microglia aumentou substancialmente na região motora lombar após a LM e o treinamento realizado na esteira.

No entanto, a relação entre eficiência sináptica e ativação microglial ainda não está bem descrita na literatura. Shafer e colaboradores (2012) acreditam que durante uma tarefa específica, a atividade fagocitária da microglia faz com que sinapses mais fracas sejam eliminadas, levando a uma

maior ativação de sinapses mais fortes. No segmento caudal à lesão da medula espinhal dos animais do grupo treinado foi encontrado aumento da densidade sináptica e aumento de células da microglia, resultados que podem reforçar a ideia de Shafer *et al.* (2015) de que uma atividade específica, neste caso o treinamento na esteira, pode melhorar a eficiência sináptica, por meio de ativação microglial.

Como mencionado, as células microgliais, assim como os astrócitos, respondem rapidamente à lesão, estendendo os processos celulares ou migrando em direção ao local de lesão, onde elas participam da formação da cicatriz glial. Esta resposta precoce e rápida serve como uma proteção, por formar uma parede física e molecular de isolamento de zonas de inflamação intensas e fornece uma medida de proteção ao frágil tecido residual. O bloqueio ou a prevenção de ativação microglial, tanto por via farmacológica como por meio genético, exacerba a lesão e impede a recuperação da função (Silver *et al.*, 2015).

Neste estudo notou-se um aumento da densidade óptica integrada do marcador de astrócitos para ambos os grupos lesados no foco de lesão, enquanto que no segmento caudal à lesão houve uma manutenção destas células para o grupo treinado e uma diminuição para o grupo controle quando comparados aos animais sem lesão. Noble e colaboradores (2011) afirmam que, no SNC intacto, os astrócitos são fundamentais para o fornecimento de substratos para o crescimento axonal, a regulação da arborização dendrítica, a promoção da função sináptica, a produção de diversos fatores que contribuem para sobrevivência de neurônios e oligodendrócitos, entre outros. A falta destas células gliais no segmento caudal

à lesão nos animais controles deste trabalho pode ter contribuído, portanto, para menor recuperação funcional desses animais ao longo do tempo.

Ainda no presente trabalho verificou-se aumento da marcação de astrócitos no segmento rostral à lesão nos animais do grupo treinado. De acordo com Garcia-Álvarez e colaboradores (2015), os astrócitos são possivelmente os componentes do SNC mais plásticos da cicatriz glial, capazes de mudar em número e morfologia em resposta a perturbações. Após a lesão eles se tornam reativos ou fibrosos (processo nomeado como astrogliose reativa). Evidências mostram que a cicatriz glial pode contribuir para o insucesso da regeneração axonal nos focos de lesão medular, ou podem ainda inibir a entrada de células progenitoras de oligodendrócitos no local da lesão, diminuindo as chances de remielinização (Thuret *et al.*, 2006; Rowland *et al.*, 2008; Noble *et al.*, 2011). Essas informações sugerem que o aumento das células gliais acima do foco de lesão encontrado nos animais treinados pode ser um fator negativo para regeneração, impactando na recuperação funcional de um animal lesado medular. Porém, os animais submetidos ao treinamento na esteira apresentaram melhora da função motora.

Segundo De Luca e colaboradores (2016), os astrócitos exercem um papel central na homeostase extracelular de neurotransmissores, predominantemente o glutamato. Este neurotransmissor é a principal molécula extracelular do SNC, mas em excesso ela desencadeia morte neuronal excitotóxica. O equilíbrio entre glutamato e GABA é o pilar da transmissão sináptica. No corno ventral da medula espinhal, a modulação do equilíbrio excitatório e inibitório é crucial para prevenir o viés homeostático e eventualmente a perda neuronal. O papel central exercido pelos astrócitos no

metabolismo do glutamato e na manutenção da homeostase sináptica está claramente estabelecido.

Os fatos mencionados por De Luca *et al.* (2016) são interessantes ao notarmos que no segmento rostral à lesão houve um aumento significativo da imunoreatividade para o marcador de astrócitos, quando comparados os animais lesados treinados na esteira com os animais sem lesão e com os do grupo controle, e da mesma forma, houve um aumento significativo da imunoreatividade para o marcador de vesícula sináptica para os animais treinados, indicando realmente uma possível relação entre as células da glia e a manutenção das sinapses. Desta forma, as alterações imunohisquímicas encontradas no presente trabalho indicam que o treinamento na esteira foi capaz de melhorar funcionalmente e estruturalmente as redes de células da medula espinhal, o que pode ter contribuído para promoção da recuperação funcional do animal lesado medular.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que o treinamento na esteira após lesão medular é, independentemente do exato mecanismo, suficiente para promover reorganização cortical sensório-motora e medular, por meio da neuroproteção e neuroregeneração. O exercício abaixo do nível de lesão em ratos alterou tanto as proteínas relacionadas à plasticidade no córtex sensório-motor, como promoveu reorganização mensurável eletrofisiologicamente na área cortical dos membros posteriores que foi deaferentada após a lesão medular incompleta. Além disso, o treinamento na esteira também foi capaz de promover alterações estruturais e funcionais em níveis acima e abaixo do nível de lesão na medula espinhal. Esses resultados suportam o importante papel da atividade física para o aprendizado e a plasticidade e sugerem que o exercício deve ser considerado, entre outros efeitos, como uma estratégia de reabilitação que genericamente produz plasticidade cortical e medular, revelando a interação entre corpo e encéfalo que não tem por base vias sensório-motoras intactas, que conectam partes do corpo exercitadas com o encéfalo. Com isto, pretende-se ajudar na elaboração de estratégias terapêuticas mais eficientes para indivíduos lesados medulares, levando em consideração, principalmente, a independência e qualidade de vida dos indivíduos lesionados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MM, Ginis KAM, Hicks AL. The Spinal Cord Injury Spasticity Evaluation Tool: Development and Evaluation. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88:1185-92.

Afshari FT, Kappagantula S, Fawcett JW. Extrinsic and intrinsic factors controlling axonal regeneration after spinal cord injury. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e37.

Aguilar J, Humanes-Valera D, Alonso-Calviño E, Yague JG, Moxon KA, Oliviero A, Foffani G. Spinal Cord Injury Immediately Changes the State of the Brain. *J Neurosci.* 2010;30(22):7528-37.

Ahmed Z, Wieraszko A. Combined Effects of Acrobatic Exercise and Magnetic Stimulation on the Functional Recovery after Spinal Cord Lesions. *J Neurotrauma.* 2008;25:1257-69.

Ahmed Z, Wagdy M, Benjamin M, Mohamed S, Mohamed H, Ahmed S, Kanjilal B, Wieraszko A. Therapeutic Effects of Acrobatic Exercise and Magnetic Field Exposure on Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Mice. *Bioelectromagnetics.* 2011;32(1):49-57.

Ahn SN, Guu JJ, Tobin AJ, Edgerton VR, Tillakaratne NJ. Use of c-fos to identify activity-dependent spinal neurons after stepping in intact adult rats. *Spinal Cord.* 2006;44(9):547-59.

Akkal D, Dum RP, Strick PL. Supplementary Motor Area and Presupplementary Motor Area: Targets of Basal Ganglia and Cerebellar Output. *J Neurosci.* 2007;27(40):10659-73.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. New York: Garland Publishing; 2002.

Alstermark B, Isa T, Pettersson LG, Sasaki S. The C3–C4 propriospinal system in the cat and monkey: a spinal pre-motoneuronal centre for voluntary motor control. *Acta Physiol.* 2007;189:123-40.

Bareyre FM. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 2008;265(1-2):63-72.

Barrière G., Leblond H, Provencher J, Rossignol S. Prominent role of the spinal central pattern generator in the recovery of locomotion after partial spinal cord injuries. *J Neurosci.* 2008;28(15):3976-87.

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.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Descending systems contributing to locomotor recovery after mild or moderate spinal cord injury in rats: experimental evidence and a review of literature. *Restor Neurol Neurosci*. 2002;20:189-218.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre: ArtMed;2008.

Beaumont E, Kaloustian S, Rousseau G, Cormery B. Training improves the electrophysiological properties of lumbar neurons and locomotion after thoracic spinal cord injury in rats. *Neurosci. Res*. 2008;62:147-54.

Beauparlant J, Van Den Brand R, Barraud Q, Friedli L, Musienko P, Dietz V, Courtine G. Undirected compensatory plasticity contributes to neuronal dysfunction after severe spinal cord injury. *Brain*. 2013;136(Pt 11):3347-61.

Behrman AL, Harkema SJ. Locomotor training after human spinal cord injury: a series of case studies. *Phys Ther*. 2000;80(7):688-700.

Bensmaia SJ, Miller LE. Restoring sensorimotor function through intracortical interfaces: progress and looming challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15:313-25.

Berrocal Y, Pearse DD, Singh A, Andrade CM, McBroom JS, Puentes R, Eaton MJ. Social and Environmental Enrichment Improves Sensory and Motor Recovery after Severe Contusive Spinal Cord Injury in the Rat. *J Neurotr*. 2007;24:1761-72.

Bertrand S, Cazalets JR. The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the solated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci*. 2002;16:1741-50.

Bhatt A, Fan LW, Pang Y. Strategies for myelin regeneration: lessons learned from development. *Neural Regen Res*. 2014;9(14):1347-50.

Biering-Sorensen B, Kristensen IB, Kjaer M, Biering-Sorensen F. Muscle After Spinal Cord Injury. *Mus Nerv*. 2009;40:499-519.

Bigbee AJ, Crown ED, Ferguson AR, Roy RR, Tillakaratne LJ, Grau JW, Edgerton VR. Two chronic motor training paradigms differentially influence acute instrumental learning in spinally transected rats. *Behav Brain Res*. 2007;180(1):95-101.

Birbaumer N, Cohen LG. Brain–computer interfaces: communication and restoration of movement in paralysis. *J Physiol*. 2007;579(3):621-36.

Borton D, Bonizzato M, Beauparlant J, DiGiovanna J, Mourad EM, Wenger N, Musienko P, Minev IR, Lacour SP, Millán JR, Micera S, Courtine G. Corticospinal neuroprostheses to restore locomotion after spinal cord injury. *Neurosci Res.* 2014;78:21-9.

Bostan AC, Dum RP, Strick PL. The basal ganglia communicate with the cerebellum. *PNAS.* 2010;107(18):8452-6.

Boyce VS, Mendell LM. Neurotrophins and spinal circuit function. *Front Neural Circuits.* 2014;8:59-66.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, Marshall LF, Perot PL, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC, Wilberger JE, Winn HR. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naxolone in the treatment of acute spinal-cord injury – Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med.* 1990;322(20):1405-11.

Bradbury EJ, Carter LM. Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Res Bull.* 2011;10;84(4-5):306-16.

Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(8):644-53.

Bradbury EJ. Re-wiring the spinal cord: introduction to the special issue on plasticity after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2012;235(1):1-4.

Brown A, Ricci MJ, Weaver LC. NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord. *Exp Neurol.* 2004;188:115-27.

Castro MJ, Apple DF, Staron RS, Campos GER, Dudley GA. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle within 6 mo of injury. *J Appl Physiol.* 1999;86:350-8.

Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol.* 2010;91:313-48.

Chang CM, Lee MH, Wang TC, Weng HH, Chung CY, Yang JT. Brain protection by methylprednisolone in rats with spinal cord injury. *Neuroreport.* 2009;20(10):968-72.

Chapin JK, Nicolelis MA. Neural network mechanisms of oscillatory brain states: characterization using simultaneous multi-single neuron recordings. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1996;45:113-22.

Chapin JK, Moxon KA, Markowitz RS, Nicolelis MA. Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *Nat Neurosci.* 1999;2(7):664-70.

Chau C, Barbeau H, Rossignol S. Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *J Neurophysiol.* 1998;79:392-409.

Christensen MD, Hulsebosch CE. Spinal Cord Injury and Anti-NGF Treatment Results in Changes in CGRP Density and Distribution in the Dorsal Horn in the Rat. *Exp Neurol.* 1997;147:463-75.

Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 2007;30(9):464-72.

Coumans JV, Lin TTS, Dai HN, MacArthur L, Macatee M, Nash C, Bregman BS. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci.* 2001;21:9334-44.

Courtine G, Roy RR, Raven J, Hodgson J, McKay H, Yang H, Zhong H, Tuszynski MH, Edgerton VR. Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain.* 2005;128:2338-58.

Craig M, Jackson AB, Lindsey L. Research for the Cure in Spinal Cord Injury. 2002;4(1):1-6.

Cramer SC, Orr EL, Cohen MJ, Lacourse MG. Effects of motor imagery training after chronic, complete spinal cord injury. *Exp Brain Res.* 2007;177(2):233-42.

Csuzs E, Hans VH, Ammann E, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport.* 2000;11(11):2587-90.

Darian-Smith C. Synaptic Plasticity, Neurogenesis, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Neuroscientist.* 2009;15(2):149-65.

Dasari VR, Veeravalli KK, Dinh DH. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. *World J Stem Cells.* 2014;6(2):120-33.

De Leon RD, Hodgson JA, Roy RR, Edgerton VR. Locomotor Capacity Attributable to Step Training Versus Spontaneous Recovery After Spinalization in Adult Cats. *J Neurophysiol.* 1998;79(3):1329-40.

De Luca C, Savarese L, Colangelo AM, Bianco MR, Cirillo G, Alberghina L, Papa M. Astrocytes and Microglia-Mediated Immune Response in Maladaptive Plasticity is Differently Modulated by NGF in the Ventral Horn of the Spinal Cord Following Peripheral Nerve Injury. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36(1):37-46.

Defrin R, Grunhaus L, Zamir D, Zeilig G. The effect of a series of repetitive transcranial magnetic stimulations of the motor cortex on central pain after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88(12):1574-80.

Denker M, Riehle A, Diesmann M, Grün S. Estimating the contribution of assembly activity to cortical dynamics from spike and population measures. *J Comput Neurosci*. 2010;29:599-613.

Dietz V. Body weight supported gait training: from laboratory to clinical setting. *Brain Res Bull*. 2009;78(1):I-VI.

Dietz V, Curt A. Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. *Lancet Neurol*. 2006;5:688-694.

Dietz V, Fouad K. Restoration of sensorimotor functions after spinal cord injury. *Brain*. 2014;137:654-667.

Dietz V, Harkema SJ. Locomotor activity in spinal cord-injured persons. *J Appl Physiol*. 2004;96:1954-60.

Dietz V, Muller R, Colombo G. Locomotor activity in spinal man: significance of afferent input from joint and load receptors. *Brain*. 2002;125(Pt 12):2626-34.

Dietz V. Neuronal plasticity after a human spinal cord injury: Positive and negative effects. *Exp Neurol*. 2012;235:110-5.

Dobkin BH, Apple D, Barbeau H, Basso M, Behrman A, Deforge D, Ditunno J, Dudley G, Elashoff R, Fugate L, Harkema S, Saulino M, Scott M. Methods for a randomized trial of weight-supported treadmill training versus conventional training for walking during inpatient rehabilitation after incomplete traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*. 2003;17(3):153-67.

Doyon J, Bellec P, Amsel R, Penhune V, Monchi O, Carrier J, Lehericy S, Benali H. Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. Review. *Behav Brain Res*. 2009;199(1):61-75.

Drew T, Jiang W, Widajewicz W. Contributions of the motor cortex to the control of the hindlimbs during locomotion in the cat. *Brain Res Rev*. 2002;40:178-91.

Dudley-Javoroski S, Shields RK. Muscle and bone plasticity after spinal cord injury: Review of adaptations to disuse and to electrical muscle stimulation. *J Rehabil Res Dev*. 2008;45(2):283-96.

Dupont-Versteegden EE, Murphy RJL, Houlié JD, Gurley CM, Peterson CA. Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(6):1677-84.

Duschau-Wicke A, Caprez A, Riener R. Patient-cooperative control increases active participation of individuals with SCI during robot-aided gait training. *J Neuroeng Rehab*. 2010;7:43.

Edgerton VR, Courtine G, Gerasimenko YP, Lavrov I, Ichiyama RM, Fong AJ, Cai LL, Otoshi CK, Tillakaratne NJ, Burdick JW, Roy RR. Training locomotor networks. *Brain Res Rev.* 2008;57:241-54.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000)*. *Neurochem Res.* 2000;9(10):1439-51.

Elbasiouny SM, Moroz D, Bakr MM, Mushahwar VK. Management of spasticity after spinal cord injury: current techniques and future directions. *Neurorehabil Neural Repair.* 2010; 24(1):23-33.

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;201:154-64.

Evans GJO, Cousin MA. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans.* 2005;33:1350-53.

Ferreira AFB. *Neuroplasticidade Induzida pelo Exercício: Efeitos sobre o Hipocampo e Regiões Motoras do Encéfalo de Ratos* [Tese]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Ferreira AF, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LRG. Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain. *Brain Res.* 2010;1361:31-42.

Fetz EE. Volitional control of neural activity: implications for brain–computer interfaces. *J Physiol.* 2007;579(3):571-9.

Field-Fote EC, Roach KE. Influence of a locomotor training approach on walking speed and distance in people with chronic spinal cord injury: a randomized clinical trial. *Phys Ther.* 2011;91(1):48-60.

Filli L, Schwab ME. Structural and functional reorganization of propriospinal connections promotes functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2015;10(4):509-13.

Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008;209(2):294-301.

Fogassi L, Luppino G. Motor functions of the parietal lobe. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15:626-31.

Fortun J, Hill CE, Bunge MB. Combinatorial strategies with Schwann cell transplantation to improve repair of the injured spinal cord. *Neurosci Lett.* 2009;456:124-32.

Fouad K, Pearson K. Restoring walking after spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2004;73(2):107-26.

Fouad K, Rank MM, Vavrek R, Murray KC, Sanelli L, Bennett DJ. Locomotion after spinal cord injury depends on constitutive activity in serotonin receptors. *J Neurophysiol.* 2010;104:2975-84.

Fouad K, Tse A. Adaptive changes in the injured spinal cord and their role in promoting functional recovery. *Neurol Res.* 2008;30:17-27.

Fouad K, Tetzlaff W. Rehabilitative training and plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2012;235:91-9.

Franssen EH, De Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: Their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev.* 2007;56:236-58.

García-Álvarez I, Fernández-Mayoralas A, Moreno-Lillo S, Sánchez-Sierra M, Nieto-Sampedro M, Doncel-Pérez E. Inhibition of glial proliferation, promotion of axonal growth and myelin production by synthetic glycolipid: A new approach for spinal cord injury treatment. *Restor Neurol Neurosci.* 2015;33(6):895-910.

Gardiner P, Dai Y, Heckman CJ. Effects of exercise training on alpha motoneurons. *J Appl Physiol.* 2006;101:1228-36.

Gerasimenko YP, Ichiyama RM, Lavrov IA, Courtine G, Cai L, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Epidural Spinal Cord Stimulation Plus Quipazine Administration Enable Stepping in Complete Spinal Adult Rats. *J Neurophysiol.* 2007;98(5):2525-36.

Gerrits HL, De Haan A, Hopman MT, van Der Woude LH, Jones DA, Sargeant AJ. Contractile properties of the quadriceps muscle in individuals with spinal cord injury. *Muscle Nerve.* 1999;22:1249-56.

Ghosh A, Haiss F, Sydekum E, Schneider R, Gullo M, Wyss MT, Mueggler T, Baltés C, Rudin M, Weber B, Schwab ME. Rewiring of hindlimb corticospinal neurons after spinal cord injury. *Nat Neurosci.* 2010;13:97-104.

Giangregorio L, McCartney N. Bone Loss and Muscle Atrophy in Spinal Cord Injury: Epidemiology, Fracture Prediction, and Rehabilitation Strategies. *J Spinal Cord Med.* 2006;29:489-500.

Giangregorio LM, Hicks AI, Webber CE, Phillips SM, Craven BC, Bugaresti JM, McCartney N. Body weight supported treadmill training in acute spinal cord injury: impact on muscle and bone. *Spinal Cord.* 2005;43(11):649-57.

González SL, López-Costa JJ, Labombarda F, González Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone effects on neuronal

ultrastructure and expression of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in rats with acute spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29(1):27-39.

Gomez-Pinilla F, Ying Z, Zhuang Y. Brain and Spinal Cord Interaction: Protective Effects of Exercise Prior to Spinal Cord Injury. *Plos One.* 2012;7(2):e32298.

Gorassini MA, Knash ME, Harvey PJ, Bennett DJ, Yang JF. Role of motoneurons in the generation of muscle spasms after spinal cord injury. *Brain.* 2004;127:2247-58.

Gorgey AS, Chiodo AE, Zemper ED, Hornyak JE, Rodriguez GM, Gater DR. Relationship of Spasticity to Soft Tissue Body Composition and the Metabolic Profile in Persons With Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury. *J Spinal Cord Med.* 2010;33(1):6-15.

Gorrie CA, Hayward I, Cameron N, Kailainathan G, Nandapalan N, Sutharsan R, Wang J, Mackay-Sim A, Waite PME. Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury. *Brain Res.* 2010;1337:8-20.

Gourab K, Schmit BD. Changes in movement-related beta-band EEG signals in human spinal cord injury. *Clin Neurophysiol.* 2010;121(12):2017-23.

Graziano A, Foffani G, Knudsen EB, Shumsky J, Moxon KA. Passive Exercise of the Hind Limbs after Complete Thoracic Transection of the Spinal Cord Promotes Cortical Reorganization *PLoS ONE.* 2013;8(1):e54350.

Greenhalgh AD, David S. Differences in the phagocytic response of microglia and peripheral macrophages after spinal cord injury and its effects on cell death. *J Neurosci.* 2014;34:6316-22.

Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci.* 2009;29:12764-7.

Grillner S. Biological Pattern Generation: The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron.* 2006;52(7):751-66.

Grillner S, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström MA. Mechanisms for selection of basic motor programs – roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci.* 2005;28(7):364-70.

Grillner S. Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol Rev.* 1975;55:247-304.

Grossman RG, Frankowski RF, Bureau KD, Toups EG, Crommet JW, Johnson MM, Fehlings MG, Tator CH, Shaffrey SI, Harkema SJ, Hodes JE, Aarabi B, Rosner MK, Guest JD, Harrop JS. Incidence and severity of acute

complications after spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2012;17(1 Suppl):119-28.

Grumbles RM, Sesodia S, Wood PM, Thomas CK. Neurotrophic Factors Improve Motoneuron Survival and Function of Muscle Reinnervated by Embryonic Neurons. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(7):736-46.

Gustin SM, Wrigley PJ, Gandevia SC, Middleton JW, Henderson LA, Siddall PJ. Movement imagery increases pain in people with neuropathic pain following complete thoracic spinal cord injury. *Pain*. 2008;137(2):237-44.

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. EUA:Elsevier Saunders; 2006.

Gwak YS, Hulsebosch CE..Remote Astrocytic and Microglial Activation Modulate Neuronal Hyperexcitability and Below-Level Neuropathic Pain after Spinal Injury in Rat. *Neurosci*. 2009;161(3):895-903.

Gwak YS, Tan HY, Nam TS, Paik KS, Hulsebosch CE, Leem JW. Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(7):1111-24.

Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2006;19:4308-17.

Hajela N, Mummidisetty CK, Smith AC, Knikou M. Corticospinal Reorganization after Locomotor Training in a Person with Motor Incomplete Paraplegia. *Biomed Res Int*. 2013;2013:e516427.

Harkema SJ, Hillyer J, Schmidt-Read M, Ardolino E, Sisto SA, Behrman AL. Locomotor training: as a treatment of spinal cord injury and in the progression of neurologic rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil*. 2012;93:1588-97.

Harkema SJ, Plasticity of interneuronal networks of the functionally isolated human spinal cord. *Brain Res Rev*. 2008;57(1):255-64.

Herbert D, Tran Y, Craig A, Boord P. Altered Brain Wave Activity in Persons with Chronic Spinal Cord Injury. *Intern J Neurosci*. 2007;117:1731-46.

Herrera JJ, Haywood-Watson RJ, Grill RJ. Acute and chronic deficits in the urinary bladder following spinal contusion injury in the adult rat. *J Neurotrauma*. 2010;27(2):423-31.

Hodgson JÁ, Roy RR, De Leon RD, Dobkin B, Edgerton VR. Can the mammalian lumbar spinal cord learn a motor task? *Med Sci Sports Exerc*. 1994;26(12):1491-97.

Holschneider DP, Yang J, Guo Y, Maarek JM. Reorganization of functional brain maps after exercise training: importance of cerebellar-thalamic-cortical pathway. *Brain Res.* 2007;1184:96-107.

Hoover JE, Strick PL. The Organization of Cerebellar and Basal Ganglia Outputs to Primary Motor Cortex as Revealed by Retrograde Transneuronal Transport of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Neurosci.* 1999;19(4):1446-63.

Hoshi E, Tremblay L, Féger J, Carras PL, Strick PL. The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat Neurosci.* 2005;8:1491-93.

Hu R, Zhou J, Luo C, Lin J, Wang X, Li X, Bian X, Li Y, Wan Q, Yu Y, Feng H. Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. *J Neurosurg Spine.* 2010;13:169-80.

Hubli M, Dietz V. The physiological basis of neurorehabilitation - locomotor training after spinal cord injury. *J of NeuroEng and Rehab.* 2013;10:5-13.

Hulsebosch CE. Recent Advances in Pathophysiology and Treatment of Spinal Cord Injury. *Adv Physiol Educ.* 2002;26:238-55.

Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):202-13.

Humanes-Valera D, Aguilar J, Foffani G. Reorganization of the Intact Somatosensory Cortex Immediately after Spinal Cord Injury. *Plos One* 2013;8(7):e69655.

Humanes-Valera D, Foffani G, Aguilar J. Increased cortical responses to forepaw stimuli immediately after peripheral deafferentation of hindpaw inputs. *Sci Rep.* 2014;2(4):7278-83.

Hutchinson KJ, Pinilla FG, Crowe MJ, Ying Z, Basso M. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain.* 2004;127(6):1403-14.

Iannotti C, Zhang YP, Shields CB, Han Y, Burke DA, Xu XM. A neuroprotective role of glial cell line-derived neurotrophic factor following moderate spinal cord contusion injury. *Exp Neurol.* 2004;189:317-332.

Ichiyama RM, Broman J, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Havton LA. Locomotor training maintains normal inhibitory influence on both alpha- and gamma-motoneurons after neonatal spinal cord transection. *J Neurosci.* 2011;31(1):26-33.

Ilha J, da Cunha NB, Jaeger M, de Souza DF, Nascimento PS, Marcuzzo S, Figueiró M, Gottfried C, Achaval M. Treadmill step training-induced adaptive

muscular plasticity in a chronic paraplegia model. *Neurosci Lett*. 2011;492(3):170-74.

Jain N, Kenneth CC, Kaas JH. Deactivation and reactivation of somatosensory cortex after dorsal spinal cord injury. *Nature*. 1997;386:495-8.

Jang JY, Lee SH, Kim M, Ryu JS. Characteristics of neuropathic pain in patients with spinal cord injury. *Ann Rehabil Med*. 2014;38(3):327-34.

Jayaraman A, Shah P, Gregory C, Bowden M, Stevens J, Bishop M, Walter G, Behrman, Vandenboorne K. Locomotor Training and Muscle Function After Incomplete Spinal Cord Injury: Case Series. *J Spinal Cord Med*. 2008;31(2):185-93.

Kaas JH, Qi HX, Burish MJ, Gharbawie OA, Onifer SM, Massey JM. Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord. *Exp Neurol*. 2008;209:407-16.

Kambi N, Halder P, Rajan R, Arora V, Chand P, Arora M, Jain N. Large-scale reorganization of the somatosensory cortex following spinal cord injuries is due to brainstem plasticity. *Nat Commun*. 2014;5:3602-12.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science* EUA:McGrow-Hill; 2000.

Kao T, Shumsky JS, Murray M, Moxon KA. Exercise induces cortical plasticity after neonatal spinal cord injury in the rat. *J Neurosci*. 2009;29(23):7549-57.

Kim BG, Dai HN, Mcatee M, Vicini S, Bregman BS. Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2006;198:401-15.

Kim S, Putrino D, Ghosh S, Brown EN. A granger causality measure for point process models of ensemble neural spiking activity. *Plos Comput Biol*. 2011;7(3):e1001110.

Kipke DR, Shain W, Buzsák G, Fetze E, Henderson JM, Hetke JF, Schalk G. Advanced Neurotechnologies for Chronic Neural Interfaces: New Horizons and Clinical Opportunities. *J Neurosci*. 2008; 28(46):11830-8.

Kleim JA, Cooper NR, VandenBerg PM. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res*. 2002;934:1-6 (a).

Kleim JA, Barbay S, Cooper NR, Hogg TM, Reidel CN, Remple MS, Nudo RJ. Motor Learning-Dependent Synaptogenesis Is Localized to Functionally Reorganized Motor Cortex. *Neurobiol Learn Mem*. 2002;77:63-77 (b).

Kleim JA, Barbay S, Nudo RJ. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol.* 1998;80(6):3321-5.

Kleim JA, Hogg TM, Vandenberg PM, Cooper NR, Bruneau R, Rempel M. Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning. *J Neurosci.* 2004;24(3):628-33.

Kokotilo KJ, Eng JJ, Curt A. Reorganization and preservation of motor control of the brain in spinal cord injury: a systematic review. *J Neurotrauma.* 2009;26(11):2113-26.

Kuzhandaivel A, Nistri A, Mazzone GL, Mladinic M. Molecular Mechanisms Underlying Cell Death in Spinal Networks in Relation to Locomotor Activity After Acute Injury in vitro. *Front Cell Neurosci.* 2011;5:9.

Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2005;83(3):206-216.

Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci.* 2011;33(7):1264-74.

Lawhern V, Wu W, Hatsopoulos NG, Paninski L. Population Decoding of Motor Cortical Activity using a Generalized Linear Model with Hidden States. *J Neurosci Methods.* 2010;189(2):267-80.

Lebedev MA, Tate AJ, Hanson TL, Li Z, O'Doherty JE, Winans JA, Ifft PJ, Zhuang KZ, Fitzsimmons NA, Schwarz DA, Fuller AM, An JH, Nicolelis MAL. Future developments in brain-machine interface research. *Clinics* 2011;66(S1):25-32.

Lee C, Won D, Cantoria MJ, Hamlin M, De Leon RD. Robotic assistance that encourages the generation of stepping rather than fully assisting movements is best for learning to step in spinally contused rats. *J Neurophysiol.* 2011;105(6):2764-71.

Leech KA, Kinnaird CR, Hornby TG. Effects of serotonergic medications on locomotor performance in humans with incomplete spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2014;31(15):1334-42.

Lemon RN. Descending Pathways in Motor Control. *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:195-218.

Lemon RN, Griffiths J. Comparing the Function of the Corticospinal System in Different Species: Organizational Differences for Motor Specialization? *Muscle Nerve.* 2005;32:261-79.

Lim PAC, Tow AM. Recovery and Regeneration after Spinal Cord Injury: A Review and Summary of Recent Literature. *Ann Acad Med Singapore*. 2007;36:49-57.

Lin CL, Heron P, Hamann SR, Smith GM. Functional distinction between NGF-mediated plasticity and regeneration of nociceptive axons within the spinal cord. *Neuroscience*. 2014;272:76-87.

Liu Q, Xie F, Siedlak SL, Nunomura A, Honda K, Moreira PI, Zhua X, Smith MA, Perry G. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:3057-75.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co.; 2000.

López-Larraz E, Montesano L, Gil-Agudo Á, Minguez J, Oliviero A. Evolution of EEG Motor Rhythms after Spinal Cord Injury: A Longitudinal Study. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0131759.

Losey P, Young C, Krimholtz E, Bordet R, Anthony DC. The role of hemorrhage following spinal-cord injury. *Brain Res*. 2014;1569:9-18.

Lotze M, Laubis-Herrmann U, Topka H. Combination of TMS and fMRI reveals a specific pattern of reorganization in M1 in patients after complete spinal cord injury. *Rest Neurol Neurosci*. 2006;24:97-107.

Loy DN, Magnuson DSK, Zhang YP, Onifer SM, Mills MD, Cao Q, Darnall JB, Fajardo LC, Burke DA, Whittermore SR. Functional Redundancy of Ventral Spinal Locomotor Pathways. *J Neurosci*. 2002;22(1):315-23.

Lu P, Blesch A, Graham L, Wang Y, Samara R, Banos K, Haringer V, Havton L, Weishaupt N, Bennett D, Fouad K, Tuszynski MH. Motor axonal regeneration after partial and complete spinal cord transection. *J Neurosci*. 2012;32(24):8208-18.

Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2005;191:344-60.

Lundy-Ekman L. *Neurociência: Fundamentos para Reabilitação*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

Luppino G, Rizzolatti G. The Organization of the Frontal Motor Cortex. *News Physiol Sci*. 2000;15:219-24.

Lyalka VF, Zelenin PV, Karayannidou A, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG. Impairment and Recovery of Postural Control in Rabbits With Spinal Cord Lesions. *J Neurophysiol*. 2005;94:3677-90.

Mackay WA. *Wheels of Motion: Oscillatory Potentials in the Motor Cortex*. In Riehle A, Vaadia E. *Motor Cortex in Voluntary Movements*. EUA:CRC Press; 2005.

Magnuson DS, Smith RR, Brown EH, Enzmann G, Angeli C, Quesada PM, Burke D. Swimming as a model of task-specific locomotor retraining after spinal cord injury in the rat. *Neurorehabil Neural Repair*. 2009;23(6):535-45.

Mangold S, Keller T, Curt A, Dietz V. Transcutaneous functional electrical stimulation for grasping in subjects with cervical spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2005;43:1-13.

Marsh BC, Astill SL, Utley A, Ichiyama RM. Movement rehabilitation after spinal cord injuries: emerging concepts and future directions. *Brain Res Bull*. 2011 10;84(4-5):327-336.

Martin JH. *Neuroanatomy Text and Atlas*. EUA:McGraw-Hill; 2003.

Martinez M, Brezun JM, Zennou-Azogui Y, Baril N, Xerri C. Sensorimotor training promotes functional recovery and somatosensory cortical map reactivation following cervical spinal cord injury. *Eur J Neurosci*. 2009;30(12):2356-67.

Martinez M, Delcour M, Russier M, Zennou-Azogui Y, Xerri C, Coq JO, Brezun JM. Differential tactile and motor recovery and cortical map alteration after C4–C5 spinal hemisection. *Exp Neurol*. 2010;221:186-97.

Masini M. Estimativa da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. *J Bras Neurocirurg*. 2001;12(2):97-100.

McDonald JW. Repairing the damaged spinal cord. *Sci Am*. 1999;281(3):64-73.

McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet*. 2002;359:417-25.

McFarland DJ, Wolpaw JR. Brain-Computer Interfaces for Communication and Control. *Commun ACM*. 2011;54(5):60-6.

M'Dahoma S, Bourgoïn S, Kayser V, Barthélémy S, Chevarin C, Chali F, Orsal D, Hamon M. Spinal cord transection-induced allodynia in rats – behavioral, physiopathological and pharmacological characterization. *Plos One*. 2014;9(7):e102027.

Mikolajewska E, Mikolajewski D. Neuroprostheses for increasing disabled patients' mobility and control. *Adv Clin Exp Med*. 2012;21(2):263-72.

Miranda, TAB. *Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora* [Dissertação]. São Paulo (Brasil): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

Mitra PP, Bokil H. *Electrophysiology: Microelectrode Recordings in Observed Brain Dynamics*. EUA:Oxford University Press; 2008.

Molnár Z, Cheung AF. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res*. 2006;55(2):105-15.

Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(6):427-37.

Moritz CT, Perlmutter SI, Fetz EE. Direct control of paralysed muscles by cortical neurons. *Nature*. 2008;456(7222):639-42.

Moxon KA, Oliviero A, Aguilar J, Foffani G. Cortical reorganization after spinal cord injury: Always for good? *Neurosci*. 2014;283:78-94.

Muir GD, Whishaw IQ. Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behav Brain Res*. 1999;103:45-53.

Murakami Y, Furukawa S, Nitta A, Furukawa Y. Accumulation of nerve growth factor protein at both rostral and caudal stumps in the transected rat spinal cord. *J Neurol Sci*. 2002;198:63-9.

Murray KC, Nakae A., Stephens MJ, Rank M, D'Amico J, Harvey PJ, Li X, Harris RL, Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ, Fouad K. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors. *Nat Med*. 2010;16:694-700.

Musienko P, Heutschi J, Friedli L, Van Den Brand R, Courtine G. Multi-system neurorehabilitative strategies to restore motor functions following severe spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2012;235(1):100-9.

Nardone R, Iler Y, Brigo F, Orioli A, Tezzon F, Schwenker K, Christova M, Golaszewski S, Trinka E. Descending motor pathways and cortical physiology after spinal cord injury assessed by transcranial magnetic stimulation: a systematic review. *Brain Res*. 2015;1619:139-54.

Nardone R, Trinka E. Reorganization of spinal neural circuitry and functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2015;10(2):201-2.

National Spinal Cord Injury Database. Facts and Figures at a Glance. National Spinal Cord Injury Statistical Center, Birmingham, Alabama, jun., 2014. Disponível em: <https://www.nscisc.uab.edu/PublicDocuments/fact_figures_docs/Facts%202013.pdf> Acesso em: 17 mai. 2014.

Nicolelis MA, Chapin JK. Controlling robots with the mind. *Sci Am*. 2002;287(4):46-53.

Nicolelis MA, Lin C-S, Woodward DJ, Chapin JK. Distributed processing of somatic information by networks of thalamic cells induces time-dependent shifts of their receptive fields. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:2212-6.

Nicolelis MA, Baccala LA, Lin RC, Chapin JK. Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system. *Science*. 1995;268(5215):1353-8.

Nicolelis MA, Lin RCS, Chapin JK. Neonatal whisker removal reduces the discrimination of tactile stimuli by thalamic ensembles in adult rats. *J Neurophysiol*. 1997;78(3):1691-706(b).

Nishikawa K, Maciver MB. Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *J Neurosci*. 2000;20(16):5915-23.

Nishimura Y, Onoe H, Onoe K, Morichika Y, Tsukada H, Isa T. Neural substrates for the motivational regulation of motor recovery after spinal-cord injury. *Plos One*. 2011;6(9):e24854.

Noble M, Davies JE, Mayer-Pröschel M, Pröschel C, Davies SJ. Precursor cell biology and the development of astrocyte transplantation therapies: lessons from spinal cord injury. *Neurotherap*. 2011;8(4):677-93.

Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharm*. 2015;96:29-41.

Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma*. 2004;21(4):429-40.

Norrie BA, Nevett-Duchcherer JM, Gorassini MA. Reduced Functional Recovery by Delaying Motor Training After Spinal Cord Injury. *J Neurophysiol*. 2005;94:255-64.

Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama Y. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Dev Biol*. 2003;14:191-8.

Oudega M, Bradbury EJ, Ramer MS. Combination therapies. *Hand Clin Neurol*. 2012;109:617-36.

Oza CS, Giszter SF. Plasticity and alterations of trunk motor cortex following spinal cord injury and non-stepping robot and treadmill training. *Exp Neurol*. 2014;256:57-69.

Paillard T, Rolland Y, de Souto Barreto P. Protective effects of physical exercise in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a narrative review. *J Clin Neurol*. 2015;11(3):212-9.

Pang Y, Fan LW, Tien LT, Dai X, Zheng B, Cai Z, Lin RC, Bhatt A. Differential roles of astrocyte and microglia in supporting oligodendrocyte development and myelination in vitro. *Brain Behav.* 2013;3:503-14

Pavlidis C, Miyashita E, Asanuma H. Projection from the sensory to the motor cortex is important in learning motor skills in the monkey. *J Neurophysiol.* 1993;70(2):733-41.

Paxinos G. *The Rat Nervous System.* EUA:Elsevier Academic Press; 2004.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* EUA:Elsevier Academic Press; 2007.

Pearce, JMS. Brodmann's cortical maps. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76(2):259.

Penfield W, Boldrey E. Somatic Motor and Sensory Representation in the Cerebral Cortex of Man as Studied by Electrical Stimulation. *Brain.* 1937;60(4):389-443.

Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM, Couto PA, Filipe VM, Magalhães LG, Fornaro M, Scipio FD, Geuna S, Maurício AC, Varejão ASP. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2009;220:71-81.

Peruzzotti-Jametti L, Donegá M, Giusto E, Mallucci G, Marchetti B, Plunichino S. The role of the immune system in central nervous system plasticity after acute injury. *Neurosci.* 2014;283:210-21.

Petruska JC, Ichiyama RM, Jindrich DL, Crown ED, Tansey KE, Roy RR, Edgerton VR, Mendell LM. Changes in motoneuron properties and synaptic inputs related to step training after spinal cord transection in rats. *J Neurosci.* 2007;27(16):4460-71.

Pfurtscheller G, Neuper C, Birbaumer N. *Human brain-computer interface (BCI).* In *Motor Cortex in Voluntary Movements. A Distributed System for Distributed Functions,* Riehle A, Vaadia E. CRC Press; 2005.

Popovich P, McTigue D. Beware the immune system in spinal cord injury. *Nat Med.* 2009;15(7):736-7

Putrino D, Brown EN, Mastaglia FL, Ghosh S. Differential involvement of excitatory and inhibitory neurons of cat motor cortex in coincident spike activity related to behavioral context. *J Neurosci.* 2010;30(23):8048-56.

Qi HX, Jaina N, Collins CE, Lyon DC, Kaas JH. Functional organization of motor cortex of adult macaque monkeys is altered by sensory loss in infancy. *PNAS.* 2010;107(7):3192-7.

Qin DX, Zou XL, Luo W, Zhang W, Zhang HT, Li XL, Zhang H, Wang XY, Wang TH. Expression of some neurotrophins in the spinal motoneurons after cord hemisection in adult rats. *Neurosci Lett*. 2006;410:222-7.

Rank NM, Flynn JR, Galea MP, Callister R, Callister RJ. Electrophysiological characterization of spontaneous recovery in deep dorsal horn interneurons after incomplete spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2015;271:468-78.

Rathelot JA, Strick PL. Muscle representation in the macaque motor cortex: An anatomical perspective. *PNAS*. 2006;103(21):8257-62.

Riegger T, Conrad S, Liu K, Schluesener HJ, Adibzadeh M, Schwab JM. Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS). *Eur J Neurosci*. 2007;25(6):1743-7.

Riegger T, Conrad S, Schluesener HJ, Kaps HP, Badke A, Baron C, Gerstein J, Dietz K, Abdizadeh M, Schwab JM. Immune Depression Syndrome Following Human Spinal Cord Injury (SCI): a pilot study. *Neuroscience*. 2009;158(3):1194-9.

Rigosa J, Panarese A, Dominici A, Friedli L, van den Brand R, Carpaneto J, DiGiovanna J, Courtine G, Micera S. Decoding bipedal locomotion from the rat sensorimotor cortex. *J Neural Eng*. 2015;12(5):056014.

Rossignol S. Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/or peripheral lesions in the adult mammals. *Phil Trans R Soc*. 2006;361:1647-71.

Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*. 2008;25(5):E2.

Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2012;235(1):78-90.

Sainburg RL, Ghilardi MF, Poizner H, Ghez C. Control of limb dynamics in normal subjects and patients without proprioception. *J Neurophysiol*. 1995;73:820-35.

Sakai ST, Istepniewska I, Qi HX, Kaas JH. Pallidal and Cerebellar Afferents to Pre- Supplementary Motor Area Thalamocortical Neurons in the Owl Monkey: A Multiple Labeling Study. *J Comp Neurol*. 2000;417:164-80.

Sameshima K, Baccala LA. Using partial directed coherence to describe neuronal ensemble interactions. *J Neurosci Methods*. 1999;94(1):93-103.

Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol*. 2000;61(2):133-68.

- Sarikcioglu L, Ozsoy U. Bror Rexed (1914–2002). *J Neurol.* 2008;255:1988-9.
- Sauseng P, Klimesch W. What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(5):1001-13.
- Sawada M, Kato K, Kunieda T, Mikuni N, Miyamoto S, Onoe H, Isa T, Nishimura Y. Function of the nucleus accumbens in motor control during recovery after spinal cord injury. *Science.* 2015;350:98-101.
- Scanziani M, Häusser M. Electrophysiology in the age of light. *Nature.* 2009;461:930-9.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron.* 2012;74(4):691-705.
- Shi Q, Gao W, Han X, Zhu X, Sun J, Xie F, Yang, Dai J, Chen L. Collagen scaffolds modified with collagen-binding bFGF promotes the neural regeneration in a rat hemisection spinal cord injury model. *Sci China Life Sci.* 2014;57(2):232-40.
- Shin HC, Chapin JK. Movement induced modulation of afferent transmission to single neurons in the ventroposterior thalamus and somatosensory cortex in rat. *Exp Brain Res.* 1990;81(3):515-22.
- Shin HY, Kim H, Kwon MJ, Hwang DH, Lee K, Kim G. Molecular and Cellular Changes in the Lumbar Spinal Cord following Thoracic Injury: Regulation by Treadmill Locomotor Training. *Plos One.* 2014;9(2):e88215.
- Sinescu C, Popa F, Grigorean VT, Onose G, Sandu AM, Popescu M, Burnei G, Strambu V, Popa C. Molecular basis of vascular events following spinal cord injury. *J Med Life.* 2010;3:254-61.
- Silver J, Schwab ME, Popovich PG. Central Nervous System Regenerative Failure: Role of Oligodendrocytes, Astrocytes, and Microglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7:a020602.
- Smith RR, Brown EH, Shum-Siu A, Whelan A, Burke DA, Benton RL, Magnuson DSK. Swim Training Initiated Acutely after Spinal Cord Injury Is Ineffective and Induces Extravasation In and Around the Epicenter. *J Neurotrauma.* 2009;26:1017-27.
- Smillie KJ, Evans GJ, Cousin MA. Developmental change in the calcium sensor for synaptic vesicle endocytosis in central nerve terminals. *J Neurochem.* 2005;94(2):452-8.

Song XY, Fang Li F, Zhang FH, Zhong JH, Zhou XF. Peripherally-Derived BDNF Promotes Regeneration of Ascending Sensory Neurons after Spinal Cord Injury. *Plos One*. 2008;3(3):e1707.

Stamoulis C, Richardson AG. Encoding of brain state changes in local field potentials modulated by motor behaviors. *J Comput Neurosci*. 2010;29(3):475-83.

Stark E, Drori R, Abeles M. Motor cortical activity related to movement kinematics exhibits local spatial organization. *Cortex*. 2008;45(3):1-14.

Takami T, Oudega M, Bethea JR, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone and Interleukin-10 Reduce Gray Matter Damage in the Contused Fischer Rat Thoracic Spinal Cord but Do Not Improve Functional Outcome. *J Neurotrauma*. 2002;19(5):653-66.

Takeoka A, Vollenweider I, Courtine G, Arber S. Muscle Spindle Feedback Directs Locomotor Recovery and Circuit Reorganization after Spinal Cord Injury. *Cell*. 2014;159:1626-39.

Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(8):628-43.

Tohda C, Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol Ther*. 2011;132(1):57-71.

Trindade MJ. Magnetoencephalography - clinical applications. *Acta Med Port*. 2004;17(3):231-40.

Turner JA, Lee JS, Martinez O, Medlin AL, Schandler SL, Cohen MJ. Somatotopy of the motor cortex after long-term spinal cord injury or amputation. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2001;9(2):154-60.

Van Den Brand R, Heutschi J, Barraud Q, DiGiovanna J, Bartholdi K, Huerlimann M, Friedli L, Vollenweider I, Moraud EM, Duis S, Dominici N, Micera S, Musienko P, Courtine G. Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. *Science*. 2012;336(6085):1182-5.

Vaynman SS, Gomez-Pinilla F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehab Neural Repair*. 2005;19(4):283-95.

Vaynman SS, Ying Z, Yin D, Gomez-Pinilla F. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res*. 2006;1070(1):124-30.

Vodušek DB. Lower urinary tract and sexual dysfunction in neurological patients. *Eur Neurol*. 2014;72(1-2):109-15.

Wang H, Liu NK, Zhang YP, Deng L, Lu QB, Shields CB, Walker MJ, Li J, Xu XM. Treadmill training induced lumbar motoneuron dendritic plasticity and behavior recovery in adult rats after a thoracic contusive spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2015;271:368-78.

Ward RE, Huang W, Kostusiak M, Pallier PN, Michael-Titus AT, Priestley JV. A characterization of white matter pathology following spinal cord compression injury in the rat. *Neuroscience*. 2014;260:227-39.

Wilkinson I, Lennox G. *Essential Neurology*. EUA:Blackwell Publishing Ltd; 2005.

Winter B, Pattani H. Spinal Cord Injury. *Anaest and Int Care Med*. 2011;12(9):403-5.

Winchester P, McColl R, Querry R, Foreman N, Mosby J, Tansey K, Williamson J. Changes in supraspinal activation patterns following robotic locomotor therapy in motor-incomplete spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*. 2005;19(4):313-24.

Wise SP, Boussaoud D, Johnson PB, Caminiti R. Premotor and Parietal Cortex: Corticocortical Connectivity and Combinatorial Computations. *Annu Rev Neurosci*. 1997;20:25-42.

Wolpaw JR. Brain-computer interfaces as new brain output pathways. *J Physiol*. 2007;579(Pt 3):613-9.

Wolpert DM, Ghahramani Z, Flanagan JR. Perspectives and problems in motor learning. *Trends Cogn Sci*. 2001;5(11):487-94.

Yague JG, Foffani G, Aguilar J. Cortical hyperexcitability in response to preserved spinothalamic inputs immediately after spinal cord hemisection. *Exp Neurol*. 2011;277:252-63.

Yang Z, Wang KWW. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosci*. 2015;38(6):364-74.

Yeziarski RP. Spinal Cord Injury: A Model of Central Neuropathic Pain. *Neurosignals*. 2005;14:182-93.

Yin HH. The sensorimotor striatum is necessary for serial order learning. *J Neurosci*. 2010;30(44):14719-23.

Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Gómez-Pinilla F. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2005;193(2):411-9.

Zai LJ, Wrathall JR. Cell Proliferation and Replacement Following Contusive Spinal Cord Injury. *Glia*. 2005;50:247-57.

Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Wu YP, Chen WS. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Indian J Med Res*. 2012;135:287-96.

Zhang SX, Underwood M, Landfield A, Huang FF, Gison S, Geddes JW. Cytoskeletal disruption following contusion injury to the rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(4):287-96.

Zhou L, Shine HD. Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 2003;74(2):221-6.

Zhou X, He X, Ren Y. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2014;9(20):1787–95.

Zilles K, Amunts K. Centenary of Brodmann's map - conception and fate. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11:139-45.

Apêndice A - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



APROVAÇÃO

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 18.04.2012, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº 025/12 intitulado: "Reorganização cortical sensório-motora induzida pela atividade física realizada na esteira por ratos lesados medulares" que utilizará 21 animais da espécie Ratos Wistar, apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Alexandre Fogaça Cristante

Pesquisador (a) Executante: Taisa Amoroso Bortolato Miranda

CEP-FMUSP, 18 de abril de 2012.

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

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa