Rebeca Boltes Cecatto

Avaliação clínico-experimental dos efeitos da estimulação neuronal na resposta funcional, na neuroproteção e na neuroplasticidade após isquemia cerebral. Estudo da FES em pacientes portadores de sequela de AVE em modelo experimental em ratos

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

Programa de: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cecatto, Rebeca Boltes

Avaliação clínico-experimental dos efeitos da estimulação neuronal na resposta funcional, na neuroproteção e na neuroplasticidade após isquemia cerebral. Estudo da FES em pacientes portadores de sequela de AVE em modelo experimental em ratos / Rebeca Boltes Cecatto. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Gerson Chadi.

Descritores: 1.Acidente vascular encefálico 2.Reabilitação 3.Terapia por estimulação elétrica 4.Platicidade neuronal

USP/FM/DBD-073/11

Dedicatória

Aos pacientes queridos. Fonte maior de amor e compaixão. Com quem verdadeiramente aprendi a doçura, a ética, o desapego, a cumplicidade, a confiança, o comprometimento e a humildade. Sem vocês, esta tese não existiria.

Aos futuros alunos. Que de algum modo eu possa auxiliá-los a encontrar o caminho e, quem sabe, inspirá-los.

Aos meus avós Emílio, Margarida, Tereza e Jordão. De quem herdei tudo o que sou.

Agradecimentos

A esta Faculdade por todos os ensinamentos e por ser a minha fonte de vida.

Agradeço imensamente a Prof Dra Linamara Rizzo Battistella com quem pude contar nas horas mais difíceis. Pelo seu exemplo de força, vitalidade, coragem, visão, audácia, brilhantismo, sabedoria e justiça. Agradeço ainda às inúmeras oportunidades recebidas. Espero poder honrá-las como devo.

Ao Prof Ricardo Nitrini, por me acolher no Departamento de Neurologia.

Ao Prof Dr Gerson Chadi, pela oportunidade e confiança. Por manter o laboratório sempre aberto.

Ao Prof Dr Wilson Jacob Filho, por ter sido o primeiro professor. Aquele que plantou a semente do amor pela medicina, pelos pacientes e pelos alunos.

À Prof Dra. Julia Maria D Andrea Greve, por ter me apresentado o mundo novo da reabilitação.

À Dra Satiko Tomikawa, pela sabedoria infindável. Exemplo de altivez, experiência e competência.

Ao Prof. Dr. Milton de Arruda Martins, Prof. Dr Paulo Saldiva, Prof Dr. Cesar Timo-Iaria e todos os outros ilustres professores desta Casa de Arnaldo. Por serem exemplos de vida e inspiração eterna.

Aos membros da Banca de Qualificação desta tese, Dr Mario Augusto Taricco, Dra Lin Tchia Yeng e Maria Inês Lourenção pelas sugestões para o engrandecimento deste trabalho e pelas palavras de apoio e carinho.

A Cristiane Isabela de Almeida do Hospital Israelita Albert Einstein, por viabilizar o meu tempo e a minha rotina para esta tese.

À Prof Dra Sonia Jancar, pelo apoio precioso.

Aos meus colegas do Instituto de Medicina Física e Reabilitação, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e do Hospital Israelita Albert Einstein, pelo convívio e pelo compartilhamento.

A Thais, secretária da pós, e a todos os funcionários do departamento de neurologia por toda a paciência e ajuda.

Aos amigos do LIM 45, Sara, Florence, Camila, Beatriz, Bianca, André e Jessica por toda a colaboração.

Aos alunos Leonardo Bianqui e Bruno Zanon, por terem transformado os momentos difíceis em alegria.

Um agradecimento especial aos amigos Daniel Rubio, Christina Moran e Paula Ricci, por todos estes anos de amizade fiel e apoio a este trabalho. Sem vocês, a minha vida seria muito mais difícil.

Aos animais que emprestaram seus corpos para a realização de meus experimentos, meu mais profundo agradecimento e reverência.

Aos meus sogros Elson e Myriam por serem hoje a minha família. A Valentina, Vitor, Mari e Rico, pela doçura e amizade.

Ao Umberto e Bernardo por existirem na minha vida.

Às minhas irmãs Raquel e Suzana. Lindas, que sempre sejamos amigas e companheiras. Obrigado por me amar como a uma filha.

Aos meus pais. Por toda a força, amor e ensinamentos. Que esta tese demonstre o meu empenho em retribuir toda uma vida de lutas e sacrifícios em nome da minha felicidade. Por respeitar incondicionalmente as minhas escolhas e a minha liberdade.

À FAPESP (2009/14018-3) e CNPQ

Ao Mauricio, uma pessoa sem igual, por me proteger, por saber dizer as coisas certas nas horas certas, pela nossa sintonia e companheirismo, por estar sempre presente, por me apoiar em todos os momentos e por ter me ensinado a amar.

Ao meu broto de flor que está por vir, por toda a sua paciência.

Moraûsuba opakatu mba'e oîmoaûîé.
(Do tupi-guarani: O amor vence todas as coisas)

Normatização adotada

1. 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 Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

2. Embora a denominação de língua inglesa "FES", utilizada para a abreviatura do termo "Functional Electrical Stimulation", já tenha sido traduzida para a língua portuguesa como EEF na abreviatura de Estimulação Elétrica Funcional, adotou-se nesta tese o uso em todo o texto da sigla original em inglês FES em substituição à sigla EEF, devido a sua notoriedade no meio médico e acadêmico brasileiro e sua utilização corrente nos artigos e trabalhos científicos publicados tanto na língua inglesa quanto na língua portuguesa.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

Publicações produzidas

1. Introdução	1
2. Objetivos	9
3. Revisão da Literatura	11
4. Métodos	40
5. Resultados	78
6. Discussão	108
7. Conclusão	126
8. Referências	129

Lista de Abreviaturas

ABC Avidina-biotina

ADM amplitude de movimento

ATP Adenosina Trifosfato

AVD Atividades de Vida Diária

AVE Acidente Vascular Encefálico

BCI *Brain-Computer Interface*

D Dia

DAB 3-3-diaminobenzidina tetrahydroclorito

DBS Deep Brain Stimulation

EEG Eletroencefalograma

EPSPs Potenciais Excitatórios Pós-Sinápticos dos Motoneurônios

EUA Estados Unidos da América

FES Estimulação Elétrica Funcional

fMRI Ressonância Magnética Funcional

GABA ácido γ amino-butírico

Hz Hertz

LIM 45 Laboratório de Investigação Médica 45

LTP *Long-term Potentiation*

LTD *Long-term Depression*

M1 Córtex Motor Primário

mA Mili Ampère

MAP-2 Proteína Associada ao Microtúbulo-2

MEP Potencial Evocado Motor

NF-200 Neurofilamento 200

NMDA N-metil D-aspartato

OMS Organização Mundial da Saúde

PET Tomografia por Emissão de Pósitrons

SNC Sistema Nervoso Central

TDCS Estimulação Craniana com Corrente Direta

TENS Transcutaneous Nervous Electrical Stimulation

TMS Estimulação Magnética Transcraniana

VC Violeta de Cresilo

Lista de Figuras

Figura 1: Conexões anatômicas entre o córtex somatosensitivo áreas 1, 2 e 3 de Brodman e a área 4 motora de Brodman. O tálamo age como um relé para o input sensitivo ao córtex. Fonte Cecatto e Chadi, 2007.

Figura 2: Fotografia da capa da edição original de 1791 do manuscrito *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius* publicada em 1791, Galvani, Bologna Universitá.

Fonte: http://137.204.24.205/cis13b/bsco3/intro_opera.asp?id_opera=23

Figura 4: Fotografia do frontispício da edição original de 1855 da monografia "De l'electrisation localisée et de son application a la physiologie, a la pathologie et a la thérapeutique", Paris, J.B. Baillière, 1855.

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Duchenne_de_Boulogne.

Figura 4: Fotografias da edição original de 1855 da monografia "De l'electrisation localisée et de son application a la physiologie, a la pathologie et a la thérapeutique", Paris, J.B. Baillière, 1855. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Duchenne_de_Boulogne.

Figura 5: Esquema e legenda originais da publicação feita por Melzack e Wall sobre a teoria das Comportas. Fonte: (Melzack e Wall, 1965).

Figura 6: Protótipo da FES para a aquisição da dorsiflexão, desenhado e publicado por Liberson. Fonte: (Liberson, Holmquest *et al.*, 1961) .

Figura 7. Modelo de uma neuroprótese de membro superior acoplada a FES para a aquisição da flexoextensão de punho em doentes plégicos após lesão medular cervical, em estudo na literatura. Fonte : [http : // www . bioness . com / NESS _ H200 _ for _ Hand _ Rehab / Videos _ for _ NESS _ H200.php](http://www.bioness.com/NESS_H200_for_Hand_Rehab/Videos_for_NESS_H200.php).

Figuras 8, 9 e 10. Animais sendo submetidos ao procedimento cirúrgico para a indução da lesão isquêmica cortical

Figura 11. Esquema didático da localização da lesão de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson (1986) que tem como referência "Zero" o bregma.

Figura 12. Confeção do eletrodo de estimulação à partir de uma agulha hipodérmica de aço inox. A= cabo da agulha. B-C = corte da agulha que dará origem ao eletrodo. D-E= corte e aberturas feitas para a passagem do fio de sutura.

Figura 13. Fio de estimulação soldado ao eletrodo de estimulação já com o fio de sutura em seu lúmen. J= solda

Figura 14. Anatomia da pata traseira do rato. Fonte: Greene, EC. Anatomy of the rat. Philadelphia : American Philosophical Society, 1935 pag 93

Figura 15: Anatomia da pata traseira do rato. BFp= Bíceps femoral posterior. BFa= Bíceps femoral anterior.

Figura 16: Anatomia da pata traseira do rato. N= Nervo tibial. EDL= Músculo extensor de dedos. TA: Músculo Tibial Anterior.

Figura 17. Eletrodo pronto para a sutura no músculo tibial. X= ponto de sutura no músculo tibial. L= eletrodo. TA= Músculo Tibial Anterior. G= Fio de sutura. J= solda. H= fio/eletrodo de condução da corrente.

Figura 18. Foto do Fio/eletrodo pronto para a sutura no músculo tibial.

Figura 19. Desenho do animal após a cirurgia de implante dos eletrodos. No maior aumento músculo tibial com o eletrodo suturado.

Figura 20: Foto durante a testagem do implante cirúrgico do eletrodo de estimulação no músculo tibial para a reprodução do movimento de dorsiflexão com 2mA de intensidade de corrente

Figura 21: Foto de um animal realizando o "Foot Fault Test"

Figura 22. Foto do aparelho de estimulação elétrica funcional utilizado. Fonte:<http://www.quarkmedical.com.br/eletro.php>.

Figura 23. Foto de um animal já conectado ao aparelho de eletroestimulação alguns minutos antes do início da corrente elétrica

Figura 24. Secção medular no nível L4-L5 mostrando o corno anterior e posterior estimulados, com importante marcação da proteína FOS em ambos os cornos anterior e posterior

Figura 25. Secção medular no nível L4-L5 mostrando corno anterior e posterior não estimulados, com assimetria de marcações da proteína FOS, com maior positividade no corno posterior

Figura 26: Foto do aspecto macroscópico da lesão encefálica, logo após a eutanásia do animal através da técnica de perfusão com paraformaldeído e a retirada do encéfalo.

Figura 27: Organização do citoesqueleto durante o processo de arborização dendrítica. Fonte: Dehmelt e Halpian, 2004.

Figura 28: Organização do citoesqueleto durante o processo de arborização dendrítica. Fonte: Dehmelt e Halpian, 2004.

Figura 29. Esquema de corte sagital do encéfalo do animal, ilustrando, em vermelho, a região da lesão observada em um dos ratos. As bordas anterior e posterior estão, respectivamente a 1,7 mm anterior e 3,3, mm posterior ao bregma.

Figura 30: Foto de um corte coronal do cérebro de um animal submetido à lesão fototrombótica e contrainjetada com Violeta de Cresilo, mostrando a borda anterior da lesão.

Figura 31: Fotografia em maior aumento da mesma região, detalhando o limite entre o córtex lesado e o tecido normal adjacente à borda da lesão.

Figura 32: Foto de secção coronal do cérebro do rato submetido à lesão fototrombótica. Limite entre o córtex lesado e o tecido normal adjacente na borda da lesão evidenciando neurônios marcados com a proteína FOS.

Figura 33: Dado 1 - Tempo sem Movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 11 o momento pré lesão, VAR 12 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 13 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Máximo os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, o momento pré lesão difere estatisticamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,001$ para ambos os grupos) e não difere do momento pós lesão pós estímulo. ($p=0,48$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,001$) em ambos os grupos.

Figura 34: Dado 2 - Número de eventos sem movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 21 o momento pré lesão, VAR 22 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 23 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Máximo os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, o momento pré lesão difere estatisticamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$ em ambos os grupos) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p=0,93$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,05$) Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Figura 35: Dado 3 - Tempo de pequenos movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 31 o momento pré lesão, VAR 32 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 33 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Máximo os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, o momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$ em ambos os grupos) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p=0,06$) O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pós lesão pós

estímulo ($p < 0,05$ em ambos os grupos). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Figura 36: Dado 4 - Número de pequenos movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 41 o momento pré lesão, VAR 42 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 43 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Máximo os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, observamos que há alteração significativa dos momentos avaliados nos dois grupos. O momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p = 0,14$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Figura 37: Dado 5 - Tempo de grandes movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 51 o momento pré lesão, VAR 52 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 53 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Máximo os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, observamos que há alteração significativa dos momentos avaliados nos dois grupos. O momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p = 0,84$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Figura 38: Dado 6 - Numero de grandes movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 61 o momento pré lesão, VAR 62 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 63 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Máximo os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, observamos que há alteração significativa dos momentos avaliados nos dois grupos. O momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,001$) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p = 0,74$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,001$).

Figura 39. Resultados do "Foot Fault Test. Valores das porcentagens de assimetria entre os 2 hemisférios dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO. Os grupos não apresentam diferenças estatísticas nos momentos pré

lesão ($p=0,32$) e pós lesão pré estímulo ($p=0,13$) mas diferem no momento pós lesão pós estímulo ($p< 0,001$).

Figura 40: Gráfico das médias e desvio padrão da área de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Figura 41: Gráfico da correlação estatística entre os valores da área da MAP-2 cortical do hemisfério lesado com os valores encontrados no "Foot Fault Test" de ambos os grupos pelo Teste de correlação de Spearman.

Figura 42: Gráfico com as médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

Figura 43: Gráfico com as médias e desvio padrão da área de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Figura 44: Gráfico com as médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

Figura 45: Gráfico com os valores máximos, mínimos, de mediana, desvio padrão e dispersão da área de imunomarcção do NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Figura 46: Gráfico com os valores mínimos, máximos, de mediana, de desvio padrão e dispersão da intensidade de imunomarcção da NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais estudiosos da corrente elétrica do séc. XVII ao XIX.

Tabela 2: Estudos da literatura que utilizaram a técnica da isquemia fototrombótica induzida pelo Rose Bengal em animais de pequeno porte. Revisão da literatura de 1985 a 2007 para comparação dos parâmetros metodológicos.

Tabela 3. Casuística das amostras utilizadas no estudo. As bordas anterior e posterior são definidas em relação ao bregma de acordo com Paxinos e Watson (1986), sendo os valores negativos correspondentes ao posicionamento anterior e os valores positivos correspondentes ao posicionamento posterior ao bregma, em um eixo craniocaudal.

Tabela 4: Animais excluídos durante o estudo (vide item 4.7).

Tabela 5: Animais excluídos durante o estudo (vide item 4.7).

Tabela 6. Extensão craniocaudal total das lesões em mm sendo N, número de animais e d.p. o desvio-padrão da média. Os valores mínimo, máximo da mediana e de p são apresentados.

Tabela 7. Porcentagem do número de animais e o comprimento das lesões em mm, sendo N o número de animais.

Tabela 8.: Localização da borda anterior da lesão em mm, sendo N número de animais, p o nível de significância do teste t e d.p. o desvio-padrão da média. Os valores de média, mínimo, máximo, da mediana e de p são apresentados. Os valores negativos representam o posicionamento anterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal. Valores positivos representam o posicionamento posterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal.

Tabela 9: Localização da borda posterior da lesão em mm, sendo N número de animais, p o nível de significância do teste t e d.p. o desvio-padrão da média. Os valores de média, mínimo, máximo, da mediana e de p são apresentados. Os valores negativos representam o posicionamento anterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal. Valores positivos representam o posicionamento posterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal.

Tabela 10. Presença de acometimento da borda superior do corpo caloso para os grupos de animais dos grupos ESTIMULADO E NÃO ESTIMULADO, sendo N o número de animais e p o nível de significância para o teste t.

Tabela 11. Valores de média e desvio padrão (d.p.) do tempo total de estimulação realizado em cada animal no D1, no D7 e no D14, assim como os valores totais obtidos entre os períodos D1 a D14, sendo N o número de animais.

Tabela 12: Valores dos resultados do "Foot Fault Test. Valores das porcentagens de assimetria entre os 2 hemisferios dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo n o número de animais e dp o desvio-padrão. Os valores de média, mediana, mínimos e máximos estão apresentados. Os grupos não apresentam diferenças estatísticas nos momentos pré lesão ($p=0,32$) e pós lesão pré estímulo ($p=0,13$) mas diferem no momento pós lesão pós estímulo ($p<0,001$).

Tabela 13: Valores das médias e desvio padrão da area de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Tabela 14: Valores de médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

Tabela 15: Valores de médias e desvio padrão da area de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Tabela 16: Valores das médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

Tabela 17: Valores máximos, mínimos, de medianas, de médias e desvio padrão da área de imunomarcção do NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 , p o nível de significância e dp o desvio padrão.

Tabela 18: Valores máximos, mínimos, de medianas, de médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção do NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo p o nível de significância e dp o desvio padrão.

Tabela 19: Valores de médias, mínimos, máximos, de mediana e de desvio padrão da área em μm^2 e da intensidade de imunomarcção da NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem nas regiões de corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo dp o desvio padrão e p o nível de significância.

Resumo

Cecatto RB. Avaliação clínico-experimental dos efeitos da estimulação neuronal na resposta funcional, na neuroproteção e na neuroplasticidade após isquemia cerebral. Estudo da FES em pacientes portadores de sequela de AVE em modelo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 157 p.

INTRODUÇÃO: O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das principais causas mundiais de morte e incapacidade crônica de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Os mecanismos neuronais envolvidos na aquisição de funcionalidade e independência após o AVE estão em discussão na literatura e compreendem provavelmente a reativação do tecido neuronal da zona de penumbra, a resolução da diátese, a reparação tecidual das áreas acometidas, e provavelmente mecanismos plásticos neuronais do tecido preservado adjacente à lesão. A estimulação elétrica funcional (FES) é utilizada com sucesso desde os anos 1960 para a estimulação e aquisição de funcionalidade após as lesões motoras corticais encontradas no AVE. Apesar disso, pouco se sabe sobre a influência da FES na neuroplasticidade e no neurotrofismo das áreas envolvidas com o controle motor. **OBJETIVOS:** Este estudo tem por objetivo avaliar a melhora funcional e mudanças na neuroplasticidade cortical de ratos submetidos à isquemia cerebral, tratados com um modelo experimental da FES. **MÉTODOS:** Analisamos um grupo de 8 ratos portadores de hemiparesia esquerda após isquemia encefálica cortical frontoparietal direita da área sensitivomotora das patas anterior e posterior, divididos em 2 grupos: A) sem uso de qualquer terapia após a lesão; e B) submetidos a um período de 14 dias de estimulação neuromotora com o uso de um modelo experimental da FES. Para a avaliação clínico-funcional foram realizados a Análise do Comportamento Motor Espontâneo pelo Infrared, e o Foot Fault Test nos momentos prévios a lesão, posterior a lesão antes da estimulação e posterior a 14 dias de estimulação com a FES. As respostas plásticas nesses animais foram analisadas através de imunorreatividades com o MAP-2 e o NF 200 nas regiões corticais e de corpo caloso. Todos os dados foram submetidos à análise estatística. **RESULTADOS:** Foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros funcionais do Foot Fault Test, na Análise do Comportamento com o Infrared e na imunomarcação da MAP-2 nas comparações dos grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, sendo que o grupo estimulado apresentou maior grau de recuperação motora que o grupo não estimulado. A análise da imunomarcação da MAP-2 demonstrou aumento na área imunomarcada no hemisfério lesado do grupo estimulado em comparação ao hemisfério não lesado e em comparação ao grupo não tratado. **CONCLUSÕES:** A recuperação motora induzida pela FES nestes animais foi acompanhada de modificações corticais representadas por uma maior imunorreatividade da MAP-2 no hemisfério lesado de animais tratados.

Descritores: Acidente vascular encefálico, reabilitação, terapia por estimulação elétrica, plasticidade neuronal.

Summary

Cecatto RB. The motor recovery and cortical plasticity after stroke induced by functional electrical stimulation therapy [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2011. 157 p.

INTRODUCTION: Stroke is the leading cause of disability and the third-leading cause of death among adults worldwide. The neural mechanisms involved in the acquisition of functionality and independence in the long term after stroke have been discussed in the literature. These include the reactivation of neuronal tissue from the penumbra, resolution of transhemispheric diaschisis, compensation of the affected areas by functional replacement behavior and also probably include the natural neuroplasticity of remaining preserved perilesional tissue. Functional electrical stimulation (FES) is used successfully since the 1960s for stimulation and acquisition of motor function after cortical ischaemic lesions found in stroke. In despite of this, little is known about the influence of FES on neuroplasticity involved with motor control. **OBJECTIVES:** This study aims to assess the functional improvement and changes in cortical neuroplasticity in rats with cerebral ischemia treated with an experimental model of FES. **METHODS:** We analyzed a group of eight rats with left hemiparesis after right cerebral cortical ischemia divided into two groups: A) without use of any therapy after the injury, and B) underwent a period 14 days of neuromotor stimulation using an experimental model of FES. For the clinical and functional evaluation were performed the Spontaneous Motor Behavior Analysis by Infrared and Foot Fault Test in times prior to injury after injury before stimulation and after 14 days of stimulation with FES. Plastic responses in these animals were analyzed by immunochemistry techniques with MAP-2 and NF 200 in the cortical areas and corpus callosum. All data were submitted to statistical analysis. **RESULTS:** There were statistical differences in Foot Fault Test, in Behavior Analysis with the Infrared and immunochemistry of MAP-2 in the comparison groups, while the STIMULATED group had a greater degree of motor recovery that UNSTIMULATED group. Analysis of MAP-2 demonstrated an increase in the immunochemistry of injured hemisphere of the STIMULATED group compared to the uninjured hemisphere and compared to the UNSTIMULATED group. **CONCLUSIONS:** FES-induced motor recovery in these animals was accompanied by cortical changes represented by increased immunoreactivity of MAP-2 in the injured hemisphere of treated animals.

Descriptors: stroke, rehabilitation, electric stimulation therapy, neuronal plasticity

The importance of neuronal stimulation in central nervous system plasticity and neurorehabilitation strategies

Rebeca Boltes Cecatto
Gerson Chadi

Neuroregeneration Center, Department of Neurology,
University of São Paulo School of Medicine,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Prof. Gerson Chadi,
Department of Neurology
Center for Nervous System Regeneration
University of São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 2nd floor, room 2119
01246-903 - São Paulo - Brazil
E-mail: gerchadi@usp.br

Accepted for publication: August 2007

Summary

Basic neuroscience has demonstrated new mechanisms of neuroplasticity in the healthy and the lesioned brain. Post injury, behavioral experience and neuronal stimulation-based therapy seem to play an adaptive role in the injured brain, modifying the functional organization of remaining cortical tissue and leading to clinical improvements. A better understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying human neuroplasticity might benefit neurorehabilitation strategies designed to promote recovery of function. We review some of the main results from animal experimental and human clinical studies focusing on mechanisms of reorganization of the motor cortex in response to injury and highlight different available approaches used to modulate and to evaluate motor cortical plasticity. Finally, we discuss how knowledge on neuroplasticity might be applied to neurorehabilitation strategies in neurologically impaired patients.

KEY WORDS: brain, neuroplasticity, recovery of function, rehabilitation, stimulation.

Introduction

During the past two decades, experimental animal investigations and neurophysiological/neuroimaging studies in humans have demonstrated that the healthy adult brain maintains the ability to reorganize connections and functions throughout life (1). Cortical reorganization, or plasticity, was defined by Bütefisch (2) as "any enduring change in the cortical brain properties either morphological or functional". Since Donald Hebb's original demonstration (3), in which laboratory rats allowed to move freely had better memory and learning capacities than

animals kept in laboratory cages, further studies have shown that neuronal cortical connections can be remodeled by experience or injury in order to improve neurological functions and abilities (4). These responses are best conceptualized as spanning various levels: brain level (microvasculature function, brain barriers, nutritional support), neuronal network level (dynamics of neuronal interconnection and synaptic features), inter-cellular level (regulation of glial-neuronal events), intra-cellular level (downstream signals), biochemical level (protein conformation, enzyme mobilization), and genetic level (transcriptional regulation) (5). With regard to neurological impairments, the wide range of events related to neuroplasticity play a very important role and may correlate with improvements but also with apparent deteriorations of neurological function.

Thus, cortical reorganization after neurological injury was classified, in clinical terms, as *function-enabling* or *function-disabling plasticity*. The first leads to a behavioral improvement, for instance, changes in cortical representation and functional gain with the use of an affected extremity. The second may result in an apparent deterioration of function, for instance, the appearance of epileptic seizures after brain injury or of progressive hyperreflexia, clonus, dystonias and phantom limb after amputation or spinal cord injury (6). In this context, functional gains can be conceptualized as adaptive behaviors, offering opportunities that may be addressed in order to minimize disabilities.

Neurorehabilitation seeks to overcome the disabilities of neurologically impaired patients by looking for strategies to bring about functional improvement and amelioration of neurological deficits. The possibility of driving cortical plasticity with a view to neurofunctional gain has opened up a new dimension in the care of neurologically impaired patients and provides a creative new set of tools for the rehabilitation team.

This review focuses on mechanisms of reorganization of the motor cortex in response to injury and considers experiments in laboratory animals and clinical evidence. Different approaches intended to modulate and stimulate motor cortical plasticity are discussed from the perspective of their clinical application in the rehabilitation of neurologically impaired patients.

Evidence of cortical plasticity after injury in experimental and human studies

The concept of neuroplasticity dates back to 1928 and Cajal's observation (7) on the responses of the peripheral nervous system to injury. Cajal showed initially morphological changes in axotomized motor neurons. Over the many decades since then, animal and human studies have provided evidence of neuronal responses in

cortical regions after peripheral or central nervous system (CNS) injuries (8).

Morphological and physiological analyses have shown a loss of rat motor cortical representation of the respective innervated musculature with specific cortical areas taken over by adjacent regions after nerve transection (9). Moreover, a similar cortical reorganization response was also described, following facial tactile stimulation, in monkeys with somatosensory deafferentation of an entire forelimb (10). Peripheral stimuli gave rise to evoked responses in the facial projection areas of the animal cortex but also triggered signals in the adjacent cortical zones representing the now deafferented arm. Thus, the somatosensory cortico-facial area overlapped the cortical zone representing the deafferented arm.

More recently, Stroemer and collaborators, by means of modern immunolabeling techniques, showed increases in the growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin protein in the rat neocortex after unilateral ischemia (11), providing further evidence of the occurrence of neurite growth and synaptogenesis in the injured neocortex. These events are considered morphological features of cortical plasticity after injury.

We have indeed learned a lot from experimental models. However, the time course of lesion progression, the influence of surrounding tissue, and the regenerative capacity of nervous tissue may differ among species, influencing interpretation of the cortical responses related to neurofunctional recovery. Investigators have studied cortical neuroplasticity in rodent brain lesion models of ischemia/stroke because of its clinical relevance to humans (12,13). These models include transient or permanent vascular occlusion by means of arterial vessel manipulation as well as thrombotic lesions, which trigger different types of blood-brain barrier breakdown (14). Despite methodological limitations, cortical plasticity appears to play a beneficial or adaptive role in general behavioral responses after brain lesions. It should be pointed out that various factors, genetic, gender, and hormonal, for example, as well as animal age, might also influence lesion-induced brain plasticity (15).

The development of brain imaging, especially methods using motor activation, opened up the possibility of looking at the functional organization of the human motor system, and of analyzing recovery mechanisms in human beings. Among others, Rossini and Dal Forno (16) have discussed the strengths and limitations of the available non-invasive brain imaging tools. For instance, positron emission tomography, functional magnetic resonance imaging (fMRI), high-resolution electroencephalography, magnetoencephalography (MEG), and transcranial magnetic stimulation (TMS) have been employed in several neurological services around the world. In the case of stroke, the combination of imaging techniques has allowed a detailed description of cortical plasticity events (16).

A variable expansion of the cortical region can be recruited in functional reorganization after brain lesions or other disease. It is likely that functional changes of the motor cortex after brain lesions depend on the influence of other functionally connected brain regions. One report suggested that the decreased intracortical inhibition pattern found in patients with cortical or thalamic stroke might follow the opposite direction when the cerebellum is included in the infarct area (17). Furthermore, an ab-

normally high interhemispheric cortical inhibition from the contralateral hemisphere to the ipsilesional lesioned M1 (primary motor cortex) was demonstrated (18) to impair rather than facilitate motor performance in stroke patients. Moreover, other events, like ipsilateral recruitment of activity within the corresponding sensorimotor area in the non-involved hemisphere, may occur in neurofunctional recovery after stroke injuries (19). These responses are part of a compensatory cortico-cortical process, and they seem to be related to the severity and location of the cortical lesion.

Moreover, longitudinal studies have shown that the motor activity improvement after a brain injury is accompanied by a cortical activation pattern on fMRI and TMS in many motor-related regions, such as the bilateral sensorimotor cortex, premotor cortex, cingulate motor areas and cerebellum (20,21). Furthermore, MEG showed a significant reduction of the cortical hand representation for the affected side of patients with a chronic pain syndrome (22). Moreover, the center of the hand was shifted toward the cortical representation of the lip. Additionally, activation in the primary sensory cortex following tactile stimulation was significantly increased on the chronic painful side compared to the unaffected limb.

Finally, cortical reorganization events may persist following chronic deafferentation. In limb amputees, the motor-evoked potentials of muscles proximal to the stump level were elicited by TMS at a lower intensity and from more distant scalp positions, indicating a facilitation of cortical efferent output to the periphery (8,23).

Taken together, current knowledge on the mechanisms of neuroplasticity of the brain cortex and subcortical regions after nervous system injury could favor new strategies to improve neuronal responses necessary for behavioral rehabilitation.

Role of neuronal stimulation in neuroplasticity in human and animal studies

There is exciting evidence in both animal and human studies that brain plasticity can be driven by a number of factors triggering neuronal stimulation, such as physical activity, motor and cognitive learning, reading, and environmental enrichment (2,4,23-26).

A certain degree of neurofunctional recovery can occur in a variable time span following a neurological injury, a span that can range from seconds to years. The neurobiology behind this evidence has recently become better understood. Prompt restoration of the original substrate after a stroke is of course desirable and may include immediate reperfusion of ischemic areas, elimination of edema, restitution of non-infarcted penumbral areas and resolution of diaschisis. In many circumstances, adequate initial clinical management of the acute phase post stroke can allow partial or total recovery of function. Tissue protection is an objective in the neuroscience and neurorehabilitation fields, too (5).

Mechanisms for functional recovery also include mobilization of new or existing neural substrate to achieve function, possibly both at anatomical and molecular level. As mentioned above, the large number of brain events involved in neurofunctional adaptation are known as neuroplasticity, and neuroplasticity occurs during normal neural processing and after neuronal injury. Cellular

and molecular mechanisms related to stimulation of neuronal sprouting, functional enforcement of existing neural circuits and development of fresh polysynaptic connections have been extensively investigated. The time-window for inducible neuroplasticity is wide and may be unrestricted (27).

Important events in cerebral cortical reorganization post injury include, for instance, the unmasking of existing, but latent, horizontal connections and the modulation of synaptic efficacy through mechanisms of long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). Both mechanisms can occur within milliseconds to hours, and in some cases might be prolonged for weeks after injury, and they are based on the concept that the motor cortex contains multiple overlapping motor representations which are functionally connected (28). LTP and LTD may lead to changes in the strength of connections among motor neurons, and different functional neuronal assemblies can form, thereby providing a substrate for the construction of dynamic motor output zones. Many recent publications have focused on the involvement of γ aminobutyric acid (GABA)ergic and glutamatergic systems, paying particular attention to the role of the activated N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptor (29).

Recent analyses have shown the effect of motor practice and intensive training on motor system reorganization in the healthy and injured primate brain (30), including the human brain (31). Sustained performance of a specific motor task, for instance playing string instruments, is able to induce a motor cortical reorganization, providing data about the neural mechanisms for skill acquisition (32). Moreover, imaging studies in humans indicated that motor recovery after stroke, as promoted by training, is correlated with changes in the sensorimotor pattern of cortical activation (33), highlighting the importance of specific functional demands such as more carefully performed visuomotor, sensorimotor and/or cognitive tasks (34).

Learning-dependent synaptogenesis has been shown at cellular level in rats trained to perform a skilled reaching task, accompanied furthermore by FOS expression (a marker for neuronal activation) and increases of synaptic density within motor cortical layer II/III (35).

Moreover, the complex nature of sensorimotor integration as a possible substrate for functional motor cortical adaptations after brain damage and training has been underlined (24,34).

The voluntary efferent output as well as afferent input may assist in the organization of altered signals arising from a damaged brain area. Proprioceptive feedback seems to play a critical role in motor planning by updating an internal model of the state and properties of motor activity. On the basis of the proposed model of the sensorimotor cycle (Fig. 1), strategies like peripheral sensory stimulation, pharmacological stimulation of brain receptors and direct cortical stimulation, have been tested in order to achieve neuroplasticity-induced motor system responses (24,36).

Transcranial direct current stimulation (tDCS) and repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) are methods applied to humans in order to modulate excitability in specific cortical areas. Indeed, low-frequency rTMS (about 1 Hz) usually results in inhibitory effects which may be related to LTD mechanisms. High-frequency

Figure 1 - Anatomical connections between somatosensory cortex and primary motor cortex. Connections are shown in the somatosensory cortex of Brodmann area 1, 2, 3 and 5, and primary motor cortex area 4. Note that somatosensory and motor cortices are highly interconnected. The thalamus acts as a relay station for peripheral somatosensory input into the cortex.

rTMS (more than 5 Hz), on the other hand, leads to LTP-related excitability responses. Interestingly, TMS is able to trigger a predominantly transsynaptic activation of pyramidal neurons through their cortical connections, and is a potential method to stimulate motor plasticity following motor functional impairment (37).

Peripherally or centrally applied electrical stimulation is another valuable tool to promote functional improvement related to modulation of specific cortical areas and the underlying mechanisms have been investigated. Recent analyses with fMRI have revealed areas of brain activation induced by peripheral neuromuscular electrical stimulation in healthy and stroke subjects (38, 39), a method of stimulation that has been combined with TMS in order to evaluate neuroplasticity changes in the CNS during training.

An exciting finding involving central neuroplasticity was the effect of environmental enrichment. This refers to the paradigm of behavioral modeling wherein the animal is kept in an open, stimulus-rich environment or in a closed, unstimulating one. Although implications for rehabilitation in humans have been suggested, well-designed studies in environmental enrichment have been conducted only in animals. In the context of an enriched environment, neuroplasticity events such as dendritic arborization, synaptogenesis and neurogenesis, have been found to be enhanced in the dentate gyrus of rodent hippocampus (40,41).

Physical exercise in a wheel, an important component of such an enriched environment, is also able to trigger neuronal growth, proliferation and survival in healthy mouse hippocampus (Fig. 2) (25,42). Moreover, wheel running prior to experimental transient global cerebral ischemia is capable of reducing animal mortality and hippocampal neuronal damage (43). Studies demonstrate, as described below, the mechanisms by which the neuronal activation promoted by physical activity are able to trigger the neuroplasticity responses necessary for post-ischemic neurofunctional recovery (25).

More recently, it has been shown that drugs with adren-

Figure 2 - An example of neuronal stimulation promoted by physical activity inducing molecular plasticity in the brain. Digital color image of a film radioautogram showing growth associated protein 43 (GAP-43) mRNA signal from a hybridized section of the hippocampus of rats kept in a control cage (A) or in a cage provided with an exercise wheel (B). GAP-43 expression has been associated with morphological neuronal changes in the brain. Exercised rats were allowed spontaneous physical activity in the wheel for 14 days. GAP-43 mRNA signals were massively increased in all sub-regions of the hippocampal formation of the trained animals. Several research groups have associated an enriched environment, including exercise wheel training, with better cognitive performance and reduced anxiety.

ergic or dopaminergic function administered in combination with training might modulate neuroplasticity in cortical areas. Indeed, drugs inducing functional modulation of GABA, glutamate or muscarine cholinergic receptors might trigger or impair cortical plasticity. For example, it was shown that the GABA receptor agonist lorazepam is able to block LTP responses. Moreover, the antagonist action induced by dextromethorphan on NMDA receptors also blocks LTP and experience-dependent plasticity in the motor and somatosensory cortices (29). These descriptions emphasize the role of neuronal activity, physiological and/or drug-induced, on cortical neuroplasticity in the brain.

Several reports have shown the involvement of neurotrophic factors, particularly the members of the neurotrophin family, in the brain mechanisms related to neuroplasticity during normal conditions or after injury (44). Their actions are seen in a wide range of neuronal events, including development, proliferation, differentiation, myelination, maintenance and apoptosis. Moreover, neurotrophic molecules are also factors for axonal growth and synaptic plasticity (45).

The history of neurotrophins can be traced back 50 years, to when Levi-Montalcini, Cohen and Hamburger discovered the nerve growth factor (NGF), a prototypical

neurotrophin required for axonal growth from peripheral sympathetic and sensory neurons (46). Other members of the neurotrophin family, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and neurotrophin-4 (NT-4), were then identified and their contribution to brain neuroplasticity has been the subject of extensive investigation. Indeed, several recent reports have described in detail the importance of BDNF in neuroplasticity, highlighting the molecular mechanisms involved in its ability to modulate synaptic efficacy, including regulation of synapse formation, neurotransmitter release and neuronal excitability (Fig. 3) (47-49). Recent studies have demonstrated the ability of an enriched environment to upregulate neurotrophins in the rat hippocampus, providing a valuable tool for triggering the hippocampal neuroplasticity required for learning and memory (50). Despite the robust knowledge acquired from experimental models on the importance of neurotrophic factors in brain plasticity, data about their effects in humans are still lacking, given the inherent infeasibility of *in vivo* chemical investigations of human brain tissue.

Attention should be drawn to the fact that molecules involved in axon guidance during CNS development may interfere with axonal outgrowth after neuronal injury and may also be important in the process of neurorehabilitation. They include oligodendrocyte myelin proteins (e.g. Nogo-A) as well as astroglial cell surface and extracellular matrix molecules (51). It is worth drawing attention to the analysis of the effects of Nogo-A neutralization on neuronal regeneration and plasticity in experiments conducted *in vitro* and also after CNS lesions, in this latter case leading to functional recovery *in vivo* (52). Moreover, there is a role for regulation of extracellular matrix molecules, like proteoglycans, after CNS injury, given that their expression in the lesioned area changes and

Figure 3 - Scheme showing the relationship between neuronal activity and neuroplasticity in the brain. Neuroplasticity is modulated by neurotrophic factor signaling during neurotransmission. Neuronal stimulation and activity triggering synaptic transmission lead to neurotransmitter and neurotrophic factor signaling between pre- and postsynaptic neurons. BDNF is the most studied neurotrophin in glutamatergic synapses. Morphological and molecular responses take place in the involved synapses leading to increased synapse efficiency. Due to the participation of neurotrophic molecules, the neuronal stimulation-induced neuroplasticity may be able to trigger neuroprotection against secondary neurodegeneration in the subacute phases post injury, favoring subsequent neurorehabilitation.

contributes to the inhibition of axon regrowth and brain repair (53). Despite the potential of these molecules to influence the results of neuroplasticity, analysis of their regulation by neuronal stimulation or neurorehabilitation strategies is still lacking.

The effects of adaptive plasticity on functional recovery after motor cortical damage and its relevance to clinical neurorehabilitation strategies

While many animal experiments and clinical brain imaging studies have attempted to clarify the mechanisms underlying neuroplasticity after brain lesions, only few clinical studies have focused on the benefits of neuroplasticity and rehabilitation intervention in the time course of human neurofunctional recovery. Currently, neurorehabilitation interventions are based on the concept that neuronal stimulation triggers neuroplasticity, however, clinical examination of its effects has been mainly at behavioral level. In spite of the fact that several types of rehabilitation intervention have been employed to achieve functional gain after CNS lesions, much work is still needed in order better to understand the underlying mechanisms. Having, on the basis of experimental evidence, gained enormous knowledge of cellular and molecular mechanisms related to neuroplasticity and cortical reorganization after brain lesions, we now need to understand better the exact role of clinical intervention in these events and vice versa.

In a meta-analysis conducted on a behavioral level, Kwakkel et al. (5) provided evidence of a similar non-linear pattern of arm and leg functional spontaneous recovery, as well as competence in basic activities of daily living, over approximately six months after stroke. Indeed, a powerful predictor of degree of independence at six months was the rate of responses during the phase with fastest recovery, which was the first few weeks post stroke. After reviewing the mechanisms of brain and behavioral reorganization, the authors concluded that the neuroplastic capacity of the CNS is more intense during acute and subacute phases and that early training can favor functional improvements, thus providing support for the value of therapeutic rehabilitation intervention as early as the initial phases post injury.

Another issue in rehabilitation strategies that has been analyzed behaviorally is how to deal with affected body segments. *Constraint-induced movement therapy* for chronic stroke hemiparesis and other disabilities has given some functional results, however it is not yet widely accepted among rehabilitation professionals. Enduring non-use of the affected limb can be observed after stroke and may, in part, be behaviorally conditioned by the experience of uselessness in the acute phase. This kind of non-use learning might persist even after the release of the affected limb in the chronic phase. This notion has provided support for the strategy of *constraint-induced rehabilitation*. This approach uses several techniques, including restraint of the healthy limb, to stimulate the use of the paretic extremity in an attempt to encourage function-enabling plasticity, because non-use of the paretic limb may further contribute to function-disabling plasticity (54).

Like other authors, Deutsch et al. (55) described the use of the virtual reality technology model of neuronal stim-

uli for neurofunctional rehabilitation of individuals post stroke. This system, mimicking the enriched environment studies, creates several virtual simulations which engage the user in a problem-solving task in order to acquire a skill. In addition, virtual simulation is able to address specific impairments, of range of motion, strength and speed for example, to promote intense repetitive practice, and to provide sensory and proprioceptive inputs using cues and feedback in a variety of ways (5). Likewise, many studies using assistive technology in rehabilitation, for instance functional neuroprostheses, peripheral sensorimotor stimulation, anesthesia or brain cortical stimulations, showed clinical evidence of improved motor recovery. Visuomotor coordination, motor learning, skilled finger movements and working memory responses could be seen in healthy volunteers and also in patients with brain lesions (2,24,56,57). Worth highlighting are the results of clinical studies on functional neuromuscular electrical stimulation, which show that local coordination training associated with active stimuli on the impaired upper extremity can promote motor recovery in terms of muscle activation pattern and manual dexterity (58).

All in all, there is much scope for neurorehabilitation therapies based on the concepts of task-specific repetitive training, sensorimotor stimulation and intensive training. These may enhance functional recovery by exploiting brain plasticity, which should be further investigated clinically at cellular and molecular level with the development of appropriate technologies.

Concluding remarks

Recent neurochemical and neuroimaging evidence has highlighted the functional and structural dynamic properties of the nervous system, particularly the cerebral cortex, allowing a non-linear neurological functional recovery after injury. At cellular level, neurochemical and morphological changes in the neuronal contacts and also in non-neuronal cells are observed experimentally. The functional topography of the motor cortex can be modified after brain injury by a variety of experimental manipulations, including neuronal stimulation and behavioral experience. Spontaneous post-injury neuroplasticity or therapeutic stimulation may play an adaptive role in modifying the functional organization of the remaining cortical tissue, leading to clinical improvements. A better understanding of the mechanisms of neuroplasticity is necessary to develop more effective rehabilitation strategies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP (95/9060-6; 98/13122-5; 99/01319-1; 2007/00491-3) and CNPQ, Brazil.

References

1. Bayona NA, Bitensky J, Teasell R. Plasticity and reorganization of the uninjured brain. *Top Stroke Rehabil* 2005;12:1-10
2. Bütefisch CM. Plasticity in the human cerebral cortex: lessons from the normal brain and from stroke. *Neuroscientist* 2004;10:163-173

3. Hebb DO. The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am Psychol* 1947;2:306-307
4. Elbert T, Rockstroh B. Reorganization of human cerebral cortex: the range of changes following use and injury. *Neuroscientist* 2004;10:129-141
5. Kwakkel G, Kollen B, Lindeman E. Understanding the pattern of functional recovery after stroke: facts and theories. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:281-299
6. Drubach DA, Makley M, Dodd ML. Manipulation of central nervous system plasticity: a new dimension in the care of neurologically impaired patients. *Mayo Clin Proc* 2004;79:796-800
7. Cajal SR. Degeneration and regeneration of the nervous system. London; Oxford University Press 1928
8. Chen R, Cohen LG, Hallett M. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 2002;111:761-773
9. Sanes JN, Suner S, Lando JF, Donoghue JP. Rapid reorganization of adult rat motor cortex somatic representation patterns after motor nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2003-2007
10. Pons TP, Garrigthy PE, Ommaya AK, Kaas JH, Taub E, Mishkin M. Massive cortical reorganization after sensory deafferentation in adult macaques. *Science* 1991;252:1857-1860
11. Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioural recovery after neocortical infarcts in rats. *Stroke* 1995;26:2135-2144
12. Nudo RJ. Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery. *Stroke* 2007;38(2 Suppl):840-845
13. Nudo RJ. Adaptive plasticity in motor cortex: implications for rehabilitation after brain injury. *J Rehabil Med* 2003;41:7-10
14. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 2003;44:85-95
15. Nudo RJ, Plautz EJ, Frost SB. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve* 2001;24:1000-1019
16. Rossini PM, Dal Forno G. Neuronal post-stroke plasticity in the adult. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:193-206
17. Liepert J, Hamzei F, Weiller C. Lesion-induced and training-induced brain reorganization. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:269-277
18. Murase N, Duque J, Mazzocchio R, Cohen L. Influence of inhemispheric interactions on motor function in chronic stroke. *Ann Neurol* 2004;55:400-409
19. Feydy A, Carlier R, Roby-Brami A et al. Longitudinal study of motor recovery after stroke: recruitment and focusing of brain activation. *Stroke* 2002;33:1610-1617
20. Seitz RJ, Bütefisch CM, Kleiser R, Hömberg V. Reorganization of cerebral circuits in human ischemic brain disease. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:207-229
21. Ward NS. Functional reorganization of the cerebral motor system after stroke. *Curr Opin Neurol* 2004;17:725-730
22. Maihöfner C, Handwerker HO, Neundörfer B, Birklein F. Patterns of cortical reorganization in complex regional pain syndrome. *Neurology* 2003;61:1707-1715
23. Duffau H. Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. *J Clin Neurosci* 2006;13:885-897
24. Hummel FC, Cohen LG. Drivers of brain plasticity. *Curr Opin Neurol* 2005;18:667-674
25. Johansson BB. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:163-174
26. Kleim JA, Jones TA, Timothy S. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. *Neurochem Res* 2003;28:1757-1769
27. Stein DG, Hoffman SW. Concepts of CNS plasticity in the context of brain damage and repair. *J Head Trauma Rehabil* 2003;18:317-341
28. Sanes JN, Donoghue JP. Plasticity and primary motor cortex. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:393-415
29. Ziemann U, Meintzschel F, Korchounov A, Ilic TV. Pharmacological modulation of plasticity in the human motor cortex. *Neurorehabil Neural Repair* 2006;20:243-251
30. Nudo RJ, Milliken GW, Jenkins WM, Merzenich MM. Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci* 1996;16:785-807
31. Liepert J, Bauder H, Wolfgang HR, Miltner WH, Taub E, Weiller C. Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans. *Stroke* 2000;31:1210-1216
32. Elbert T, Pantev C, Wienbruch C, Rockstroh B, Taub E. Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players. *Science* 1995;270:305-307
33. Nelles G. Cortical reorganization – effects of intensive therapy. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:239-244
34. Celnik PA, Cohen LG. Modulation of motor function and cortical plasticity in health and disease. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:261-268
35. Kleim JA, Lussing E, Schwartz ER, Comery TA, Greenough WT. Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *J Neurosci* 1996;16:4529-4535
36. Dobkin BH. Do electrically stimulated sensory inputs and movements lead to long-term plasticity and rehabilitation gains? *Curr Opin Neurol* 2003;16:685-691
37. Harris-Love ML, Cohen LG. Noninvasive cortical stimulation in neurorehabilitation: a review. *Arch Phys Med Rehabil* 2006;87(12 Suppl 2):S84-93
38. Han BS, Jang SH, Chang Y, Byun WM, Lim SK, Kang DS. Functional magnetic resonance image finding of cortical activation by neuromuscular electrical stimulation on wrist extensor muscles. *Am J Phys Med Rehabil* 2003;82:17-20
39. Kimberley TJ, Lewis SM, Auerbach EJ, Dorsey LL, Lojovich JM, Carey JR. Electrical stimulation driving functional improvements and cortical changes in subjects with stroke. *Exp Brain Res* 2004;154:450-460
40. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 2006;16:250-260
41. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:191-198
42. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999;2:266-270
43. Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 1994;25:1862-1869
44. Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2000;23:639-645
45. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:289-317
46. Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma AS 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1954;40:1014-1048
47. Soule J, Messaoudi E, Bramham CR. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem Soc Trans*. 2006;34:600-604
48. Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 2003;10:86-98

49. Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:24-32
50. Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:167-175
51. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:617-627
52. Grandpré T, Strittmatter SM. Nogo: a molecular determinant of axonal growth and regeneration. *Neuroscientist* 2001;7:377-386
53. Properzi F, Fawcett JW. Proteoglycans and brain repair. *News Physiol Sci* 2004;19:33-38
54. Mark VM, Taub E. Constraint-induced movement therapy for chronic stroke hemiparesis and other disabilities. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:317-336
55. Deutsch JE, Merians AS, Adamovich S, Poizner H, Burdea GC. Development and application of virtual reality technology to improve hand use and gait of individuals post-stroke. *Restor Neurol Neurosci* 2004;22:371-386
56. Krakauer JW. Motor learning: its relevance to stroke recovery and neurorehabilitation. *Curr Opin Neurol* 2006;19: 84-90
57. Ring H, Rosenthal N. Controlled study of neuroprosthetic functional electrical stimulation in sub-acute post-stroke rehabilitation. *J Rehabil Med* 2005;37:32-36
58. de Kroon JR, Ijzerman MJ, Chae J, Lankhorst GJ, Zilvold G. Relation between stimulation characteristics and clinical outcome in studies using electrical stimulation to improve motor control of the upper extremity in stroke. *J Rehabil Med* 2005;37:65-74

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das principais causas mundiais de morte e incapacidade crônica de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, compreende a primeira causa de sequelas crônicas da nossa população (De Padua Mansur, De Fátima Marinho Do Souza *et al.*, 2003; Camargo, Bacheschi *et al.*, 2005). A cada ano são registrados aproximadamente 800.000 novos casos de AVE nos Estados Unidos da América (EUA). Estima-se que pelo menos cerca de 3.500.000 americanos convivem hoje com algum grau de incapacidade adquirida devido a um ou mais episódios de AVE (Lloyd-Jones, Adams *et al.*, 2010).

O AVE tem por etiologia a interrupção do fluxo sanguíneo ao encéfalo de maneira localizada, seja por oclusão arterial, encontrada nos AVEs isquêmicos, seja por uma hemorragia vascular, presente nos AVEs hemorrágicos. A interrupção do aporte sanguíneo resulta em lesão da célula neuronal no território de irrigação comprometido. As sequelas encontradas muito dependem da área encefálica acometida e compreendem quadros de afasia, disfagia, disartria, déficits cognitivos, sensoriais ou motores, entre outros. O quadro clássico de hemiparesia sensitivomotora contralateral à lesão pode ser encontrado em cerca de 60% dos casos (Lloyd-Jones, Adams *et al.*, 2009).

O retorno funcional após o AVE pode compreender uma melhora nos padrões de força, sensibilidade, equilíbrio, coordenação e memória, bem como na capacidade de marcha, na função manual e na independência cognitiva, que podem ocorrer, em parte, de maneira espontânea devido à capacidade endógena de recuperação do Sistema Nervoso Central (SNC) e, em parte, através das

intervenções terapêuticas clínicas de fase aguda e de reabilitação.

Alguns aspectos sobre a evolução e recuperação funcional após o AVE têm sido estudados. A literatura já demonstra que o retorno funcional pode ser influenciado por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos à lesão e ao ambiente. Revisões da literatura indicam que aspectos demográficos, a severidade do AVE na fase aguda, mecanismos inflamatórios locais, as terapêuticas neuroprotetoras de fase aguda e a restauração vascular da circulação comprometida têm forte influência na capacidade de recuperação funcional a médio e longo prazo (Kwakkel, Wagenaar *et al.*, 1996; Hendricks, Van Limbeek *et al.*, 2002; Ginsberg, 2008; Del Zoppo, Saver *et al.*, 2009; Becker, 2010; Cramer, 2010; Henninger, Kumar *et al.*, 2010; Jin, Yang *et al.*, 2010; Krishnan, Lopes *et al.*, 2010; Liebeskind, 2010; Mantz, Degos *et al.*, 2010; Saver, 2010). Já se sabe também que doentes que apresentam maior retorno funcional nas primeiras quatro semanas após o AVE atingem níveis maiores de independência aos seis meses de lesão (Kwakkel, Kollen *et al.*, 2003; Kwakkel, Kollen *et al.*, 2004; Kollen, Kwakkel *et al.*, 2006; Kwakkel, Kollen *et al.*, 2006; Kwakkel e Kollen, 2007). Além disso, Ottenbacher e Janell (1993) em uma revisão sistemática com 36 trials e 3717 doentes, assim como outros autores (Rabadi e Blau, 2005; Gagnon, Nadeau *et al.*, 2006; Salter, Jutai *et al.*, 2006), demonstraram relação estatística entre a melhora funcional e o momento de início da reabilitação, sugerindo que a precocidade do tratamento pode mudar a evolução da recuperação motora.

Os mecanismos neurológicos envolvidos na aquisição de funcionalidade e independência a longo prazo também estão em discussão na literatura e compreendem provavelmente a reativação do tecido neuronal da zona de

penumbra, a resolução da diáskise, a reparação tecidual das áreas acometidas e a compensação e substituição comportamental funcional (Rothi e Horner, 1983; Kwakkel, Kollen *et al.*, 2004; Cramer, 2008b; Cramer e Riley, 2008; Murphy e Corbett, 2009).

A zona de penumbra é a região tecidual em torno da lesão gravemente hipoperfundida, na qual ocorre uma diminuição da atividade funcional neuronal elétrica, apesar de mantidas a homeostase e a integridade das membranas celulares (Phan, Wright *et al.*, 2002). Na zona de penumbra o tecido neuronal está hipofuncionante, contudo, ainda se encontra preservado o suficiente para sobreviver a um curto período de hipóxia. Esses neurônios mantêm a sua integridade fisiológica e podem, em número variável, morrer por apoptose ou ser capazes de manter o trofismo e retomar sua atividade neuronal após a restituição do fluxo sanguíneo local. A localização e a extensão da zona de penumbra sofrem a influência de vários fatores, como por exemplo do tempo total de isquemia. É sobre tal premissa que se baseiam as terapias neuroprotetoras em desenvolvimento e o uso dos trombolíticos na prática clínica atual, os quais têm encontrado resultados clínicos promissores (Del Zoppo, 2009; Del Zoppo, Saver *et al.*, 2009).

A resolução da diáskise é estudada desde 1914, quando Von Monakow a definiu (Finger, Koehler *et al.*, 2004). Monakow sugeriu que frente a lesões agudas, as áreas cerebrais distantes, porém funcional e anatomicamente conectadas àquelas lesadas, desenvolvem um "choque apoplético" com diminuição funcional, hipometabolismo celular e inibição da atividade neuronal. Essas alterações são mediadas pela diminuição de estímulos fisiológicos habitualmente recebidos das áreas lesadas e também por mecanismos bioquímicos locais, como a toxicidade

gabaérgica (Staley, 2010; Hutchinson, 2011), a desestabilização glutamatérgica e dos receptores NMDA (Choi e Rothman, 1990) e o influxo celular de íons de cálcio (Cross, Meloni *et al.*, 2010). Estudos pré clínicos experimentais em animais sugerem que a resolução gradativa dessas alterações metabólicas está intimamente relacionada à restituição da atividade neuronal desse tecido não lesado, porém, hipofuncionante durante a diáquise (Mehta, Manhas *et al.*, 2007), resultando *per se* em algum grau de melhora clínica (Ginsberg, 2008; Fisher, 2011).

Há também fortes evidências de que o retorno funcional possa ser atribuído, em parte, às capacidades adaptativas neuroplásticas corticais e subcorticais do tecido preservado adjacente à lesão (Cramer, Nelles *et al.*, 1997; Nudo, 1999; Nudo e Friel, 1999; Sanes e Donoghue, 2000; Nudo, Plautz *et al.*, 2001; Calautti e Baron, 2003; Carmichael, 2003; Stein e Hoffman, 2003; Drubach, Makley *et al.*, 2004; Kwakkel, Kollen *et al.*, 2004; Platz, 2004; Hlustík e Mayer, 2006; Brown, Li *et al.*, 2007; Cramer, 2008b; Cramer e Riley, 2008; Murphy e Corbett, 2009). Estudos neurofisiológicos de imagem com o uso da Estimulação Magnética Transcraniana (TMS) encontraram mudanças concomitantes na funcionalidade e no padrão de ativação elétrica cortical durante a recuperação motora após o AVE, sugerindo que as modificações plásticas do tecido neuronal preservado têm relação com as mudanças funcionais clínicas encontradas (Richards, Stewart *et al.*, 2008). As respostas à lesão podem ocorrer nas diversas estruturas celulares e subcelulares em áreas específicas do SNC, produzindo modificações anatômicas, intercelulares, intracelulares, bioquímicas e genéticas. Tais mecanismos pressupõem a ocorrência de processos intrínsecos ao tecido neuronal normal como, por exemplo, a reativação de conexões que se tornaram inativas funcionalmente na fase aguda, a

sinaptogênese e a regeneração axonal ou dendrítica. Questiona-se também o papel do hemisfério contralateral, da inibição interhemisférica e da ativação de áreas corticais distante e não relacionadas funcionalmente à área lesada (Cramer, Nelles *et al.*, 1997; Carmichael, 2003; Kwakkel, Kollen *et al.*, 2004; Brown, Li *et al.*, 2007; Cramer, 2008b; Cramer e Riley, 2008; Di Filippo, Tozzi *et al.*, 2008; Milot e Cramer, 2008; Murphy e Corbett, 2009; Benowitz e Carmichael, 2010). Entretanto, a interpretação desses resultados ainda está em curso (Kleim e Jones, 2008; Murphy e Corbett, 2009).

Estudos revelaram ainda modificações plásticas neuronais concomitantes à melhora clínica funcional de pacientes submetidos às terapias externas de estimulação, sugerindo que as respostas plásticas observadas no tecido neuronal preservado podem refletir a recuperação funcional encontrada e ser dependentes, pelo menos em parte, da estimulação externa. A interpretação desses resultados permanece ambígua, já que há uma grande variabilidade nas respostas neurofisiológicas e comportamentais para as técnicas de estimulação estudadas (Bütefisch, Davis *et al.*, 2000; Stein e Hoffman, 2003; Carmichael, 2003; Bütefisch, 2004; Cramer, 2008a;b; Cramer e Riley, 2008; Kleim e Jones, 2008; Richards, Stewart *et al.*, 2008; Murphy e Corbett, 2009; Benowitz e Carmichael, 2010; Carmichael, 2010; Wittenberg, 2010).

Nesse sentido, uma nova área de atuação surge como perspectiva futura promissora no entendimento dos mecanismos que regulam a recuperação funcional após o AVE: o uso terapêutico da estimulação da plasticidade do SNC (Murphy e Corbett, 2009; Benowitz e Carmichael, 2010; Carmichael, 2010; Howells e Donnan, 2010). De modo que novas terapias biológicas e de reabilitação baseadas

na estimulação da neuroplasticidade tem sido estudadas. Por exemplo, o uso de terapias de estimulação sensitiva, terapias baseadas na robótica e na realidade virtual e as terapias de neuromodulação baseadas na estimulação cortical direta, na estimulação com o TMS e na estimulação elétrica funcional (FES). Esta última, uma técnica não invasiva de eletroestimulação neuromuscular periférica do neurônio motor inferior, que requer integridade do sistema nervoso periférico e que ativa os músculos esqueléticos produzindo movimentos (Chae, 2003; Nudo, 2003a; Bütefisch, 2004; Peckham e Knutson, 2005; Chae, Sheffler *et al.*, 2008; Sadowsky e McDonald, 2009; Deroide, Nih *et al.*, 2010; Floel e Cohen, 2010).

A literatura internacional considera que a funcionalidade ou a estimulação externa participam da formação e refinamento das sinapses dos circuitos neuronais após o AVE (Nudo, Wise *et al.*, 1996; Chen, Cohen *et al.*, 2002; Bütefisch, 2004; Seitz, Bütefisch *et al.*, 2004; Ward, 2004; Kleim e Jones, 2008; Murphy e Corbett, 2009; Wittenberg, 2010). Entretanto, ainda não se sabe exatamente como isso ocorre. Como as terapias de estimulação e reabilitação participam da síntese dos componentes bioquímicos e celulares para a formação e maturação dos circuitos neuronais? Quais os parâmetros têmporo-espaciais que influenciam esses circuitos? Qual a relação entre os mecanismos de plasticidade neuronal e as melhoras clínicas funcionais encontradas? Como podemos melhor aproveitar o potencial neuroplástico e a capacidade neuronal de recuperação espontânea durante as terapias de reabilitação? Como podemos desenvolver terapias de reabilitação baseadas no substrato clínico-funcional e também no substrato anatômico endógeno de recuperação neuronal? Como as terapias de reabilitação podem interferir e melhorar tais processos?

Este estudo tem por objetivo, portanto, avaliar a resposta funcional e as modificações corticais plásticas encontradas em uma amostra de animais com sequela de isquemia encefálica induzida experimentalmente, submetidos a um modelo animal de estimulação funcional terapêutica baseada nas terapias de reabilitação tradicionais.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Análise clínico-experimental dos efeitos de um modelo de estimulação elétrica funcional (FES) na resposta funcional e nas mudanças encefálicas encontradas em uma amostra de animais com sequela de isquemia encefálica cortical induzida experimentalmente.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Analisar as modificações no comportamento motor induzidas pela isquemia e pela FES comparando animais estimulados com animais não estimulados nos momentos pré lesão, que antecedem o período de estimulação e após o período de estimulação funcional terapêutica.

3.2.2 Analisar as alterações encontradas no tecido neuronal do SNC, especificamente nas imunorreatividades da proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2) e ao neurofilamento (NF-200), marcadores do citoesqueleto neuronal, após o período de estimulação funcional terapêutica, comparando animais estimulados com animais não estimulados.

REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da literatura

2.0 A neuroplasticidade do SNC após as lesões isquêmicas corticais motoras implicada como substrato anatômico da recuperação funcional.

Considerada inicialmente uma propriedade exclusiva do sistema nervoso em processo de desenvolvimento, e embora seja notadamente maior nesse período, a neuroplasticidade é hoje um dos elementos-chave para o entendimento da neurofisiologia do tecido cortical adulto normal e dos processos de aprendizagem e memória (Kandel, 2000).

Embora já no início do século XX uma das maiores contribuições de Santiago Ramon y Cajal (1852-1934) tenha sido formular o conceito de capacidade regenerativa do sistema nervoso (Cajal, Defelipe *et al.*, 1991), foi o psiquiatra italiano Ernesto Lugaro que, em 1906, introduziu o termo "plasticidade" às neurociências (Berlucchi, 2002).

O conceito de plasticidade no sistema nervoso é amplamente utilizado, mas a sua definição no campo da neurologia ainda é controversa e descrita como "qualquer modificação morfológica ou funcional do tecido neuronal saudável ou após lesões, dependente de seus mecanismos adaptativos e que ocorra a partir de estímulos, sejam estes endógenos ou externos" (Bloedel, Ebner *et al.*, 1996; Bütefisch, 2004). Mais ainda, pode representar muitos eventos diferentes, tais como alterações estruturais dos axônios e dendritos (Cotman, 1978) ou alterações fisiológicas na formação da sinapse (Martin, Grimwood *et al.*, 2000).

Embora o entendimento da recuperação funcional espontânea após o AVE tem como marco inicial a publicação de Twitchell (1951), os estudos sobre a relação entre a plasticidade do SNC e a recuperação funcional após o AVE ganham destaque entre as décadas de 1970-1980. Um novo marco foi o artigo publicado por Jenkins e Merzernich (1987), baseado nos conceitos de Cajal, Lugano e em estudos anteriores que na época já demonstravam que a perda funcional após lesões neurocutâneas periféricas correlacionava-se a uma diminuição da área de representação cortical dessas mesmas regiões lesadas. Utilizando técnicas de mapeamento elétrico cortical com microeletrodos cerebrais – antes, imediatamente após e algumas semanas após o AVE – esses autores pioneiramente demonstraram que frente a uma lesão isquêmica restrita ao córtex, a recuperação funcional periférica é acompanhada de um aumento da área de sua representação elétrica cortical. *A posteriori*, outros estudos com as mesmas metodologias encontraram resultados semelhantes corroborando a hipótese (Nudo, R *et al.*, 1996; Nudo, R e Milliken, 1996; Xerri, Merzenich *et al.*, 1998; Frost, Barbay *et al.*, 2003).

Desde o fim dos anos 1980, estudos experimentais em ratos também demonstraram após o AVE modificações encefálicas envolvendo a arborização dendrítica (Jones e Schallert, 1992), a sinaptogênese (Stroemer, Kent *et al.*, 1995; Bütefisch, 2004; Ploughman, Windle *et al.*, 2009), as modificações na excitabilidade dos neurotransmissores ácido γ amino-butírico (GABA) e glutamato (Schiene, Bruehl *et al.*, 1996; Qü, Mittmann *et al.*, 1998; Redecker, Wang *et al.*, 2002) e um aumento dos receptores N-metil D-aspartato (NMDA), nas regiões próximas e distais à lesão. Tais achados sugerem que fenômenos de plasticidade

sináptica vinculados à "Long-term Potentiation" (LTP) e à "Long-term Depression" (LTD) seriam os mecanismos endógenos importantes pelo qual o tecido cortical trabalha pela recuperação funcional e pelo reaprendizado motor após lesões (Buchkremer-Ratzmann, August *et al.*, 1996; Buchkremer-Ratzmann e Witte, 1997; Witte, Buchkremer-Ratzmann *et al.*, 1997; Hagemann, Redecker *et al.*, 1998; Qü, Mittmann *et al.*, 1998). Quase duas décadas depois, estes achados têm sido confirmados e correlacionados às melhoras funcionais encontradas (Brown Craig E *et al.*, 2007; Crmichael Thomas S *et al.*, 2003; Cramer Steven C 2008b; Milot-Marie e Cramer Steven C 2008; Murphy Timothy H e Corbett Dale 2009; Wittenberg George F 2010).

Ainda nos início dos anos 2000, trabalhos que utilizam técnicas de eletrodiagnóstico e de neuroimagem como a TMS, o Eletroencefalograma (EEG), o Potencial Evocado Motor (MEP), a *fMRI* e a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), também demonstraram que as áreas de representação cortical da função perdida se modificam. De início, ocorre uma diminuição do tamanho da área representante da função acometida. À medida que o retorno funcional clínico acontece, essas áreas são novamente expandidas, o que demonstra a presença de fenômenos neuroplásticos implicados na recuperação motora após o AVE, correlacionando uma vez mais a recuperação funcional às modificações corticais plásticas (Nudo, 2003a; b; Ward, Brown *et al.*, 2003; Rossini e Dal Forno, 2004).

Além disso, muito embora ainda haja controvérsia em relação ao papel do córtex contralateral à lesão, a partir dos anos 2000 surgiram evidências de que o córtex preservado adjacente à lesão pode responder plasticamente, assumindo funções antes pertinentes às áreas lesadas (Nudo, Plautz *et al.*, 2001; Werhahn,

Mortensen *et al.*, 2002; Sohn, Jung *et al.*, 2003; Stein e Hoffman, 2003; Bützfisch, 2004; Kwakkel, Kollen *et al.*, 2004).

Tais trabalhos, reunidos, indicam que a plasticidade endógena do tecido nervoso participa da recuperação funcional motora após lesões corticais.

2.1 A estimulação da neuroplasticidade endógena e a recuperação funcional após lesões.

Desde que Donald Hebb, em seu estudo original da década de 1940 (Condensed Program, 1947; Hebb, 1949; Morris, 1999), sugeriu que animais mantidos em ambientes estimulantes têm uma melhor capacidade de aprendizado e memória do que animais mantidos em gaiolas restritivas, vários estudiosos mostram que os córtices sensorial e motor são dinamicamente influenciados pelo uso, pelo desuso, pela ação de drogas e pelos estímulos ambientais, indicando a existência de uma relação, mesmo que ainda pouco compreendida, entre a recuperação funcional após lesões corticais, neuroplasticidade e as terapias de estimulação do tecido nervoso (Nudo, Plautz *et al.*, 2001; Chen, Cohen *et al.*, 2002; Nudo, 2003a; Stein e Hoffman, 2003; Bützfisch, 2004; Elbert e Rockstroh, 2004; Johansson, 2004a; Platz, 2004; Bayona, Bitensky e Teasell, 2005; Kelly, Foxe *et al.*, 2006; Ward, 2006; Ziemann, Meintzschel *et al.*, 2006; Kleim e Jones, 2008). A partir de então, diversas formas de estimulação do SNC que podem auxiliar nas melhoras clínicas após o AVE têm sido descritas (Johansson, 2004b; Hummel e Cohen, 2005; Moucha e Kilgard, 2006).

Em 1992, a revisão de Will e Kelche com os resultados encontrados até a década de 1980, pontuou definitivamente que animais portadores de sequela de AVE, quando mantidos em ambientes estimulantes, têm um melhor desempenho funcional do que quando mantidos em ambientes pouco enriquecidos. Nos anos 2000, esses achados foram correlacionados à ocorrência de mudanças plásticas no padrão de expressão gênica dos neurônios (Zhao, Mattsson *et al.*, 2000), ao aumento no número de espinhas dendríticas corticais (Biernaskie e Corbett, 2001) e a modificações na diferenciação de neurônios hipocampais (Komitova, Perfilieva *et al.*, 2002), demarcando o conceito de que a melhora funcional, a plasticidade neuronal e a estimulação ambiental se relacionam como mecanismos de recuperação funcional após o AVE.

Várias drogas têm sido testadas como estimulantes da plasticidade neuronal no papel de promotoras de melhora funcional após lesões encefálicas (Feeney e Sutton, 1987; Goldstein, 1998). Os exemplos clássicos são os estudos da década de 1980 e 1990 com a anfetamina, droga capaz de modificar a sinaptogênese e a arborização dendrítica em estudos experimentais (Stroemer, Kent *et al.*, 1998).

O treino de habilidades motoras através das terapias de reabilitação também leva a modificações da representação cortical, fenômeno observado em estudos clínicos e experimentais (Castro-Alamancos e Borrel, 1995; Elbert, Pantev *et al.*, 1995; Nudo e Milliken, 1996; Nudo, Milliken *et al.*, 1996; Nudo, Wise *et al.*, 1996; Liepert, Miltner *et al.*, 1998; Xerri, Merzenich *et al.*, 1998; Nudo e Friel, 1999; Büttefisch, Davis *et al.*, 2000; Liepert, Bauder *et al.*, 2000; Nudo, Plautz *et al.*, 2001; Büttefisch, 2004; Elbert e Rockstroh, 2004; Liepert, Hamzei *et al.*, 2004; Nelles, 2004; Chakrabarty, Friel *et al.*, 2009).

Desde 1940 sabe-se que, frente a lesões piramidais, o uso do membro parético poderia levar a um maior ganho funcional se o membro não afetado tiver seu uso restrito (Tower, 1940). Este conceito foi retomado na década de 1990, quando as terapias de restrição-induzida demonstraram uma melhora funcional relacionada a mudanças no padrão cortical de representação motora após o AVE (Taub, Uswatte *et al.*, 1999; Liepert, J *et al.*, 1998).

Ainda nos anos 1990, a presença da proteína FOS, um marcador da atividade do neurônio (Herrera e Robertson, 1996; Coggeshall, 2005), o aumento na sinaptogênese, sobretudo nas camadas corticais II e III, o aumento de densidade sináptica, as modificações no limiar de despolarização neuronal e os sinais de LTP e LTD entre as conexões horizontais das camadas corticais II e III, foram eventos descritos em animais normais ou com lesão cortical submetidos ao treino motor repetitivo (Kleim, Lussnig *et al.*, 1996). Essas modificações, embora presentes, não têm a mesma magnitude em animais lesados não submetidos ao treino repetitivo (Hess Aizenman *et al.*, 1996; Hess e Donoghue, 1996a; b; Hess e Krawczyk, 1996; Kleim, Lussnig *et al.*, 1996; Nudo, Milliken *et al.*, 1996; Kleim, Barbay *et al.*, 1998; Rioult-Pedotti, Friedman *et al.*, 1998; Nudo, 1999; Nudo e Friel, 1999; Kleim e Jones, 2008).

Mais recentemente, estudos sugerem que a atividade física exerce um efeito neuroprotetor no tecido nervoso normal ou após lesões (Kleim, Jones *et al.*, 2003; Kleim e Jones, 2008). Em contrapartida, nos modelos animais de lesão focal, a hiperatividade motora nos sete primeiros dias após a lesão pode produzir áreas corticais de hiperexcitabilidade mediada pelos receptores NMDA, um aumento da área de lesão e uma piora funcional, sugerindo mais uma vez que o ambiente tem

forte influência sobre os mecanismos de neuroplasticidade e sobre a evolução da recuperação motora (Kozlowski, James *et al.*, 1996; Humm, Kozlowski *et al.*, 1998; Nudo, Plautz *et al.*, 2001; Kleim, Jones *et al.*, 2003; Johansson, 2004b).

Após os anos 2000, retomaram-se também as discussões sobre o papel da estimulação sensitiva periférica na reabilitação após o AVE. Segundo o princípio da Integração Sensorial de Sherrington (Library, 1906; Burke, 2007), os sistemas somatossensorial e motor são altamente interconectados e o *input* aferente sensorial modula o *output* eferente motor (figura 1).

Figura 1: Conexões anatômicas entre o córtex somatossensorial áreas 1, 2 e 3 de Brodman e a área 4 motora de Brodman. O tálamo age como um relé para o input sensorial ao córtex. Fonte Cecatto e Chadi, 2007.

A importância crítica da aferência sensorial para o aprendizado motor tem sido demonstrada em experimentos em humanos e em animais. Talvez seja possível modular o circuito motor espinhal e supraespinhal ao acionarmos aferências sensoriais ativadas durante o ato motor normal (Celnik e Cohen, 2004). Isso poderia ser obtido, por exemplo, pela estimulação das fibras sensoriais que conduzem as informações da periferia para a medula espinhal, seja por uso de estimulação tátil, seja por corrente elétrica periférica. O emprego de metodologias de estimulação cortical não invasiva, como o uso da TMS e da Estimulação Craniana com Corrente Direta (TDCS), têm encontrado resultados promissores. Com o uso isolado dessas metodologias de estimulação ou em conjunto com outras técnicas de reabilitação, estudos clínicos demonstram respostas funcionais melhores que as obtidas pelas terapias de reabilitação tradicionais nas áreas da performance motora, movimentação de dedos, coordenação visuomotora e memória de trabalho. Os estudos são enfáticos ao ressaltar a importância do substrato neuronal adequado para a eficiência de tais técnicas (Hummel e Cohen, 2005; Reis, Robertson *et al.*, 2008; Bolognini, Pascual-Leone *et al.*, 2009).

Nos últimos 5 anos, outras técnicas terapêuticas como a realidade virtual, a robótica (Johansson, 2011) e, mais recentemente, o uso do transplante de células e outras terapias biológicas (Döbrösy, Busse *et al.*, 2010) têm sido estudadas, ainda com resultados controversos.

No conjunto, os trabalhos indicam que as diversas metodologias de estimulação podem atuar no potencial plástico endógeno do tecido neuronal com o intuito de atingir um maior retorno funcional após lesões corticais do SNC. A literatura já indica que as terapias de reabilitação mais promissoras são aquelas que

interagem com as características plásticas do SNC, encontrando no potencial endógeno de recuperação do tecido lesado o substrato anatômico necessário para a sua atuação (Dobkin, 2003; Nudo, 2003a; b; Bütetfisch, 2004; Dobkin, 2004a; b; Elbert e Rockstroh, 2004; Johansson, 2004a; Krakauer, 2006; Meintzschel e Ziemann, 2006; Moucha e Kilgard, 2006; Daly e Ruff, 2007; Nicoletis e Lebedev, 2009; Sadowsky e McDonald, 2009; Wang, Collinger *et al.*, 2010).

2.2 O uso terapêutico da estimulação elétrica neuromuscular periférica

Desde o uso do peixe-torpedo em Roma há 2.000 anos atrás, a medicina tem usado a estimulação elétrica para fins terapêuticos que vão da analgesia à ressuscitação cardiovascular (Cambridge, 1977).

Estudiosos exploraram o campo da eletroterapia, entre os séculos XVII e XIX. Enquanto Benjamin Franklin, Leyden Jar, Cavallo e, mais tardiamente, Faraday e Ure descobriam a corrente elétrica e suas aplicabilidades físicas práticas, Luigi Galvani e Aldini demonstravam a ocorrência de eletricidade em tecidos biológicos animais e identificavam a corrente elétrica contínua e a sua capacidade de obter contrações tetânicas em fibras musculares (Faraday, 1839; Galvani, Green *et al.*, 1953; Fodstad e Hariz, 2007) (tabela 1).

Magnetismo e Corrente Estática	
Gilbert	1600
Leyden Jar	1746
Wesley	1759
Franklin	1775
Cavallo	1777
Eletricidade Bimetálica	
Alessandro Volta	1794
Galvanização	
Galvani	1787
Aldini	1804
Remak	1855
Faradização	
Faraday	1831
Duchenne	1855

Tabela 1: Principais estudiosos da corrente elétrica do séc. XVII ao XIX.

Durante um experimento com eletricidade estática de Galvani, um de seus assistentes acidentalmente tocou um nervo ciático de uma rã com um objeto metálico, produzindo uma contração muscular. A partir dessa observação, Galvani investigou a relação entre a eletricidade e a animação (movimento ou vida), inferindo que músculos e células nervosas eram capazes de interagir com a eletricidade, também denominada por ele de eletricidade galvânica. Galvani, então, cunhou o termo "eletricidade animal" para descrever o que hoje é chamado de

bioeletricidade. Assim como seus contemporâneos, deduziu que a ativação muscular era gerada por um fluido elétrico conduzido aos músculos através dos nervos o que, mais tarde, Galvani demonstraria ser originário de reações químicas. A descrição desses resultados foi feita no manuscrito *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius* (figura 2), publicado no Instituto de Ciências de Bologna, em 1791 (Galvani, Green *et al.*, 1953).

Figura 2: Fotografia da capa da edição original de 1791 do manuscrito *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius* publicada em 1791, Galvani, Bologna Universitá.

Fonte: http://137.204.24.205/cis13b/bsco3/intro_opera.asp?id_opera=23

Curiosamente, tempos depois, os resultados das pesquisas e investigações de Galvani foram mencionados pela escritora Mary Shelley, como parte de uma lista de recomendações de leitura para um concurso de histórias de terror, que resultou no romance *Frankenstein*, cuja construção e animação se deu pela eletricidade.

Mas foi apenas em 1855, após a descoberta da corrente alternada por Faraday que o médico francês Guillaume Duchenne (Duchenne, 1855), considerado o pai da eletroterapia, tornou-se o pioneiro em demonstrar com sucesso o uso da estimulação transcutânea do nervo frênico na obtenção da contração diaframática e consequente respiração em doentes vivos. Com a mesma técnica, Hugo von Ziemssen conseguiu devolver a respiração a um doente em parada cardiorrespiratória por envenenamento a gás. Já datam dessa mesma época, a criação da Escola Alemã de Eletroterapia, que levou para a prática clínica da medicina o uso da corrente direta galvânica (Erdmann, 1858) e as primeiras recomendações e publicações sobre a utilização da eletroterapia em diversas condições biológicas consideradas patológicas como a epilepsia, a insuficiência respiratória, a amaurose, a insanidade mental e a plegia muscular (Beard, 1881).

Ao publicar a monografia "*De l'electrisation localisée et de son application a la physiologie, a la pathologie et a la thérapeutique*" (Duchenne, 1855), Duchenne foi o primeiro a usar as correntes contínua (galvânica) e alternada (farádica) para estimular tanto os nervos periféricos quanto os músculos, consolidando o uso da corrente elétrica como um recurso diagnóstico e terapêutico da medicina em inúmeras alterações anatômicas e fisiológicas (figuras 3 e 4).

Figura 3: Fotografia do frontispício da edição original de 1855 da monografia "De l'electrisation localisée et de son application a la physiologie, a la pathologie et a la thérapeutique", Paris, J.B. Baillière, 1855. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Duchenne_de_Boulogne.

Figura 4: Fotografias da edição original de 1855 da monografia "De l'electrisation localisée et de son application a la physiologie, a la pathologie et a la thérapeutique", Paris, J.B. Baillière, 1855. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Duchenne_de_Boulogne.

A partir de então, inúmeros campos de atuação da eletroterapia se desenvolveram concomitantemente.

Enquanto o uso da corrente elétrica nos estudos de estimulação do tecido encefálico central e da medula progrediu muito durante toda a primeira metade do século 20 – com pesquisadores como Roberts Bartholow (Bartholow, 1874), Victor Horsley (Compston, 2007), Carl Wilhelm Sem-Jacobsen (Ramey e O'doherty, 1960), Walter Hess (Scientific, 1999), Antonio Egas Moniz (Feldman e Goodrich, 2001) e Ugo Cerletti (Sackler, 1956) –, o uso da estimulação elétrica neuromuscular transcutânea periférica teve um novo salto apenas na década de 1960 com Melzack, Wall e Lieberman (Liberson, Holmquest *et al.*, 1961; Melzack e Wall, 1965).

Em 1965, Melzack e Wall publicaram na *Science* a Teoria das Comportas e firmaram o uso da estimulação transcutânea (TENS) como terapêutica analgésica e neuroestimuladora das vias neurais que controlam a dor (Melzack e Wall, 1965). Foi a partir dos conceitos de neuroestimulação propostos por Melzack e Wall que várias outras metodologias, como a estimulação cortical superficial, a estimulação encefálica profunda (DBS) e a estimulação intramedular puderam se desenvolver.

Baseados nos estudos de autores como Hebb e Descartes, Melzack e Wall descreveram a existência de duas vias neuronais ascendentes de sensibilidade: a lenta e a rápida. A via rápida, ou do trato neoespinotalâmico, é composta por neurônios de axônios rápidos, com fibras de grosso calibre, as fibras A-delta. Isto é, a via responsável por levar ao SNC as informações periféricas de sensibilidade tátil, térmica e vibratória. O seu neurônio ocupa a lâmina I da Medula Espinhal e cruza imediatamente para o lado contrário, ascendendo pela substância branca na

região antero-lateral até atingir a sua sinapse terminal no tálamo e na formação reticular.

A via lenta, ou do tracto paleoespinotalâmico, utiliza axônios lentos, finos, com fibras de diâmetro pequeno. Essa via leva ao SNC as informações de dor. O seu neurônio ocupa a lâmina V da Medula Espinhal e tem sua sinapse terminal na formação reticular, no colículo superior e na substância cinzenta periaquedutal.

Pela Teoria das Comportas, as vias grossas de tato, pressão e sensibilidade vibratória, e as vias finas de dor levam informações da periferia para duas localizações do corno posterior da medula: os circuitos inibitórios da dor e os circuitos de transmissão ascendente da dor.

Quando essas vias são ativadas simultaneamente na periferia, competem entre si pelos receptores. Mas as fibras de tato e sensibilidade são mais rápidas e conseguem atingir os receptores medulares antes das fibras de dor, finas e lentas. E assim, inibem as vias da dor, impedindo que os impulsos dolorosos da periferia ascendam até os núcleos do tálamo (Figura 5).

Fig. 4. Schematic diagram of the gate control theory of pain mechanisms: *L*, the large-diameter fibers; *S*, the small-diameter fibers. The fibers project to the substantia gelatinosa (*SG*) and first central transmission (*T*) cells. The inhibitory effect exerted by *SG* on the afferent fiber terminals is increased by activity in *L* fibers and decreased by activity in *S* fibers. The central control trigger is represented by a line running from the large-fiber system to the central control mechanisms; these mechanisms, in turn, project back to the gate control system. The *T* cells project to the entry cells of the action system. +, Excitation; -, inhibition (see text).

Figura 5: Esquema e legenda originais da publicação feita por Melzack e Wall sobre a teoria das Comportas. Fonte: (Melzack e Wall, 1965).

Na vigência de um quadro doloroso, outros estímulos periféricos não dolorosos análogos ao tato – como aqueles obtidos pela estimulação elétrica transcutânea de alta frequência (TENS) – são capazes de ativar as fibras grossas rápidas e atingem o corno medular antes dos estímulos oriundos das vias finas, lentas. Dessa forma, estímulos não dolorosos conseguem inibir por competitividade estímulos dolorosos oriundos da periferia.

Por essa teoria, diversos estudiosos implementaram e difundiram o uso da estimulação elétrica transcutânea como um recurso terapêutico analgésico baseado na neurofisiologia e na sua capacidade de interagir com o sistema nervoso (Fodstad e Hariz, 2007).

Na mesma época, Liberson (1961) retomou os estudos de Duchenne de estimulação neuromuscular com o uso da corrente farádica, desenvolvendo o que

denominou de "Functional Electrotherapy", mais tardiamente chamada por Moe e Post de "Functional Electrical Stimulation"(FES), denominação utilizada até hoje (Moe e Post, 1962).

Ao contrário da corrente farádica analgésica TENS estimuladora da via sensitiva e estudada por Melzack e Wall, que se utiliza de altas frequências e baixa intensidade de corrente, a corrente da FES usa baixas frequências de pulso, em torno de 20 a 50 Hz, com intensidade de corrente acima do limiar de despolarização do neurônio motor, produzindo contrações musculares em vez de analgesia. Esses autores foram os primeiros a utilizar a corrente elétrica periférica para ativar a via neural de músculos esqueléticos específicos com intuito funcional, estimulando a contração muscular e a produção de movimento articular e funções motoras. O primeiro estudo foi desenhado para a aquisição da dorsiflexão a partir da estimulação do músculo tibial (figura 6) (Liberson, Holmquest *et al.*, 1961; Moe e Post, 1962). Iniciou-se assim o uso clínico e o estudo da FES.

Figura 6: Protótipo da FES para a aquisição da dorsiflexão, desenhado e publicado por Liberson. Fonte: (Liberson, Holmquest *et al.*, 1961) .

A FES é uma técnica de fácil aplicabilidade, com poucas contra-indicações ou efeitos colaterais e baixo custo em relação às terapias atuais de estimulação cortical (Peckham e Knutson, 2005). As contrações musculares evocadas são obtidas através de envelopes de pulsos elétricos de pequena duração aplicados sob frequência controlada, que despolarizam as fibras nervosas da placa motora que, por sua vez, são mais excitáveis que as fibras musculares. Tais envelopes de pulsos elétricos duram poucos segundos, podendo-se obter contrações em condições biológicas com baixo risco de desconforto ou queimaduras e que se aproximam

muito da contração muscular fisiológica (Peckham e Knutson, 2005). Em doentes com lesões do SNC sem sinapses ativas entre os neurônios do córtex motor primário e os motoneurônios α que atuam na contração muscular eferente, a corrente elétrica liberada pelo eletrodo da FES ativa diretamente a fibra neural da terminação nervosa da placa motora, produzindo sua despolarização e a consequente contração muscular, movimentação articular e substituição da função comprometida pela lesão (Peckham e Knutson, 2005).

Desde meados de 1960, a FES tem sido utilizada com o intuito primordial de manutenção do trofismo e hipertrofia muscular, para a substituição de funções neuromusculares comprometidas, para o aumento da amplitude articular e para a facilitação da atividade motora voluntária seletiva em doentes com lesões do motoneurônio superior ou com patologias orgânicas acompanhadas de atrofia muscular (Alfieri, 1982; Stefanovska, Vodovnik *et al.*, 1989; Glanz, Klawansky *et al.*, 1996; Dimitrijevic e Dimitrijevic, 2002; Chae, 2003; Aoyagi e Tsubahara, 2004; Bolton, Cauraugh *et al.*, 2004; Dobkin, 2004b; De Kroon, Ijzerman *et al.*, 2005; Peckham e Knutson, 2005; Vitenzon, Mironov *et al.*, 2005; Pomeroy, King *et al.*, 2006; Chae, Sheffler *et al.*, 2008; O'dell, Lin *et al.*, 2009). Nos últimos 40 anos, estudos demonstram os resultados clínicos da FES em doentes com lesões após o AVE ou após lesões medulares. Já foram demonstradas melhoras clínicas na função motora voluntária de membro superior, na recuperação da marcha e na preensão manual dos doentes (Alfieri, 1982; Stefanovska, Vodovnik *et al.*, 1989; Glanz, Klawansky *et al.*, 1996; Chae, 2003; Aoyagi e Tsubahara, 2004; Bolton, Cauraugh *et al.*, 2004; Dobkin, 2004b; Peckham e Knutson, 2005; Vitenzon,

Mironov *et al.*, 2005; Yan, Hui-Chan *et al.*, 2005; Pomeroy, King *et al.*, 2006; Chae, Sheffler *et al.*, 2008; O'dell, Lin *et al.*, 2009).

Desde os anos 1960, sabe-se também que classicamente as fibras musculares são capazes de hipertrofiar em resposta à estimulação elétrica (Bassel-Duby e Olson, 2006; Olson, Eadie *et al.*, 2006; Wolpaw e Carp, 2006). Esses efeitos ditos "musculares" da FES, que são utilizados amplamente para explicar a melhora clínica encontrada em doentes, são conseqüências da sua atuação no recrutamento das fibras musculares e na terminação nervosa da junção neuromuscular da placa motora (Pette e Vrbová, 1999; Al-Majed, Brushart *et al.*, 2000; Al-Majed, Neumann *et al.*, 2000; Busetto, Buffelli *et al.*, 2000; Brushart, Jari *et al.*, 2005; English, Schwartz *et al.*, 2007; Geremia, Gordon *et al.*, 2007).

A contração muscular fisiológica envolve uma série de eventos desencadeados pela ativação do motoneurônio α . Com a despolarização, o potencial de ação se propaga pelo axônio até a sinapse da junção neuromuscular, liberando a acetilcolina na fenda sináptica (Wolpaw e Carp, 2006). Esta se liga aos receptores pós sinápticos, causando a despolarização e eventos intracelulares que culminam na contração, força e conseqüente movimento muscular e articular.

Algumas das características técnicas da FES são determinantes para as modificações musculares encontradas. Devido a sua capacidade de estimulação supramáxima, na qual o recrutamento das unidades motoras independe do tamanho das unidades, todas as unidades motoras são ativadas com a mesma intensidade de estímulo, simultânea e precocemente, atingindo níveis de treino muscular intenso e diminuindo a acomodação das unidades motoras aos estímulos (Peckham e Knutson, 2005; Chae, Sheffler *et al.*, 2008).

Embora já documentada no âmbito clínico, muscular, na junção neuromuscular e na placa motora, ainda hoje se discute a natureza da interferência da FES na plasticidade do SNC e se essa interação tem papel decisivo nos efeitos clínicos encontrados.

A dificuldade da análise estatística fidedigna dos efeitos neurofisiológicos da FES deve-se, entre outros fatores, às características dos estudos em reabilitação humana, de difícil desenho e execução (Glanz, Klawansky *et al.*, 1996; De Kroon, Ijzerman *et al.*, 2005). Variáveis, como o grau de comprometimento motor, o controle motor residual, o tamanho e a localização da área cerebral acometida, o tempo de lesão, as comorbidades, o estado funcional prévio ou a idade, são encontradas na prática médica da reabilitação (Hendricks, Van Limbeek *et al.*, 2002; Dobkin, 2004a; b; Kwakkel, Kollen *et al.*, 2004; Teasell, Bayona *et al.*, 2005; Teasell, Bitensky *et al.*, 2005; Lang, Macdonald *et al.*, 2009; French, Thomas *et al.*, 2010). Adicionalmente, restrições inerentes ao estudo morfológico, químico e neurofisiológico, dificultam a análise do SNC "in vivo" dos doentes, ficando esta sob a responsabilidade de métodos de neuroimagem funcional, que tem apresentado limitações quanto a análise dos efeitos celulares da estimulação.

A FES tem sido utilizada também como o princípio básico de funcionamento das neuropróteses funcionais, desde os estudos pioneiros de Riso *et al.*, (1991) e Prochazka *et al.*, (1997). As neuropróteses funcionais são equipamentos ortésicos que utilizam a FES para a obtenção de contração muscular e/ou substituição funcional de movimentos articulares e funções corporais perdidas após lesões do SNC, como as alterações vesicais, laríngeas e diafragmáticas (Hendricks, Ijzerman *et al.*, 2001; Alon, 2003; Alon e McBride, 2003; Alon e Ring, 2003; Alon,

Sunnerhagen *et al.*, 2003; Peckham e Knutson, 2005; Ring e Rosenthal, 2005; Dunning, Berberich *et al.*, 2008; Hara, 2008) (figura 7).

Figura 7. Modelo de uma neuroprótese de membro superior acoplada a FES para a aquisição da flexoextensão de punho em doentes plégicos após lesão medular cervical, em estudo na literatura. Fonte : [http : // www . bioness . com / NESS _ H200 _ for _ Hand _ Rehab / Videos _for_NESS_H200.php](http://www.bioness.com/NESS_H200_for_Hand_Rehab/Videos_for_NESS_H200.php).

O campo de estudo na área das neuropróteses vem crescendo muito e existem diversos modelos em estudo e aprovação na prática clínica como o *Parastep™ Neural Prosthesis for Walking* (Sigmedics, 1994), o *Freehand™ Upper Extremity Neural Prosthesis* (Neuro-Control Corp., 1997) ou o *RGO-Assisted Walking* (Tashman, Zajac *et al.*, 1995). Em geral, o desenvolvimento das neuropróteses acopladas à FES tem se beneficiado de estudos sobre novas metodologias de *feedback* sensorial, regulação da estimulação externa e novas metodologias de estimulação que sejam embasadas no substrato funcional anatômico residual e na plasticidade neuronal endógena para a aquisição de resultados terapêuticos mais eficazes.

Estudos recentes investigam a hipótese de integrar a FES às *Brain-Computer Interfaces* (BCIs) (Wolpaw, 2007), de modo a conseguir que a própria atividade cortical motora fisiológica controle diretamente os dispositivos da FES atuantes na função periférica de membros paréticos de doentes com lesões nervosas centrais (Moritz, Perlmutter *et al.*, 2008; Wang, Collinger *et al.*, 2010).

Até os anos 1980, a FES era encarada como uma terapia funcional de neuroestimulação, capaz de interagir plasticamente com o sistema muscular e nervoso periférico, mas incapaz de interagir de modo modulatório com o SNC. A ideia de que a FES pode atuar como um neuromodulatório central baseado na capacidade plástica endógena do SNC é mais recente e, *a priori*, advém dos estudos clínicos que demonstram os efeitos terapêuticos da FES, mesmo em doentes em que a terapia foi descontinuada após um período de uso. Doentes submetidos a longos períodos de uso da FES e/ou uma neuroprótese com FES como substituto funcional readquirem a função anteriormente perdida mesmo após a suspensão do uso da estimulação periférica ortésica.

Portanto, a FES é um treino terapêutico funcional e contextualizado capaz de levar ao reaprendizado da função motora perdida a ser substituída, e não apenas uma terapia de substituição funcional do ato motor perdido (Burridge, J, Taylor, P *et al.*, 1997; Burridge, Jh, Taylor, Pn *et al.*, 1997; Wieler, Stein *et al.*, 1999; Ladouceur e Barbeau, 2000; Sinkjaer, Andersen *et al.*, 2000; Popovic, Popovic *et al.*, 2002; Stein, Chong *et al.*, 2006; Hook e Grau, 2007; Alon, Levitt *et al.*, 2008; Laufer, Hausdorff *et al.*, 2009; Laufer, Ring *et al.*, 2009; Everaert, Thompson *et al.*, 2010).

Os substratos para a possível neurorestauração obtida com o uso da FES podem incluir tanto os mecanismos característicos da própria técnica de estimulação – que sabidamente acarreta modificações do arcabouço osteomuscular (Pette e Vrbová, 1999; Dupont Salter, Richmond *et al.*, 2003; Marqueste, Decherchi *et al.*, 2006; Wolpaw e Carp, 2006) – quanto os mecanismos intrínsecos ao tecido neuronal, provavelmente moduláveis pela estimulação. No séc. XXI, a neurobiologia da FES para a reabilitação começa a ser melhor estudada (Dobkin, 2004a; Floel e Cohen, 2006).

Surpreendentemente, pouco se conhece sobre o impacto e a interação da FES com os circuitos corticais ou vice-versa (Daly, Marsolais *et al.*, 1996; Peckham e Knutson, 2005; Chae, Sheffler *et al.*, 2008; Everaert, Thompson *et al.*, 2010). Conhecemos os efeitos clínicos da FES na substituição funcional, na hipertrofia muscular e no aumento da amplitude articular durante a função. Pouco ainda sabemos, contudo, sobre a sua influência na neuroplasticidade das áreas envolvidas com o controle e reaprendizado motor.

2.3 A neuroplasticidade do SNC e o uso das terapias de estimulação elétrica neuromuscular periférica

Em 1960, Sir John C. Eccles foi um dos pioneiros ao utilizar a corrente elétrica para atuar na capacidade plástica do tecido nervoso. Ele demonstrou que os potenciais excitatórios pós-sinápticos (EPSPs) dos motoneurônios na placa motora da junção neuromuscular podem ser inibidos por estimulação elétrica de baixa frequência, facilitados pela estimulação acima de 30 Hz e novamente

inibidos por estimulação acima de 100 Hz (Curtis e Eccles, 1960). A demonstração de que a fibra neural periférica da junção neuromuscular e o recrutamento das fibras musculares pelo motoneurônio periférico se adaptam de maneira frequência/estímulo dependente abriu uma nova dimensão no estudo dos efeitos da estimulação elétrica neuromuscular na plasticidade do sistema nervoso (Wolpaw e Carp, 2006).

Mais de 40 anos depois, estudos clínicos e experimentais sobre as alterações neurais da junção neuromuscular e a velocidade de condução de nervos periféricos encontraram modificações na condução axonal após períodos de estimulação elétrica neuromuscular (Al-Majed, Brushart *et al.*, 2000; Al-Majed, Neumann *et al.*, 2000; Busetto, Buffelli *et al.*, 2000; Brushart, Jari *et al.*, 2005; English, Schwartz *et al.*, 2007; Geremia, Gordon *et al.*, 2007). A literatura também cita, desde os anos 1980, que a utilização da estimulação elétrica da FES de modo repetitivo sobre grupos musculares paréticos pode produzir, por um mecanismo de ação inibitória recíproca e ativação de fibras grossas mielinizadas nos circuitos medulares, alterações no limiar de ativação das vias medulares e a diminuição do tônus e hiperreflexia do grupo muscular antagonista ao estimulado (Alfieri, 1982; Stefanovska, Vodovnik *et al.*, 1989; Field-Fote, 2004; Hook e Grau, 2007).

Nas mesmas décadas, estudos que se utilizaram da avaliação da presença da proteína FOS (Herrera e Robertson, 1996; Coggeshall, 2005) demonstram que a estimulação elétrica periférica atua diretamente no axônio e pode também ativar o próprio corpo celular do neurônio no tecido do SNC. O uso desse marcador possibilitou a compreensão de que a estimulação elétrica periférica neuromuscular interage com o sistema nervoso, seguindo um padrão de resposta central com

organização medular somatotópica, dependente do grau de consciência e interatividade do animal, de maneira dose e tempo-dependente, e que varia de acordo com o local de estimulação, frequência e tipo de corrente elétrica utilizada, conceito introduzido na literatura apenas a partir de 1990 (Bullitt, Lee *et al.*, 1992; Wei e Zhao, 1995; Willcockson, Taylor-Blake *et al.*, 1995).

Alterações moleculares e metabólicas do SNC, como o aumento de perfusão sanguínea perilesional e efeitos neurotróficos, já foram também descritas (Lever, Bradbury *et al.*, 2001; Buitrago, Luft *et al.*, 2004; Burnett, Shimazu *et al.*, 2006; Weingarden e Ring, 2006).

Doravante, na última década, surgiram resultados interessantes no campo da avaliação neurofisiológica e de imagem. Com o uso de técnicas como o TMS, EEG, a *fMRI*, o PET e o MEP – e embora haja grande diversidade metodológica, no tipo de amostra e na padronização dos protocolos de estímulos e, consequentemente, nos resultados – já é possível assumirmos que a estimulação elétrica periférica leva a modificações nas velocidades de condução e limiar de despolarização do circuito espinhal e cortical, sobretudo quando aplicada nos nervos tibial e mediano (Van Camp, Verhoye *et al.*, 2006; Almaguer-Melian, Bergado *et al.*, 2010). Ao que parece, a resposta dependerá do tipo de corrente e parâmetros da estimulação, assim como do estado funcional do tecido nervoso lesado anteriormente à estimulação, uma vez mais sugerindo que a interação entre o estímulo e o substrato neuronal é um fator determinante na resposta funcional encontrada (Van Camp, Verhoye *et al.*, 2006; Almaguer-Melian, Bergado *et al.*, 2010).

No esteio das mesmas ideias, estudos como os de Wu *et al.* (2005), Conforto *et al.* (2008) e Stefan *et al.* (2002) encontraram mudanças na ativação cortical de indivíduos durante ou após o uso de estimulação elétrica periférica, sendo esta última pareada ou não a protocolos de estimulação cortical associada. Foram encontradas modificações nos padrões de ativação cortical de áreas sensitivas, motoras e nas áreas corticais suplementares de indivíduos normais ou com lesões isquêmicas encefálicas. Essas modificações ocorreram, em geral, de maneira somatotópica – ora no córtex lesado, ora no córtex contralateral à lesão – foram diretamente proporcionais ao tipo, localização e intensidade da corrente e acompanhadas de melhoras clínicas motoras e sensitivas, mesmo quando a corrente elétrica teve sua ação restrita à via sensitiva (Conforto, Kaelin-Lang *et al.*, 2002; Charlton, Ridding *et al.*, 2003; Ridding e Uy, 2003; Smith, Alon *et al.*, 2003; Rosenkranz e Rothwell, 2006; Conforto, Cohen *et al.*, 2007; Rosenkranz, Kacar *et al.*, 2007; Castel-Lacanal, Marque *et al.*, 2009; Conforto, Ferreira *et al.*, 2010).

Especificamente na FES foram encontrados resultados não conclusivos, embora semelhantes com as mesmas metodologias.

Kimberley *et al.*, (2004) estudaram 16 doentes com sequela de AVE, divididos em grupo placebo e grupo com o uso da FES, em estudo cego controlado. Avaliações realizadas com exames de imagem, antes e após 48 horas do final da terapia, apontaram um aumento de força em ambos os grupos, porém, uma melhora do padrão funcional global apenas no grupo tratamento. Embora não tenha havido um aumento no número ou nas áreas de ativação cortical, foi

observado um aumento na intensidade de ativação do giro pós central, córtex sensorial primário.

Outros estudos em doentes com lesões neurológicas centrais, e avaliados com o uso de TMS e MEP, também revelaram modificações no padrão de ativação cortical dos indivíduos submetidos à estimulação com corrente elétrica motora, cujos achados foram concomitantes às melhoras motoras observadas (Han, Jang *et al.*, 2003; Pitcher, Ridding *et al.*, 2003; Smith, Alon *et al.*, 2003; Kido Thompson e Stein, 2004; Hook e Grau, 2007; Everaert, Thompson *et al.*, 2010).

Estudos em roedores, empregando diferentes modelos de estimulação elétrica, podem auxiliar na compreensão dos mecanismos celulares, bioquímicos e da neuroplasticidade central envolvidos na melhora funcional encontrada em doentes submetidos à reabilitação. Os resultados dos estudos de campo com a FES poderão ser aplicados nas pesquisas sobre neurorestauração para trazer novos conhecimentos sobre as terapias de neurorreabilitação, neuroplasticidade e recuperação motora. Conhecendo os mecanismos celulares, moleculares e hebbianos da neuroplasticidade pode-se compreender melhor o efeito exato das terapias de estimulação elétrica periférica na reorganização cortical, o que contribuirá para o desenvolvimento de estratégias de reabilitação mais promissoras e fisiologicamente integradas à capacidade plástica endógena de recuperação funcional do SNC.

MÉTODOS

4. Métodos

Este é um estudo experimental, prospectivo, realizado no Laboratório de Neurocirurgia Funcional (LIM-45) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O LIM-45, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gerson Chadi, pertence à Disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia da FMUSP. Esse experimento foi realizado de acordo com as normas científicas da Comissão de Ética, Ensino e Pesquisa do hospital e segundo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados neste experimento ratos *Wistar* machos adultos saudáveis, pesando de duzentas a trezentas gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os ratos foram manipulados da mesma maneira padronizada no laboratório recebendo água e alimentação *ad libitum*. Os animais permaneceram em suas gaiolas individuais livres e seguiram o seguinte protocolo ao longo dos dias:

- Dia 0 (D0): os ratos foram submetidos à avaliação do comportamento motor do momento pré lesão (item 4.5).
- Dia 1 (D1): os ratos foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a indução da lesão isquêmica cortical (item 4.1).
- Dia 2 (D2): os ratos foram submetidos à avaliação do comportamento motor do momento pós lesão pré estimulação (item 4.5).
- Dia 3 (D3): os ratos foram submetidos ao implante cirúrgico dos eletrodos

de estimulação (item 4.4).

- Dia 4 (D4): os ratos foram submetidos à randomização nos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO. No mesmo dia iniciou-se o protocolo de estimulação, sendo o grupo ESTIMULADO submetido ao protocolo de estimulação elétrica e o grupo NÃO ESTIMULADO submetido a um protocolo de estimulação SHAM, descritos abaixo (item 4.6).

- Dia 5 (D5) ao dia 17 (D17): uso diário dos protocolos de estimulação (item 4.6).

- Dia 18 (D18): os ratos foram submetidos a avaliação do comportamento motor do momento pós lesão pós estimulação (item 4.5).

- Dia 19 (D19): morte dos animais (item 4.8).

4.1 O modelo de lesão isquêmica.

O modelo de lesão isquêmica escolhido foi o da isquemia fototrombótica induzida pelo Rose Bengal desenvolvido por Watson (1985) e aperfeiçoado por Grome (1988). Nessa técnica, o corante Rose Bengal é injetado intravenosamente e o escalpo é rebatido, mantendo a integridade da calota óssea. As áreas corticais a serem lesadas são posicionadas no foco de uma lâmpada de luz verde de comprimento de onda específico de 560 nm. A luz interage com o corante injetado, produzindo uma agregação plaquetária intravascular e conseqüente lesão tecidual isquêmica por trombose (Ginsberg e Busto, 1989; Traystman, 2003).

Em nosso estudo, usando como referência os parâmetros de lesão descritos por Shanina *et al.* (2006), Markgraf *et al* (1994), Lippoldt *et al.* (1993) e Watson

et al. (1985) e após uma revisão da literatura (tabela 2) as variáveis foram controladas para produzir lesões corticais incompletas, de morfologia circunferencial de no máximo 6 mm de diâmetro e que estivessem restritas à camada cortical poupando os territórios e estruturas abaixo do corpo caloso.

estudo	peso animal	comp onda	diâmetro	potência	conversão	marca	tipo	dose rose bengal
1 anil 2002	152-185	540 nm				L4887 Hamamatsu	xenon lamp	10 mg/ kg
2 przylek 2007	350-450	542 nm	5 mm	0.60 mW/mm quad 0.85 mW/mm quad	6 mW/cm qua 8.5 mW/cm qua	Photonics Japan	green laser	25 mg/ kg
3 maikraf 1983	300-400	562 nm		20 mW		Coherent Inc.	argon dye laser	0.67 ml/ kg 15 mg/ml sal
4 maikraf 1984	250-300	562 nm		20 mW		Coherent Inc.	argon dye laser	0.67 ml/ kg 15 mg/ml sal
5 cal 1988		568 nm		20 mW		Innova 301	krypton laser	20 mg/ kg 15 mg/ ml sal
6 persner 2001	200-300		5 mm	0.1 W/cm quad 150 W		Coherent Inc	halogen bulb, cold white light	20 mg/ kg
7 paul 2006	250-350	532 nm	1, 5 mm	2.5mW with 140 mW/cm quad			dide laser	0.133 mg/ 100 g 15 mg/ ml sal
8 hoif 2005		532 nm	2.4 mm	300mW/cm quad			dide-pumped solid laser	20 mg kg entros B
9 watson 1985	290-370	560 nm	4 por 6 mm	0.64W/cm quad			xenon lamp	1 mg/ 100g 7.5 mg/ ml sal
10 gadamski 2001	150-200			250 W			halogen bulb	40 mg/ kg 3% sal
11 zhao 2005	395-713		4 mm			Olympus	cold white	20 mg/ kg
12 brown 2004	245-320		8 mm	150 W		BICO	halogen	80 mg/ kg
13 lippoldt 1993	230-231		6 mm	150 W			dichroic halogen	160 mg/ ml sal 80 mg/ ml sal
14 ryck 1989	270-320		1 a 2 mm	150W mas com apenas 60% de pot		Schott	cold white light	160 mg/ ml sal varios
15 wood 1996	250-280		3 mm	300 W			xenon lamp	20 mg/ kg
16 kelly 2001		400-1200 nm	varios	100 W		Olympus	dichroic halogen	80 mg/ kg
17 abo 2001	160-230		8 mm	150 W		BICO	cold white	80 mg/ kg v 60µl/min 160mg / ml sal
18 shanina 2006	280 + 30		2.4 mm			Schott	cold white light	1.3 mg/ 100 g 1mg / 100 µl sal
19 buchremer 1996	290-310		1.5 mm	300 W		Schott	cold white light	1.3 mg/ 100 g
20 buchremer 1997	290-310		1.5 mm			Schott	cold white light	1.3 mg/ 100g
21 bidnon 1997	280-320		1.5 mm			Schott	cold white light	1.3 mg/ 100 g
22 grome 1988	300-350	wavelength and heat filter 570 nm Schott	3 mm	75 W		Zeiss	green light	1 ml 5mg / ml sal
23 dietrich 1986	250-300	560 nm	4 po 6mm				xenon lamp	0.133 ml/ 100g sal 7.5mg/ml sal
24 van reemps 1987			1 mm	150 W			halogen lamp	
25 lanens 1995			1 mm	150 W			halogen	
26 lee 1996			3.2 mm	300 W com 0.5 W/cm quad			cold white	
27 schroeter 2001			1, 5 mm	150 W				
28 boquillon 1992	25-30 mice	562 nm	2 mm	2 a 20 mW em 0.064 ou 0.16 0.32 ou 0.64 W/cm qu	64 ou 160 ou 320 ou 640 mW/cm qu	Innova 90 Coherent CR 599,21	argon laser	10 mg/kg
Range de potencia halogena: 0.1 ou 0. 64 ou 0.5 W/ cm quad com lamp de 75, 90, 150, 250, 300 W totais								
Range de potencia laser: 6 ou 8.5 ou 64 ou 140 ou 160 ou 300 ou 320 ou 640 mW/ cm quad com lamp de 2 ou 2.5 ou 20 mW totais.								

Tabela 2: Estudos da literatura que utilizaram a técnica da isquemia fototrombótica induzida pelo Rose Bengal em animais de pequeno porte. Revisão da literatura de 1985 a 2007 para comparação dos parâmetros metodológicos.

Para este modelo de isquemia fototrombótica, no D1, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xylazina e tricotomizados na região craniana. Cada animal recebeu pela cauda uma injeção intravenosa lenta do corante Rose Bengal (Sigma Chemical Co, Estados Unidos da América), na dose de 30mg/kg, diluído em solução salina a 20mg/ml. Imediatamente após a injeção, os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico, onde o escalpo foi rebatido expondo o bregma. Um cabo de fibra óptica circular com foco de 5mm de diâmetro que irradiava luz verde no comprimento de onda de 560 nm vinda da fonte de luz KL 1500 LCD (Schott Mainz, G), que é eletronicamente regulada para garantir 60% de sua potência máxima (Watson, Dietrich *et al.*, 1985; Lippoldt, Andbjer *et al.*, 1993) e que contém uma lâmpada halógena fria não filtrada de 150W (Osram Xenophot, Eichstätt, G) foi colocado sobre a área a ser irradiada, nunca encostando no tecido ósseo. A irradiação de luz permaneceu por 30 minutos (figuras 8, 9 e 10).

8

9

10

Figuras 8, 9 e 10. Animais sendo submetidos ao procedimento cirúrgico para a indução da lesão isquêmica cortical

Logo após a cirurgia, os animais retornaram às gaiolas de origem permanecendo em ambiente aquecido por 30 minutos.

4.2 A localização da lesão

As coordenadas estereotáticas para a localização da região a ser irradiada

seguiram os padrões descritos por Paxinos e Watson (1986) e compreenderam o território de irrigação da artéria cerebral média direita, nas áreas corticais direitas frontoparietais sensitivas e motoras primárias de pata dianteira e traseira, na posição de 1,5mm anterior até 3,5mm posterior ao bregma, justaposto a linha medial interhemisférica (figura 11). Esta região foi escolhida como localização da lesão, com o intuito de obtenção da perda da dorsiflexão unilateral.

Figura 11. Esquema didático da localização da lesão de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson (1986) que tem como referência "Zero" o bregma.

4.3 Confeção dos fios/eletrodos para a estimulação funcional periférica terapêutica.

Foi realizado no próprio laboratório a confecção de um fio/eletrodo de estimulação baseado em Miles (2001).

- Confeção dos eletrodos:

Os eletrodos de aço inoxidável foram confeccionados a partir de agulhas

hipodérmicas estéreis em aço inox de tamanho 30 X 7. Cada agulha foi cortada em duas partes iguais de 1,5 cm de comprimento e o cabo da agulha foi retirado dando origem então a eletrodos de 1,5 cm de comprimento, 0,7 mm de espessura, com lúmen pérvio para permitir a passagem do fio de sutura longitudinalmente por dentro do eletrodo (figura 12)

Figura 12. Confeção do eletrodo de estimulação à partir de uma agulha hipodérmica de aço inox. A= cabo da agulha. B-C = corte da agulha que dará origem ao eletrodo. D-E= corte e aberturas feitas para a passagem do fio de sutura.

- Confeção dos fios/eletrodos

Utilizamos fio condutor em cobre revestido de silicone isolante. Cada fio apresentava uma de suas extremidades soldada a um borne de conexão a ser conectado ao aparelho de eletroestimulação e a outra de suas extremidades soldada ao eletrodo de aço inoxidável descrito acima (figura 13). Todos os pontos de solda receberam cobertura de verniz isolante (Isalkyd SM - 206/AR, São Marco Ind. Com LTDA) para evitar a perda da corrente no ponto da solda.

Figura 13. Fio de estimulação soldado ao eletrodo de estimulação já com o fio de sutura em seu lúmen. J= solda

4.4 Cirurgia para o implante no animal dos fios/eletrodos de estimulação

Cada animal foi submetido ao implante cirúrgico do fio/eletrodo, através de técnica cirúrgica baseada na referências de Dow *et.al.*, (2004), Marqueste *et al.*, (2006) e Miles (2001).

No D3 os animais eram anestesiados com Ketamina e Xylazina e tricotomizados na região da pata esquerda e coluna torácica. A seguir era feita então uma incisão cirúrgica de 1 a 2 cm de comprimento na pele da região da pata traseira esquerda, longitudinalmente e paralela ao osso da tíbia. Era feita também outra incisão de 1 cm na pele de cobertura da coluna dorsal, na altura de T8. A seguir afastavam-se os planos musculares superficiais e a fáscia que recobre o músculo bíceps femoral, expondo o músculo tibial anterior.

Com uma pinça pequena curva, o músculo tibial era isolado anatomicamente, tendo sua borda anterior descolada do osso da tíbia e a borda posterior descolada do músculo extensores de dedos (figuras 14, 15 e 16).

Figura 14. Anatomia da pata traseira do rato. Fonte: Greene, EC. Anatomy of the rat. Philadelphia : American Philosophical Society, 1935 pag 93 (Greene, 1935).

Figura 15: Anatomia da pata traseira do rato. BFp= Bíceps femoral posterior. BFa= Bíceps femoral anterior.

Figura 16: Anatomia da pata traseira do rato. N= Nervo tibial. EDL= Músculo extensor de dedos. TA: Músculo Tibial Anterior.

Com outra pinça curva, o tecido subcutâneo da pele de toda a cobertura dorsal do animal era dissecado criando-se um túnel de passagem por dentro do tecido subcutâneo que unia o compartimento muscular exposto da pata à incisão na

pele dorsal na altura de T8. Através deste túnel o fio/eletrodo de estimulação era introduzido, mantendo-se a extremidade superior com o borne de conexão exteriorizado na pele dorsal na altura da vértebra T8 e a extremidade inferior com o eletrodo de aço exteriorizado na região da pata traseira esquerda.

O eletrodo de aço soldado ao fio de estimulação era então suturado com fio de nylon 6-0 (Paralon 6-0 NYC 601215) no ponto motor do ventre muscular do músculo tibial esquerdo (figura 17 e 18).

Figura 17. Eletrodo pronto para a sutura no músculo tibial. X= ponto de sutura no músculo tibial. L= eletrodo. TA= Músculo Tibial Anterior. G= Fio de sutura. J= solda. H= fio/eletrodo de condução da corrente.

Figura 18. Foto do Fio/eletrodo pronto para a sutura no músculo tibial.

Para a escolha do ponto de sutura, testava-se a capacidade de contração muscular do músculo tibial em 3 regiões do ventre, quais sejam, lateral direita, lateral esquerda e ponto médio. Para tal utilizamos um eletrodo caneta conectado ao aparelho de eletroestimulação ligado. O local a receber a sutura seria aquele onde conseguíssemos obter a contração muscular mais efetiva, ampla e isolada para a dorsiflexão do tornozelo, com uma intensidade de corrente elétrica padronizada fixa de 1mA. Após isso, o borne de conexão na extremidade superior do fio também era suturado externamente à pele dorsal do animal com fio de algodão. Além disso, também na altura de T8 era fixado à pele e subcutâneo um segundo borne de conexão, que funcionava como “terra” durante o período de estimulação. Finalizando realizava-se o fechamento dos planos musculares, subcutâneos e pele (figura 19).

Figura 19. Desenho do animal após a cirurgia de implante dos eletrodos. No maior aumento músculo tibial com o eletrodo suturado.

Logo após o implante cirúrgico e com os animais ainda anestesiados, testava-se o protocolo de estimulação elétrica escolhido (item 4.6) ligando-se os

bornes de conexão, já suturados à pele do animal, aos cabos de conexão e ao aparelho de eletroestimulação. Animais que não apresentassem o movimento de dorsiflexão ampla e visível de no mínimo 45 graus de amplitude de movimento (ADM), ou aqueles que apresentassem movimentação associada de outras articulações, ou ainda, que necessitassem de corrente elétrica com intensidade superior a 2mA para apresentarem contração muscular visível, eram descartados do estudo (figura 20).

Figura 20: Foto durante a testagem do implante cirúrgico do eletrodo de estimulação no músculo tibial para a reprodução do movimento de dorsiflexão com 2mA de intensidade de corrente

Logo após, os animais retornavam às gaiolas de origem permanecendo em ambiente aquecido por 30 minutos. Todos animais receberam antibioticoterapia com cefalotina sódica via intramuscular (IM), 40mg/Kg/dia, e terapia antiinflamatória IM, durante os 2 dias que se sucederam ao procedimento cirúrgico.

4.5 Avaliação do comportamento motor

A avaliação do comportamento motor aconteceu nos seguintes momentos:

- Dia 0 (D0): 24 horas antes da realização do procedimento cirúrgico de indução da lesão encefálica isquêmica, chamado de momento pré lesão.
- Dia 2 (D2): 24 horas após a realização do procedimento cirúrgico de indução da lesão isquêmica, cerca de 24 horas antes do implante dos eletrodos de estimulação, chamado de momento pós lesão pré estímulo.
- Dia 18 (D18): 24 horas após o último dia de estimulação, cerca de 24 horas antes da eutanásia, chamado de momento pós lesão pós estímulo.

As seguintes metodologias de avaliação foram aplicadas nos ratos, seguindo os protocolos de avaliação comportamental em animais com hemiparesia isolada localizada (Wood, Sopesen *et al.*, 1996; Shanina, Schallert *et al.*, 2006; Kleim, Boychuk *et al.*, 2007) :

1. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto por infravermelho e equipamento computadorizado. Esta análise é realizada utilizando-se um sistema automatizado de análise da atividade motora por emissão de feixe de luz infravermelho (Coulborn Instruments, Estados Unidos da América). Este sistema permite a análise rápida e simultânea da atividade motora global espontânea e de exploração do ambiente de diversos animais. Os ratos foram colocados individualmente em caixas de polietileno (37 X 17 X 30 cm) equipadas com um emissor de luz infravermelha e um sensor de calor na porção superior de sua parede. Os feixes de luz infravermelha são capazes de varrer todo o espaço interior da caixa e ao refletir no animal, proporcionam uma onda de calor que é captada pelo sensor de temperatura. Os parâmetros são detectados e registrados de acordo com o tempo de ocorrência. Os registros feitos antes da

lesão, 24 h após a lesão cirúrgica isquêmica e 14 dias após a estimulação elétrica diária, correspondem a uma tomada de 30 minutos cada um. A sala de experimentação tinha sua iluminação interrompida e era mantida sob condições constantes de temperatura e umidade. Seis parâmetros foram detectados e registrados de acordo com o tempo de ocorrência do movimento. O tempo sem movimentos (Dado 1) corresponde ao tempo no qual o animal não se moveu ou o fez por um tempo inferior a 0,01s durante o período de registro. O número de eventos sem movimentos (Dado 2) refere-se ao número médio destes eventos registrados durante o tempo de registro. O tempo de pequenos e grandes movimentos (Dado 3 e Dado 5 respectivamente) são definidos como a duração de movimentos contínuos nos intervalos de tempos de 0,01 a 0,1s e maiores que 1,0 segundo, respectivamente. O número de pequenos e grandes movimentos (Dado 4 e Dado 6 respectivamente) referem-se ao número médio de pequenos e grandes movimentos durante o tempo de registro. Os dados são transferidos para um computador e um programa específico fez a análise dos números. Os dados foram agrupados e as médias foram apresentadas.

Foi realizada também uma análise comportamental com o teste "Foot Fault Test" (Barth e Stanfield, 1990; Bona, Johansson *et al.*, 1997; Kleim, Boychuk *et al.*, 2007).

2. O "Foot Fault Test" é um teste motor comportamental utilizado para evidenciar a assimetria funcional motora entre hemicorpos, encontrada em animais com hemiparesia após lesão cortical unilateral das áreas sensitivomotoras. Pode

evidenciar diferenças entre os hemis corp os tanto para os membros dianteiros quanto para os membros traseiros. Para a realização do teste, os animais são colocados em uma plataforma suspensa de aproximadamente 40-60 cm de comprimento, que possui a superfície de apoio inferior vazada, com barras de apoio transversais para as patas de 0,4 cm de espessura e com espaços de 3 cm entre uma barra de apoio e outra. Ao caminhar pela plataforma os animais devem coordenar os passos de modo a evitar que o pé "caia" da barra de apoio por entre os espaços, o que é considerado um "erro" (figura 21).

Figura 21: Foto de um animal realizando o "Foot Fault Test"

Animais normais raramente cometem os erros de modo assimétrico em relação a seus hemis corp os, ou com mais de 10% de assimetria em relação aos lados direito e esquerdo. O cálculo do "Foot Fault Score" é feito analisando-se visualmente as diferenças no número de erros cometidos durante a caminhada contabilizando-se cada hemis corp o em separado através da fórmula abaixo:

$$\text{"Foot Fault Score"} = \frac{\text{Número de erros de passos do membro analisado}}{\text{Número total de passos do membro analisado}}$$

Em nosso estudo, no tempo D0, os animais foram colocados a caminhar na barra uma primeira vez antes do teste definitivo, como uma forma de treino pré teste. A segunda caminhada foi então gravada em vídeo e analisada posteriormente quanto ao número de erros cometidos para cada hemicorpo individualmente. O valor do "Foot Fault Score" de cada hemicorpo foi então comparado ao lado contralateral do mesmo animal e a diferença entre os hemicorpos em porcentagem foi o valor analisado estatisticamente entre os ratos e entre os grupos.

Todos os procedimentos comportamentais foram feitos colocando-se os animais sem a identificação de seus grupos de origem, para que a avaliação dos dados fosse feita de maneira que o examinador não identificasse a qual grupo cada animal pertencia. Apenas após a coleta dos dados, durante a análise estatística os animais foram identificados como pertencentes ao grupo NÃO ESTIMULADO ou ao grupo ESTIMULADO.

4.6 Protocolo da estimulação elétrica funcional terapêutica utilizado nos animais

Tendo em vista a grande controvérsia da literatura sobre quais parâmetros de frequência e intensidade de corrente são mais propícios a gerar modificações neuroplásticas centrais, utilizamos como parâmetros de estimulação os modelos de estimulação elétrica funcional em pequenos animais descritos na literatura para o treino motor do músculo tibial anterior parético, clinicamente representado pela perda da dorsiflexão (Siatras, Poumarat *et al.*, 1994; Daly, Marsolais *et al.*, 1996;

Pilyavskii, Maisky *et al.*, 2001; Dimitrijevic e Dimitrijevic, 2002; Dow, Cederna *et al.*, 2004; De Kroon, Ijzerman *et al.*, 2005; Dow, Faulkner *et al.*, 2005; Peckham e Knutson, 2005; Blum, Haun *et al.*, 2007). O protocolo de estimulação compreendeu o uso de estimulação elétrica periférica neuromuscular com corrente Farádica alternada, onda quadrada com tempo de contração de 3 segundos, duração de pulso de 300 ms, tempo de relaxamento de 10 segundos e intensidade de corrente elétrica compreendendo o menor valor de intensidade de corrente acima do limiar motor de contração muscular, capaz de obter um movimento articular e contração muscular em dorsiflexão visível a olho nu acima de 45 graus, mas nunca com intensidades de corrente acima de 2 mA. A determinação do limiar de contração e o valor da intensidade da corrente a ser utilizado foram ajustados individualmente, de rato para rato e sessão para sessão, a partir de 0,1mA, ascendentemente.

Portanto, esse estudo utilizou o protocolo de corrente com 0,1mA a 2mA de intensidade e 30 Hz de frequência de pulso. Cada animal foi estimulado diariamente, 1 X ao dia, por 14 dias, durante um período de 20 a 40 minutos no máximo, porém nunca além do tempo de fadiga muscular que foi definido como a diminuição da amplitude de movimento articular de dorsiflexão a inspeção visual (Siatras, Poumarat *et al.*, 1994; Pilyavskii, Maisky *et al.*, 2001; Dow, Faulkner *et al.*, 2005).

A sala de experimentação tinha sua iluminação interrompida e era mantida sob condições constantes de temperatura e umidade, sem a presença de pessoas ou outros estímulos ambientais. Todos os animais foram retirados de suas caixas individuais e levados a uma outra caixa própria para estimulação apenas no

momento que antecedia aos estímulos. Cerca de 48 horas após o implante do fio/eletrodo, iniciava-se o protocolo de estimulação elétrica com o uso do aparelho Vif FES 4 canais da Quark que consiste de 3 partes: o estimulador alimentado por energia elétrica, os eletrodos de superfície e os cabos de conexão (figura 22).

Figura 22. Foto do aparelho de estimulação elétrica funcional utilizado. Fonte: <http://www.quarkmedical.com.br/eletro.php>.

Os animais de ambos os grupos NÃO ESTIMULADO (ESTIMULAÇÃO SHAM) e ESTIMULADO seguiram o seguinte protocolo:

- Permaneciam por 10 minutos sozinhos em silêncio e escuro na caixa de estimulação para um período de adaptação em que ficaram livres para explorar a caixa.
- Após este período, gentilmente procedíamos a conexão dos cabos de estimulação do aparelho aos bornes suturados na pele dorsal do animal (figura 23)

Figura 23. Foto de um animal já conectado ao aparelho de eletroestimulação alguns minutos antes do início da corrente elétrica

- Os ratos eram então mantidos por mais um período de 10 minutos de adaptação em silêncio, livres para a marcha na caixa, mas agora já conectados pelos bornes dorsais ao aparelho de estimulação desligado.
- Após isso em ratos de ambos os grupos, os aparelhos eram ligados e ajustados os parâmetros da corrente.
- A partir daqui, para o grupo NÃO ESTIMULADO, apenas mantínhamos os animais dentro da caixa conectados ao aparelho ligado. O aparelho de estimulação destes animais também foi mantido ligado, produzindo o mesmo som que os do grupo tratamento, mas não liberava a corrente elétrica. A sua intensidade de corrente era mantida em ZERO, garantindo que estes animais foram tratados com as mesmas condições que os animais estimulados, mas foram submetidos a um modelo de estimulação SHAM (NÃO ESTIMULACÃO).
- Para os animais do grupo ESTIMULADO, o botão de controle da intensidade da corrente era então ajustado ascendente e progressivamente, de modo a liberar a corrente e produzir uma contração muscular de dorsiflexão que

fosse visível e olho nu, sem outra contração muscular associada, desde que a intensidade não ultrapassasse o valor de 2mA de intensidade.

- Os animais foram estimulados sempre aos pares, 2 a 2 concomitantemente em caixas separadas mas lado a lado na mesma sala, sendo o par de animais sempre composto por um animal do grupo NÃO ESTIMULADO (SHAM) e um outro animal do grupo ESTIMULADO. O tempo total de estimulação para todos os animais não excedeu 45 minutos. O tempo mínimo também foi sempre superior a 20 minutos em ambos os grupos. De 20 a 45 minutos, os animais permaneciam em estimulação até atingirem os 45 minutos totais ou até que apresentassem sinais de diminuição de amplitude de movimento articular (ADM) da dorsiflexão abaixo de 45 graus visível a olho nu. Este cuidado foi tomado para evitarmos dor, fadiga e/ou lesões musculares por hiperestimulação (Siatras, Poumarat *et al.*, 1994; Humm, Kozlowski *et al.*, 1998; Pilyavskii, Maisky *et al.*, 2001). Sempre que um animal do grupo ESTIMULADO chegasse ao fim de sua estimulação, fosse pelo tempo limite de 45 minutos, fosse pela diminuição da movimentação ativa/induzida de tornozelo, seu par NÃO ESTIMULADO tinha seu aparelho desligado e era também devolvido à gaiola de origem. Deste modo, ambos os animais eram retirados de suas caixas de estimulação juntos, ainda que apenas um deles demonstrasse esses sinais de diminuição de resposta à estimulação. Este cuidado foi tomado, pois assim foi possível parear o tempo de estimulação entre os grupos, já que o tempo de estímulo foi individualizado de rato para rato, de acordo com a tolerância clínica ao estímulo.

Uma avaliação prévia à coleta de dados foi realizada com um grupo de 5 animais para evidenciarmos histologicamente se o protocolo de implante e a estimulação escolhida foram efetivos e suficientemente capazes de alcançar o corno medular. Estes 5 animais de mesmo peso, mantidos sob os mesmos cuidados e submetidos aos mesmos procedimentos de confecção e implante de eletrodos descritos nos itens 4.4 foram sacrificados após duas horas e trinta minutos do uso de 1 dia de estimulação conforme protocolo descrito no item 4.6. Após isso, estes animais foram perfundidos com solução de paraformaldeído e tiveram suas medulas da região lombar L2 a L5 retiradas, congeladas, e seccionadas em cortes de 20 μ m de espessura. Estas secções foram imunomarcadas com a proteína FOS e analisadas à microscopia simples. O padrão regional da marcação FOS foi analisado e comparado com a literatura (Coggeshall, 2005). Comparações entre os lados direito não estimulado e o esquerdo estimulado da medulas dos ratos à microscopia simples das secções medulares lombares, evidenciou marcações positivas da FOS nos níveis L3 a L5, com marcação muito esparsa nas secções acima de L3 e sacrais, maior presença de marcação positiva no corno anterior do lado estimulado e pouca marcação do corno anterior do lado não estimulado (Wei e Zhao, 1995; Willcockson, Taylor-Blake *et al.*, 1995; Coggeshall, 2005) (Figuras 24 e 25).

Figura 24. Secção medular no nível L4-L5 mostrando o corno anterior e posterior estimulados, com importante marcação da proteína FOS em ambos os cornos anterior e posterior

Figura 25. Secção medular no nível L4-L5 mostrando corno anterior e posterior não estimulados, com assimetria de marcações da proteína FOS, com maior positividade no corno posterior

4.7 Os critérios de exclusão dos animais

- Seguindo os critérios do manual Definition of Pain and Distress and Reporting Requirements for Laboratory Animals: Proceedings of the Workshop Held June 22, 2000 do Committee on Regulatory Issues in Animal Care and Use, Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, foram excluídos os animais que apresentaram sinais de dor durante todo o período do protocolo, desde a cirurgia para obtenção da lesão até o final dos 14 dias de estimulação, mesmo nos períodos de descanso ou fora do ambiente de estimulação.

Este cuidado foi tomado para evitarmos o sofrimento dos animais e também pois a dor é um potente estimulante da neuroplasticidade central (Latremoliere e Woolf, 2009), o que poderia falsear os resultados encontrados no estudo .

- Foram também excluídos os seguintes animais:
 1. A cada dia de procedimento cirúrgico para a realização da isquemia encefálica (vide item 4.1) 10 animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Aqueles que não apresentaram a inspeção visual sinais de absorção do corante Rose Bengal nos tecidos periféricos de cauda, orelha, pele e esclera durante o procedimento cirúrgico para a obtenção da lesão isquêmica ou aqueles que apresentaram óbito durante o procedimento foram excluídos do estudo.
 2. Dentre aqueles animais que permaneceram inclusos no estudo após a cirurgia da isquemia, foram excluídos do estudo aqueles que não apresentaram um implante de eletrodo com as características padronizadas no item 4.4.
 3. Dentre os animais que receberam o implante do eletrodo, foram excluídos do estudo durante os 14 dias de estimulação, aqueles que apresentaram sinais de alterações clínicas, infecção, ruptura ou perda do implante, deiscência das suturas, perda do borne de conexão implantado dorsalmente, sinais de contração de pele ou muscular de outras regiões que não o músculo tibial, sinais de perda de corrente elétrica ao longo do circuito implantado (vide item 4.6).
 4. Foram excluídos aqueles animais que não apresentaram a contração

muscular em dorsiflexão isolada da articulação do tornozelo acima de 45 graus e com intensidade de corrente inferior a 2 mA no teste da corrente durante a cirurgia para o implante cirúrgico dos eletrodos de estimulação ou durante os 14 dias de estimulação diária.

5. Foram excluídos aqueles que não apresentaram lesão encefálica visível a inspeção visual durante o procedimento cirúrgico de sacrifício e retirada dos encéfalos descrita no item 4.8A (figura 26).
6. Após a retirada dos encéfalos foram também excluídos os animais que foram estimulados durante os 14 dias, portadores de lesão comprovada durante a retirada do encéfalo, mas que durante os 14 dias do período de estimulação tiveram seus animais pares de estimulação excluídos por um dos motivos descritos acima ou por motivo de óbito antes do fim do 14º dia de estimulação.

Figura 26: Foto do aspecto macroscópico da lesão encefálica, logo após a eutanásia do animal através da técnica de perfusão com paraformaldeído e a retirada do encéfalo.

4.8 Processamento Tecidual

A. Sacrifício dos animais e armazenamento dos cérebros:

Transcorrido um período de 14 dias de terapia de estimulação elétrica após a lesão isquêmica focal, cada rato foi anestesiado por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (3%, 100mg/Kg, Cristália/Brasil) e sacrificado através de perfusão transcardíaca com 70 ml de solução salina (0,9%) durante 30 segundos, continuada com 50ml de fixador a 4°C por 30 segundos e, a seguir, com 350 ml adicionais do mesmo fixador a 4°C durante 6 minutos. O fixador, modificado de Zamboni e De Martino (Gomide e Chadi, 1999), foi preparado com paraformaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,9). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e imediatamente pós fixados no mesmo fixador a 40°C por 90 minutos. Em seguida, mergulhados por 48 horas (com trocas a cada 24 horas) em solução de sacarose tamponada a 10% dissolvida em tampão fosfato (Merck, Brasil) para crioproteção e, então, congeladas pela imersão no líquido isopentano (Sigma, Estados Unidos da América), resfriado (-45°C) com gelo seco. Após o congelamento, os encéfalos foram armazenados em um congelador de baixa temperatura (-70°C) até o seccionamento. Todos os procedimentos cirúrgicos para o sacrifício dos animais foram feitos colocando-se os animais sem a identificação de seus grupos de origem, para que a retirada dos encéfalos fosse feita de maneira que o examinador não identificasse a qual grupo cada animal pertencia.

B. Seccionamento dos cérebros

O seccionamento dos cérebros foi realizado segundo um protocolo de amostragem sistemática previamente descrito por Chadi *et al.* (1993). Cerca de oito secções consecutivas coronais de 14µm de espessura (séries de 1 a 8) foram obtidas sistematicamente a cada 86 secções. Sete regiões nomeadas de A a G, em ordem rostro-caudal, foram então obtidas para a análise. A primeira amostra, região A, foi retirada no plano correspondente a borda mais anterior da lesão visível a olho nu, e a última amostra, região G, retirada no plano coronal cerca de 7,2 mm posterior ao primeiro plano de corte. A espessura dos cortes foi mantida constante. Estas séries foram então submetidas à análise imunohistoquímica.

4.9. Avaliação da extensão craniocaudal e da localização da lesão

A avaliação quanto a extensão craniocaudal e quanto a localização da lesão foram feitas de maneira descritiva, analisando-se o deslocamento das lesões no eixo anteroposterior dos encéfalos em cada animal. Para tal, uma série panorâmica de cada animal, contendo uma secção de cada região de A a G, corada com Violeta de Cresilo (CV) foi analisada à microscopia simples. Consideramos como borda anterior a secção mais cranial de A a G que continha a lesão e como borda posterior a secção da região mais caudal de A a G que continha a lesão. Determinamos assim, quais secções no eixo craniocaudal dos encéfalos continham as bordas anterior e posterior da lesão de cada animal. Considerando as coordenadas espaciais anatómicas descritas por Paxinos e Watson (1986) e o

bregma como referência zero, foi possível determinamos em qual localização do eixo craniocaudal descrito em Paxinos e Watson (1986) os planos de secções de A a G de cada animal se encontravam e também calcularmos em mm a distância total entre a borda anterior e a borda posterior de cada lesão. Isso nos possibilitou então compará-las com o local escolhido para a irradiação da luz verde utilizada na indução das lesões, já descrito acima no item 4.2 como 1,5 mm anterior e 3,5 mm posterior ao bregma. Foram determinadas portanto a localização das bordas e a extensão da lesão em mm no eixo craniocaudal dos encéfalos. Da mesma maneira determinamos quais animais tiveram suas lesões atingindo profundamente a borda superior do corpo caloso.

4.10. A avaliação imunohistoquímica dos encéfalos

O método imunohistoquímico utilizado foi descrito com detalhes por Chadi *et al.*, (1993) e Humpel *et al.*, (1994). As secções foram incubadas por 48 horas, sob agitação a 4°C com os marcadores histoquímicos descritos a seguir. O sistema de imunoperoxidase indireta empregando a avidina-biotina (ABC) (Vectastain, Estados Unidos da América) foi usado com a 3-3-diaminobenzidina tetrahydroclorito (DAB, Sigma, Estados Unidos da América) como cromógeno. Depois de lavadas em tampão fosfato, as secções foram incubadas com imunoglobulinas biotiniladas (Vector, Estados Unidos da América, diluído 1:200) por uma hora. Essas imunoglobulinas são obtidas de ovelha ou cavalo e produzidas contra anticorpos de animais em cujos anticorpos primários foram retirados. Os anticorpos foram diluídos em tampão fosfato contendo 0,3% Triton X-100. Numa

terceira incubação, a avidina e uma peroxidase biotinilada foram introduzidas (Vectastain, Vector, Estados Unidos da América; ambas diluídas 1:100) durante 45 minutos. A reação foi completada com 0,03% de DAB (Sigma) como cromógeno e H₂O₂ (Sigma) durante 6 minutos. Os procedimentos imunohistoquímicos foram uniformizados. Assim, foram considerados o ponto de saturação do DAB, a diluição do anticorpo primário longe da saturação e um tempo de incubação ajustado de tal modo que os elementos mais escuros das secções cerebrais estejam inferior a saturação (Zoli, Agnati *et al.*, 1990). Após as reações, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas. Os seguintes marcadores foram utilizados (anticorpos primários):

a) proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2): este marcador foi utilizado na identificação de ramos finos da árvore dendrítica dos neurônios. Foi utilizado o anticorpo monoclonal feito em camundongo, anti-MAP-2 (Sigma). A MAP-2 é uma proteína de alto peso molecular presente sobretudo em neurônios maduros. Pode ser considerada uma fosfoproteína específica do citoesqueleto dendrítico. Esta proteína tem papel fundamental na estabilidade dos microtúbulos da parede dendrítica, mantendo a integridade do citoesqueleto, participando da plasticidade dendrítica e da formação de novas sinapses (figuras 27 e 28) (Dehmelt e Halpain, 2004). Ao mesmo tempo é uma das proteínas do citoesqueleto mais vulneráveis a lesões. Por isso, a imunohistoquímica da MAP-2 é considerada um dos principais marcadores de lesão cerebral aguda e é considerada hoje uma proteína fundamental na ocorrência de plasticidade neuronal (Johnson e Jope, 1992; Dehmelt e Halpain, 2004; Farah e Leclerc, 2008).

Figura 27: Organização do citoesqueleto durante o processo de arborização dendrítica. Fonte: (Dehmelt e Halpain, 2004).

Figura 28: Organização do citoesqueleto durante o processo de arborização dendrítica. Fonte: (Dehmelt e Halpain, 2004).

b) neurofilamento (NF-200): esse marcador foi utilizado na identificação do citoesqueleto axonal. Foi empregado o anticorpo monoclonal feito em camundongo, anti-NF-200 (Sigma). O NF-200 é uma proteína de alto peso molecular que embora também possa ser encontrada em dendritos, é considerada uma proteína específica do citoesqueleto axonal (Lariviere e Julien, 2004). O NF-200 está envolvido nos processos de formação e crescimento axonal bem como na estabilização e maturação das fibras e conexões axonais recém formadas. A imunohistoquímica dos neurofilamentos tem sido utilizada como um marcador dos processos de degeneração axonal frente a diversos tipos de lesão, como a isquemia ou a farmacotoxicidade (Gotow, 2000; Sánchez, Hassinger *et al.*, 2000; Lariviere e Julien, 2004; Cuthill, Fowler *et al.*, 2006).

4.11 Análise quantitativa das imunomarcações

Com a utilização do sistema KS-400 (Zeiss, Alemanha) do LIM-45 foram então realizados os procedimentos de discriminação dos valores médios dos tons de cinza (MGV), do erro padrão da média (s.e.m.) e dos valores médios dos tons de cinza obtidos da substância branca desprovida de marcação específica. Os valores de tons de cinza mais escuros que o *background* MGV-3 s.e.m. foram considerados como marcação específica e, deste modo, discriminados. Os MGV específicos (sp) foram definidos como a diferença entre os MGV do *background* e os MGV dos perfis discriminados. Os MGV da lâmina foram mantidos constantes. Este procedimento foi repetido para cada secção, no intuito de corrigir as medidas de cada marcação específica em relação aos valores do seu próprio *background*. Esta metodologia foi utilizada nas medidas dos imunomarcadores nas diversas áreas estudadas.

Campos de áreas definidas foram amostrados de regiões específicas das secções, dependendo das imunorreatividades a serem quantificadas. Foram quantificadas as seguintes regiões de cada animal (figuras 27 e 28):

- área do córtex frotontoparietal preservado adjacente e lateral à lesão no hemisfério lesado.
- área do córtex frontoparietal preservado adjacente e lateral à área homóloga à lesão no hemisfério não lesado.
- área do corpo caloso, na região interhemisférica.

4.12 Análise estatística

Toda a casuística, os dados obtidos na avaliação do comportamento motor bem como os dados obtidos na análise das imunorreatividades obtidas dos preparados dos grupos estudados foram submetidos a análise estatística. Todos os dados foram submetidos a testagem da normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e a testes estatísticos paramétricos para as variáveis que apresentaram uma distribuição normal e testes não paramétricos para as variáveis com distribuição não Gaussiana. A descrição das amostras compreendeu a obtenção do número de animais (N ou n), dos valores de média, mediana e desvio padrão (d.p.) das variáveis estudadas. O valor de p considerado significativo foi $p < 0,05$ (Timm, 1975; Rosner, 1986).

4.12.1 Análise da extensão craniocaudal e da localização da lesão

Foi utilizado o teste t para a comparação dos grupos quanto a extensão da lesão e localização da mesma em relação ao eixo craniocaudal do animal, uma vez que todos os dados apresentaram uma distribuição normal. Os dados referentes ao acometimento do corpo caloso foram calculados em porcentagens de acometimento. Todas as análises foram realizadas com a utilização do *software* estatístico Minitab, versão 15.1.

4.12.2 Análise da comparação do tempo de estimulação ao longo dos 14 dias

Foi utilizado um modelo de Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores. Para a comparação entre os grupos, também foi utilizado o teste t para amostras independentes. Todas as análises foram realizadas com a utilização do *software* estatístico Minitab, versão 15.1.

4.12.3 Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto por infravermelho.

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e medianas. Para averiguar o comportamento dos grupos em relação as condições estudadas fez-se uso da técnica ANOVA Análise de Variância com medidas repetidas. O software utilizado para os cálculos foi o SPSS 15.0 for Windows.

4.12.4. Análise do "Foot Fault Test"

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e medianas. Para averiguar o comportamento dos grupos em relação as condições estudadas fez-se

uso do Teste não-paramétrico de Friedman e do Teste não-paramétrico de Mann-Whitney uma vez que o dados apresentaram uma distribuição não Gaussiana. O software utilizado para os cálculos foi o SPSS 15.0 for Windows.

4.12.5 Análise da imunomarcção do MAP 2

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias e desvios-padrão e medianas. Para as comparações entre os hemisférios corticais dentro dos grupos foi utilizado o Teste T de Student pareado. Para a comparação dos hemisférios e quanto ao corpo caloso entre os grupos foi utilizado o Teste T de Student não pareado. O software utilizado para os cálculos foi o SPSS 15.0 for Windows.

4.12.6 Análise da imunomarcção do NF-200

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias e desvios-padrão e medianas. Para as comparações entre os hemisférios corticais dentro dos grupos foi utilizado o Teste não-paramétrico de Wilcoxon. Para a comparação dos hemisférios e quanto ao corpo caloso entre os grupos foi utilizado o Teste não-paramétrico de Mann-Whitney uma vez que o dados apresentaram uma distribuição não Gaussiana. O software utilizado para os cálculos foi o SPSS 15.0 for Windows.

4.12.7 Correlação estatística entre os valores encontrados nas imunohistoquímicas e na avaliação funcional

Para a correlação dos valores encontrados na imunohistoquímica com os valores encontrados no "Foot Fault Test" foi realizado o Teste de correlação de Spearman. O valor de r calculado como significativo para o $p < 0,05$ foi o de $r = 0,51$.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Casuística do animais

Os valores da casuística da amostra estão apresentadas na tabela 3.

Peso	Grupo	Borda Anterior	Borda Posterior	Comprimento total	Destruição do limite superior do corpo caloso
215	Não Estimulado	-1,5	3,3	4,8 mm	Não
300	Estimulado	-1,7	3,3	5 mm	Não
296	Não Estimulado	-1,5	2,1	3,6 mm	Não
264	Estimulado	-1,5	3,3	4,8 mm	Não
219	Não Estimulado	-2,2	0,9	3,1 mm	Não
235	Estimulado	-1,5	3,3	4,8 mm	Sim
297	Não Estimulado	-1,7	3,3	5 mm	Não
305	Estimulado	-1,7	3,3	5 mm	Sim
243	Não Estimulado	-1,5	3,3	4,8 mm	Não
288	Estimulado	-0,3	4,5	4,8 mm	Não
253	Não Estimulado	-1,5	4,5	6 mm	Sim
250	Estimulado	-1,5	3,3	4,8 mm	Não
273	Não Estimulado	-1,7	3,3	5 mm	Não
262	Estimulado	-2,2	2,1	4,3 mm	Não
260	Não Estimulado	-1,7	3,3	5 mm	Não
301	Estimulado	excluído	excluído	excluído	excluído

Tabela 3. Casuística das amostras utilizadas no estudo. As bordas anterior e posterior são definidas em relação ao bregma de acordo com Paxinos e Watson (1986), sendo os valores negativos correspondentes ao posicionamento anterior e os valores positivos correspondentes ao posicionamento posterior ao bregma, em um eixo craniocaudal.

5.1.2. Animais excluídos do estudo

Foram realizados ao todo 6 dias de procedimento cirúrgico para a indução da lesão isquêmica, com inclusão de 10 animais por dia (vide item 4.1). Aqueles

animais que não apresentaram sinais de absorção do corante Rose Bengal nos tecidos periféricos de cauda, orelha, pele e esclera durante o procedimento cirúrgico para a obtenção da lesão isquêmica ou aqueles que apresentaram óbito durante o procedimento (ao todo 11 animais, cerca de 18,33%) foram excluídos do estudo. Dentre aqueles animais que permaneceram inclusos no estudo após a cirurgia da isquemia (total de 49), foram excluídos do estudo um total de 13 (26,54%) animais que não apresentaram um implante de eletrodo viável e com as características padronizadas no estudo (vide item 4.4). Dentre os 36 animais que receberam o implante do eletrodo viável, foram excluídos do estudo durante os 14 dias de estimulação, um total de 16 (44,45%) animais que apresentaram sinais de alterações clínicas, dor, óbito, alterações referente a qualidade do implante ou alterações referentes a padronização do estímulo (vide item 4.6). Dentre os 20 animais que foram submetidos ao procedimento cirurgico de retirada dos encéfalos, foram excluídos um total de 2 (10%) animais que não apresentaram a inspeção visual, sinais de lesão isquêmica no encéfalo (vide item 4.8). Foram também excluídos mais 2 (11,12%) animais que foram estimulados durante os 14 dias, portadores de lesão comprovada durante a retirada do encéfalo, mas que durante os 14 dias do período de estimulação tiveram seus animais pares de estimulação excluídos por um dos motivos descritos acima (tabelas 4 e 5).

	animais portadores da isquemia de cada 10 animais inclusos no estudo	animais submetidos ao implante do eletrodo	animais que receberam 14 dias totais de estímulo	animais que realizaram a cirurgia de retirada dos encéfalos	encéfalos utilizados para a estatística após a retirada do encéfalo
Data 1 total inicial de 10 animais	5	2	2	2	2
Data 2 total inicial de 10 animais	9	7	4	3	2
Data 3 total inicial de 10 animais	8	6	2	2	2
Data 4 total inicial de 10 animais	8	7	5	4	4
Data 5 total inicial de 10 animais	9	7	4	4	4
Data 6 total inicial de 10 animais	10	7	3	3	2

Tabela 4: Animais excluídos durante o estudo (vide item 4.7).

	para lesão	para o implante	para a estimulação	para a retirada do encéfalo	Após a retirada do encéfalo
total de animais inclusos inicialmente	(60) 100%	(49) 100%	(36) 100%	(20) 100%	(18) 100%
total de animais utilizados	(49) 81,66%	(36) 73,46%	(20) 55,55%	(18) 90%	(16) 88,88%
total de animais excluídos	(11) 18,33%	(13) 26,54%	(16) 44,45%	(2) 10%	(2) 11,12%

Tabela 5: Animais excluídos durante o estudo (vide item 4.7).

5.1.1 Extensão craniocaudal e localização da lesão

5.1.2 Extensão craniocaudal

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto a extensão craniocaudal total da lesão ($p=0,72$). A tabela 6 abaixo mostra as medidas resumo da extensão craniocaudal total da lesão por grupo (NÃO ESTIMULADO E ESTIMULADO) bem como em todos os animais avaliados.

		extensão craniocaudal total (mm)				
	N	média	d.p.	mínimo	mediana	máximo
NÃO ESTIMULADO	8	4,7	0,9	3,1	4,9	6,0
ESTIMULADO	7	4,8	0,2	4,3	4,8	5,0
total	15	4,7	0,7	3,1	4,8	6,0

Tabela 6. Extensão craniocaudal total das lesões em mm sendo N, número de animais e d.p. o desvio-padrão da média. Os valores mínimo, máximo e da mediana são apresentados.

Cerca de 73,3% dos animais apresentaram lesões entre 4,8 e 5 mm de extensão craniocaudal total (tabela 7).

N de animais	Comprimento Total da lesão	% de animais
1	6 mm	6,67%
5	5 mm	33,33%
6	4,8 mm	40%
1	4,3 mm	6,67%
1	3,6 mm	6,67%
1	3,1 mm	6,66%

Tabela 7. Porcentagem do número de animais e o comprimento das lesões em mm, sendo N o número de animais.

5.1.3 Localização da lesão

Também não foi observada diferença estatística entre os grupos com relação à localização da borda anterior ($p=0,47$) bem como da borda posterior ($p=0,52$). As tabelas 8 e 9 abaixo mostram as estatísticas resumo em cada grupo e no total dos animais avaliados. As figuras de 29 a 32 são ilustrativas quanto as bordas lesionais.

		borda anterior (mm)					
	N	méd ia	d.p.	Máximo	mediana	Mínimo	p
NÃO ESTIMULADO	8	-1,7	0,2	-2,2	-1,6	-1,5	0,47
ESTIMULADO	7	-1,5	0,6	-2,2	-1,5	-0,3	
total	15	-1,6	0,4	-2,2	-1,5	-0,3	

Tabela 8.: Localização da borda anterior da lesão em mm, sendo N número de animais, p o nível de significância do teste t e d.p. o desvio-padrão da média. Os valores de média, mínimo, máximo, da mediana e de p são apresentados. Os valores negativos representam o posicionamento anterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal. Valores positivos representam o posicionamento posterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal.

		borda posterior (mm)					
	N	média	d.p.	mínim o	mediana	máxim o	p
NÃO ESTIMULADO	8	3,0	1,1	0,9	3,3	4,5	0,52
ESTIMULADO	7	3,3	0,7	2,1	3,3	4,5	
total	15	3,1	0,9	0,9	3,3	4,5	

Tabela 9: Localização da borda posterior da lesão em mm, sendo N número de animais, p o nível de significância do teste t e d.p. o desvio-padrão da média.

Os valores de média, mínimo, máximo, da mediana e de p são apresentados. Os valores negativos representam o posicionamento anterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal. Valores positivos representam o posicionamento posterior ao bregma no eixo craniocaudal do animal.

Figura 29. Esquema de corte sagital do encéfalo do animal, ilustrando, em vermelho, a região da lesão observada em um dos ratos. As bordas anterior e posterior estão, respectivamente a 1,7 mm anterior e 3,3 mm posterior ao bregma.

Figura 30: Foto de um corte coronal do cérebro de um animal submetido à lesão fototrombótica e contrainjetado com Violeta de Cresilo, mostrando a borda anterior da lesão.

Figura 31: Fotografia em maior aumento da mesma região, detalhando o limite entre o córtex lesado e o tecido normal adjacente à borda da lesão

Figura 32: Foto de secção coronal do cérebro do rato submetido à lesão fototrombótica. Limite entre o córtex lesado e o tecido normal adjacente na borda da lesão evidenciando neurônios marcados com a proteína FOS.

5.1.4. Acometimento da borda do corpo caloso

As lesões foram avaliadas ainda quanto ao comprometimento ou não, da borda do corpo caloso. No total, foram observados 3 casos em que houve envolvimento da borda do corpo caloso, sendo 1 animal no grupo NÃO ESTIMULADO (12,5%) e 2 no grupo ESTIMULADO (28,6%), não sendo observada diferença estatística entre os grupos ($p=0,56$). Os dados estão expostos na tabela 10.

acometimento da borda do corpo caloso	NÃO ESTIMULADO N (%)	ESTIMULADO N (%)	p
sim	1 (12,5)	2 (28,6)	0,56
não	7 (87,5)	5 (71,4)	
total de animais	8 (100)	7 (100)	

Tabela 10. Presença de acometimento da borda superior do corpo caloso para os grupos de animais dos grupos ESTIMULADO E NÃO ESTIMULADO, sendo N o número de animais e p o nível de significância para o teste t.

5.1.5. Tempo de estimulação

Não foi observado diferença estatística entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO quanto ao tempo de estimulação nos 14 dias do estudo ($p=0,98$), porém foi detectado um aumento progressivo do tempo de estimulação de D1 até D14 em ambos os grupos ($p<0,001$). Com relação ao tempo total de estimulação (soma de todos os tempos de D1 até D14) também não foi

observado diferença estatística entre os grupos ($p=0,93$), sendo que os valores da média e desvio padrão (d.p.) no grupo NÃO ESTIMULADO foram de $391,8 \pm 8,1$ e no grupo ESTIMULADO $391,4 \pm 9,4$. A tabela 11 abaixo mostra os valores de média e desvio padrão do tempo de estimulação dos animais em minutos, nos momentos D1, D7 e D14, bem como a soma do tempo total de estimulação durante os 14 dias para os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

	NÃO ESTIMULADO (N=8)	ESTIMULADO (N=8)
dia	média +- d.p.	média +- d.p.
D1	$21,9 \pm 2,5$	$22,7 \pm 2,1$
D7	$28,9 \pm 2,1$	$28,9 \pm 2,5$
D14	$37,3 \pm 1,3$	$37,4 \pm 1,5$
total (D1 à D14)	$391,8 \pm 8,1$	$391,4 \pm 9,4$

Tabela 11. Valores de média e desvio padrão (d.p.) do tempo total de estimulação realizado em cada animal no D1, no D7 e no D14, assim como os valores totais obtidos entre os períodos D1 a D14, sendo N o número de animais.

5.2 Análise do comportamento motor

5.2.1 Comportamento motor espontâneo em campo aberto por infravermelho

Os parâmetros motores relacionados ao teste a saber, de tempo sem movimentos (Dado 1), número de eventos sem movimentos (Dado 2), tempo de pequenos e grandes movimentos (Dado 3 e Dado 5 respectivamente) e o número

de pequenos e grandes movimentos (Dado 4 e Dado 6 respectivamente) apresentaram distribuição normal nos três momentos analisados.

Através da análise de variância com medidas repetidas observamos que os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO não apresentaram diferença de comportamento e não diferiram entre si nas médias analisadas nos tempos pré lesão, pós lesão pré estímulo e pós lesão pós estímulo, em nenhum dos seis dados avaliados ($p > 0,05$ em todos os momentos para todos os seis dados analisados). No entanto houve alteração temporal significativa dos momentos avaliados nos dois grupos ($p < 0,05$ para os seis dados avaliados). O momento pré lesão diferiu significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$ em ambos os grupos nos seis dados avaliados) mas não diferiu do momento pós lesão pós estímulo ($p > 0,05$ em ambos os grupos nos seis dados avaliados). Já o momento pós lesão pré estímulo diferiu significativamente dos outros dois momentos ($p < 0,05$) em ambos os grupos nos seis dados avaliados (figuras de 33 a 38).

Dado 1

GRUPO=1						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR11	8	1288	243,84348	1358	860,00000	1523
VAR12	8	1584	109,81990	1603	1425	1734
VAR13	8	1298	227,72540	1313	817,00000	1593
GRUPO=2						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR11	8	1258	245,77109	1269	817,00000	1645
VAR12	8	1584	164,79202	1576	1267	1788
VAR13	8	1348	182,63151	1373	973,00000	1577

Figura 33: Dado 1 - Tempo sem Movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 11 o momento pré lesão, VAR 12 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 13 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Maximum os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, o momento pré lesão difere estatisticamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,001$ para ambos os grupos) e não difere do momento pós lesão pós estímulo. ($p = 0,48$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,001$) em ambos os grupos.

Dado 2

GRUPO=1						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR21	8	337,12500	111,47766	354,00000	196,00000	507,00000
VAR22	8	209,87500	58,71101	209,50000	117,00000	284,00000
VAR23	8	339,62500	97,95033	357,00000	145,00000	453,00000
GRUPO=2						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR21	8	305,37500	83,22592	288,50000	200,00000	453,00000
VAR22	8	222,37500	121,70331	235,50000	46,00000	404,00000
VAR23	8	297,12500	82,83277	300,50000	174,00000	427,00000

Figura 34: Dado 2 - Número de eventos sem movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 21 o momento pré lesão, VAR 22 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 23 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Maximum os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, o momento pré lesão difere estatisticamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$ em ambos os grupos) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p = 0,93$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,05$) Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Dado 3

GRUPO=1						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR31	8	112,37500	46,11457	100,00000	67,00000	200,00000
VAR32	8	48,25000	10,19454	52,50000	32,00000	60,00000
VAR33	8	74,12500	27,01554	76,00000	25,00000	111,00000
GRUPO=2						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR31	8	64,00000	20,69506	69,00000	39,00000	91,00000
VAR32	8	51,37500	30,51902	54,50000	3,00000	92,00000
VAR33	8	65,75000	19,12926	64,50000	33,00000	91,00000

Figura 35: Dado 3 - Tempo de pequenos movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 31 o momento pré lesão, VAR 32 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 33 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Maximum os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, o momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$ em ambos os grupos) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p = 0,06$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,05$ em ambos os grupos). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Dado 4

GRUPO=1						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR41	8	245,25000	38,22770	253,00000	183,00000	291,00000
VAR42	8	152,25000	36,47994	164,00000	86,00000	198,00000
VAR43	8	203,75000	64,36670	234,50000	85,00000	263,00000
GRUPO=2						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR41	8	196,62500	48,65311	198,50000	100,00000	260,00000
VAR42	8	156,25000	76,91507	186,50000	41,00000	226,00000
VAR43	8	182,75000	43,97970	184,50000	103,00000	242,00000

Figura 36: Dado 4 - Número de pequenos movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 41 o momento pré lesão, VAR 42 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 43 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Maximum os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, observamos que há alteração significativa dos momentos avaliados nos dois grupos. O momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p = 0,14$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Dado 5

GRUPO=1						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR51	8	367,00000	260,89516	248,50000	131,00000	840,00000
VAR52	8	167,87500	102,90278	149,50000	25,00000	320,00000
VAR53	8	413,37500	179,49607	383,50000	182,00000	772,00000
GRUPO=2						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR51	8	414,50000	227,23493	406,00000	111,00000	772,00000
VAR52	8	164,75000	140,86645	151,00000	9,00000	441,00000
VAR53	8	340,87500	196,06008	300,00000	162,00000	736,00000

Figura 37: Dado 5 - Tempo de grandes movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 51 o momento pré lesão, VAR 52 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 53 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Maximum os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, observamos que há alteração significativa dos momentos avaliados nos dois grupos. O momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pré estímulo ($p < 0,05$) e não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p = 0,84$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO nos três momentos avaliados.

Dado 6

GRUPO=1						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR61	8	154,00000	64,89772	133,00000	90,00000	269,00000
VAR62	8	70,87500	37,17694	61,00000	19,00000	124,00000
VAR63	8	152,62500	51,45577	167,00000	68,00000	237,00000
GRUPO=2						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
VAR61	8	137,37500	59,23546	117,50000	68,00000	237,00000
VAR62	8	73,87500	61,27558	75,50000	6,00000	199,00000
VAR63	8	127,87500	52,12468	129,00000	74,00000	213,00000

Figura 38: Dado 6 - Numero de grandes movimentos. Análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto pelo infravermelho, sendo Grupo 1 o grupo NÃO ESTIMULADO, grupo 2 o ESTIMULADO, VAR 61 o momento pré lesão, VAR 62 o momento pós lesão pré estímulo, VAR 63 o momento pós estímulo, N o número de animais, Mean a média dos valores encontrados, Std Dev o desvio padrão, Median a mediana dos valores e Minimum e Máximo os valores mínimos e máximos respectivamente. Em ambos os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO, Observamos que há alteração significativa dos momentos avaliados nos dois grupos. O momento pré lesão difere significativamente do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,001$) e não difere do momento pós lesão pré estímulo ($p = 0,74$). O momento pós lesão pré estímulo difere do momento pré lesão e do momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,001$).

5.2.2. Foto Fault Test

Na análise da variação temporal intra grupos, nos três momentos estudados com o uso do Teste não-paramétrico de Friedman os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO apresentaram diferenças específicas ao longo dos momentos. No grupo NÃO ESTIMULADO o momento pré lesão diferiu significativamente dos outros dois momentos ($p < 0,05$). O momento pós lesão pré estímulo não foi diferente do momento pós lesão pós estímulo ($p > 0,05$). Já o grupo ESTIMULADO, que também apresentou alteração ao longo dos momentos na avaliação da variação temporal, o momento pós lesão pré estímulo diferiu significativamente dos outros dois momentos ($p < 0,05$) mas o momento pré lesão não difere do momento pós lesão pós estímulo ($p > 0,05$). Quando os valores de compração entre os grupos das medianas dos momentos analisados e comparados com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO não apresentam diferença significativa nos momentos pré lesão ($p = 0,32$) e pós lesão pré estímulo ($p = 0,13$) mas diferem no momento pós lesão pós estímulo ($p < 0,001$), onde o grupo NÃO ESTIMULADO apresenta valor significativamente maior de assimetria de erros que o grupo ESTIMULADO (tabela 12 e figura 39).

Grupo	Momento	n	Média	dp	Mediana	Mínimo	Máximo
NÃO ESTIMULADO	Pré lesão	8	2,08	7,38	4,17	-8,33	8,33
	Pos lesao pré estímulo	8	23,96	8,26	25,00	8,33	33,33
	Pos lesão pós estímulo	8	21,88	4,31	22,00	16,67	25,00
ESTIMULADO	Pré lesão	8	-1,04	2,94	0,00	-8,33	0,00
	Pos lesao pré estímulo	8	17,71	6,96	16,67	8,33	25,00
	Pos lesão pós estímulo	8	5,21	6,20	4,17	0,00	16,67

Tabela 12: Valores dos resultados do "Foot Fault Test. Valores das porcentagens de assimetria entre os 2 hemisferos dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo n o número de animais e dp o desvio-padrão. Os valores de média, mediana, mínimos e máximos estão apresentados. Os grupos não apresentam diferenças estatísticas nos momentos pré lesão ($p=0,32$) e pós lesão pré estímulo ($p=0,13$) mas diferem no momento pós lesão pós estímulo ($p<0,001$).

Figura 39. Gráfico com os valores de mediana e desvio-padrão do "Foot Fault Test. Valores das porcentagens de assimetria entre os 2 hemisferos dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO. Os grupos não apresentam diferenças estatísticas nos momentos pré lesão ($p=0,32$) e pós lesão pré estímulo ($p=0,13$) mas diferem no momento pós lesão pós estímulo ($p<0,001$).

5.3 Análise Imunohistoquímica

5.3.1 MAP-2

5.3.1.1 Quanto a avaliação do córtex motor adjacente à lesão

5.3.1.1.1 Análise da área de marcação Em relação a imunorreatividade da MAP-2, no grupo NÃO ESTIMULADO encontramos diferença estatística entre a área de imunomarcação do córtex preservado e adjacente à lesão do hemisfério lesado em comparação à região equivalente do hemisfério contralateral não lesado. As médias dos valores encontrados no hemisfério não lesado foram estatisticamente maiores que os valores encontrados no hemisfério lesado ($p < 0,05$). Já no grupo ESTIMULADO a área de imunomarcação da MAP-2 do hemisfério lesado não diferiu do hemisfério não lesado ($p = 0,20$). Não houve diferença entre os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO em relação à média de área da imunomarcação da MAP-2 do hemisfério não lesado ($p = 0,42$) mas houve diferença significativa entre os grupos em relação às médias de área imonumarcada do hemisfério lesado. O grupo ESTIMULADO apresentou valores maiores que grupo NÃO ESTIMULADO no hemisfério lesado ($p < 0,05$). (figuras 40 e tabela 13).

Figura 40: Gráfico das médias e desvio padrão da área de imunomarcação da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

		Hemisférios			
		Não Lesado		Lesado	
grupos		média	d.p.	média	d.p.
	NÃO ESTIMULADO	500,10	200,78	180,97	100,99
	ESTIMULADO	480,53	180,06	400,95	120,84

Tabela 13: Valores das médias e desvio padrão da área de imunomarcação da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Foi realizada também a correlação estatística dos valores da área da MAP-2 cortical do hemisfério lesado com os valores encontrados no "Foot Fault Test" de ambos os grupos. Para tal realizamos o Teste de correlação de Spearman. O valor de r calculado como significativo e de correlação moderada para o $p < 0,05$ foi o de $r > 0,51$. Nesta avaliação encontramos o resultado de $r = -0,76$ demonstrando que os valores encontrados na marcação da MAP-2 no córtex lesado de ambos os grupos, tem correlação estatística positiva aos valores encontrados no "Foot Fault Test" de maneira inversamente proporcional (figura 41).

Figura 41: Gráfico da correlação estatística entre os valores da área da MAP-2 cortical do hemisfério lesado com os valores encontrados no "Foot Fault Test" de ambos os grupos pelo Teste de correlação de Spearman.

5.3.1.1.2 Análise da intensidade de marcação

Observamos que não houve diferença de comportamento entre os dois grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO em relação as médias de

intensidade de marcação do córtex lesado ($p=0,32$) ou do córtex não lesado ($p=0,35$). Além disso, tanto no grupo ESTIMULADO como no grupo NÃO ESTIMULADO a intensidade de marcação do córtex lesado não diferiu do córtex não lesado em ambos os grupos ($p=0,32$ e $p=0,38$) (figura 42 tabela 14).

Figura 42: Gráfico com as médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

		Hemisférios			
		Não Lesado		Lesado	
grupos	NÃO ESTIMULADO	média	d.p.	média	d.p.
	ESTIMULADO	16,52	8,82	14,94	7,39
	ESTIMULADO	18,95	14,01	17,37	12,21

Tabela 14: Valores de médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

5.3.1.2 Quanto a avaliação do corpo caloso

5.3.1.2.1 Análise da área e intensidade de marcação

Nas regiões de corpo caloso, não houve diferença de comportamento entre os dois grupos. Não houve diferença estatística entre ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO em relação as médias de área ($p=0,36$) nem mesmo em relação a intensidade de marcação ($p=0,53$) (figuras 43 e 44 e tabela 15 e 16) .

Figura 43: Gráfico com as médias e desvio padrão da area de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Grupo	média	d.p
NÃO ESTIMULADO	449,79	446,43
ESTIMULADO	281,54	226,54

Tabela 15: Valores de médias e desvio padrão da área de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 .

Figura 44: Gráfico com as médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

Grupo	média	d.p.
NÃO ESTIMULADO	19,75	13,24
ESTIMULADO	23,68	10,73

Tabela 16: Valores das médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção da MAP-2 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem das regiões do corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

5.3.2 NF 200

5.3.2.1 Quanto a avaliação do córtex motor adjacente à lesão

5.3.2.1.1 Análise da área de marcação

Área

Pelo teste de Wilcoxon observamos que não houve diferença estatística entre os hemisférios com e sem lesão, em ambos os grupos ESTIMULADO ($p= 0,23$) e NÃO ESTIMULADO ($p= 0,67$). Do mesmo modo, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney observamos que não houve diferença significativa entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO em relação à média de área de marcação do hemisfério não

lesado ($p=0,53$) bem como em relação às médias de área de marcação do hemisfério lesado ($p=0,33$) (figura 45 e tabela 17).

Figura 45: Gráfico com os valores máximos, mínimos, de mediana, desvio padrão e dispersão da área de imunomarcação do NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2

Grupo	Hemisfério	n	Média	dp	Mediana	Mínimo	Máximo
ESTIMULADO	Lesado	7	394,96	480,78	152,81	56,99	1390,77
	Não Lesado	7	532,27	245,87	576,48	175,67	846,16
NÃO ESTIMULADO	Lesado	8	647,80	655,48	487,55	97,49	2015,65
	Não Lesado	8	400,53	276,49	436,18	13,27	777,94

Tabela 17: Valores máximos, mínimos, de medianas, de médias e desvio padrão da área de imunomarcção do NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo a área representada em μm^2 , e dp o desvio padrão.

5.3.2.1.2. Análise da intensidade de marcação

Intensidade

Pelo teste de Wilcoxon observamos que não houve diferença entre os hemisférios com e sem lesão, em ambos os grupos ESTIMULADO ($p=0,91$) e NÃO ESTIMULADO ($p=0,09$). Do mesmo modo, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney observamos que não houve diferença significativa entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO em relação à média de área de marcação do hemisfério não lesado ($p=0,22$) bem como em relação às médias de área imonumarcada do hemisfério lesado ($p=0,86$) (figura 46 e tabela 18).

Figura 46: Gráfico com os valores mínimos, máximos, de mediana, de desvio padrão e dispersão da intensidade de imunomarcção da NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO.

Grupo	Hemisfério	n	Média	dp	Mediana	Mínimo	Máximo
ESTIMULADO	Lesado	6	29,84	29,00	17,38	5,71	81,98
	Não Lesado	6	29,81	29,17	19,97	10,23	88,01
NÃO ESTIMULADO	Lesado	8	19,82	10,31	21,44	5,01	34,46
	Não Lesado	8	14,85	7,29	14,37	5,27	26,52

Tabela 18: Valores máximos, mínimos, de medianas, de médias e desvio padrão da intensidade de imunomarcção do NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem entre as regiões corticais do hemisfério lesado e não lesado dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo dp o desvio padrão.

5.3.2.2 Quanto a avaliação do corpo caloso

5.3.2.2.1 Análise da área e intensidade de marcação

Corpo Caloso

Na tabela 19 abaixo, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney observamos que não houve diferença entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO em relação às médias de área ($p= 0,77$) e intensidade ($p=0,66$) de marcação.

	Grupos	n	Média	dp	Mediana	Mínimo	Máximo
Área	ESTIMULADO	7	585,48	579,47	358,32	0,78	1431,67
	Não ESTIMULADO	8	317,17	207,15	273,62	22,93	712,64
Intensidade	ESTIMULADO	6	17,94	10,75	17,27	5,79	32,25
	Não ESTIMULADO	8	21,30	13,27	18,60	4,19	37,98

Tabela 19: Valores de médias, mínimos, máximos, de mediana e de desvio padrão da área em μm^2 e da intensidade de imunomarcção da NF-200 medida por método morfométrico/microdensitométrico de imagem nas regiões de corpo caloso dos grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO, sendo dp o desvio padrão e p o nível de significância.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Este estudo avaliou um grupo de 8 animais com lesão encefálica cortical submetidos a um modelo de FES, comparando-os a um grupo controle de 8 animais também portadores do mesmo modelo de lesão cortical, mas não submetidos a nenhuma terapêutica, e encontrou modificações comportamentais funcionais e estruturais em neurônios do córtex cerebral.

A FES é uma técnica não invasiva de eletroestimulação neuromuscular periférica, que requer integridade do sistema nervoso periférico e que ativa os músculos esqueléticos para produzir movimentos. Os seus efeitos clínicos já foram amplamente documentados (Peckham e Knutson, 2005), porém, os mecanismos relacionados carecem de esclarecimento.

Neste estudo, os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO não apresentaram diferenças quanto aos parâmetros de idade, peso, tamanho e localização da lesão, bem como no comportamento funcional motor prévio ou após à lesão antes do período de estimulação, denotando a homogeneidade da amostra. Ressalta-se que a isquemia cortical por fototrombose no método do Rose Bengal é um modelo que produz lesões reprodutíveis em tamanho, localização e expressão comportamental clínica. O método é de fácil execução, pouco invasivo, e permite que o animal retorne às atividades cotidianas poucas horas após o procedimento. A lesão obtida é de grãe reprodutibilidade, uma vez que a localização, a extensão e a profundidade da lesão podem ser controladas conforme a intensidade, a localização da irradiação e a concentração do corante injetado (Watson, Dietrich *et al.*, 1985; Ginsberg e Busto, 1989; Hunter, Green *et al.*, 1995; Traystman, 2003).

Permite inclusive localizar com precisão a área isquêmica, seu tamanho e localização, o que possibilita a quantificação acurada do processo neurodegenerativo secundário e das respostas neuroplásticas na zona marginal à lesão (Watson, Dietrich *et al.*, 1985; Barth e Stanfield, 1990; Markgraf, Green *et al.*, 1994; Wood, Sopesen *et al.*, 1996; Bona, Johansson *et al.*, 1997; Pevsner, Eichenbaum *et al.*, 2001; Traystman, 2003; Shanina, Schallert *et al.*, 2006; Kleim, Boychuk *et al.*, 2007). Essa constância nos parâmetros morfológicos das lesões obtidas foi constatada pela análise do posicionamento das bordas anterior e posterior das lesões e suas mensurações. O modelo aqui empregado mostra-se também vantajoso em relação ao modelo tradicional de sutura do tronco da artéria cerebral média (Ginsberg e Busto, 1989; Traystman, 2003), pois permite lesões de pequeno porte, com localização bem delimitada e restritas ao córtex, de borda definida e mostrando tecido adjacente preservado. Já que este estudo objetivou avaliar a capacidade neuroplástica do tecido preservado, a fototrombose induzida pelo Rose Bengal foi escolhida como a metodologia de indução das lesões. O que permitiu o estudo de alterações funcionais sensitivomotoras específicas, a análise tecidual celular por técnicas de imunohistoquímica em territórios corticais adjacentes à lesão e, sobretudo, permitiu que a plasticidade endógena do tecido adjacente à lesão fosse preservada após as lesões. Assim, os resultados da casuística da amostra sugerem que os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO apresentaram parâmetros de comparação homogêneos, minimizando fatores externos de influência na análise dos resultados funcionais e de imunohistoquímica encontrados após o período de estimulação.

As análises do posicionamento das lesões fototrombóticas pelos registros da posição das bordas anterior e posterior (em relação ao nível do Bregma) e a análise dos seus tamanhos, pela medida da extensão craniocaudal total nos animais sacrificados após o término do protocolo da FES, mostraram ausência de diferenças entre os grupos ESTIMULADO e NÃO ESTIMULADO. Este é um indicativo de que, independentemente das respostas comportamentais e neuronais encontradas, a terapêutica da estimulação não promoveu efeito neuroprotetor no cérebro dos animais. Apesar das descrições controversas sobre os efeitos de estimulações e atividade física na contenção do tamanho das lesões cerebrais, este regime da FES não indicou essa possibilidade.

Em relação à análise do comportamento motor espontâneo em campo aberto por uso de luz no espectro do infravermelho nos três momentos analisados, os grupos não apresentaram diferença de comportamento em todos os seis parâmetros motores relacionados ao teste. Os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO não diferiram nas médias analisadas nos tempos pré lesão e pós lesão pré estímulo em nenhum dos seis dados avaliados, demonstrando novamente a homogeneidade e o pareamento dos dois grupos. Observamos, no entanto, que houve uma alteração temporal significativa nos momentos avaliados nos dois grupos para os seis dados analisados. O momento pós lesão pré estímulo diferiu significativamente do momento pré lesão, resultado também encontrado no "Foot Faut Test", que demonstra que a lesão isquêmica encefálica realizada nos animais encontrou tradução clínica quantificável com equivalência e mesma intensidade para os dois grupos. Além disso, a análise em campo aberto por infravermelho demonstrou para ambos os grupos que o momento pré lesão difere significativamente do momento

pós lesão pré estímulo, mas não difere do momento pós lesão pós estímulo, evidenciando graus de retorno funcional em todos os animais analisados. No caso do modelo aqui empregado, a lesão de tamanho suficiente para promover alterações no comportamento motor em campo aberto permitiu a ocorrência de recuperação motora espontânea, uma vez que o momento pós lesão pós estímulo não diferiu do momento pré lesão, mesmo nos grupos não tratados. Essa recuperação espontânea do comportamento motor em campo aberto, encontrada também nos animais não estimulados e relacionada basicamente à locomoção e mobilidade (quantidade de movimento e tempos de descanso), reflete a capacidade natural do SNC em promover adaptações funcionais.

A análise do "Foot Fault Test" reforça os resultados do comportamento motor em campo aberto, já que houve diferença entre os três momentos estudados em ambos os grupos. No grupo NÃO ESTIMULADO o momento pré lesão diferiu dos outros dois momentos. Já no grupo ESTIMULADO, o momento pós lesão pré estímulo diferiu dos outros dois momentos e o momento pré lesão não diferiu do momento pós lesão pós estímulo. Quando comparamos os valores dos momentos analisados entre os grupos, ambos não apresentam diferença significativa nos momentos pré lesão e pós lesão pré estímulo. Porém, diferem no momento pós lesão pós estímulo, quando o grupo NÃO ESTIMULADO apresentou valores estatísticos maiores de assimetria de erros que o grupo ESTIMULADO. Os dados supramencionados sugerem que o grupo ESTIMULADO apresentou níveis de recuperação funcional maiores que o grupo NÃO ESTIMULADO, e que a terapia funcional foi efetiva na melhora motora para a dorsiflexão. Nossos dados corroboram a literatura que identifica a necessidade de testes funcionais

qualitativos específicos para as alterações clínicas funcionais produzidas pela lesão fototrombótica dependente da localização e do tamanho da lesão. Neste estudo o "Foot Fault Test" encontrou diferenças na avaliação clínica motora da dorsiflexão nos momentos analisados e nos grupos, endossando os estudos clínicos e estudos animais que demonstram a efetividade da FES na recuperação motora clínica funcional após o AVE.

No grupo NÃO ESTIMULADO, apesar da análise motora de campo aberto com infravermelho ter demonstrado o retorno motor espontâneo, o "Foot Fault Test" do momento pós lesão pré estímulo não diferiu do momento pós lesão pós estímulo. O "Foot Fault Test" é específico para avaliar as alterações no padrão de dorsiflexão. Contudo, é menos sensível a pequenas variações motoras globais e incapaz de traduzir clinicamente em nossa amostra modificações de magnitude incompleta, ou melhoras motoras relacionadas a outros grupos musculares que não o dorsiflexor, advindas do retorno motor espontâneo e evidenciadas no teste motor de campo aberto. Em valores absolutos, não significativos estatisticamente neste tamanho de amostra, encontramos uma diminuição do índice de erros de 15% no tempo pós estimulação do grupo NÃO ESTIMULADO, em relação ao número de erros do momento pós lesão pré estímulo. Uma vez mais, tais resultados sugerem a presença de recuperação motora espontânea, ainda que parcial para este grupo muscular nesse grupo de animais. De fato, o grau de recuperação motora em seguimentos mais distais, subordinados às camadas corticais mais refinadas, será parcial em relação àqueles relacionados ao comportamento motor de mobilidade avaliado em campo em aberto, principalmente em roedores, nos quais o sistema extrapiramidal é fortemente atuante.

Em conjunto, esses dados indicam que o modelo de lesão isquêmica realizado foi efetivo em produzir lesões com tradução clínica para a perda da dorsiflexão. Assim como o tamanho e a localização das lesões, as alterações funcionais produzidas pela isquemia foram clinicamente homogêneas em toda a amostra. Essa análise mostrou também que o modelo da FES utilizado foi efetivo em produzir melhora funcional nos animais tratados, que apresentaram no decorrer do tempo padrões funcionais melhores que os animais não tratados. A melhora encontrada foi específica à deficiência e incapacidade produzidas pela lesão e apresentou expressão clínica quantificável. Os dados comportamentais também foram suficientes em demonstrar a ocorrência de algum grau de retorno funcional espontâneo em todos os animais, mesmo para o grupo NÃO ESTIMULADO, sugerindo que o retorno funcional possa ocorrer de maneira espontânea e independente de tratamento ou estimulação externa.

Inúmeros estudos clínicos longitudinais têm demonstrado que, indiferentemente do tipo e intensidade de reabilitação, algum grau de recuperação motora espontânea pode ocorrer após o AVE. Essa recuperação é determinada, em parte, por processos neurológicos biológicos ainda mal compreendidos e chamados em conjunto de retorno neurológico espontâneo. Os três principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesses processos compreendem a restituição das áreas de penumbra, a resolução da diátese e a reparação tecidual (Rothi e Horner, 1983; Stein e Hoffman, 2003; Cramer, 2008b).

O terceiro mecanismo, chamado de reparação tecidual, envolve processos de plasticidade neuronal do SNC tais como a arborização dendrítica (Brown, Li *et al.*, 2007), o reforço de conexões sinápticas pré existentes à lesão e o desenvolvimento

de novas conexões neurais (Carmichael, 2003). Por conseguinte, as alterações adaptativas nos circuitos e transmissão sináptica de neurônios após a ocorrência de uma lesão, podem resultar em reparação tecidual na rede neuronal. A regeneração/plasticidade do SNC após lesões pode se beneficiar da reativação dos processos endógenos presentes nas fases do desenvolvimento do SNC, como a elaboração de vias de projeção próximas e distantes à lesão (Stroemer, Kent *et al.*, 1995; Cramer, 2008b; Cramer e Riley, 2008). Ao que parece, dependendo da capacidade natural plástica do SNC de recuperação espontânea, a indução de mudanças duradouras na plasticidade cortical após terapias de estimulação pode, sob certas condições, modificar o comportamento clínico, colaborando para a recuperação motora após o AVE (Carmichael, 2003; Cramer, 2008b; a; Cramer e Riley, 2008; Richards, Stewart *et al.*, 2008; Murphy e Corbett, 2009; Benowitz e Carmichael, 2010; Carmichael, 2010; Wittenberg, 2010) .

Partindo dessa premissa, este estudo investigou a ocorrência de mecanismos plásticos celulares nos tecidos corticais preservados adjacentes e homólogos contralaterais à lesão e nas fibras do corpo caloso após estimulação terapêutica, analisando os resultados da imunohistoquímica frente às mudanças funcionais encontradas já discutidas acima.

Em relação à quantificação imunohistoquímica da MAP-2, nossos resultados encontraram diferenças estatísticas. A MAP-2 é uma proteína associada ao microtúbulo encontrada em todo neurônio e permite a visualização da árvore dendrítica e, em menor grau, do corpo celular e do axônio (Farah e Leclerc, 2008).

Este trabalho mostrou que o grupo NÃO ESTIMULADO apresentou diferença estatística entre a área de imunomarcação do córtex preservado do

hemisfério lesado em comparação ao córtex preservado do hemisfério contralateral não lesado. Os valores encontrados no hemisfério não lesado são significativamente maiores do que os valores encontrados no hemisfério lesado. Estudos prévios com modelos de lesão em animais também demonstram, já nos primeiros 20 dias após a lesão, uma diminuição aguda da arborização dendrítica no córtex homolateral preservado adjacente à lesão, concomitante ao aumento dessa marcação no córtex contralateral em áreas homólogas após lesões de diversas etiologias como a hipóxia, a isquemia, convulsões ou excitotoxicidade (Johnson e Jope, 1992; Jones e Schallert, 1992; 1994; Stroemer, Kent *et al.*, 1995; Pettigrew, Holtz *et al.*, 1996; Bidmon, Jancsik *et al.*, 1998; Brodtmann, Macdonell *et al.*, 1999; Bury e Jones, 2002; Hsu e Jones, 2006). E ainda, alterações na atividade mitocondrial de áreas corticais adjacentes à lesão isquêmica foram correlacionadas às mudanças nos níveis da MAP-2 e morte celular local, demonstrando que a diminuição da atividade da MAP-2 pode interferir negativamente no transporte mitocondrial e na estabilidade do citoesqueleto, na produção de energia e na morte celular local (Puka-Sundvall, Wallin *et al.*, 2000).

Não encontramos também diferença estatística entre os grupos NÃO ESTIMULADO e ESTIMULADO em relação a área de imunomarcção do hemisfério não lesado, mas encontramos diferença significativa entre os grupos em relação à área imonumarcada do hemisfério lesado. O grupo ESTIMULADO, que se utilizou da FES, não apresentou diferença de marcação entre os hemisférios lesado e não lesado. E apresentou valores significativamente maiores do que o grupo NÃO ESTIMULADO no córtex preservado adjacente à lesão do hemisfério lesado.

A literatura também já demonstrou que a recuperação motora espontânea, o treino e o reaprendizado motor levam à arborização dendrítica cortical do hemisfério estimulado submetido ao treino. Estudos prévios correlacionaram o treino de novas habilidades motoras após lesões corticais a um aumento da arborização dendrítica e da imunomarcação da MAP-2 cortical em animais com lesões focais, ainda que esses achados dependam do tamanho da lesão, do local analisado e do grau de atividade aos quais os animais foram submetidos (Johnson e Jope, 1992; Jones e Schallert, 1992; 1994; Kleim, Lussnig *et al.*, 1996; Hsu e Jones, 2006).

Feng *et.al.*, (2008) encontraram resultados semelhantes com o uso da TMS. Estudo no qual a MAP-2 foi usada como um marcador da evolução dos efeitos celulares da TMS em animais portadores de lesão isquêmica cortical. Os autores encontraram valores menores da MAP-2 no grupo controle não estimulado em relação ao grupo estimulado com a TMS. E concluíram que a TMS pode auxiliar na manutenção da estabilidade intracelular e na sobrevivência neuronal, fenômenos mediados pela MAP-2.

A MAP-2 pode portanto ser usada como um marcador dos eventos relacionados à perda funcional após a lesão assim como um marcador da recuperação funcional espontânea e da efetividade das terapias de reabilitação de estimulação funcional (Jones e Schallert, 1992; 1994; Hsu e Jones, 2006; Brown, Li *et al.*, 2007),

Em relação às lesões isquêmicas em pequenos animais, o padrão de imunorreatividade do córtex relacionado à melhora funcional ou submetido à estimulação segue um padrão de duas fases distintas. Na fase inicial ocorre um

aumento do número de conexões neuronais, agrupadas aleatoriamente. Essa fase, que tem seu pico máximo dezoito dias após às lesões, caracteriza-se pelo aumento no número de novas conexões entre os dendritos, sobretudo na camada cortical profunda V. *A posteriori*, surge uma fase de refinamento dessas conexões, dependente da expressão gênica do neurônio, quando apenas aquelas com efetividade funcional se manterão preservadas e fortes. Nessa segunda fase, passível de identificação apenas após o décimo nono dia, ocorre novamente uma diminuição do número das conexões. Não obstante, há um aumento da estabilidade e efetividade das sinapses. Essa fase perdura até 60 dias após as lesões quando a arborização dendrítica tende à regressão progressiva ao seu patamar original. Apesar disso, é apenas a partir do início dessa fase que os estudos demonstram a estabilização e as alterações sinápticas locais dos novos dendritos formados, sugerindo que o crescimento dendrítico precede temporalmente a formação, o refinamento e o aumento de densidade sináptica, bem como o crescimento e a maturação axonal das novas conexões à distância (Jones e Schallert, 1992; 1994; Bidmon, Jancsik *et al.*, 1998; Kozłowski e Schallert, 1998; Nudo, 1999; Nudo e Friel, 1999; Sánchez, Hassinger *et al.*, 2000). De fato, nosso estudo, que avaliou os animais dentro dos primeiros dezenove dias da lesão, apontou diferença estatística quanto à área de marcação da MAP-2, mas não encontrou diferenças quanto à marcação do NF-200, sugerindo mais uma vez que a estabilização das novas conexões sinápticas e o crescimento axonal ocorrem apenas após o aumento do número de novos dendritos e a posterior estabilização e maturação desses últimos. Além disso, a ausência de diferenças na área das imunomarcações do NF-200 – que marca fortemente todo o neurofilamento, incluindo aquele no corpo

celular e axônios – reafirma a possível natureza dendrítica das respostas observadas pela imunoreatividade da MAP-2. Já a intensidade da marcação reflete a quantidade de produto de imunomarcação depositada nos neurônios e deste modo a quantidade de MAP-2 por fibra discriminada. Portanto, a ausência na resposta da intensidade da MAP-2 e do NF-200 observadas são indicativos de aumento de dendritos MAP-2 positivos, sinal de arborização dendrítica e não de aumento de proteína estrutural contida dentro dessa parte do neurônio.

Também não encontramos diferenças estatísticas nas imunomarcações da MAP-2 ou do NF-200 no corpo caloso, região rica em fibras axonais mielinizadas, que corresponde a maior estrutura de conexão entre os hemisférios cerebrais e exerce o papel fundamental na troca interhemisférica de informações sensitivas, cognitivas e motoras.

O estudo do perfil funcional do corpo caloso se iniciou com Poffenberger (1912). Entretanto, ainda não são totalmente compreendidas as características dessas conexões interhemisféricas, tanto na neurofisiologia normal quanto após o AVE. Estudiosos pioneiros, como Cracco (1989) e Ferber (1992) demonstraram a existência de importantes conexões e interações entre os córtices motores (M1) através do corpo caloso. Mais adiante, novos estudos confirmaram a hipótese de que a interação entre os hemisférios via corpo caloso participa do aprendizado de tarefas motoras e se modifica frente a estímulos e lesões corticais (Chen, 2004; Reis, Swayne *et al.*, 2008).

Em meados dos anos 2000, acreditava-se que o córtex contralateral à lesão participava da recuperação funcional após o AVE (Cramer, Nelles *et al.*, 1997; Cao, D'olhaberriague *et al.*, 1998; Trompetto, Assini *et al.*, 2000). Mais

recentemente, em contrapartida, estudos com o uso do TMS e o MEP têm demonstrado que, na vigência de uma lesão isquêmica unilateral, o córtex sadio contralateral à lesão exerce um efeito inibitório sobre o córtex ispilateral à lesão através da ativação das fibras do corpo caloso. Mais do que isso, estudos que utilizaram o TMS para induzir uma inibição do córtex sadio contralateral à lesão, obtiveram melhor retorno funcional do que estudos em que a hiperexcitabilidade cortical contralateral à lesão e a assimetria de ativação cortical entre os hemisférios foram mantidas (Lang, Nitsche *et al.*, 2004; Nowak, Grefkes *et al.*, 2009; Farias Da Guarda, Cohen *et al.*, 2010).

A literatura mostra que os estímulos periféricos capazes de inibir a atuação do córtex sadio, e também capazes de inibir a inibição interhemisférica sobre o córtex lesado e as fibras interhemisféricas do corpo caloso, podem levar a um maior retorno funcional (Traversa, Cicinelli *et al.*, 1998; Cicinelli, Pasqualetti *et al.*, 2003; Werhahn, Conforto *et al.*, 2003; Murase, Duque *et al.*, 2004; Duque, Hummel *et al.*, 2005). A literatura também questiona se a arborização dendrítica do hemisfério não lesado tem papel positivo na recuperação funcional motora ou se é fator inibidor ao córtex lesado (Kozlowski e Schallert, 1998).

Muito embora já tenha sido demonstrado que a estimulação elétrica neuromuscular periférica sensitiva e a FES podem alterar a velocidade de condução axonal, a mielinização e o crescimento axonal de nervos periféricos (Al-Majed, Brushart *et al.*, 2000; Al-Majed, Neumann *et al.*, 2000; Brushart, Jari *et al.*, 2005; English, Schwartz *et al.*, 2007; Geremia, Gordon *et al.*, 2007), o estudo dessas alterações em regiões do SNC, após o uso da estimulação elétrica periférica, ainda é incipiente (Fang, Huang *et al.*, 2002; Yi, Xu *et al.*, 2006). Nosso

trabalho não encontrou diferença entre os grupos na área e intensidade de marcação imunohistoquímica do NF-200 no corpo caloso ou nas áreas adjacentes à lesão. Os resultados indicam que as lesões corticais não se estenderam à região do corpo caloso e também não promoveram diminuição ou aumento considerável do número ou ativação das fibras de projeção interhemisféricas.

Desse modo, nossos achados referentes à imunorreatividade da MAP-2 nas áreas corticais avaliadas, possivelmente nos dendritos dos neurônios piramidais adjacentes à lesão, sugerem que o tecido cortical preservado adjacente e ipsilateral à lesão teve as suas conexões dendríticas diminuídas após a lesão tecidual. O aumento da MAP-2 no córtex cerebral do hemisfério lesado dos animais que obtiveram maior recuperação funcional sugere que a plasticidade dendrítica encontrada no córtex estimulado, aqui demonstrada pela modificação da MAP-2, é o substrato anatômico neuronal envolvido na melhora comportamental desses animais. Também sugere que a recuperação motora induzida pela FES pode interagir e/ou restroestimar a capacidade natural plástica do SNC, esta última implicada na manutenção da função motora readquirida. Tais dados estão de acordo com descrições anteriores sobre a recuperação funcional induzida pelas terapias de treino motor, pela estimulação sensitiva periférica e pela estimulação cortical. Mas, são pioneiros para o uso da estimulação elétrica neuromuscular motora terapêutica e, dessa maneira, levam-nos a questionar quais são as características da recuperação motora induzida pela FES que podem ser fatores moduladores desse achado.

Desde os anos 1990, autores como Pascual-Leone (1995) sugerem que o treino motor repetitivo não acompanhado de aquisição funcional de uma nova

tarefa – como, por exemplo, o fortalecimento muscular puro – não leva a modificações da representação cortical na mesma magnitude que a aquisição de tarefas motoras complexas com participação ativa do indivíduo. (Plautz, Milliken *et al.*, 2000). Outros autores também têm discutido esta questão e demonstram que o treino motor repetitivo, intencional e funcional (chamado na literatura internacional de *goal-direct active training* e *repetitive task training*) parece atingir níveis clínicos funcionais e modificações da neuroplasticidade central mais significativos do que a estimulação sensitiva ou motora passiva pura, ou seja, sem a participação ativa e intencional dos doentes (Pascual-Leone, Nguyet *et al.*, 1995; Lotze, Braun *et al.*, 2003; Bayona, Bitensky, Salter *et al.*, 2005; Jensen, Marstrand *et al.*, 2005; Krakauer, 2006; Krakauer e Shadmehr, 2006; Urton, Kohia *et al.*, 2007; Beekhuizen e Field-Fote, 2008; Kleim e Jones, 2008; Chakrabarty, Friel *et al.*, 2009; Hubbard, Parsons *et al.*, 2009; Langhorne, Coupar *et al.*, 2009; Nicoletti e Lebedev, 2009; Sadowsky e McDonald, 2009; French, Thomas *et al.*, 2010; Chipchase, Schabrun *et al.*, 2011). Um dos exemplos é o estudo controlado de Santos *et al.* (2006), no qual uma série de doentes com sequela crônica de AVC foi submetida a dois diferentes tipos de estimulação elétrica neuromuscular no membro superior: "ativa", durante a manipulação de uma bola de tênis, ou "passiva", durante a estimulação elétrica isolada da flexoextensão de punho. Os dois grupos apresentaram melhora nos testes de sensibilidade e força, mas apenas o primeiro grupo apresentou ganhos funcionais em atividades de vida diária (AVD)s. A FES atua de modo similar. Mais do que um estímulo exclusivo à via motora, a FES promove um estímulo à via motora de modo funcional, contextualizado e com participação ativa dos doentes. Nosso estudo procurou

preservar essa característica da FES, o que pode ter colaborado para os resultados positivos encontrados. Ao contrário de alguns estudos da literatura, nossos animais foram estimulados para a dorsiflexão durante a marcha ativa, e não independentemente dela, assim como ocorre nos estudos de estimulação elétrica realizados em animais inconscientes anestesiados.

Claro que a FES também estimula as vias sensitivas, o que já foi demonstrado ser um fator auxiliar na melhora clínica motora e nas alterações corticais encontradas nesses doentes. Portanto, a FES agiria, no mínimo, como um estímulo ao córtex sensorial e associativo que, por sua vez, interagindo com o motor, auxiliaria este último no aprendizado das novas tarefas (Conforto, Kaelin-Lang *et al.*, 2002; Dobkin, 2004a; Elbert e Rockstroh, 2004; Hummel e Cohen, 2005; Krakauer, 2006; Krakauer e Shadmehr, 2006; Conforto, Cohen *et al.*, 2007; Conforto, Santos *et al.*, 2008; Conforto, Ferreira *et al.*, 2010). Não foi objetivo deste estudo identificar se as alterações corticais encontradas na imunomarcagem da MAP-2 ocorreram de forma diferente nas células dos cortices sensorial e motor separadamente. Estudos na literatura sobre a atuação da FES nos diferentes tipos histológicos corticais são ainda incipientes.

O último aspecto da FES, citado na literatura como uma particularidade positiva de tal técnica terapêutica, diz respeito a sua capacidade de ativar as fibras nervosas por estimulação ortodrômica e antidrômica (Peckham e Knutson, 2005; Hook e Grau, 2007; Everaert, Thompson *et al.*, 2010). O impulso ortodrômico da FES ativa diretamente as fibras nervosas motoras, despolariza a membrana nervosa na junção neuromuscular e acarreta uma contração do músculo para compensar a fraqueza muscular, produzindo movimento e consequente ativação dos receptores

periféricos sensoriais articulares e musculares. Já o impulso antidrômico alcança e ativa repetidamente as células da medula espinhal de modo previsível, de frequência alta e com uma relação temporal direta com a contração muscular periférica induzida pelo impulso ortodrômico. O referido impulso antidrômico *backfired* é seguido por aferências sensoriais periféricas produzidas pela contração motora involuntária coincidente, alcançada pela FES na periferia. Estão presentes, portanto, a estimulação das vias motoras e das vias sensitivas, que apresentam uma relação temporal consecutiva na ativação do corno medular. Portanto, as sinapses da medula espinhal estariam sujeitas a se modificar pelo mecanismo adaptativo hebbiano de potenciação de longa duração (LTP).

Há muitos anos, Donald Hebb propôs que algumas sinapses modificáveis poderiam ser fortalecidas se o disparo pré-sináptico fosse coincidente com ou seguido por uma descarga pós-sináptica na vigência de estimulação neuronal repetitiva e disparos consecutivos (Morris, 1999). As sinapses hebbianas foram descritas no hipocampo, no cerebelo, na medula espinhal e nos contextos de aprendizado e memória. Se as sinapses das células corticais e medulares são modificáveis e hebbianas, e se a FES pode realmente fazer uma ativação antidrômica da medula espinhal por duas descargas consecutivas repetidamente, então, podemos dizer que a FES interfere nos circuitos medulares por um mecanismo de neuromodulação hebbiano adaptativo, capaz de promover modificações sinápticas restauradoras no nível da célula da medula espinhal e cortical (Field-Fote, 2004; Peckham e Knutson, 2005; Everaert, Thompson *et al.*, 2010). Não foi objetivo deste estudo identificar se as alterações funcionais

encontradas no comportamento motor dos animais ocorreram concomitantemente a alterações modulatorias da medula espinhal.

Desse modo, a FES é uma técnica promissora na recuperação motora de doentes com AVE. Tanto pela sua capacidade de levar a um treino funcional e melhora clínica sensitivomotora, aspectos já consagrados na literatura, quanto pela sua capacidade de interagir com a plasticidade do SNC, um aspecto que ainda precisa ser estudado.

CONCLUSÕES

7. Conclusões:

- A lesão fototrombótica cortical levou a diminuição da imunorreatividade da MAP-2 no córtex preservado adjacente e ipsilateral à lesão, possivelmente em dendritos de neurônios. Este fenômeno foi modificado após 14 dias de estimulação com a FES.
- O modelo da FES utilizado foi efetivo em produzir uma melhora funcional nos animais tratados que apresentaram, ao longo do tempo, padrões funcionais melhores que os animais não tratados. A melhora encontrada foi específica à deficiência produzida pela lesão e apresentou expressão clínica quantificável.
- A recuperação motora induzida pela FES demonstrada nesses animais pelo "Foot Fault Test" foi acompanhada de modificações corticais representadas por uma maior imunorreatividade MAP-2 do hemisfério lesado nos animais tratados, sem alterar o tamanho da lesão.
- O aumento da MAP-2 no córtex cerebral do hemisfério lesado dos animais que obtiveram maior recuperação funcional sugere que a plasticidade dendrítica encontrada no córtex estimulado, aqui demonstrada pela modificação da MAP-2, é um substrato anatômico neuronal envolvido na melhora comportamental encontrada nesses animais.
- A recuperação motora induzida pela FES pode interagir e/ou restroestimar a capacidade natural plástica do SNC, esta última implicada na manutenção da função motora readquirida.

- Ainda é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e neurológicos envolvidos na interação da FES com a plasticidade do SNC, bem como das diferenças entre a estimulação sensitivomotora e a estimulação periférica sensitiva pura, da capacidade de interação da FES com os axônios neuronais e dos parâmetros de estimulação que regulam essa interação de modo fisiológico.

REFERÊNCIAS

8. Referências:

AL-MAJED, A. *et al.* Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 12, n. 12, p. 4381-90, Dec 2000.

AL-MAJED, A. *et al.* Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci* [S.I.], v. 20, n. 7, p. 2602-8, Apr 2000.

ALFIERI, V. Electrical treatment of spasticity. Reflex tonic activity in hemiplegic patients and selected specific electrostimulation. *Scand J Rehabil Med* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 177-82, 1982.

ALMAGUER-MELIAN, W. *et al.* Differential effects of electrical stimulation patterns, motivational-behavioral stimuli and their order of application on functional plasticity processes within one input in the dentate gyrus of freely moving rats in vivo. *Neuroscience* [S.I.], v. 165, n. 4, p. 1546-58, Feb 2010.

ALON, G. Use of neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation: a challenge to all. *J Rehabil Res Dev* [S.I.], v. 40, n. 6, p. ix-xii, 2003 Nov-Dec 2003.

ALON, G. *et al.* Functional electrical stimulation (FES) may modify the poor prognosis of stroke survivors with severe motor loss of the upper extremity: a preliminary study. *Am J Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 87, n. 8, p. 627-36, Aug 2008.

ALON, G.; MCBRIDE, K. Persons with C5 or C6 tetraplegia achieve selected functional gains using a neuroprosthesis. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 84, n. 1, p. 119-24, Jan 2003.

ALON, G.; RING, H. Gait and hand function enhancement following training with a multi-segment hybrid-orthosis stimulation system in stroke patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* [S.I.], v. 12, n. 5, p. 209-16, 2003 Sep-Oct 2003.

ALON, G. *et al.* A home-based, self-administered stimulation program to improve selected hand functions of chronic stroke. *NeuroRehabilitation* [S.I.], v. 18, n. 3, p. 215-25, 2003.

AOYAGI, Y.; TSUBAHARA, A. Therapeutic orthosis and electrical stimulation for upper extremity hemiplegia after stroke: a review of

effectiveness based on evidence. *Top Stroke Rehabil* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 9-15, 2004.

BARTH, T.; STANFIELD, B. The recovery of forelimb-placing behavior in rats with neonatal unilateral cortical damage involves the remaining hemisphere. *J Neurosci* [S.I.], v. 10, n. 10, p. 3449-59, Oct 1990.

BARTHOLOW, R. Art. I.-Experimental Investigations into the Functions of the Human Brain. *The American Journal of the Medical Sciences* [S.I.], v. 66, n. 134, p. 305-313, 1874.

BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* [S.I.], v. 75, p. 19-37, 2006.

BAYONA, N. *et al.* The role of task-specific training in rehabilitation therapies. *Top Stroke Rehabil* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 58-65, 2005.

BAYONA, N. *et al.* Plasticity and reorganization of the uninjured brain. *Top Stroke Rehabil* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 1-10, 2005.

BEARD, G. *A Practical treatise on the medical & surgical uses of electricity*. W. Wood, 1881.

BECKER, K. J. Modulation of the postischemic immune response to improve stroke outcome. *Stroke* [S.I.], v. 41, n. 10 Suppl, p. S75-8, Oct 2010.

BEEKHUIZEN, K.; FIELD-FOTE, E. Sensory stimulation augments the effects of massed practice training in persons with tetraplegia. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 89, n. 4, p. 602-8, Apr 2008.

BENOWITZ, L. I.; CARMICHAEL, S. T. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 259-66, Feb 2010.

BERLUCCHI, G. The origin of the term plasticity in the neurosciences: Ernesto Lugaro and chemical synaptic transmission. *J Hist Neurosci* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 305-9, Sep 2002.

BIDMON, H. *et al.* Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience* [S.I.], v. 82, n. 2, p. 397-420, Jan 1998.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci* [S.I.], v. 21, n. 14, p. 5272-80, Jul 2001.

BLOEDEL, J. *et al.* *The acquisition of motor behavior in vertebrates.* MIT Press, 1996.

BLUM, E. *et al.* A musculo-skeletal model of rat ankle motion and its experimental test on rat. *J Biomech* [S.I.], v. 40, n. 4, p. 891-9, 2007.

BOLOGNINI, N. *et al.* Using non-invasive brain stimulation to augment motor training-induced plasticity. *J Neuroeng Rehabil* [S.I.], v. 6, p. 8, 2009.

BOLTON, D. *et al.* Electromyogram-triggered neuromuscular stimulation and stroke motor recovery of arm/hand functions: a meta-analysis. *J Neurol Sci* [S.I.], v. 223, n. 2, p. 121-7, Aug 2004.

BONA, E. *et al.* Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res* [S.I.], v. 42, n. 5, p. 678-83, Nov 1997.

BRODTMANN, A. *et al.* Cortical excitability and recovery curve analysis in generalized epilepsy. *Neurology* [S.I.], v. 53, n. 6, p. 1347-9, Oct 1999.

BROWN, C. E. *et al.* Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci* [S.I.], v. 27, n. 15, p. 4101-9, Apr 2007.

BRUSHART, T. *et al.* Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Exp Neurol* [S.I.], v. 194, n. 1, p. 221-9, Jul 2005.

BUCHKREMER-RATZMANN, I. *et al.* Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 1105-9; discussion 1109-11, Jun 1996.

BUCHKREMER-RATZMANN, I.; WITTE, O. Extended brain disinhibition following small photothrombotic lesions in rat frontal cortex. *Neuroreport* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 519-22, Jan 1997.

BUITRAGO, M. *et al.* Effects of somatosensory electrical stimulation on neuronal injury after global hypoxia-ischemia. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 158, n. 3, p. 336-44, Oct 2004.

BULLITT, E. *et al.* The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-fos expression in the rodent spinal cord. *Brain Res* [S.I.], v. 580, n. 1-2, p. 172-9, May 1992.

BURKE, R. E. Sir Charles Sherrington's The integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain* [S.I.], v. 130, n. 4, p. 887-894, April 1, 2007 2007.

BURNETT, M. *et al.* Electrical forepaw stimulation during reversible forebrain ischemia decreases infarct volume. *Stroke* [S.I.], v. 37, n. 5, p. 1327-31, May 2006.

BURRIDGE, J. *et al.* Experience of clinical use of the Odstock dropped foot stimulator. *Artif Organs* [S.I.], v. 21, n. 3, p. 254-60, Mar 1997.

BURRIDGE, J. *et al.* The effects of common peroneal stimulation on the effort and speed of walking: a randomized controlled trial with chronic hemiplegic patients. *Clin Rehabil* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 201-10, Aug 1997.

BURY, S.; JONES, T. Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the "unaffected" forelimb and training-induced dendritic structural plasticity in the motor cortex. *J Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 19, p. 8597-606, Oct 2002.

BUSETTO, G. *et al.* Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions. *J Neurosci* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 685-95, Jan 2000.

BÜTEFISCH, C. Plasticity in the human cerebral cortex: lessons from the normal brain and from stroke. *Neuroscientist* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 163-73, Apr 2004.

BÜTEFISCH, C. *et al.* Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 97, n. 7, p. 3661-5, Mar 2000.

CAJAL, S. *et al.* *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*. Oxford University Press, 1991.

CALAUTTI, C.; BARON, J. Functional neuroimaging studies of motor recovery after stroke in adults: a review. *Stroke* [S.I.], v. 34, n. 6, p. 1553-66, Jun 2003.

CAMARGO, E. *et al.* Stroke in Latin America. *Neuroimaging Clin N Am* [S.I.], v. 15, n. 2, p. 283-96, x, May 2005.

CAMBRIDGE, N. Electrical apparatus used in medicine before 1900. *Proc R Soc Med* [S.I.], v. 70, n. 9, p. 635-41, Sep 1977.

CAO, Y. *et al.* Pilot study of functional MRI to assess cerebral activation of motor function after poststroke hemiparesis. *Stroke* [S.I.], v. 29, n. 1, p. 112-22, Jan 1998.

CARMICHAEL, S. T. Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 64-75, Feb 2003.

CARMICHAEL, S. T. Translating the frontiers of brain repair to treatments: starting not to break the rules. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 237-42, Feb 2010.

CASTEL-LACANAL, E. *et al.* Induction of cortical plastic changes in wrist muscles by paired associative stimulation in the recovery phase of stroke patients. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 23, n. 4, p. 366-72, May 2009.

CASTRO-ALAMANCOS, M.; BORREL, J. Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of cortex. *Neuroscience* [S.I.], v. 68, n. 3, p. 793-805, Oct 1995.

CECATTO, R.; CHADI, G. The importance of neuronal stimulation in central nervous system plasticity and neurorehabilitation strategies. *Funct Neurol* [S.I.], v. 22, n. 3, p. 137-43, 2007 Jul-Sep 2007.

CELNIK, P.; COHEN, L. Modulation of motor function and cortical plasticity in health and disease. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 3-5, p. 261-8, 2004.

CHADI, G. *et al.* Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 97, n. 1, p. 145-58, 1993.

CHAE, J. Neuromuscular electrical stimulation for motor relearning in hemiparesis. *Phys Med Rehabil Clin N Am* [S.I.], v. 14, n. 1 Suppl, p. S93-109, Feb 2003.

CHAE, J. *et al.* Neuromuscular electrical stimulation for motor restoration in hemiplegia. *Top Stroke Rehabil* [S.I.], v. 15, n. 5, p. 412-26, 2008 Sep-Oct 2008.

CHAKRABARTY, S. *et al.* Activity-dependent plasticity improves M1 motor representation and corticospinal tract connectivity. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 101, n. 3, p. 1283-93, Mar 2009.

CHARLTON, C. *et al.* Prolonged peripheral nerve stimulation induces persistent changes in excitability of human motor cortex. *J Neurol Sci* [S.I.], v. 208, n. 1-2, p. 79-85, Apr 2003.

CHEN, R. Interactions between inhibitory and excitatory circuits in the human motor cortex. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 154, n. 1, p. 1-10, Jan 2004.

CHEN, R. *et al.* Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* [S.I.], v. 111, n. 4, p. 761-73, 2002.

CHIPCHASE, L. S. *et al.* Peripheral electrical stimulation to induce cortical plasticity: A systematic review of stimulus parameters. *Clin Neurophysiol* [S.I.], v. 122, n. 3, p. 456-63, Mar 2011.

CHOI, D. W.; ROTHMAN, S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 13, p. 171-82, 1990.

CICINELLI, P. *et al.* Interhemispheric asymmetries of motor cortex excitability in the postacute stroke stage: a paired-pulse transcranial magnetic stimulation study. *Stroke* [S.I.], v. 34, n. 11, p. 2653-8, Nov 2003.

COGGESHALL, R. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 77, n. 5, p. 299-352, Dec 2005.

COMPSTON, A. The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. By Sir Victor Horsley, FRS, FRCS and R.H. Clarke, MA, MB. *Brain* 1908: 31; 45-124. *Brain* [S.I.], v. 130, n. 6, p. 1449-1452, June 1, 2007 2007.

Condensed Program. *American Psychologist August* [S.I.], v. 2, n. 8, p. 255-352, 1947.

CONFORTO, A. *et al.* Effects of somatosensory stimulation on motor function in chronic cortico-subcortical strokes. *J Neurol* [S.I.], v. 254, n. 3, p. 333-9, Mar 2007.

CONFORTO, A. *et al.* Effects of somatosensory stimulation on motor function after subacute stroke. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 24, n. 3, p. 263-72, Mar 2010.

CONFORTO, A. *et al.* Increase in hand muscle strength of stroke patients after somatosensory stimulation. *Ann Neurol* [S.I.], v. 51, n. 1, p. 122-5, Jan 2002.

CONFORTO, A. *et al.* Effects of somatosensory stimulation on the excitability of the unaffected hemisphere in chronic stroke patients. *Clinics (Sao Paulo)* [S.I.], v. 63, n. 6, p. 735-40, Dec 2008.

COTMAN, C. *Neuronal plasticity*. Raven Press, 1978.

CRACCO, R. Q. *et al.* COMPARISON OF HUMAN TRANSCALLOSAL RESPONSES EVOKED BY MAGNETIC COIL AND ELECTRICAL-STIMULATION. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* [S.I.], v. 74, n. 6, p. 417-424, Nov-Dec 1989.

CRAMER, S. *et al.* A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. *Stroke* [S.I.], v. 28, n. 12, p. 2518-27, Dec 1997.

CRAMER, S. C. Repairing the human brain after stroke. II. Restorative therapies. *Ann Neurol* [S.I.], v. 63, n. 5, p. 549-60, May 2008a.

CRAMER, S. C. Repairing the human brain after stroke: I. Mechanisms of spontaneous recovery. *Ann Neurol* [S.I.], v. 63, n. 3, p. 272-87, Mar 2008b.

CRAMER, S. C. Stratifying patients with stroke in trials that target brain repair. *Stroke* [S.I.], v. 41, n. 10 Suppl, p. S114-6, Oct 2010.

CRAMER, S. C.; RILEY, J. D. Neuroplasticity and brain repair after stroke. *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 76-82, Feb 2008.

CROSS, J. L. *et al.* Modes of Neuronal Calcium Entry and Homeostasis following Cerebral Ischemia. *Stroke Res Treat* [S.I.], v. 2010, p. 316862, 2010.

CURTIS, D.; ECCLES, J. Synaptic action during and after repetitive stimulation. *J Physiol* [S.I.], v. 150, p. 374-98, Feb 1960.

CUTHILL, D. *et al.* Different patterns of axonal damage after intracerebral injection of malonate or AMPA. *Exp Neurol* [S.I.], v. 200, n. 2, p. 509-20, Aug 2006.

DALY, J. *et al.* Therapeutic neural effects of electrical stimulation. *IEEE Trans Rehabil Eng* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 218-30, Dec 1996.

DALY, J.; RUFF, R. Construction of efficacious gait and upper limb functional interventions based on brain plasticity evidence and model-based measures for stroke patients. *ScientificWorldJournal* [S.I.], v. 7, p. 2031-45, 2007.

DE KROON, J. *et al.* Relation between stimulation characteristics and clinical outcome in studies using electrical stimulation to improve motor control of the upper extremity in stroke. *J Rehabil Med* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 65-74, Mar 2005.

DE PADUA MANSUR, A. *et al.* Stroke and ischemic heart disease mortality trends in Brazil from 1979 to 1996. *Neuroepidemiology* [S.I.], v. 22, n. 3, p. 179-83, 2003 May-Jun 2003.

DEHMELT, L.; HALPAIN, S. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* [S.I.], v. 58, n. 1, p. 18-33, Jan 2004.

DEL ZOPPO, G. Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia. *Cerebrovasc Dis* [S.I.], v. 27 Suppl 1, p. 65-76, 2009.

DEL ZOPPO, G. *et al.* Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* [S.I.], v. 40, n. 8, p. 2945-8, Aug 2009.

DEROIDE, N. *et al.* [Cerebral plasticity: From bench to bedside in stroke treatment.]. *Rev Med Interne* [S.I.], May 2010.

DI FILIPPO, M. *et al.* Plasticity and repair in the post-ischemic brain. *Neuropharmacology* [S.I.], v. 55, n. 3, p. 353-62, Sep 2008.

DIMITRIJEVIC, M.; DIMITRIJEVIC, M. Clinical elements for the neuromuscular stimulation and functional electrical stimulation protocols in the practice of neurorehabilitation. *Artif Organs* [S.I.], v. 26, n. 3, p. 256-9, Mar 2002.

DOBKIN, B. Do electrically stimulated sensory inputs and movements lead to long-term plasticity and rehabilitation gains? *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 16, n. 6, p. 685-91, Dec 2003.

DOBKIN, B. Neurobiology of rehabilitation. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 1038, p. 148-70, Dec 2004a.

DOBKIN, B. Strategies for stroke rehabilitation. *Lancet Neurol* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 528-36, Sep 2004b.

DOW, D. *et al.* Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve* [S.I.], v. 30, n. 1, p. 77-86, Jul 2004.

DOW, D. *et al.* Distribution of rest periods between electrically generated contractions in denervated muscles of rats. *Artif Organs* [S.I.], v. 29, n. 6, p. 432-5, Jun 2005.

DRUBACH, D. *et al.* Manipulation of central nervous system plasticity: a new dimension in the care of neurologically impaired patients. *Mayo Clin Proc* [S.I.], v. 79, n. 6, p. 796-800, Jun 2004.

DUCHENNE, G. *De l'électrisation localisée: et de son application a la physiologie, a la pathologie et a la thérapeutique.* Chez J.-B. Baillière, 1855.

DUNNING, K. *et al.* A four-week, task-specific neuroprosthesis program for a person with no active wrist or finger movement because of chronic stroke. *Phys Ther* [S.I.], v. 88, n. 3, p. 397-405, Mar 2008.

DUPONT SALTER, A. *et al.* Prevention of muscle disuse atrophy by low-frequency electrical stimulation in rats. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 218-26, Sep 2003.

DUQUE, J. *et al.* Transcallosal inhibition in chronic subcortical stroke. *Neuroimage* [S.I.], v. 28, n. 4, p. 940-6, Dec 2005.

DÖBRÖSSY, M. *et al.* Neurorehabilitation with neural transplantation. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 24, n. 8, p. 692-701, Oct 2010.

ELBERT, T. *et al.* Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players. *Science* [S.I.], v. 270, n. 5234, p. 305-7, Oct 1995.

ELBERT, T.; ROCKSTROH, B. Reorganization of human cerebral cortex: the range of changes following use and injury. *Neuroscientist* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 129-41, Apr 2004.

ENGLISH, A. *et al.* Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. *Dev Neurobiol* [S.I.], v. 67, n. 2, p. 158-72, Feb 2007.

ERDMANN, B. *Die oertliche Anwendung der Elektricitaet in der Physiologie, Pathologie und Therapie.* J.A. Barth, 1858.

EVERAERT, D. *et al.* Does functional electrical stimulation for foot drop strengthen corticospinal connections? *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 24, n. 2, p. 168-77, Feb 2010.

FANG, Y. *et al.* [Study on effect of electrical stimulus on repairing of astrocytes and neurons in rehabilitation after middle cerebral artery

occlusion in rats]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* [S.I.], v. 22, n. 7, p. 531-3, Jul 2002.

FARADAY, M. *Experimental researches in electricity: reprinted from the Philosophical Transactions of 1831-1843, 1846-1852*. Richard and John Edward Taylor, 1839. (v. 2).

FARAH, C.; LECLERC, N. HMWMAP2: new perspectives on a pathway to dendritic identity. *Cell Motil Cytoskeleton* [S.I.], v. 65, n. 7, p. 515-27, Jul 2008.

FARIAS DA GUARDA, S. *et al.* Interhemispheric Asymmetry of Corticomotor Excitability After Chronic Cerebellar Infarcts. *Cerebellum* [S.I.], May 2010.

FEENEY, D.; SUTTON, R. Pharmacotherapy for recovery of function after brain injury. *Crit Rev Neurobiol* [S.I.], v. 3, n. 2, p. 135-97, 1987.

FELDMAN, R.; GOODRICH, J. Psychosurgery: a historical overview. *Neurosurgery* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 647-57; discussion 657-9, Mar 2001.

FENG, H. *et al.* Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on adenosine triphosphate content and microtubule associated protein-2 expression after cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Chin Med J (Engl)* [S.I.], v. 121, n. 14, p. 1307-12, Jul 2008.

FERBERT, A. *et al.* Interhemispheric inhibition of the human motor cortex. *The Journal of Physiology* [S.I.], v. 453, n. 1, p. 525-546, January 1, 1992 1992.

FIELD-FOTE, E. Electrical stimulation modifies spinal and cortical neural circuitry. *Exerc Sport Sci Rev* [S.I.], v. 32, n. 4, p. 155-60, Oct 2004.

FINGER, S. *et al.* The Monakow concept of diaschisis: origins and perspectives. *Arch Neurol* [S.I.], v. 61, n. 2, p. 283-8, Feb 2004.

FISHER, M. New approaches to neuroprotective drug development. *Stroke* [S.I.], v. 42, n. 1 Suppl, p. S24-7, Jan 2011.

FLOEL, A.; COHEN, L. Translational studies in neurorehabilitation: from bench to bedside. *Cogn Behav Neurol* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 1-10, Mar 2006.

FLOEL, A.; COHEN, L. G. Recovery of function in humans: cortical stimulation and pharmacological treatments after stroke. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 243-51, Feb 2010.

FODSTAD, H.; HARIZ, M. Electricity in the treatment of nervous system disease. *Acta Neurochir Suppl* [S.I.], v. 97, n. Pt 1, p. 11-9, 2007.

FRENCH, B. *et al.* Does repetitive task training improve functional activity after stroke? A Cochrane systematic review and meta-analysis. *J Rehabil Med* [S.I.], v. 42, n. 1, p. 9-14, Jan 2010.

FROST, S. *et al.* Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 89, n. 6, p. 3205-14, Jun 2003.

GAGNON, D. *et al.* Ideal timing to transfer from an acute care hospital to an interdisciplinary inpatient rehabilitation program following a stroke: an exploratory study. *BMC Health Serv Res* [S.I.], v. 6, p. 151, 2006.

GALVANI, L. *et al.* *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius: a translation of luigi Galvani's de viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. Licht, 1953.

GEREMIA, N. *et al.* Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp Neurol* [S.I.], v. 205, n. 2, p. 347-59, Jun 2007.

GINSBERG, M.; BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* [S.I.], v. 20, n. 12, p. 1627-42, Dec 1989.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* [S.I.], v. 55, n. 3, p. 363-89, Sep 2008.

GLANZ, M. *et al.* Functional electrostimulation in poststroke rehabilitation: a meta-analysis of the randomized controlled trials. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 77, n. 6, p. 549-53, Jun 1996.

GOLDSTEIN, L. Potential effects of common drugs on stroke recovery. *Arch Neurol* [S.I.], v. 55, n. 4, p. 454-6, Apr 1998.

GOMIDE, V.; CHADI, G. The trophic factors S-100beta and basic fibroblast growth factor are increased in the forebrain reactive astrocytes of adult callosotomized rat. *Brain Res* [S.I.], v. 835, n. 2, p. 162-74, Jul 1999.

GOTOW, T. Neurofilaments in health and disease. *Med Electron Microsc* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 173-99, 2000.

GREENE, E. *Anatomy of the rat*. The American philosophical society, 1935. (v. 27).

GROME, J. *et al.* Quantitation of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 8, n. 1, p. 89-95, Feb 1988.

HAGEMANN, G. *et al.* Increased long-term potentiation in the surround of experimentally induced focal cortical infarction. *Ann Neurol* [S.I.], v. 44, n. 2, p. 255-8, Aug 1998.

HAN, B. *et al.* Functional magnetic resonance image finding of cortical activation by neuromuscular electrical stimulation on wrist extensor muscles. *Am J Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 82, n. 1, p. 17-20, Jan 2003.

HARA, Y. Neurorehabilitation with new functional electrical stimulation for hemiparetic upper extremity in stroke patients. *J Nippon Med Sch* [S.I.], v. 75, n. 1, p. 4-14, Feb 2008.

HEBB, D. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. Wiley, 1949.

HENDRICKS, H. *et al.* Functional electrical stimulation by means of the 'Ness Handmaster Orthosis' in chronic stroke patients: an exploratory study. *Clin Rehabil* [S.I.], v. 15, n. 2, p. 217-20, Apr 2001.

HENDRICKS, H. *et al.* Motor recovery after stroke: a systematic review of the literature. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 83, n. 11, p. 1629-37, Nov 2002.

HENNINGER, N. *et al.* Acute ischemic stroke therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* [S.I.], v. 8, n. 10, p. 1389-98, Oct 2010.

HERRERA, D.; ROBERTSON, H. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 50, n. 2-3, p. 83-107, Oct 1996.

HESS, G. *et al.* Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 75, n. 5, p. 1765-78, May 1996.

HESS, G.; DONOGHUE, J. Long-term depression of horizontal connections in rat motor cortex. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 658-65, Apr 1996a.

HESS, G.; DONOGHUE, J. Long-term potentiation and long-term depression of horizontal connections in rat motor cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* [S.I.], v. 56, n. 1, p. 397-405, 1996b.

HESS, G.; KRAWCZYK, R. Cholinergic modulation of synaptic transmission in horizontal connections of rat motor cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* [S.I.], v. 56, n. 4, p. 863-72, 1996.

HLUSTÍK, P.; MAYER, M. Paretic hand in stroke: from motor cortical plasticity research to rehabilitation. *Cogn Behav Neurol* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 34-40, Mar 2006.

HOOK, M.; GRAU, J. An animal model of functional electrical stimulation: evidence that the central nervous system modulates the consequences of training. *Spinal Cord* [S.I.], v. 45, n. 11, p. 702-12, Nov 2007.

HOWELLS, D.; DONNAN, G. Where will the next generation of stroke treatments come from? *PLoS Med* [S.I.], v. 7, n. 3, p. e1000224, 2010.

HSU, J.; JONES, T. Contralesional neural plasticity and functional changes in the less-affected forelimb after large and small cortical infarcts in rats. *Exp Neurol* [S.I.], v. 201, n. 2, p. 479-94, Oct 2006.

HUBBARD, I. *et al.* Task-specific training: evidence for and translation to clinical practice. *Occup Ther Int* [S.I.], v. 16, n. 3-4, p. 175-89, 2009.

HUMM, J. *et al.* Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Res* [S.I.], v. 783, n. 2, p. 286-92, Feb 1998.

HUMMEL, F.; COHEN, L. Drivers of brain plasticity. *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 18, n. 6, p. 667-74, Dec 2005.

HUMPEL, C. *et al.* Increase of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) messenger RNA and protein following implantation of a microdialysis probe into rat hippocampus. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 98, n. 2, p. 229-37, 1994.

HUNTER, A. *et al.* Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol Sci* [S.I.], v. 16, n. 4, p. 123-8, Apr 1995.

HUTCHINSON, E. Neuroplasticity: Functional recovery after stroke. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 12, n. 1, p. 4, Jan 2011.

JENKINS, W. M.; MERZENICH, M. M. Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke. *Prog Brain Res* [S.I.], v. 71, p. 249-66, 1987.

JENSEN, J. *et al.* Motor skill training and strength training are associated with different plastic changes in the central nervous system. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 99, n. 4, p. 1558-68, Oct 2005.

JIN, R. *et al.* Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 87, n. 5, p. 779-89, May 2010.

JOHANSSON, B. Brain plasticity in health and disease. *Keio J Med* [S.I.], v. 53, n. 4, p. 231-46, Dec 2004a.

JOHANSSON, B. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 3-5, p. 163-74, 2004b.

JOHANSSON, B. B. Current trends in stroke rehabilitation. A review with focus on brain plasticity. *Acta Neurol Scand* [S.I.], v. 123, n. 3, p. 147-59, Mar 2011.

JOHNSON, G.; JOPE, R. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 505-12, Dec 1992.

JONES, T.; SCHALLERT, T. Overgrowth and pruning of dendrites in adult rats recovering from neocortical damage. *Brain Res* [S.I.], v. 581, n. 1, p. 156-60, May 1992.

JONES, T.; SCHALLERT, T. Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 2140-52, Apr 1994.

KANDEL, ER. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Nobel Lecture 2000*, Dec 8; p. 392- 439.

KELLY, C. *et al.* Patterns of normal human brain plasticity after practice and their implications for neurorehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 87, n. 12 Suppl 2, p. S20-9, Dec 2006.

KIDO THOMPSON, A.; STEIN, R. Short-term effects of functional electrical stimulation on motor-evoked potentials in ankle flexor and extensor muscles. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 159, n. 4, p. 491-500, Dec 2004.

KIMBERLEY, T. *et al.* Electrical stimulation driving functional improvements and cortical changes in subjects with stroke. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 154, n. 4, p. 450-60, Feb 2004.

KLEIM, J. *et al.* Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 80, n. 6, p. 3321-5, Dec 1998.

KLEIM, J. *et al.* Rat models of upper extremity impairment in stroke. *ILAR J* [S.I.], v. 48, n. 4, p. 374-84, 2007.

KLEIM, J.; JONES, T. Principles of experience-dependent neural plasticity: implications for rehabilitation after brain damage. *J Speech Lang Hear Res* [S.I.], v. 51, n. 1, p. S225-39, Feb 2008.

KLEIM, J. *et al.* Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. *Neurochem Res* [S.I.], v. 28, n. 11, p. 1757-69, Nov 2003.

KLEIM, J. *et al.* Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *J Neurosci* [S.I.], v. 16, n. 14, p. 4529-35, Jul 1996.

KOLLEN, B. *et al.* Functional recovery after stroke: a review of current developments in stroke rehabilitation research. *Rev Recent Clin Trials* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 75-80, Jan 2006.

KOMITOVA, M. *et al.* Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 22, n. 7, p. 852-60, Jul 2002.

KOZLOWSKI, D. *et al.* Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J Neurosci* [S.I.], v. 16, n. 15, p. 4776-86, Aug 1996.

KOZLOWSKI, D.; SCHALLERT, T. Relationship between dendritic pruning and behavioral recovery following sensorimotor cortex lesions. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 97, n. 1-2, p. 89-98, Dec 1998.

KRAKAUER, J. Motor learning: its relevance to stroke recovery and neurorehabilitation. *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 84-90, Feb 2006.

KRAKAUER, J.; SHADMEHR, R. Consolidation of motor memory. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 29, n. 1, p. 58-64, Jan 2006.

KRISHNAN, A. *et al.* Antithrombotic therapy for ischemic stroke: guidelines translated for the clinician. *J Thromb Thrombolysis* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 368-77, Apr 2010.

KWAKKEL, G.; KOLLEN, B. Predicting improvement in the upper paretic limb after stroke: a longitudinal prospective study. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 25, n. 5-6, p. 453-60, 2007.

KWAKKEL, G. *et al.* Understanding the pattern of functional recovery after stroke: facts and theories. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 3-5, p. 281-99, 2004.

KWAKKEL, G. *et al.* Impact of time on improvement of outcome after stroke. *Stroke* [S.I.], v. 37, n. 9, p. 2348-53, Sep 2006.

KWAKKEL, G. *et al.* Probability of regaining dexterity in the flaccid upper limb: impact of severity of paresis and time since onset in acute stroke. *Stroke* [S.I.], v. 34, n. 9, p. 2181-6, Sep 2003.

KWAKKEL, G. *et al.* Predicting disability in stroke--a critical review of the literature. *Age Ageing* [S.I.], v. 25, n. 6, p. 479-89, Nov 1996.

LADOUCEUR, M.; BARBEAU, H. Functional electrical stimulation-assisted walking for persons with incomplete spinal injuries: longitudinal changes in maximal overground walking speed. *Scand J Rehabil Med* [S.I.], v. 32, n. 1, p. 28-36, Mar 2000.

LANG, C. *et al.* Observation of amounts of movement practice provided during stroke rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 90, n. 10, p. 1692-8, Oct 2009.

LANG, N. *et al.* Effects of transcranial direct current stimulation over the human motor cortex on corticospinal and transcallosal excitability. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 156, n. 4, p. 439-43, Jun 2004.

LANGHORNE, P. *et al.* Motor recovery after stroke: a systematic review. *Lancet Neurol* [S.I.], v. 8, n. 8, p. 741-54, Aug 2009.

LARIVIERE, R.; JULIEN, J. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* [S.I.], v. 58, n. 1, p. 131-48, Jan 2004.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* [S.I.], v. 10, n. 9, p. 895-926, Sep 2009.

LAUFER, Y. *et al.* Effects of a foot drop neuroprosthesis on functional abilities, social participation, and gait velocity. *Am J Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 88, n. 1, p. 14-20, Jan 2009.

LAUFER, Y. *et al.* Gait in individuals with chronic hemiparesis: one-year follow-up of the effects of a neuroprosthesis that ameliorates foot drop. *J Neurol Phys Ther* [S.I.], v. 33, n. 2, p. 104-10, Jun 2009.

LEVER, I. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *J Neurosci* [S.I.], v. 21, n. 12, p. 4469-77, Jun 2001.

LIBERSON, W. *et al.* Functional electrotherapy: stimulation of the peroneal nerve synchronized with the swing phase of the gait of hemiplegic patients. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 42, p. 101-5, Feb 1961.

LIBRARY, Y. U. *Report of the librarian of Yale University.* Yale University., 1906.

LIEBESKIND, D. S. Recanalization and reperfusion in acute ischemic stroke. *F1000 Med Rep* [S.I.], v. 2, 2010.

LIEPERT, J. *et al.* Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans. *Stroke* [S.I.], v. 31, n. 6, p. 1210-6, Jun 2000.

LIEPERT, J. *et al.* Lesion-induced and training-induced brain reorganization. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 3-5, p. 269-77, 2004.

LIEPERT, J. *et al.* Motor cortex plasticity during constraint-induced movement therapy in stroke patients. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 250, n. 1, p. 5-8, Jun 1998.

LIPPOLDT, A. *et al.* Photochemically induced focal cerebral ischemia in rat: time dependent and global increase in expression of basic fibroblast growth factor mRNA. *Brain Res* [S.I.], v. 625, n. 1, p. 45-56, Oct 1993.

LLOYD-JONES, D. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* [S.I.], v. 121, n. 7, p. e46-e215, Feb 2010.

LLOYD-JONES, D. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* [S.I.], v. 119, n. 3, p. e21-181, Jan 2009.

LOTZE, M. *et al.* Motor learning elicited by voluntary drive. *Brain* [S.I.], v. 126, n. Pt 4, p. 866-72, Apr 2003.

MANTZ, J. *et al.* Recent advances in pharmacologic neuroprotection. *Eur J Anaesthesiol* [S.I.], v. 27, n. 1, p. 6-10, Jan 2010.

MARKGRAF, C. *et al.* Recovery of sensorimotor function after distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion in rats. *Stroke* [S.I.], v. 25, n. 1, p. 153-9, Jan 1994.

MARQUESTE, T. *et al.* Chronic electrostimulation after nerve repair by self-anastomosis: effects on the size, the mechanical, histochemical and biochemical muscle properties. *Acta Neuropathol* [S.I.], v. 111, n. 6, p. 589-600, Jun 2006.

MARTIN, S. J. *et al.* Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 23, p. 649-711, 2000.

MEHTA, S. L. *et al.* Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev* [S.I.], v. 54, n. 1, p. 34-66, Apr 2007.

MEINTZSCHEL, F.; ZIEMANN, U. Modification of practice-dependent plasticity in human motor cortex by neuromodulators. *Cereb Cortex* [S.I.], v. 16, n. 8, p. 1106-15, Aug 2006.

MELZACK, R.; WALL, P. Pain mechanisms: a new theory. *Science* [S.I.], v. 150, n. 699, p. 971-9, Nov 1965.

MILES, J. D. *Empirical evaluation of neuromusculoskeletal models for functional electrical stimulation of the lower limb.* (2001). xxiv, 180 leaves f. Thesis (Ph D), University of Southern California, 2001., 2001.

MILOT, M. H.; CRAMER, S. C. Biomarkers of recovery after stroke. *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 21, n. 6, p. 654-9, Dec 2008.

MOE, J.; POST, H. Functional electrical stimulation for ambulation in hemiplegia. *J Lancet* [S.I.], v. 82, p. 285-8, Jul 1962.

MORITZ, C. *et al.* Direct control of paralysed muscles by cortical neurons. *Nature* [S.I.], v. 456, n. 7222, p. 639-42, Dec 2008.

MORRIS, R. D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull* [S.I.], v. 50, n. 5-6, p. 437, 1999 Nov 15-Dec 1999.

MOUCHA, R.; KILGARD, M. Cortical plasticity and rehabilitation. *Prog Brain Res* [S.I.], v. 157, p. 111-122, 2006.

MURASE, N. *et al.* Influence of interhemispheric interactions on motor function in chronic stroke. *Ann Neurol* [S.I.], v. 55, n. 3, p. 400-9, Mar 2004.

MURPHY, T. H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 10, n. 12, p. 861-72, Dec 2009.

NELLES, G. Cortical reorganization--effects of intensive therapy. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 3-5, p. 239-44, 2004.

NICOLELIS, M.; LEBEDEV, M. Principles of neural ensemble physiology underlying the operation of brain-machine interfaces. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 10, n. 7, p. 530-40, Jul 2009.

NOWAK, D. A. *et al.* Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 23, n. 7, p. 641-56, Sep 2009.

NUDO, R. Recovery after damage to motor cortical areas. *Curr Opin Neurobiol* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 740-7, Dec 1999.

NUDO, R. Adaptive plasticity in motor cortex: implications for rehabilitation after brain injury. *J Rehabil Med* [S.I.], n. 41 Suppl, p. 7-10, May 2003a.

NUDO, R. Functional and structural plasticity in motor cortex: implications for stroke recovery. *Phys Med Rehabil Clin N Am* [S.I.], v. 14, n. 1 Suppl, p. S57-76, Feb 2003b.

NUDO, R.; FRIEL, K. Cortical plasticity after stroke: implications for rehabilitation. *Rev Neurol (Paris)* [S.I.], v. 155, n. 9, p. 713-7, 1999.

NUDO, R.; MILLIKEN, G. Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 75, n. 5, p. 2144-9, May 1996.

NUDO, R. *et al.* Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 785-807, Jan 1996.

NUDO, R. *et al.* Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve* [S.I.], v. 24, n. 8, p. 1000-19, Aug 2001.

NUDO, R. *et al.* Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science* [S.I.], v. 272, n. 5269, p. 1791-4, Jun 1996.

O'DELL, M. *et al.* Stroke rehabilitation: strategies to enhance motor recovery. *Annu Rev Med* [S.I.], v. 60, p. 55-68, 2009.

OLSON, A. *et al.* Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* [S.I.], v. 16, n. 3, p. 250-60, 2006.

OTTENBACHER, K.; JANNELL, S. The results of clinical trials in stroke rehabilitation research. *Arch Neurol* [S.I.], v. 50, n. 1, p. 37-44, Jan 1993.

PASCUAL-LEONE, A. *et al.* Modulation of muscle responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor skills. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 74, n. 3, p. 1037-45, Sep 1995.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, 1986.

PECKHAM, P.; KNUTSON, J. Functional electrical stimulation for neuromuscular applications. *Annu Rev Biomed Eng* [S.I.], v. 7, p. 327-60, 2005.

PETTE, D.; VRBOVÁ, G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* [S.I.], v. 22, n. 6, p. 666-77, Jun 1999.

PETTIGREW, L. *et al.* Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 16, n. 6, p. 1189-202, Nov 1996.

PEVSNER, P. *et al.* A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. *J Pharmacol Toxicol Methods* [S.I.], v. 45, n. 3, p. 227-33, 2001 May-Jun 2001.

PHAN, T. *et al.* Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? *Clin Exp Pharmacol Physiol* [S.I.], v. 29, n. 1-2, p. 1-10, 2002 Jan-Feb 2002.

PILYAVSKII, A. *et al.* c-fos Expression and NADPH-d reactivity in spinal neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat. *Brain Res* [S.I.], v. 923, n. 1-2, p. 91-102, Dec 2001.

PITCHER, J. *et al.* Frequency-dependent, bi-directional plasticity in motor cortex of human adults. *Clin Neurophysiol* [S.I.], v. 114, n. 7, p. 1265-71, Jul 2003.

PLATZ, T. Motor system recovery: evidence from animal experiments, human functional imaging and clinical studies. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 3-5, p. 137-42, 2004.

PLAUTZ, E. *et al.* Effects of repetitive motor training on movement representations in adult squirrel monkeys: role of use versus learning. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 74, n. 1, p. 27-55, Jul 2000.

PLOUGHMAN, M. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke* [S.I.], v. 40, n. 4, p. 1490-5, Apr 2009.

POFFENBERGER, A. *Reaction time to retinal stimulation: with special reference to the time lost in conduction through nerve centers.* The Science press, 1912.

POMEROY, V. *et al.* Electrostimulation for Promoting Recovery of Movement or Functional Ability After Stroke. Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke* [S.I.], Jul 2006.

POPOVIC, M. *et al.* Restitution of reaching and grasping promoted by functional electrical therapy. *Artif Organs* [S.I.], v. 26, n. 3, p. 271-5, Mar 2002.

PROCHAZKA, A. *et al.* The bionic glove: an electrical stimulator garment that provides controlled grasp and hand opening in quadriplegia. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 78, n. 6, p. 608-14, Jun 1997.

PUKA-SUNDEVALL, M. *et al.* Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res Dev Brain Res* [S.I.], v. 125, n. 1-2, p. 43-50, Dec 2000.

QÜ, M. *et al.* Long-term changes of ionotropic glutamate and GABA receptors after unilateral permanent focal cerebral ischemia in the mouse brain. *Neuroscience* [S.I.], v. 85, n. 1, p. 29-43, Jul 1998.

RABADI, M. H.; BLAU, A. Admission ambulation velocity predicts length of stay and discharge disposition following stroke in an acute

rehabilitation hospital. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 20-6, Mar 2005.

RAMEY, E.; O'DOHERTY, D. *Electrical studies on the unanesthetized brain: a symposium with 49 participants*. P. B. Hoeber, 1960.

REDECKER, C. *et al.* Widespread and long-lasting alterations in GABA(A)-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 22, n. 12, p. 1463-75, Dec 2002.

REIS, J. *et al.* Consensus: "Can tDCS and TMS enhance motor learning and memory formation?". *Brain Stimulat* [S.I.], v. 1, n. 4, p. 363-369, Oct 2008.

REIS, J. *et al.* Contribution of transcranial magnetic stimulation to the understanding of cortical mechanisms involved in motor control. *J Physiol* [S.I.], v. 586, n. 2, p. 325-51, Jan 2008.

RICHARDS, L. G. *et al.* Movement-dependent stroke recovery: a systematic review and meta-analysis of TMS and fMRI evidence. *Neuropsychologia* [S.I.], v. 46, n. 1, p. 3-11, Jan 2008.

RIDDING, M.; UY, J. Changes in motor cortical excitability induced by paired associative stimulation. *Clin Neurophysiol* [S.I.], v. 114, n. 8, p. 1437-44, Aug 2003.

RING, H.; ROSENTHAL, N. Controlled study of neuroprosthetic functional electrical stimulation in sub-acute post-stroke rehabilitation. *J Rehabil Med* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 32-6, Jan 2005.

RIOULT-PEDOTTI, M. *et al.* Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 230-4, Jul 1998.

RISO, R. *et al.* Cognitive feedback for use with FES upper extremity neuroprostheses. *IEEE Trans Biomed Eng* [S.I.], v. 38, n. 1, p. 29-38, Jan 1991.

ROSENKRANZ, K. *et al.* Differential modulation of motor cortical plasticity and excitability in early and late phases of human motor learning. *J Neurosci* [S.I.], v. 27, n. 44, p. 12058-66, Oct 2007.

ROSENKRANZ, K.; ROTHWELL, J. Differences between the effects of three plasticity inducing protocols on the organization of the human motor cortex. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 23, n. 3, p. 822-9, Feb 2006.

ROSNER, B. *Fundamentals of biostatistics*. Duxbury Press, 1986.

ROSSINI, P.; DAL FORNO, G. Integrated technology for evaluation of brain function and neural plasticity. *Phys Med Rehabil Clin N Am* [S.I.], v. 15, n. 1, p. 263-306, Feb 2004.

ROTHI, L.; HORNER, J. Restitution and substitution: two theories of recovery with application to neurobehavioral treatment. *J Clin Neuropsychol* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 73-81, Feb 1983.

SACKLER, A. *The great physiodynamic therapies in psychiatry: an historical reappraisal*. Hoeber, 1956.

SADOWSKY, C.; MCDONALD, J. Activity-based restorative therapies: concepts and applications in spinal cord injury-related neurorehabilitation. *Dev Disabil Res Rev* [S.I.], v. 15, n. 2, p. 112-6, 2009.

SALTER, K. *et al.* Impact of early vs delayed admission to rehabilitation on functional outcomes in persons with stroke. *J Rehabil Med* [S.I.], v. 38, n. 2, p. 113-7, Mar 2006.

SANES, J.; DONOGHUE, J. Plasticity and primary motor cortex. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 23, p. 393-415, 2000.

SANTOS, M. *et al.* Neuromuscular electrical stimulation improves severe hand dysfunction for individuals with chronic stroke: a pilot study. *J Neurol Phys Ther* [S.I.], v. 30, n. 4, p. 175-83, Dec 2006.

SAVER, J. L. Target brain: neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Rev Neurol Dis* [S.I.], v. 7 Suppl 1, p. S14-21, 2010.

SCHIENE, K. *et al.* Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 16, n. 5, p. 906-14, Sep 1996.

SCIENTIFIC, N. *Nobel lectures, physiology or medicine, 1942-1962*. World Scientific, 1999.

SEITZ, R. *et al.* Reorganisation of cerebral circuits in human ischemic brain disease. *Restor Neurol Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 3-5, p. 207-29, 2004.

SHANINA, E. *et al.* Behavioral recovery from unilateral photothrombotic infarcts of the forelimb sensorimotor cortex in rats: role of the contralateral cortex. *Neuroscience* [S.I.], v. 139, n. 4, p. 1495-506, 2006.

SIATRAS, T. *et al.* Normal and paralyzed muscle force and fatigability induced by electrical stimulation. *J Manipulative Physiol Ther* [S.I.], v. 17, n. 5, p. 321-8, Jun 1994.

SINKJAER, T. *et al.* Major role for sensory feedback in soleus EMG activity in the stance phase of walking in man. *J Physiol* [S.I.], v. 523 Pt 3, p. 817-27, Mar 2000.

SMITH, G. *et al.* Functional MRI determination of a dose-response relationship to lower extremity neuromuscular electrical stimulation in healthy subjects. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 150, n. 1, p. 33-9, May 2003.

SOHN, Y. *et al.* Excitability of the ipsilateral motor cortex during phasic voluntary hand movement. *Exp Brain Res* [S.I.], v. 148, n. 2, p. 176-85, Jan 2003.

STALEY, K. Stroke: recovery inhibitors under attack. *Nature* [S.I.], v. 468, n. 7321, p. 176-7, Nov 2010.

STEFAN, K. *et al.* Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J Physiol* [S.I.], v. 543, n. Pt 2, p. 699-708, Sep 2002.

STEFANOVSKA, A. *et al.* FES and spasticity. *IEEE Trans Biomed Eng* [S.I.], v. 36, n. 7, p. 738-45, Jul 1989.

STEIN, D.; HOFFMAN, S. Concepts of CNS plasticity in the context of brain damage and repair. *J Head Trauma Rehabil* [S.I.], v. 18, n. 4, p. 317-41, 2003 Jul-Aug 2003.

STEIN, R. *et al.* A multicenter trial of a footdrop stimulator controlled by a tilt sensor. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 20, n. 3, p. 371-9, Sep 2006.

STROEMER, R. *et al.* Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* [S.I.], v. 26, n. 11, p. 2135-44, Nov 1995.

STROEMER, R. *et al.* Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke* [S.I.], v. 29, n. 11, p. 2381-93; discussion 2393-5, Nov 1998.

SÁNCHEZ, I. *et al.* Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo. Selective role of site-specific phosphorylation. *J Cell Biol* [S.I.], v. 151, n. 5, p. 1013-24, Nov 2000.

TASHMAN, S. *et al.* Modeling and simulation of paraplegic ambulation in a reciprocating gait orthosis. *J Biomech Eng* [S.I.], v. 117, n. 3, p. 300-8, Aug 1995.

TAUB, E. *et al.* Constraint-Induced Movement Therapy: a new family of techniques with broad application to physical rehabilitation--a clinical review. *J Rehabil Res Dev* [S.I.], v. 36, n. 3, p. 237-51, Jul 1999.

TEASELL, R. *et al.* Plasticity and reorganization of the brain post stroke. *Top Stroke Rehabil* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 11-26, 2005.

TEASELL, R. *et al.* Training and stimulation in post stroke recovery brain reorganization. *Top Stroke Rehabil* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 37-45, 2005.

TIMM, N. *Multivariate analysis, with applications in education and psychology*. Brooks/Cole Pub. Co., 1975.

TOWER, S. S. PYRAMIDAL LESION IN THE MONKEY. *Brain* [S.I.], v. 63, n. 1, p. 36-90, March 1, 1940 1940.

TRAVERSA, R. *et al.* Follow-up of interhemispheric differences of motor evoked potentials from the 'affected' and 'unaffected' hemispheres in human stroke. *Brain Res* [S.I.], v. 803, n. 1-2, p. 1-8, Aug 1998.

TRAYSTMAN, R. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* [S.I.], v. 44, n. 2, p. 85-95, 2003.

TROMPETTO, C. *et al.* Motor recovery following stroke: a transcranial magnetic stimulation study. *Clin Neurophysiol* [S.I.], v. 111, n. 10, p. 1860-7, Oct 2000.

TWITCHELL, T. E. The restoration of motor function following hemiplegia in man. *Brain* [S.I.], v. 74, n. 4, p. 443-80, Dec 1951.

URTON, M. *et al.* Systematic literature review of treatment interventions for upper extremity hemiparesis following stroke. *Occup Ther Int* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 11-27, 2007.

VAN CAMP, N. *et al.* Stimulation of the rat somatosensory cortex at different frequencies and pulse widths. *NMR Biomed* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 10-7, Feb 2006.

VITENZON, A. *et al.* Functional electrostimulation of muscles as a method for restoring motor functions. *Neurosci Behav Physiol* [S.I.], v. 35, n. 7, p. 709-14, Sep 2005.

WANG, W. *et al.* Neural interface technology for rehabilitation: exploiting and promoting neuroplasticity. *Phys Med Rehabil Clin N Am* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 157-78, Feb 2010.

WARD, N. Functional reorganization of the cerebral motor system after stroke. *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 17, n. 6, p. 725-30, Dec 2004.

WARD, N. The neural substrates of motor recovery after focal damage to the central nervous system. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 87, n. 12 Suppl 2, p. S30-5, Dec 2006.

WARD, N. S. *et al.* Neural correlates of outcome after stroke: a cross-sectional fMRI study. *Brain* [S.I.], v. 126, n. Pt 6, p. 1430-48, Jun 2003.

WATSON, B. *et al.* Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* [S.I.], v. 17, n. 5, p. 497-504, May 1985.

WEI, F.; ZHAO, Z. Effect of TENS-like stimulation on C afferent-induced c-fos expression in the rat spinal cord. *Neuroreport* [S.I.], v. 6, n. 12, p. 1659-63, Aug 1995.

WEINGARDEN, H.; RING, H. Functional electrical stimulation-induced neural changes and recovery after stroke. *Eura Medicophys* [S.I.], v. 42, n. 2, p. 87-90, Jun 2006.

WERHAHN, K. *et al.* Contribution of the ipsilateral motor cortex to recovery after chronic stroke. *Ann Neurol* [S.I.], v. 54, n. 4, p. 464-72, Oct 2003.

WERHAHN, K. *et al.* Cortical excitability changes induced by deafferentation of the contralateral hemisphere. *Brain* [S.I.], v. 125, n. Pt 6, p. 1402-13, Jun 2002.

WIELER, M. *et al.* Multicenter evaluation of electrical stimulation systems for walking. *Arch Phys Med Rehabil* [S.I.], v. 80, n. 5, p. 495-500, May 1999.

WILL, B.; KELCHE, C. Environmental approaches to recovery of function from brain damage: a review of animal studies (1981 to 1991). *Adv Exp Med Biol* [S.I.], v. 325, p. 79-103, 1992.

WILLCOCKSON, H. *et al.* Induction of fos-like immunoreactivity by electrocutaneous stimulation of the rat hindpaw. *Somatosens Mot Res* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 151-61, 1995.

WITTE, O. *et al.* Lesion-induced network plasticity in remote brain areas. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 20, n. 8, p. 348-9, Aug 1997.

WITTENBERG, G. F. Experience, cortical remapping, and recovery in brain disease. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 252-8, Feb 2010.

WOLPAW, J. Brain-computer interfaces as new brain output pathways. *J Physiol* [S.I.], v. 579, n. Pt 3, p. 613-9, Mar 2007.

WOLPAW, J.; CARP, J. Plasticity from muscle to brain. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 78, n. 3-5, p. 233-63, 2006 Feb-Apr 2006.

WOOD, N. *et al.* Motor dysfunction in a photothrombotic focal ischaemia model. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 113-20, Aug 1996.

WU, C. *et al.* Enduring representational plasticity after somatosensory stimulation. *Neuroimage* [S.I.], v. 27, n. 4, p. 872-84, Oct 2005.

XERRI, C. *et al.* Plasticity of primary somatosensory cortex paralleling sensorimotor skill recovery from stroke in adult monkeys. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 79, n. 4, p. 2119-48, Apr 1998.

YAN, T. *et al.* Functional electrical stimulation improves motor recovery of the lower extremity and walking ability of subjects with first acute stroke: a randomized placebo-controlled trial. *Stroke* [S.I.], v. 36, n. 1, p. 80-5, Jan 2005.

YI, W. *et al.* [Experimental study on effects of electro-acupuncture in improving synaptic plasticity in focal cerebral ischemia rats]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* [S.I.], v. 26, n. 8, p. 710-4, Aug 2006.

ZHAO, L. R. *et al.* Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* [S.I.], v. 97, n. 1, p. 177-84, 2000.

ZIEMANN, U. *et al.* Pharmacological modulation of plasticity in the human motor cortex. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 243-51, Jun 2006.

ZOLI, M. *et al.* Long-lasting reduction of glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampal field CA1 but not in the dentate

gyrus after neonatal treatment with corticosterone in the rat. *Acta Physiol Scand* [S.I.], v. 138, n. 4, p. 577-9, Apr 1990.