Taisa Amoroso Bortolato Miranda

Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profª Drª Angela Cristina do Valle

São Paulo
2011

Taisa Amoroso Bortolato Miranda

Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profª Drª Angela Cristina do Valle

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Miranda, Taisa Amoroso Bortolato
Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora / Taisa Amoroso Bortolato Miranda. São Paulo, 2011.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Ângela Cristina do Valle

Descritores: 1.Lesão medular 2.Córtex motor 3.Córtex somatosensorial 4.Recuperação motora e sensorial 5.Reabilitação 6.Dor

USP/FM/DBD-226/11

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato e Aida, por me oferecerem sempre o melhor e terem me dado todas as condições de estudo. Sem o apoio deles, em todos os sentidos, este trabalho com certeza não teria sido realizado. Muito obrigada pelo carinho e amor.

Ao meu namorado, Gustavo, pelo apoio, companheirismo, compreensão em relação ao tempo dedicado ao trabalho e amparo nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Renato, Vanessa e Paulo, com os quais eu aprendi a compartilhar, e a quem pude recorrer quando um problema surgisse.

À Nice, minha segunda mãe, pelo carinho e atenção nas horas necessárias.

A todos os meus familiares e amigos, pela convivência e apoio nas minhas decisões.

Ao Edgard Morya, pela confiança em mim e no meu trabalho, além da paciência, empenho, dedicação e orientação criteriosa.

À Angela Cristina do Valle, por ter me acompanhado desde o início desta trajetória e ter me guiado em relação aos caminhos a serem percorridos.

Ao Koichi Sameshima, pelo incentivo contínuo na pesquisa.

Ao grupo do Laboratório de Neurociências, 'Prof. Dr. César Timo-Iaria' – IEP/HSL em parceria com a AASDAP: Marina Faveri, Julien Calais, Eduardo Schenberg, Carlos Stein, Ana Carolina Kunicki, Cyrus Villas-Boas, André Cravo, André Coleman, George e Marisa Montenegro, pelas contribuições científicas e convivência no dia-a-dia, que tornou a execução deste trabalho mais prazerosa.

Ao Birajara Machado do IIEP/HAE, pela colaboração na análise dos dados eletrofisiológicos.

Aos técnicos do Centro de Treinamento do IEP/HSL: Ernande dos Santos, Renato Serapião, Flávio Novais e Petterson Pires, por todo suporte oferecido em relação

aos cuidados no Biotério e fornecimento de materiais cirúrgicos. E à veterinária Andreza Conti Patara, pelo auxílio nos cuidados dos animais quando necessário.

Às Dras. Camila Squarzoni Dale e Rosana de Lima Pagano do Laboratório de Neuromodulação e Dor Experimental – IEP/HSL, pelos ensinamentos e sugestões acerca das avaliações de dor e imunohistoquímica da medula espinhal, que enriqueceram este trabalho.

Ao Dr. Alexandre Fogaça Cristante e Gustavo Bispo do Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos (LETRAN) - IOT/HC, pelo acompanhamento nas cirurgias de lesão medular.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto do Laboratório de Neurobiologia Celular – ICB/USP e ao seu grupo, pela disponibilização de materiais e equipamentos para realização da análise histológica e imunohistoquímica; e ao Adilson Silva Alves que acompanhou todas as etapas realizadas.

Aos meus pacientes, por darem sentido ao meu trabalho.

Às Agências Financiadoras: FAPESP, CAPES e FINEP, pela concessão de bolsa de estudos e auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

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

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Avaliação Basal
ABC	Complexo avidina-biotina-peroxidase
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPG	*Central Pattern Generators* - Geradores de Padrão Central
CTL	Controle
Cx	Córtex
DAB	Diaminobenzidina
dPO	Dia Pós-operatório
ECoG	Eletrocorticograma
EEG	Eletroencefalograma
ERD	*Event-related desynchronization*
ERS	*Event-related synchronization*
et al	e outros
FES	*Functional Electrical Stimulation*
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Linhagem de Célula Glial
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HC	Hospital das Clínicas
HSL	Hospital Sírio-Libanês
IEP	Instituto de Ensino e Pesquisa
ip	Intraperitonealmente
LED	*Light-Emitting Diode*
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos
LFP	*Local Field Potential*
LM	Lesão Medular
M1	Córtex Motor Primário
MATLAB	*Matrix Laboratory*
ME	Medula Espinhal
MEG	Magnetoencefalograma
MMAA	Membros Anteriores
MMPP	Membros Posteriores
ND	Núcleo Dorsal

NeuN	*Neuronal Nuclear*
NGF	Fator de Crescimento de Nervo
NGS	*Normal Goat Serum*
NIML	Núcleo Intermédio Lateral
NIMM	Núcleo Intermédio Medial
NT-3	Neurotrofina-3
NYU	*New York University*
OTG	Órgão Tendinoso de Golgi
PB	*Phosphate Buffer* - Tampão Fosfato
PFA	Paraformoldeído
POI	Pós-operatório de Implante
SmI	Córtex Somatossensorial Primário
SmII	Córtex Somatossensorial Secundário
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPSS	*Statistical Package for Social Sciences*
TP	Trato Piramidal
TR	Treinado
TTL	*Transistor-Transistor Logic*
T5	5ª Vértebra Torácica
T7	7ª Vértebra Torácica
T8	8ª Vértebra Torácica
T9	9ª Vértebra Torácica
T10	10ª Vértebra Torácica
T11	11ª Vértebra Torácica
T13	13ª Vértebra Torácica
L2	2ª Vértebra Lombar
L3	3ª Vértebra Lombar
L4	4ª Vértebra Lombar
L5	5ª Vértebra Lombar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão cortical de acordo com a citoarquitetura 7
Figura 2 - Divisão cortical em camadas 8
Figura 3 - Representação do homúnculo 9
Figura 4 - Áreas envolvidas no controle motor 12
Figura 5 - Vias motoras descendentes 20
Figura 6 - Divisão da medula espinhal em lâminas e núcleos 21
Figura 7 - Vias sensoriais ascendentes 30
Figura 8 - Corno dorsal da medula espinhal 33
Figura 9 - Mapeamento das áreas corticais motoras e somatossensoriais do rato .. 36
Figura 10 - Comparação do trato córtico-espinhal entre roedores e humanos 38
Figura 11 - Desenho esquemático da medula espinhal do rato 39
Figura 12 - Eventos secundários da lesão medular 47
Figura 13 - Classes oscilatória do córtex de rato 69
Figura 14 - Linha do tempo do experimento 78
Figura 15 - Imagens de cortes coronais corticais correspondentes as coordenadas esterotáxicas 79
Figura 16 - Equipamento utilizado para construção do molde das matrizes 80
Figura 17 - Sequência de fotos da construção da matriz de micro-elétrodos 82
Figura 18 - Desenho esquemático da área cortical de implante da matriz 84
Figura 19 - Mesa da cirurgia de implante da matriz 85
Figura 20 - Sequência de fotos da cirurgia de implante 86
Figura 21 - Equipamento de lesão medular – *NYU-Impactor* 91
Figura 22 - Gráfico gerado pelo equipamento de lesão medular 92
Figura 23 - Sequência de fotos da cirurgia de lesão medular 94
Figura 24 - Esteira motorizada para ratos 96
Figura 25 - Dispositivo auxiliar para o treinamento na esteira 96
Figura 26 - Rato posicionado no dispositivo auxiliar 97
Figura 27 - Aparato da avaliação de dor neuropática 101
Figura 28 - Monofilamentos utilizados para avaliação de dor neuropática 102
Figura 29 - Aparato da avaliação de dor térmica 103
Figura 30 - Aparato para registro do sinal eletrofisiológico 104
Figura 31 - Imagem gerada pelo programa de registro eletrofisiológico 105
Figura 32 - Registro eletrofisiológico durante o treinamento na esteira 107
Figura 33 - Definição da área do corno ventral para contagem dos neurônios 114
Figura 34 - Demonstração dos critérios de seleção de canais 117
Figura 35 - Espectro com potência das bandas delimitadas 118
Figura 36 - Sequência de eventos para análise dos dados eletrofisiológicos 119
Figura 37 - Tipos de apoios das patas posteriores após a lesão medular 124
Figura 38 - Respostas da avaliação na escada horizontal 126
Figura 39 - Foto do encéfalo do rato 143
Figura 40 - Foto do crânio com a matriz de micro-elétrodos acoplada 144
Figura 41 - Sequência de fotos de cortes do encéfalo e imagens correspondentes do atlas de anatomia 145
Figura 42 - Foto de corte do encéfalo com rastros de micro-elétrodos 146

Figura 43 - Fotos da medula espinhal de um animal sham 146
Figura 44 - Fotos da medula espinhal de um animal lesado..... 147
Figura 45 - Fotos da morfometria da medula espinhal em cortes histológicos 148
Figura 46 - Fotos de cortes representativos da medula espinhal de um animal de cada grupo selecionados para a análise morfométrica 149
Figura 47 - Foto de corte da medula espinhal lesada com alterações estruturais.. 151
Figura 48 - Foto de corte da medula espinhal com delimitação da área de contagem e motoneurônios em detalhes..... 152

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Peso ao longo do tempo 121
Gráfico 2 - Pontuação da escala BBB ao longo do tempo..... 123
Gráfico 3 - Respostas na escada horizontal ao longo do tempo 127
Gráfico 4 - Avaliação da alodínea antes e depois da lesão 132
Gráfico 5 - Avaliação da hiperalgesia mecânica leve antes e depois da lesão 133
Gráfico 6 - Avaliação da hiperalgesia mecânica intensa antes e depois da lesão . 134
Gráfico 7 - Avaliação da dor térmica antes e depois da lesão 135
Gráfico 8 - Análise da potência *delta* antes e depois da lesão..... 137
Gráfico 9 - Análise da potência *theta* antes e depois da lesão 138
Gráfico 10 - Análise da potência *beta* antes e depois da lesão 138
Gráfico 11 - Análise da potência *delta* ao longo do tempo 139
Gráfico 12 - Análise da potência *theta* ao longo do tempo..... 140
Gráfico 13 - Análise da potência *beta* ao longo do tempo..... 140
Gráfico 14 - Análise da potência *delta* do grupo treinado - comparação do comportamento no campo aberto e treinamento na esteira..... 141
Gráfico 15 - Análise da potência *theta* do grupo treinado - comparação do comportamento no campo aberto e treinamento na esteira..... 142
Gráfico 16 - Análise da potência *beta* do grupo treinado - comparação do comportamento no campo aberto e treinamento na esteira..... 142
Gráfico 17 - Avaliação morfométrica da medula espinhal 150
Gráfico 18 - Número de neurônios por cortes da medula espinhal 153
Gráfico 19 - Número de neurônios nos segmentos rostral, central e caudal à lesão medular 154
Gráfico 20 - Correlação: Volume de Lesão X Escala BBB e Escada Horizontal.... 156
Gráfico 21 - Correlação: Volume de Lesão X Dor Neuropática 156
Gráfico 22 - Correlação: Escala BBB X Dor Neuropática..... 157
Gráfico 23 - Comportamento motor e eletrofisiológico ao longo do tempo..... 159
Gráfico 24 - Regressão: Escala BBB X Bandas *delta* e *beta*..... 161

RESUMO

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

A lesão medular (LM) promove uma condição devastadora que resulta em déficits sensorial e motor, impedindo o desempenho funcional do indivíduo. Modelos experimentais de lesão medular têm sido utilizados na investigação do funcionamento do sistema sensório-motor e da reorganização promovida por meio de tratamentos, podendo corroborar com aplicações clínicas atuais e futuras. Este trabalho tem como objetivos verificar a recuperação funcional e a dinâmica da reorganização cortical do sistema sensório-motor de ratos *Wistar* lesados medulares submetidos a treinamento motor. 17 ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos: treinado (n = 6), controle (n = 7) e sham (n = 4). Todos os animais receberam um implante de matriz de 32 micro-elétrodos no córtex sensório-motor. Os animais do grupo treinado e controle foram submetidos à LM contusa e os do grupo sham somente ao procedimento cirúrgico sem a LM. Foram realizadas as avaliações comportamentais motoras, de dor neuropática (alodínea e hiperalgesia mecânica), de dor térmica e eletrofisiológica antes da LM e nos 1º, 3º, 5º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º e 56º dias pós-operatórios (dPO) da lesão. O grupo treinado realizou treinamento motor em uma esteira com velocidade controlada, tendo início no 5º dPO e foi realizado por 15 minutos, cinco vezes na semana até o final do experimento. Os outros dois grupos ficaram sem treinamento. No 57º dPO, os animais foram sacrificados, e as medulas espinhais e os encéfalos foram coletados para análise histológica. Os resultados mostraram melhora motora significativa do grupo treinado em relação ao controle. Ao final do experimento, os animais treinados foram capazes de realizar passos plantares coordenados consistentes de forma independente. Ambos os grupos lesados apresentaram alodínea após a LM, mas somente o controle apresentou aumento da dor mecânica. Os dados eletrofisiológicos revelaram alterações na atividade cortical sensório-motora no 1º dPO e ao longo do tempo. Foi identificado que o aumento da potência da banda *beta* contribuiu para a melhora motora do grupo treinado e o aumento da potência *delta* contribuiu para a recuperação motora limitada do grupo controle. Na análise histológica os grupos não diferiram em relação ao tamanho da lesão, mas foi identificada uma diminuição significativa dos neurônios do corno ventral da medula espinhal, no segmento caudal à lesão para os animais controles. O treinamento na esteira potencializou a recuperação funcional e parece ter facilitado a reorganização do córtex sensório-motor após a lesão. Esses resultados podem servir de base para futuras aplicações clínicas em pacientes lesados medulares.

Descritores: lesão medular, córtex motor, córtex somatossensorial, recuperação motora e sensorial, reabilitação, dor.

ABSTRACT

Miranda, TAB. *Therapeutic strategy after spinal cord contusion: functional recovery and sensorimotor cortical stability* [Dissertation]. São Paulo: Medicine College of São Paulo University; 2011.

Spinal cord injury (SCI) results in a devastating condition, which leads to motor and sensory deficits that impair the injured person functional performance. Spinal cord injury experimental models are used in sensory-motor functioning and reorganization or plasticity promoted by trainings investigation. Thus, these studies can corroborate with current and future clinical approaches. This work aims to verify the functional recovery and the sensorimotor cortical reorganization dynamics in Wistar rats with spinal cord injury submitted to motor training. 17 rats were randomly divided into 3 groups: trained (n = 6), control (n = 7) and sham (n = 4). All animals received a 32 microelectrodes array in the sensorimotor cortex. Control and trained animals were submitted to contusive SCI and the sham group only to the surgical procedure without the contusion. Motor behavior, neuropathic pain (*allodynia* and mechanical hyperalgesia), thermal pain and electrophysiological assessments were accomplished before SCI and on the 1st, 3rd, 5th, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th, 42nd, 49th and 56th post-operative days (POd). The trained group performed the motor training on a treadmill with controlled speed, starting on the 5th post-operative day and it was done for 15 minutes, five times per week till the end of the experiment. The other two groups did not receive any training. Soon after SCI the animals completely lost the hindlimbs movements. On the 57th POd, the animals were sacrificed and the spinal cords and brains were collected for histological analysis. Results showed significant motor improvement of the trained group. In the end of the experiment, these animals were able to perform consistent coordinated plantar steps on their own. Both injured groups showed *allodynia* after the SCI, but only the control group presented increased mechanical pain. Electrophysiological data revealed sensorimotor cortical activity changes on the 1st POd and over time. It was indentified that an increase in *beta* power contributed to the trained group motor improvement and that an increase in *delta* power contributed to the limited motor recovery of the control group. In the histological analysis the groups did not differ concerning the lesion size, but a significant spinal cord ventral horn neurons decrease in the lesion caudal segment compared to the controlled animals was identified. The treadmill training enhanced functional recovery and seemed to facilitate sensorimotor reorganization after injury. These results can be applied for future clinical interventions in spinal cord injured patients.

Descriptors: spinal cord injury, motor cortex, sensorial cortex, sensory and motor recovery, rehabilitation, pain.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1. Neuroanatomia funcional 4
2.1.1. Sistema motor 4
2.1.1.1. Histórico 6
2.1.1.2. Lobo frontal 11
2.1.1.2.1. Áreas pré-motoras 12
2.1.1.3. Cerebelo e núcleos da base 14
2.1.1.4. Lobo parietal 17
2.1.1.5. Córtex motor primário 18
2.1.1.6. Vias descendentes e medula espinhal 19
2.1.1.7. Motoneurônios inferiores e músculos 24
2.1.2. Sistema sensorial somático 29
2.1.2.1. Sistema coluna dorsal-lemnisco medial 30
2.1.2.2. Sistema ântero-lateral 34
2.1.3. Sistema sensório-motor de ratos 35
2.2. Lesão medular 40
2.2.1. Aspectos macroscópicos 40
2.2.2. Aspectos microscópicos 45
2.2.3. Tratamento 49
2.2.3.1. Neuroproteção, regeneração e transplante celular 49
2.2.3.2. Reabilitação 54
2.2.4. Alterações corticais 62
2.3. Eletrofisiologia cortical 62

3. OBJETIVOS 74

4. MÉTODOS 75

4.1. Local de pesquisa 75
4.2. Comissão de ética 76
4.3. Análise de risco 76
4.4. Sujeitos experimentais 76
4.5. Linha de tempo do experimento 77
4.6. Confecção da matriz de micro-elétrodos 78

4.7. Procedimento cirúrgico de implante crônico da matriz de micro-elétrodos 83
4.8. Procedimento cirúrgico de lesão medular por contusão 90
4.9. Treinamento motor 95
4.10. Avaliações comportamentais 97
4.10.1. Avaliação comportamental motora: escala BBB 98
4.10.2. Avaliação comportamental sensório-motora: escada horizontal 99
4.10.3. Avaliação comportamental de dor neuropática - alodínea e hiperalgesia mecânica: *von Frey Hair Test* 100
4.10.4. Avaliação comportamental de dor térmica: *Hargreaves* 102
4.10.5. Avaliação comportamental eletrofisiológica 104
4.11. Perfusão 107
4.12. Análise histológica e imunohistoquímica 109
4.12.1. Encéfalo 109
4.12.2. Medula espinhal 110
4.13. Análise dos dados 114
4.13.1. Análise do registro eletrofisiológico 115

5. RESULTADOS 120

5.1. Avaliação comportamental motora: escala BBB 122
5.2. Avaliação comportamental sensório-motora: escada horizontal 125
5.3. Avaliação comportamental de dor neuropática - alodínea e hiperalgesia mecânica: *von Frey Hair Test* 129
5.4. Avaliação comportamental de dor térmica: *Hargreaves* 134
5.5. Avaliação comportamental eletrofisiológica 136
5.6. Análise histológica e imunohistoquímica 143
5.6.1. Encéfalo 143
5.6.2. Medula espinhal 146
5.6.2.1. Morfometria 147
5.6.2.2. Contagem de neurônios 151
5.7. Correlações 154
5.8. Regressões 157

6. DISCUSSÃO 162

7. CONCLUSÃO 189

Anexo A - Pontuação Escala BBB 190

Anexo B - Ficha de avaliação da Escala BBB.....191
Anexo C - Rotina para estimativa do espectro com base no periodograma de Welch.....192
Anexo D - Rotina para seleção de canais 193
Anexo E - Rotina para avaliação dos canais aprovados 198
Anexo F - Vídeos.....200

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....201

Apêndice A - Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais IEP/HSL
Apêndice B - Aprovação Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa FMUSP/HC
Apêndice C - Centro de Bioterismo da FMUSP

1. INTRODUÇÃO

A recuperação das funções sensorial e motora após uma lesão no sistema nervoso tem desafiado a neurociência clínica (Fouad e Pearson, 2004) no entendimento de circuitos envolvendo estruturas encefálicas e a medula espinhal, responsáveis pela execução de atividade motora e comportamentos específicos (Liebermann *et al.*, 2006). A interrupção desses circuitos, como ocorre na lesão medular (LM), afeta a condução de informações ascendentes e descendentes, provocando deficiência sensório-motora e dependência que muitas vezes acarreta perda da auto-estima no indivíduo lesado (Hulsebosch, 2002; Lu *et al.*, 2005).

Segundo Afshari *et al.* (2009), mais de dois milhões de pessoas vivem com lesão medular no mundo. Estudos estimam que, somente nos Estados Unidos da América, cerca de 262.000 indivíduos apresentam LM, com aproximadamente 12.000 novos casos por ano (*Spinal Cord Injury Statistics*, 2009). De acordo com os dados do *National Spinal Cord Injury Database* (2010), a incidência de lesões medulares por acidente automobilístico é de 41,3%, seguida por quedas (27,3%), violência (15%), esportes (7,9%) e causas desconhecidas (8,5%). No Brasil estima-se que 180.000 indivíduos vivam com a LM, sendo a incidência de 71 casos por um milhão de habitantes por ano (Masini, 2001).

Em busca de tecnologias assistivas aos pacientes paralisados, várias pesquisas recentes têm demonstrado a viabilidade de interfaces cérebro-máquina para restauração da função motora (Carmena *et al.*, 2005;

Zacksenhouse *et al.*, 2007; Fitzimmons *et al.*, 2007; Velliste *et al.*, 2008). Desta forma, emerge a necessidade de novos estudos com os aspectos envolvidos na reabilitação desses pacientes com lesão medular e interface cérebro-máquina.

Devido a incapacidade motora ser um fator extremamente limitante para as atividades de vida diária, muitos pesquisadores têm estudado estratégias de tratamento para melhorar a habilidade motora desses indivíduos. O treinamento na esteira é uma forma de atividade física intensamente investigada em estudos experimentais, tanto em humanos (Behrman e Harkema, 2000; Dobkin *et al.*, 2003; Hutchinson *et al.*, 2004; Giangregorio *et al.*, 2005; Dietz, 2009), como em modelos animais (Kunkel-Bagden *et al.*, 1993; De Leon *et al.*, 1998; Edgerton *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2006; Bigbee *et al.*, 2007; Barriere *et al.*, 2008).

Kim *et al.* (2006) afirmam que a recuperação da função motora após uma lesão é mediada por uma reorganização estrutural e funcional do sistema motor residual, que pode ser induzida pelo treinamento motor. Esta remodelação compensatória ocorre em múltiplos níveis neurais, incluindo centros espinhais motores, tratos motores supraespinhais descendentes, tronco cerebral e córtex motor (Bareyre, 2008). Vários estudos mostram que a conectividade sináptica no córtex motor pode ser modificada após a lesão medular (Jones *et al.*, 1999; Kleim *et al.*, 2004; Adkins *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2007).

Normalmente, métodos eletrofisiológicos são utilizados em pesquisas com animais não lesados, a fim de estudar a ativação do córtex motor durante determinadas tarefas (Kleim *et al.*, 1998; Kleim *et al.*, 2004;

Molina-Luna *et al.*, 2008). Por outro lado, nenhum estudo realizou os registros eletrofisiológicos das alterações corticais decorrentes da lesão medular e suas relações com as estratégias de reabilitação funcional.

Ainda não está claro em que extensão os programas de reabilitação podem potencializar ou acelerar a recuperação funcional de pacientes lesados medulares. Deste modo, pesquisas com modelos animais lesados medulares submetidos a diferentes modelos de treinamento podem contribuir para os conhecimentos nesta área. Como evidenciado a partir da revisão de literatura, não existem estudos que envolvam lesão medular, reabilitação e eletrofisiologia como método de avaliação. Neste sentido, o presente trabalho visa preencher esta lacuna na tentativa de compreender melhor os mecanismos envolvidos na recuperação funcional após a lesão medular para que futuramente tratamentos clínicos mais eficazes, de acordo com a evolução da lesão, possam ser desenvolvidos. Esses resultados podem fornecer medidas das alterações corticais que devem, por exemplo, ser consideradas na reabilitação de pacientes lesados medulares com interface cérebro máquina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Neuroanatomia funcional

Os sistemas motor e sensorial somático estão intimamente relacionados, de forma que a informação sensorial somática do corpo é essencial para coordenar os movimentos, que, por sua vez, são essenciais para nos proteger de estímulos sensoriais aversivos. Estes sistemas são formados por diversas estruturas do sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e sistema muscular, interconectadas por diferentes vias ascendentes (sistema sensorial) e descendentes (sistema motor). Neste item será explicada, de maneira geral, a organização anatômica e funcional destes sistemas para que haja um melhor entendimento posterior sobre como a lesão medular leva a uma interpretação inadequada dos estímulos sensoriais, afetando o comportamento sensório-motor.

Os termos *aferente* e *eferente* serão comumente usados, sendo que o termo aferente se refere aos neurônios, fibras, ou feixe de fibras que **trazem** impulsos a uma determinada área do sistema nervoso e o termo eferente se refere aos neurônios, fibras ou feixe de fibras que **levam** a informação desta área (Machado, 1983).

2.1.1. Sistema motor

O sistema motor engloba três categorias distintas de movimento: reflexo, automático e voluntário. De maneira resumida, o reflexo

consiste em padrões coordenados involuntários de contração e relaxamento muscular, elicitados por um estímulo periférico. O movimento reflexo mais simples envolve somente a sinapse do neurônio sensorial primário com o neurônio motor, correspondendo a um circuito monossináptico. No entanto, a maioria dos reflexos é mediada por circuitos polissinápticos, envolvendo regiões supra-espinhais.

Os movimentos automáticos são iniciados voluntariamente e continuam a ser executados de forma automática, como por exemplo, a locomoção. Estudos verificaram que mesmo quando a medula espinhal é desconectada do tronco encefálico e encéfalo, ela é capaz de gerar estes comportamentos, mostrando que as conexões espinhais agem como geradores centrais de padrão (*Central Pattern Generators, CPG*) (Kandel, 2000; Grillner, 2006; Edgerton *et al.*, 2008; Dietz, 2009). O conceito de geradores centrais de padrão sugere que o padrão básico de locomoção é gerado dentro da medula espinhal (ME) e que os comandos descendentes, assim como as informações sensoriais, interagem com esta circuitaria para iniciar, parar e modular (amplitude de movimento, coordenação, velocidade) a locomoção (Rossignol, 2006). Mais adiante, estudos sobre o envolvimento de *CPG* na lesão medular serão apresentados.

Os movimentos voluntários, por sua vez, são iniciados com um objetivo específico, podem ser aprimorados com o treinamento e envolvem uma circuitaria complexa. Para realizar um simples movimento voluntário, como pegar um objeto, distintos componentes do SNC, do SNP e muscular esquelético são recrutados. Dentre estes componentes encontram-se: áreas corticais de ordem superior, núcleos da base, cerebelo, córtex motor, tratos

motores descendentes, medula espinhal, incluindo seus interneurônios e motoneurônios, e por fim o músculo estriado esquelético. Será descrito como cada um desses componentes participa do ato motor, porém antes disso, um breve histórico sobre alguns estudos pioneiros nesta área serão relatados.

2.1.1.1. Histórico

Broca, em 1861, foi um dos primeiros pesquisadores que realmente evidenciou que áreas distintas do córtex cerebral possuem funções distintas (*apud* Penfield e Boldrey, 1937). Segundo Penfield e Boldrey (1937), foram Fritsch e Hitzig, em 1870, que apresentaram o primeiro trabalho bem sucedido a partir de estimulação elétrica direta no córtex cerebral de mamíferos, mostrando que a estimulação da parte anterior de um dos hemisférios do cachorro gerava movimentos de grupos musculares do lado oposto do corpo. Eles afirmaram também que a parte posterior do cérebro não elicitava qualquer movimento.

Estudos subseqüentes foram cada vez mais comprovando a existência de áreas corticais responsáveis por funções distintas. No início dos anos 1900, um neurocientista alemão chamado Korbinian Brodmann definiu e numerou as áreas corticais, tendo por base a organização cortical citoarquitetônica dos neurônios, observada a partir da coloração de Nissl. Brodmann, com os incentivos de Oskar Vogt (fundador do maior instituto de pesquisa do cérebro na época), estudou a citoarquitetura cortical de 64 espécies de mamíferos, sendo o córtex humano divido em 43 áreas (Figura 1).

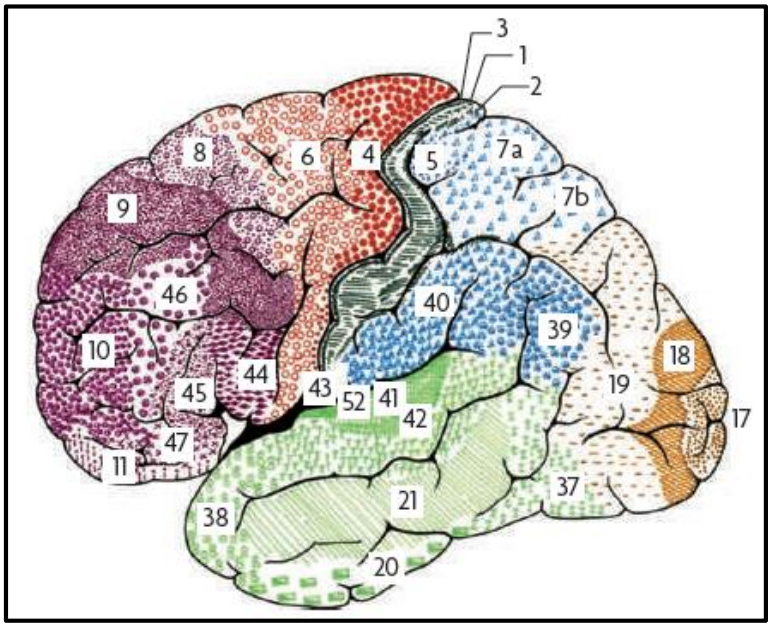

Figura 1 - Demonstração da divisão do córtex em áreas (enumeradas), identificadas por Brodmann, de acordo com a citoarquitetura de cada região. As áreas que serão mais frequentemente mencionadas neste trabalho são: 1, 2 e 3 (somatossensorial primária); 4 (motora primária); 5 e 7 (associativas); 6 (pré-motora e motora suplementar); e 23 e 24 (cingulado, que não está representado nesta figura). Fonte: Zilles e Amunts, 2010.

Após o estudo de citoarquitetura feito por Brodmann, seis camadas corticais foram classificadas de acordo com os tipos de neurônios presentes (Figura 2). Apesar de estudos subsequentes terem apontado algumas falhas na classificação de Brodmann, as áreas ainda são utilizadas para designar regiões corticais funcionais (Pearce, 2005; Zilles e Amunts, 2010).

Em 1917, Sherrington e Leyton foram os primeiros a estabelecerem de forma mais precisa a extensão da área motora, fornecendo um detalhado “mapa motor” cortical em primatas não humanos. Já nesta época foi demonstrada uma sobreposição das áreas que elicitavam movimentos de partes adjacentes do corpo. De acordo com Lemon (2008), esses pesquisadores despertaram um grande interesse na área de fisiologia do córtex, e hoje, trabalhos realizados por eles são extremamente relevantes para

o entendimento de como funciona o cérebro e para as implicações clínicas destas funções em pacientes com lesões do sistema nervoso.

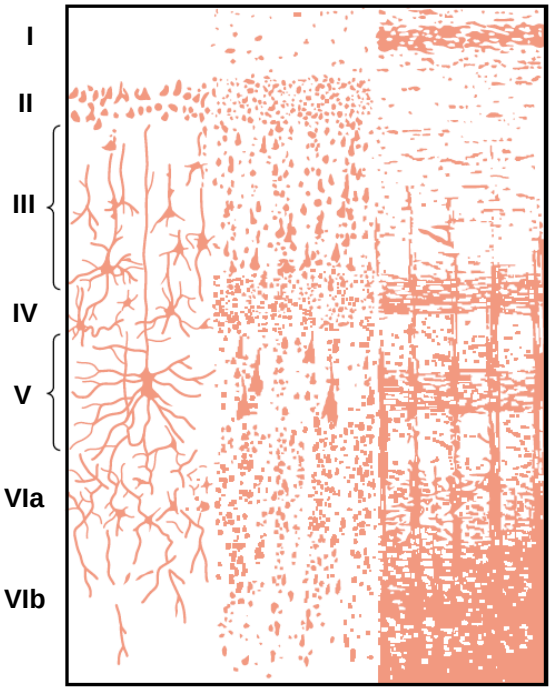

Figura 2 - Divisão do córtex cerebral em camadas: I molecular; II granular externa; III piramidal externa (pequenas células piramidais); IV granular interna; V piramidal interna (grandes células piramidais); VI polimorfa (células fusiformes ou polimórficas). Da esquerda para direita, três técnicas histológicas demonstram as diferenças entre as camadas em relação aos corpos celulares (técnica de Nissl), aos formatos de células (técnica de Golgi) e à mielinização (técnica de Weigert). A camada IV do córtex sensorial primário é mais espessa e isso ocorre com a camada V para o córtex motor primário. Fonte: Guyton e Hall, 2006.

Penfield e Boldrey (1937) apresentaram resultados parecidos com os obtidos por Sherington e Leyton, porém em humanos. Eles mostraram uma consistência nos dados obtidos sobre as funções dos córtices sensorial e motor, por meio de estimulação elétrica realizada em 126 pacientes, que necessitavam de cirurgia para retirada de tumores ou de focos epiléticos. Na maioria dos casos, a estimulação foi feita com os pacientes sem anestesia geral para que eles pudessem relatar detalhes das sensações. A partir dos resultados, eles concluíram que o movimento possui uma representação

cortical proporcionalmente maior na região anterior à fissura central e que a sensação está representada também de forma proporcionalmente maior posteriormente. Além disso, foi demonstrado que essas duas áreas se sobrepõem consistentemente e correspondem uma a outra horizontalmente (Figura 3).

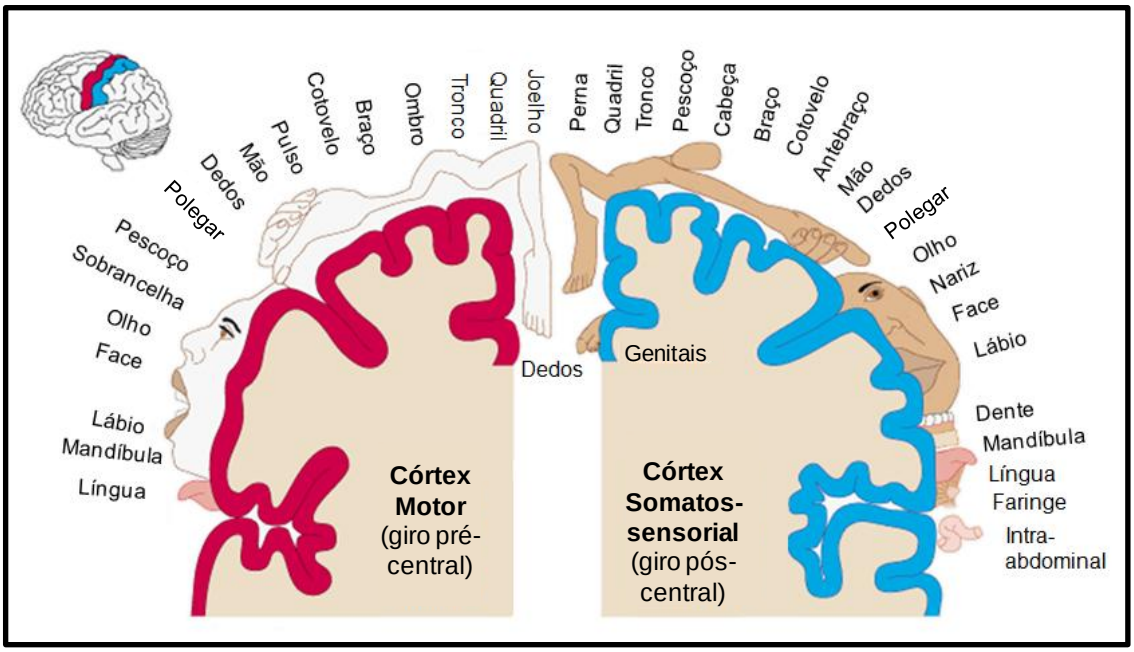

Figura 3 - Representação do homúnculo nas áreas corticais motor (em vermelho) e sensorial (em azul). É possível notar a sobreposição dos mapas no sentido horizontal. Fonte: modificada de Marieb, 2001.

O mapeamento do cérebro elaborado por Penfield retrata um homúnculo (“pequeno homem”) como caricatura, na qual as características correspondem ao tamanho da representação cortical de cada área do corpo (Todman, 2008). A existência deste mapa já foi demonstrada em diferentes espécies, como humanos, primatas não humanos, roedores, existindo diferenças entre eles. Algumas semelhanças são a não continuidade desses mapas, de forma que regiões adjacentes do corpo não necessariamente possuem representação adjacente no córtex. Além disso, como já mencionado,

a escala do corpo não é “respeitada”, de forma que a área ocupada pela mão em primatas, por exemplo, é muito maior do que aquela destinada para o tronco. O tamanho relativo da área do córtex dedicado a cada parte do corpo está correlacionado com a densidade das eferências motoras enviadas para aquela região. Este fato está diretamente relacionado com as diferenças encontradas nos mapas motores das diferentes espécies, uma vez que as habilidades motoras variam muito dentre elas (Kandel *et al.*, 2000).

Em 1954, Bernhard e Bohm ressaltaram que era necessário muito cuidado ao tirar conclusões sobre a organização cortical motora fundamentadas em estudos experimentais em que movimentos ou contrações musculares são registrados. Estes experimentos talvez possam representar o resumo de diferentes atividades (por exemplo: respostas monossinápticas a estímulos elétricos individuais em um grupo de motoneurônios relativamente restrito; respostas tardias, provavelmente polissinápticas, nos mesmos ou diferentes motoneurônios com uma distribuição periférica mais ampla; ação facilitatória nos mesmos motoneurônios; ação inibitória devido a estímulos aplicados em regiões adjacentes), que podem fazer parte de diferentes sistemas motores descendentes.

Muitos estudos, que serão mencionados ao longo deste trabalho, surgiram posteriormente na tentativa de aprimorar o conhecimento sobre a funcionalidade cortical e a sua influência nos comportamentos diários. Assim, percebeu-se que apesar de o mapa cortical apresentado parecer uma estrutura bem estabelecida, ele é altamente instável, podendo ser alterado em situações diversas, tais como nas lesões do sistema nervoso central (Hamzei *et al.*, 2006; Kaas *et al.*, 2008; Kokotilo *et al.*, 2009), nas mudanças periféricas

(Sanes *et al.*, 1988; Jain *et al.*, 1998), no aprendizado motor e no treinamento (Kleim *et al.*, 2004), em amputação de membros (Jain *et al.*, 1998; Siemionow e Mendiola, 2010), entre outras.

2.1.1.2. Lobo frontal

O lobo frontal pode ser dividido em duas regiões principais: rostral (córtex pré-frontal), que corresponde essencialmente às funções cognitivas; e caudal, que está relacionado com o controle de movimentos. Histologicamente, a porção caudal é caracterizada pelo fato de possuir pouca ou nenhuma célula granular, sendo denominado córtex frontal agranular (Geyer *et al.*, 2000; Rizzolatti e Luppino, 2001). Citoarquitetonicamente, esta região não é homogênea, possuindo diversas áreas corticais motoras, incluindo o córtex motor primário (M1) e pelo menos seis áreas pré-motoras: córtex pré-motor ventral e dorsal, área motora suplementar, córtex cingulado motor ventral, dorsal e caudal (Dum e Strick, 2002; Figura 4).

Até não muito tempo atrás, pensava-se que o córtex motor possuía um papel essencialmente de execução “passiva” do ato motor, que tinha como origem as áreas associativas dos córtices parietal e frontal. Hoje, está mais clara a visão de que as transformações sensório-motoras resultam de uma rigorosa cooperação entre áreas parietais e motoras, ligadas por conexões fortes e recíprocas, formando amplos circuitos segregados (Geyer *et al.*, 2000). Cada um destes circuitos está relacionado com aspectos específicos da transformação sensório-motora, na qual as informações sensoriais e motoras estão completamente integradas nos níveis motor e parietal, podendo

ser considerados uma unidade funcional do sistema cortical motor (Luppino e Rizzolatti, 2000).

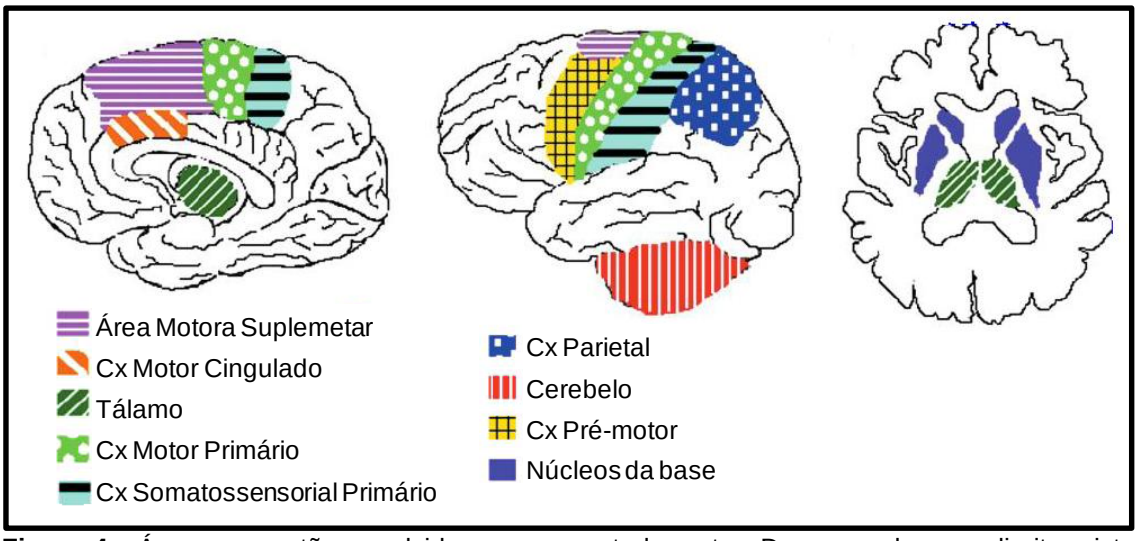

Figura 4 - Áreas que estão envolvidas com o controle motor. Da esquerda para direita: vista medial, vista lateral e vista axial. Cx: córtex. Fonte: modificada de Kokotilo *et al.*, 2009.

2.1.1.2.1. Áreas pré-motoras

As áreas pré-motoras localizadas rostralmente ao M1 na superfície lateral do lobo frontal são os córtices pré-motores ventral e dorsal (porção lateral da área citoarquitetônica 6). Medialmente estão localizadas a área motora suplementar (porção medial da área citoarquitetônica 6) e as áreas motoras do cingulado dorsal, ventral e rostral (áreas citoarquitetônica 6c, 23c e 24c, respectivamente) (He *et al.*, 1993; He *et al.*, 1995; Wise *et al.*, 1996; Rizzolatti e Luppino, 2001; Dum e Strick, 2002). Igualmente ao córtex motor primário, as áreas pré-motoras contêm neurônios piramidais na camada V que projetam axônios para a medula espinhal, no entanto, os corpos celulares são menores do que aqueles encontrados em M1 (Dum e Strick, 1991).

De forma geral, as áreas pré-motoras recebem informações do córtex somatossensorial primário (SmI), dos córtices associativos pré-frontal e parietal posterior, da área límbica e de alguns núcleos talâmicos e todas elas possuem projeções ao córtex motor primário, participando de forma importante no planejamento do movimento por transmitir informações em relação a aspectos motivacionais, planos de longo prazo e memória de ações passadas (Wise *et al.*, 1996; Inase *et al.*, 1996; Sakai *et al.*, 2000; Luppino e Rizzolatti, 2000; Dum e Strick, 2002; Fogassi e Luppino, 2005). Além disso, com o advento das técnicas de traçadores neuronais retrógrados e anterógrados, pode ser demonstrado que cada área pré-motora tem acesso direto à medula espinhal, podendo participar também na execução do movimento (Akkal *et al.*, 2007).

Ao contrário do que se pensava antigamente, a contribuição geral das áreas pré-motoras para o trato córtico-espinhal é numericamente equivalente ou maior do que de M1, mudando a visão de que o M1 é a “via final comum” (Dum e Strick, 2002). Com esses achados pode-se dizer também que talvez não haja uma organização hierárquica das áreas corticais motoras, uma vez que todas possuem projeções para a medula espinhal e se são lesadas de forma isolada não comprometem o movimento como um todo (Wise *et al.*, 1996; Graziano *et al.*, 2002).

Quatro áreas pré-motoras apresentam locais de origem distintos de projeções para os segmentos cervicais e lombossacrais da medula espinhal: córtex pré-motor dorsal, área motora suplementar, área motora do cingulado dorsal e ventral. Portanto, essas áreas contribuem tanto para o movimento de cabeça, pescoço e tronco como para o de membros superiores e

inferiores. A área motora do cingulado rostral também possui projeções para os segmentos cervicais e lombossacrais da medula espinhal, porém o local de origem dessas projeções não está bem definido (He *et al.*, 1993; He *et al.*, 1995). E a área pré-motora ventral projeta somente para segmentos cervicais altos, estando envolvida com o início e controle de movimentos de mão e dedos relacionados com dicas somatossensoriais e visuais (He *et al.*, 1993; He *et al.*, 1995; Dum e Strick, 2002; Dancause *et al.*, 2006).

Após estas colocações, fica claro que as áreas pré-motoras possuem substrato anatômico necessário para influenciar o processamento motor tanto em nível cortical como medular. Além das projeções para M1 e para a medula espinhal, algumas áreas pré-motoras participam de alças de conexões distintas com o cerebelo e núcleos da base.

2.1.1.3. Cerebelo e núcleos da base

O cerebelo e os núcleos da base, apesar de não possuírem projeções diretas para os motoneurônios localizados na medula espinhal, apresentam importante influência regulatória sobre o comportamento motor, participando na programação, início e execução de movimentos de membros e olhos (Hoover e Strick, 1999).

O cerebelo é composto por uma camada cortical externa e internamente por substância branca, onde se encontram quatro núcleos profundos pareados bilateralmente: globoso, fastigial, emboliforme e denteado. Anátomo-funcionalmente, o cerebelo é dividido em três regiões. O *vestíbulo-cerebelo* corresponde ao lobo flóculo-nodular e está relacionado com o controle

de equilíbrio e movimento ocular, por receber aferências vestibulares e contribuir para as eferências vestíbulo-espinhais (Machado, 1983; Martin, 2003).

O *espino-cerebelo* consiste no verme anterior e posterior mais a zona intermediária dos hemisférios cerebelares. Ele recebe aferências diretas e indiretas de tratos espino-cerebelares, que transmitem informações sobre os comandos motores e as consequências sensoriais do movimento. Deste modo, o cerebelo pode comparar as informações periféricas de aferências sensoriais (proprioceptivas, somestésicas), que sinalizam a todo tempo como o movimento está sendo executado, com aferências corticais de intenção motora (o que se pretende fazer), podendo participar da correção do movimento enquanto ele está acontecendo (Wolpert *et al.*, 2001). Por exemplo, ao levantar um objeto muito mais leve do que era esperado inicialmente.

E, por fim, o *cérebro-cerebelo* é composto pelos hemisférios cerebelares e a parte do meio do verme. Esta região recebe aferências corticais via núcleo pontino. As fibras córtico-pontinas têm origem predominante nas áreas sensório-motoras, incluindo córtex motor e somatossensorial primários, área suplementar motora, córtex pré-motor e córtex parietal posterior. As eferências do cérebro-cerebelo trafegam pelo núcleo denteado que está particularmente envolvido no controle motor (de movimentos guiados visualmente), enviando projeções ao núcleo ventrolateral contralateral do tálamo (Sakai *et al.*, 2000). A partir deste núcleo existem projeções ao córtex motor primário direta ou indireta, por meio de conexões com o córtex pré-motor (Martin *et al.*, 2003).

Os núcleos da base consistem em estruturas subcorticais (caudado, putamen, globo pálido interno e externo, substância negra compacta e reticulada, e núcleos subtalâmicos), conectadas reciprocamente com o sistema motor cortical. O caudado e putamen, conjuntamente chamados de neoestriado, recebem a maioria das aferências aos núcleos da base, vindas principalmente do córtex cerebral (M1, SmI, áreas associativas parietal e frontal), mas também de núcleos intralaminares do tálamo e da substância negra compacta (Grillner *et al.*, 2005).

O neoestriado envia eferências ao globo pálido e substância negra reticulada, que são as estruturas responsáveis pela maioria das eferências dos núcleos da base. As projeções mais densas são para o núcleo ventral anterior do tálamo, mas há também projeções ao núcleo centromediano do tálamo. Do núcleo ventral anterior há projeções direta ou indireta ao córtex motor primário, por meio de conexões com a área motora suplementar predominantemente (Sakai *et al.*, 2000; Akkal *et al.*, 2007).

Uma vez que os núcleos da base recebem aferências corticais e enviam eferências talâmicas e corticais também, ocorre uma alça de retroalimentação negativa, isto é, a participação dos núcleos da base no movimento ocorre a partir da memória, experiência do ato motor (aferências corticais). Deste modo, as estruturas subcorticais podem influenciar no movimento antes mesmo de ele ser iniciado (Kandel, 2000; Bear *et al.*, 2008).

Portanto, tanto o cerebelo como os núcleos da base fornecem circuitos de retroalimentação que regulam o córtex motor primário de duas maneiras: via tálamo-cortical e via córtico-cortical. Além disso, recentemente Bostan *et al.* (2010) investigaram se os núcleos da base poderiam influenciar

diretamente na função do cerebelo sem o envolvimento do córtex cerebral e os autores mostraram que existem projeções, predominantemente dissinápticas, dos núcleos da base por meio do núcleo subtalâmico ao córtex cerebelar. Em um estudo anterior do mesmo grupo (Hoshi *et al.*, 2005) já havia sido evidenciado que o núcleo denteado do cerebelo possui uma projeção dissináptica para o componente de entrada dos núcleos da base, o estriado. Esses dados fornecem substrato anatômico suficiente para uma comunicação de duas vias entre o cerebelo e os gânglios da base, formando uma rede funcional integrada.

2.1.1.4. Lobo parietal

Além das áreas pré-motoras, cerebelo e núcleos da base, as áreas sensoriais somáticas primária (áreas citoarquitetônicas de Brodmann 1, 2, 3a e 3b), secundária (SmII) e outras áreas do lobo parietal influenciam diretamente o córtex motor primário (Guyton e Hall, 2006; Bear *et al.*, 2008). As projeções mais densas e extensas do lobo parietal ao M1 se originam nas porções posteriores do lobo parietal superior (Wise *et al.*, 1997). Essas aferências partem da porção lateral do giro pós-central e da margem dorsal do sulco intraparietal. Cada um dos circuitos parieto-frontais estão relacionados com uma transformação sensório-motora particular, que são necessárias para geração do movimento (Wise *et al.*, 1997; Luppino e Rizzolatti, 2000). Além disso, Fogassi e Luppino (2005) evidenciaram em sua revisão, o envolvimento do córtex parietal posterior em aspectos de ordem superior do controle motor,

assim como codificação do objetivo das ações e ligação entre ação e percepção.

A origem das aferências do SmI é bastante difusa, embora sua densidade seja menor do que as das porções parietais posteriores. A potência das projeções de SmI é maior das áreas 1 e 2, que estão envolvidas com o processamento tardio da informação aferente proprioceptiva e cutânea em comparação com as projeções vindas das áreas 3b, que está relacionada com o estágio precoce de processamento (Martin, 2003). E a área 3a recebe aferências proeminentes de fibras sensoriais do tipo Ia que envolvem os fusos musculares e possui projeções substanciais ao córtex, estando envolvida com o controle eferente das informações proprioceptivas ascendentes aos centros superiores (Rathelot e Strick, 2006).

Além disso, Pavlides e colaboradores (1993) mostraram a importância do córtex somatossensorial no aprendizado de novas tarefas motoras, uma vez que quando lesada esta estrutura, o aprendizado era prejudicado de forma significativa.

2.1.1.5. Córtex motor primário

Anatomicamente, o córtex motor primário corresponde à área citoarquitetônica de Brodmann 4, e está localizado na parte caudal do giro pré-central, se estendendo do sulco lateral à superfície medial do hemisfério cerebral. Esta região recebeu este nome, pois é a área do córtex que gera movimento com a menor intensidade de estímulo elétrico (Penfield e Boldrey, 1937). O M1, assim como outras áreas do neocórtex, é uma estrutura

organizada em camadas, caracterizando-se por possuir uma espessa camada V, composta por células piramidais gigantes (células de Betz), que dão origem às projeções descendentes (Rathelot e Strick, 2006; Figura 2).

No início pensava-se que a grande quantidade de conexões monossinápticas com os motoneurônios da medula espinhal e que os grandes corpos celulares das células piramidais eram as marcas da função motora primária (Guyton e Hall, 2006). Porém, já em 1954, Bernhard e Bohm mostraram que estas características estão correlacionadas, principalmente, com o controle da musculatura de dedos, mãos e punhos e essa idéia foi fortalecida em estudos posteriores (Bortoff e Strick, 1993; Maier *et al.*, 1997; Lemon *et al.*, 1998). O córtex motor primário possui uma representação organizada do corpo de forma somatotópica, isto é, eferências de partes adjacentes do corpo estão geralmente localizadas próximas umas das outras e este padrão é mantido ao longo de vários níveis neurais (Darian-Smith, 2009).

2.1.1.6. Vias descendentes e medula espinhal

Vias motoras de mamíferos envolvem uma série de sistemas descendentes (Figura 5). Eles possuem características neuroanatômicas, incluindo além de origem, percurso e término distintos, número e tamanho de fibras distintos (Lemon, 2008). Neste trabalho serão apresentadas nove vias descendentes de controle motor que terminam no tronco encefálico ou na medula espinhal. Três destes tratos têm a origem na camada V do córtex cerebral, principalmente no lobo frontal, sendo eles: trato córtico-espinhal lateral; trato córtico-espinhal anterior; e trato córtico-bulbar. Além dos tratos

córtico-espinhais diretos, existem vias indiretas que fazem conexões no tronco encefálico, como o trato córtico-retículo-espinhal. Os outros seis tratos têm a sua origem em núcleos do tronco encefálico, sendo eles: trato rubro-espinhal; tratos retículo-espinhal pontino e bulbar; trato tecto-espinhal e tratos vestíbulo-espinhal medial e lateral (Lundy-Ekman, 2004).

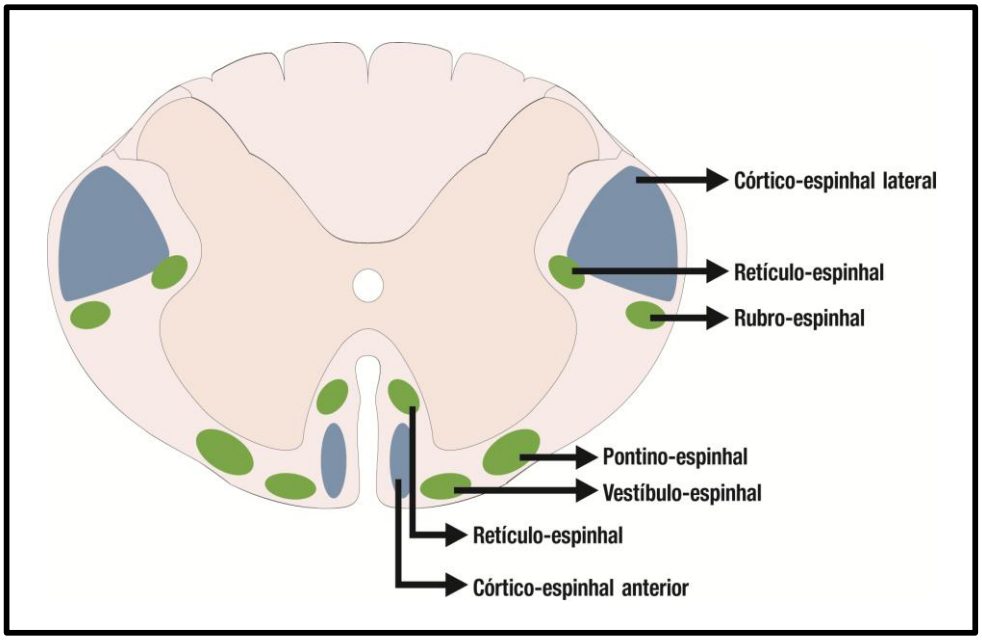

Figura 5 - Desenho esquemático da localização do término das vias motoras descendentes na medula espinhal. Tratos piramidais: córtico-espinhal lateral e córtico-espinhal anterior (em azul). Tratos extra-piramidais: rubro-espinhal, vestíbulo-espinhal e pontino-espinhal (em verde).

As vias motoras descendentes possuem muitas funções, que têm como objetivo comum a modulação cortical da atividade medular. Lemon e Griffiths, em uma revisão realizada em 2005, listaram algumas dessas funções, tais como: controle descendente das aferências sensoriais, incluindo nocicepção; excitação direta e indireta de motoneurônios; inibição de motoneurônios; controle autonômico; plasticidade de longa duração de circuitos espinhais; e funções tróficas ao longo do desenvolvimento.

Exceto pelo trato córtico-bulbar, que termina em neurônios motores de nervos cranianos e interneurônios da formação reticular, as vias motoras descendentes têm como destino final a medula espinhal (Martin, 2003). Esta estrutura é composta por substância cinzenta e substância branca. A substância cinzenta é composta predominantemente por corpos de células neuronais, podendo ser divida em duas regiões funcionalmente distintas, os cornos ventrais e dorsais. O corno dorsal é a porção receptiva, ou sensorial, e o corno ventral é a porção responsável pela função motora esquelética. A substância cinzenta possui ainda uma divisão mais detalhada, denominada pelo neurocientista sueco Bror Rexed no início dos anos 50, na qual X lâminas foram classificadas de acordo com as suas estruturas celulares (Sarikcioglu e Ozsoy, 2008; Figura 6).

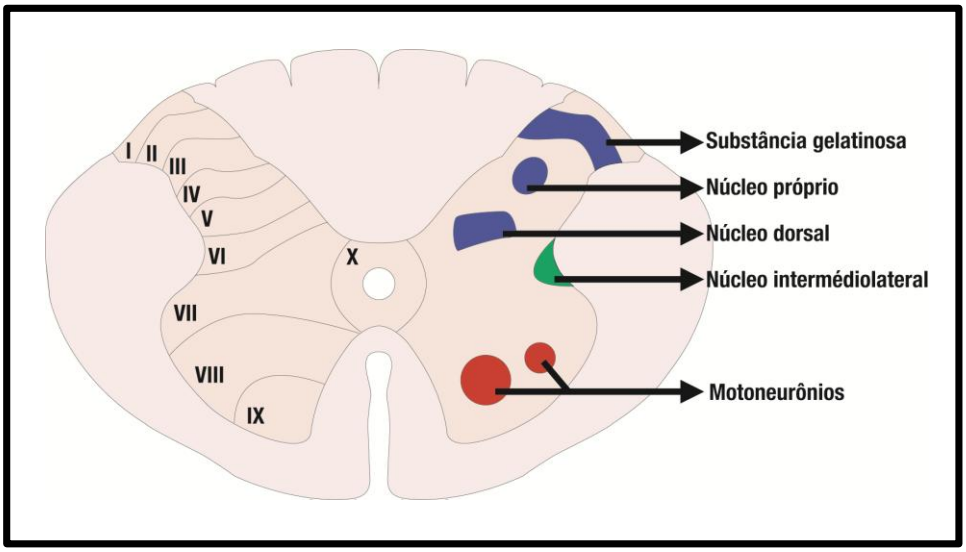

Figura 6 - Desenho esquemático da divisão da medula espinhal em lâminas de Rexed (representadas do lado esquerdo) e dos núcleos (representados do lado direito).

A substância branca da ME, que está ao redor da substância cinza, é composta predominantemente por axônios e contém três colunas orientadas rostro-caudalmente, nas quais os axônios ascendem ou descendem

- colunas dorsal, lateral e ventral. Entre os dois lados da substância cinzenta da medula espinhal está o canal central, um componente do sistema ventricular (Machado, 1983).

As vias motoras descendem nas colunas laterais e ventrais da medula espinhal. O córtex motor primário, pré-motor e sensorial somático primário têm projeções para ME, mas diferem em relação ao seu ponto final nas diferentes lâminas de Rexed. Axônios provenientes de SmI terminam no corno dorsal da medula espinhal (lâminas I a VI), sendo que estas projeções estão relacionadas com o processamento sensorial e podem modular o fluxo de informação sensorial ascendente. Axônios das regiões corticais motora primária e pré-motora fazem sinapse com os motoneurônios no corno ventral (lâminas VIII a IX) e com os interneurônios na zona intermediária (lâmina VII), que fazem sinapse com os motoneurônios (Wolpert *et al.*, 2001; Lemon e Griffiths, 2005; Rathelot e Strick, 2006).

Deste modo, cada uma das vias motoras descendentes pode influenciar na atividade muscular esquelética a partir de conexões monossinápticas (entre neurônio sensorial primário e neurônio motor, movimento reflexo), dissinápticas e polissinápticas (entre neurônios de projeção, interneurônios e motoneurônios). Tipicamente, o axônio de um neurônio de projeção descendente faz todos os tipos de conexões com os motoneurônios. Sendo dissináptica ou polissináptica, as conexões podem ser mediadas por dois tipos de interneurônios da medula espinhal: segmentar e proprioespinhal (Lemon, 2008).

Interneurônios segmentares possuem um axônio curto que distribui dendritos que fazem sinapse com neurônios motores dentro de um

segmento espinhal. Estes interneurônios estão localizados na zona intermediária e no corno ventral ipsilateral aos motoneurônios com os quais fazem a sinapse. Os interneurônios proprioespinhais têm um axônio longo que se projeta para múltiplos segmentos espinhais antes de fazerem sinapse com os motoneurônios, sendo importantes para associar a atividade de membros superiores e inferiores durante um movimento coordenado, como o caminhar, tanto em primatas como em roedores (Alstermark *et al.*, 2007; Darian-Smith, 2009).

De maneira geral, em primatas as vias descendentes dorsolaterais (tratos córtico-espinhal lateral, rubro-espinhal e retículo-espinhal bulbar) descendem ao longo da substância branca pela região dorsolateral e terminam em múltiplos segmentos medulares, nos motoneurônios e interneurônios localizados na porção lateral do corno ventral e zona intermediária. Eles estão relacionados, predominantemente, com o controle dos músculos distais. Portanto, estas vias apresentam participação importante nos movimentos direcionados a um alvo específico, especialmente de punhos e mãos (Drew *et al.*, 2002; Lemon, 2008; Darian-Smith, 2009).

As vias ventromediais (tratos córtico-espinhal anterior, tecto-espinhal, retículo-espinhal pontino e vestíbulos-espinhais medial e lateral) descendem pela região ventromedial da substância branca da medula espinhal e terminam em motoneurônios e interneurônios localizados na porção medial do corno ventral e zona intermediária. Estes tratos participam do controle dos músculos axiais e proximais, agindo nos ajustes posturais por integrar informações visuais, vestibulares e somatossensoriais. O trato córtico-bulbar é responsável pelo controle dos músculos da cabeça e face, terminando em

neurônios motores e interneurônios localizados no núcleo motor de nervos craniais e na formação reticular, respectivamente (Drew *et al.*, 2002; Lemon, 2008; Darian-Smith 2009).

Além da organização dos motoneurônios de acordo com o padrão medial-lateral no corno ventral, existe uma organização de acordo com o padrão flexor-extensor. Os músculos extensores apresentam uma posição ventral e os flexores ocupam uma posição dorsal no corno ventral (Bear *et al.*, 2008).

2.1.1.7. Motoneurônios inferiores e músculos

Os componentes “finais” dos sistemas motores envolvem o sistema nervoso periférico e o sistema muscular, sendo evidenciado neste trabalho o sistema muscular estriado esquelético. Estudos mostram que cada ponto do córtex está conectado com muitos músculos, assim como cada músculo está conectado com muitos pontos do córtex (Donoghue *et al.*, 1992; Sanes e Schieber, 2001).

Os motoneurônios são responsáveis por inervar diretamente as fibras musculares esqueléticas. Esses motoneurônios recebem aferências de neurônios corticais, que são importantes para o início e controle do movimento voluntário e recebem aferências de interneurônios, que podem ter ação excitatória ou inibitória, participando da circuitaria que gera os programas motores espinhais (*CPG*). Além dessas entradas sinápticas, os motoneurônios são influenciados também por células ganglionares da raiz dorsal, cujos

axônios inervam o fuso muscular, fornecendo um sinal de retroalimentação que informa o comprimento e a tensão do músculo (Bear *et al.*, 2008).

Os motoneurônios podem ser classificados em dois tipos: neurônio motor alfa (inerva fibras extrafusais) e neurônio motor gama (inerva fibras intrafusais). Ambos possuem axônios que saem do corno ventral da medula espinhal, formando a raiz ventral, que se junta com a raiz dorsal para então formar o nervo espinhal. Os axônios seguem, portanto, pelos nervos periféricos até atingirem o alvo final, o músculo estriado esquelético (Lundy-Ekman, 2004).

Os motoneurônios alfa possuem corpos celulares grandes e axônios de grande calibre que se ramificam em numerosos terminais ao se aproximarem do músculo. O neurônio motor alfa e todas as fibras musculares por ele inervadas formam, coletivamente, o componente básico do controle motor, designado como unidade motora. As unidades motoras variam muito em relação ao número de fibras que contêm. As fibras musculares de uma unidade motora se ligam às de outras unidades, o que permite um recrutamento adequado dos músculos necessários para uma ação (Kandel, 2000).

Quando este neurônio está ativo ocorre a liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular (sinapse especializada entre o nervo e o músculo esquelético). Os canais dos receptores nicotínicos encontrados no músculo esquelético se abrem e o sarcolema (membrana celular excitável que envolve as fibras musculares) pós-sináptico despolariza. Com isso, os canais de sódio dependentes de voltagem abrem-se, um potencial de ação na fibra muscular é gerado e propagado ao longo do sarcolema e através dos túbulos T (“T” de transverso) para o interior da fibra

muscular. A despolarização dos túbulos T provoca a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (Bear *et al.*, 2008).

Em seguida ocorre a contração muscular que engloba a ação de quatro proteínas principais: actina, miosina, tropomiosina e troponina. A miosina forma os filamentos grossos localizados na região central do sarcômero (unidade funcional do músculo). A actina é o componente primário dos filamentos finos, que estão ancorados em cada extremidade do sarcômero. No repouso, muitos locais de ligação na actina estão parcialmente cobertos pela tropomiosina, impedindo que a miosina se fixe nesses locais (Guyton e Hall, 2006).

A contração inicia-se quando o cálcio une-se a troponina, causando uma alteração na conformação desta proteína, o que leva ao afastamento da tropomiosina dos sítios de ligação da miosina na actina. As cabeças de miosina conectam-se à actina e fazem um movimento de rotação. O deslizamento dos filamentos grossos e finos gera a contração. As cabeças de miosina desconectam-se com a presença de adenosina trifosfato (ATP), portanto enquanto houver ATP e cálcio, o ciclo prossegue (Lundy-Ekman, 2004).

O relaxamento muscular ocorre quando a despolarização deixa de acontecer e assim, o sarcolema e os túbulos T retornam ao potencial de repouso. O cálcio entra no retículo sarcoplasmático por meio de uma bomba dependente de ATP. E os sítios de ligação para miosina na actina são cobertos novamente pela tropomiosina (Lundy-Ekman, 2004).

Existem dois tipos de contração muscular envolvendo unidades motoras distintas, que são classificadas como de contração lenta e contração

rápida de acordo com diversos parâmetros. As unidades motoras rápidas são compostas por fibras brancas, que contêm poucas mitocôndrias e utilizam principalmente o metabolismo anaeróbico, contraindo-se de forma rápida e potente. No entanto, essas fibras fadigam rapidamente. Os motoneurônios alfa que inervam essas fibras brancas são geralmente grandes e possuem axônios de maior diâmetro, gerando potenciais de ação de alta frequência (30 a 60 impulsos por segundo). Os músculos ligados ao reflexo de fuga, corridas de alta velocidade em distâncias curtas (por exemplo: gastrocnêmios, bíceps braquial) são compostos predominantemente por este tipo de unidade motora (Guyton e Hall, 2006; Bear *et al.*, 2008).

As unidades motoras lentas são compostas por fibras vermelhas, caracterizadas por grande quantidade de mitocôndrias e enzimas especializadas para o metabolismo oxidativo energético. Essas fibras contraem de forma relativamente lenta, mas podem manter a contração por um longo período de tempo sem fadigar. O motoneurônio alfa que inerva essas fibras é menor e possui axônio de menor calibre quando comparado com o da unidade motora rápida. Ele possui atividade de baixa frequência com 10 a 20 impulsos por segundo. Os músculos que possuem de forma predominante este tipo de unidade motora são aqueles referidos como antigravitacionais, posturais, como o sóleo e muitos músculos axiais (Guyton e Hall, 2006; Bear *et al.*, 2008).

Embora os dois tipos de fibra muscular possam coexistir em um determinado músculo, é importante ressaltar que, cada unidade motora contém um tipo de fibra muscular. As fibras musculares de contração lenta são ativadas primeiramente em muitos movimentos, uma vez que os pequenos corpos celulares dos neurônios alfa de condução lenta se despolarizam antes

dos corpos celulares dos neurônios motores alfa de tamanho maior (Bear *et al.*, 2008).

O neurônio motor gama inerva as fibras intrafusais, que são fibras musculares esqueléticas modificadas dentro da cápsula fibrosa do fuso muscular. O fuso muscular em sua região central recebe fibras sensoriais (tipo Ia) que se enrolam ao seu redor, formando uma estrutura especializada em detectar alterações do comprimento muscular, sendo chamados de proprioceptores (Kandel, 2000). Esses receptores estão relacionados com o sistema sensorial somático, que será descrito mais adiante.

A ativação dos motoneurônios alfa causa encurtamento das fibras musculares extrafusais. Se, ao mesmo tempo, o fuso muscular se tornasse “frouxo”, ele não informaria mais o comprimento do músculo. No entanto, isto não acontece, porque os motoneurônios gama também são ativados, inervando as fibras intrafusais nas duas extremidades do fuso muscular. Deste modo, as fibras sensoriais ao redor do fuso permanecem ativadas, mantendo a função proprioceptiva (Kandel, 2000).

Além dos fusos musculares, o órgão tendinoso de Golgi (OTG) também é considerado proprioceptor. Ele está localizado na junção músculo-tendínea, é inervado por fibras sensoriais (tipo Ib) e funciona como um sensor da tensão muscular. Vale ressaltar que o OTG está disposto em série com as fibras musculares, enquanto os fusos musculares encontram-se em paralelo. Esse arranjo anatômico diferente é o que distingue as diferentes informações proprioceptivas que estes receptores enviam à medula espinhal (Lundy-Ekman, 2004).

2.1.2. Sistema sensorial somático

Igualmente ao sistema motor, o sistema somatossensorial ou sensorial somático consiste em uma rede de estruturas complexas, especializadas e interconectadas. Este sistema veicula tanto as sensações de toque e posição do corpo no espaço, isto é, propriocepção (sensações epicríticas), como as sensações de dor, coceira e temperatura (sensações protopáticas), estando criticamente envolvido com a manutenção e regulação sensorial dos movimentos de cabeça, tronco e membros. A discriminação destas diferentes sensações apresenta um papel importante na preparação e correção de atos motores, no reconhecimento de objetos, ou ainda na função protetora quando a sensação de dor gera, por exemplo, uma resposta reflexa de proteção. Ao processar os estímulos não somente da superfície corporal, mas também de seu interior, provenientes dos músculos, articulações, tendões e vísceras, o sistema sensorial somático pode realizar todas essas funções (Lundy-Ekman, 2004).

Grillner (2006) afirmou que apesar de os *CPG* fornecerem base para geração de padrões motores, está claro que as aferências sensoriais são cruciais para o refinamento da atividade dos *CPG* em resposta a eventos externos. Segundo ele, se os *CPG* agissem de forma independente, seriam produzidos padrões de ações rígidas, e os animais iriam se comportar estereotipicamente como robôs ou soldados em um desfile. Mas na verdade, o que ocorre é que os *CPG* estão sujeitos à adaptação a uma variedade de mecanismos sensoriais, e assim os movimentos podem ser adaptados dinamicamente a mudanças do ambiente.

Os principais sistemas neurais implicados na transmissão das informações somestésicas ao córtex cerebral são o sistema coluna dorsal-leminisco medial e o sistema ântero-lateral (Figura 7). Essas vias somatossensoriais consistem em projeções sensório-motoras aferentes, que têm início em receptores periféricos e seguem para a medula espinhal, tronco encefálico, tálamo e córtex (Darian-Smith, 2009). Outras vias ascendentes também importantes envolvem o cerebelo, que utiliza as informações aferentes para regular o movimento (Watson *et al.*, 2009).

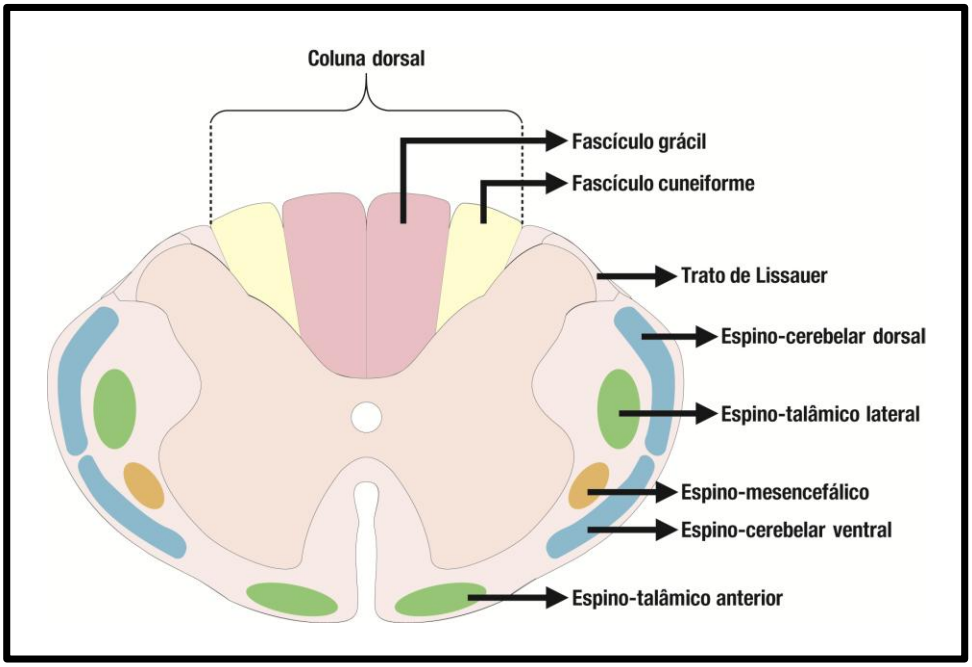

Figura 7 - Desenho esquemático da localização das vias sensoriais ascendentes na medula espinhal. Tratos espino-cerebelares: espino-cerebelar dorsal e espino-cerebelar ventral (em azul). Sistema ântero-lateral: tratos espino-talâmico lateral, espino-talâmico ventral (em verde) e espino-mesencefálico (em laranja). Sistema coluna dorsal-lemnisco medial: fascículo grácil (em rosa) e fascículo cuneiforme (em amarelo).

2.1.2.1. Sistema coluna dorsal-lemnisco medial

O sistema coluna dorsal-lemnisco medial veicula as sensações epicríticas a partir dos proprioceptores e mecanoceptores, que estão

localizados nos músculos, tendões, articulações e nas extremidades distais de nervos periféricos. Os principais tipos de proprioceptores, encontrados nos músculos e tendões, já foram mencionados, sendo eles os fusos musculares e os órgãos tendinosos de Golgi. Uma das funções primárias dos proprioceptores é detectar eventos inesperados e iniciar rápidas respostas musculares compensatórias. Além disso, os proprioceptores apresentam um papel importante na regulação de *outputs* (saídas) motores durante movimentos não perturbados (Dietz, 2002).

Os mecanorreceptores, encontrados na pele, são diversos: corpúsculos de Pacini, terminações de Ruffini, corpúsculos de Meissner e bulbos de Krause. Eles variam em relação à localização nas camadas da derme e epiderme; ao tamanho e formato; ao tamanho do campo receptivo (área do corpo que, quando estimulada, produz alteração da frequência de disparo de um neurônio sensorial); à persistência de suas respostas a estímulos de longa duração (adaptação lenta ou rápida) (Bear *et al.*, 2008).

Estes receptores propagam a informação sensorial por meio dos nervos periféricos até os neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal. Estes neurônios possuem axônios de grande diâmetro (fibras de condução rápida Aα e Aβ; Figura 8), que entram na medula espinhal pelo corno dorsal a partir da lâmina III e IV de Rexed e fletem-se medialmente para substância branca. Algumas das fibras que entram pelo corno dorsal podem também emitir colaterais para interneurônios ou motoneurônios da medula espinhal, com a finalidade de participar dos arcos reflexos espinhais, porém estas fibras não participam do sistema coluna dorsal-lemnisco medial. As fibras

deste sistema ascendem pela coluna dorsal, composta por dois fascículos: cuneiforme e grácil (Kandel, 2000).

O fascículo cuneiforme é o mais lateral e é composto, predominantemente, por fibras dos segmentos cervical e torácico alto. Portanto, este fascículo veicula as informações provenientes da parte posterior da cabeça, dos membros superiores e do tronco superior. O fascículo grácil, localizado medialmente na coluna dorsal, é composto por fibras dos segmentos torácico baixo, lombar e sacral e informa sobre as sensações do tronco inferior e dos membros inferiores (Machado, 1983). As fibras dos neurônios de primeira ordem ascendem por estes fascículos até os núcleos cuneiforme e grácil respectivamente, onde se encontram os corpos dos neurônios de segunda ordem (Jain *et al.*, 1998).

Até este ponto, a via ascendente percorre pelo lado ipsilateral ao local de origem do estímulo sensorial no corpo. Em outras palavras, as informações do lado esquerdo do corpo estão representadas na atividade dos neurônios dos núcleos esquerdos da coluna dorsal. O conhecimento da anatomia do trato é importante clinicamente, pois ajuda no entendimento das sequelas geradas por uma lesão (Bear *et al.*, 2008).

Os axônios dos neurônios de segunda ordem decussam no bulbo para se dirigirem até o núcleo ventro-póstero-lateral do tálamo por meio de um trato conspícuo de substância branca, chamado lemnisco medial. A decussassão das fibras no bulbo faz com que a informação tátil originada no lado esquerdo do corpo esteja relacionada com o lado direito do encéfalo. No núcleo ventro-póstero-lateral do tálamo encontram-se os corpos dos neurônios

de terceira ordem, cujos axônios seguem em direção ao córtex somatosensorial primário (Jain *et al.*, 1998; Martin, 2003).

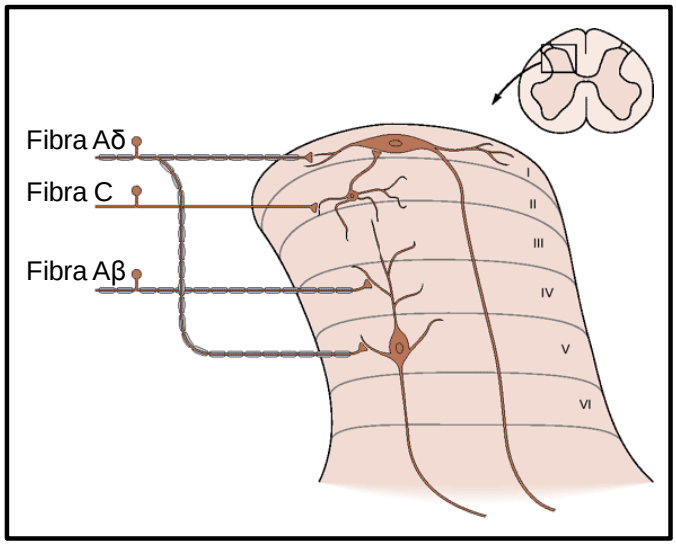

Figura 8 - Desenho esquemático da entrada de diferentes fibras em diferentes lâminas de Rexed no corno dorsal da medula espinhal. As fibras Aδ entram pelas lâminas I e V, são pouco mielinizadas e as fibras C entram pela lâmina II e são amielínicas. Essas fibras conduzem as informações protopáticas. As fibras Aβ entram pelas lâminas IV e V, são mielinizadas e conduzem as informações epicríticas. Fonte: modificado de Kandel, 2000.

O SmI está localizado no giro pós-central (Penfield e Boldrey, 1937). Brodmann dividiu o SmI em quatro áreas: 3a, 3b, 1 e 2. A área 3b recebe densas projeções do núcleo ventro-póstero-lateral e medial do tálamo e envia projeções para as áreas 1 e 2. As informações enviadas para área 1 são principalmente sobre textura, enquanto que para área 2 são sobre tamanho e forma (Bear *et al.*, 2008). O SmI é facilmente diferenciado de M1 devido a suas características citoarquitetônicas. O córtex somatossensorial primário possui uma grande densidade de células granulares na camada IV e apresenta pouca ou nenhuma célula piramidal gigante (Geyer *et al.*, 2000).

SmI possui uma organização somatotópica muito parecida com ao de M1, e isto está relacionado com o fato de que quanto maior a destreza

dos movimentos, muito provavelmente haverá uma maior sensibilidade da região do corpo responsável por aquele movimento. Penfield e Boldrey (1937) observaram que não era raro que a estimulação elétrica de uma área cortical produzisse sensação e movimento de uma mesma região do corpo, porém nunca ocorria a sensação em uma parte do corpo e movimento de outra ao mesmo tempo. Isso também mostra como as áreas corticais motora e sensorial estão extremamente interligadas.

As áreas sensoriais de ordem superior são: córtex somatossensorial secundário, córtices retro-insular e insular granular, e áreas 5 e 7b do córtex parietal posterior. O córtex somatossensorial secundário está localizado lateral e inferiormente à representação da face em SmI, e anterior ou medialmente às áreas auditivas primárias (Martin, 2003). Segundo Maeda e colaboradores (1999) não existe uma representação topográfica no SmII, o que pode ser devido ao fato de que esta área possui um papel importante na integração da percepção sensorial de diversas partes do corpo, ao invés de uma discriminação de uma parte específica do corpo como ocorre em SmI.

2.1.2.2. Sistema ântero-lateral

O sistema ântero-lateral veicula as informações protopáticas, tendo início em quimioceptores, nociceptores e termoceptores, que transmitem a informação ao neurônio de primeira ordem. Os receptores estão ligados a fibras do tipo Aδ e C, de pequeno diâmetro, muito pouco mielinizadas ou amielínicas respectivamente, levando a uma condução lenta da informação. O neurônio de primeira ordem entra pelo trato de Lissauer no corno dorsal da

medula espinhal e faz sinapse com o neurônio de segunda ordem logo no corno dorsal, nas lâminas I e II de Rexed (Kuner, 2010; Figura 8).

Os axônios de segunda ordem fletem-se e decussam na comissura branca anterior, seguindo para a região ântero-lateral da medula espinhal. Eles ascendem para diversos núcleos, diferentemente do primeiro sistema descrito, fazendo sinapse com os neurônios de terceira ordem em múltiplos níveis neurais, dando origem a diferentes tratos: espino-cerebelar, espino-reticular, espino-mesencefálico, espino-talâmico e espino-hipotalâmico. Os neurônios de terceira ordem também podem atingir diferentes áreas corticais e não somente o SmI, tais como córtex cingulado e córtex insular (Martin, 2003; Guyton e Hall, 2006).

Apesar de apenas três neurônios realizarem a união entre a periferia e o córtex, milhares de neurônios em cada nível estão tipicamente envolvidos com as experiências táteis normais. O SmI recebe aferências diretas do tálamo e processa informações sensoriais básicas. As áreas de ordem superior recebem aferências predominantemente da área cortical primária e participam da elaboração do processamento sensorial que leva à percepção (Bear *et al.*, 2008).

2.1.3. Sistema sensório-motor de ratos

O sistema sensório-motor de ratos possui algumas diferenças quando comparado com o de humanos ou primatas. A organização do córtex motor e somestésico de ratos foi muito estudada por diferentes autores (Hall e Lindholm, 1974; Donoghue e Wise, 1982; Gioanni e Lamarche, 1985; Neafsey

et al., 1986). Esses estudos mostraram que os mapas corticais motores e somatossensoriais estão sobrepostos, principalmente em relação aos membros posteriores, mas a sobreposição também ocorre de forma parcial em relação ao tronco e membros anteriores (Figura 9).

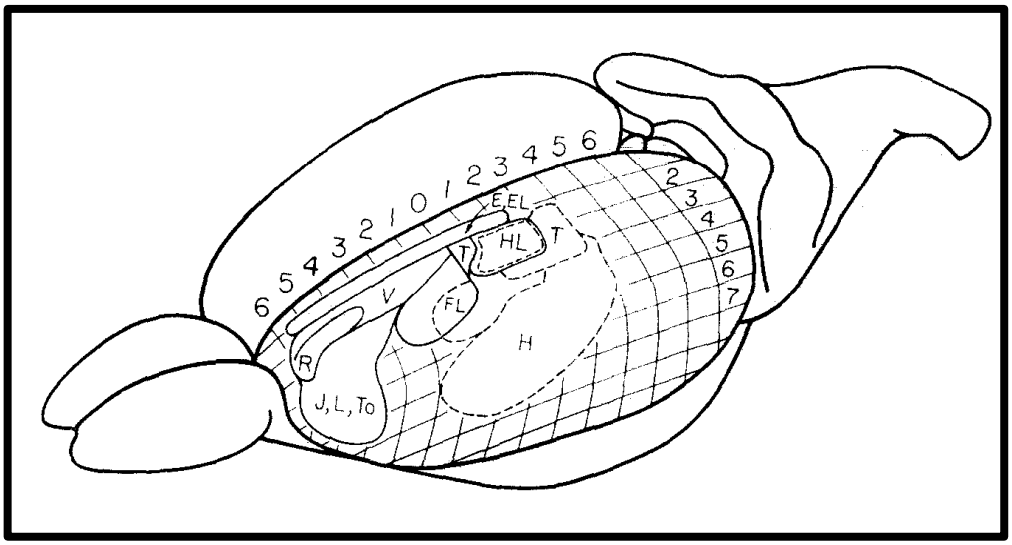

Figura 9 - Mapeamento das áreas motoras (linhas sólidas) e somatossensoriais (linhas pontilhadas) de ratos a partir de experimento com estimulação elétrica. É possível observar uma sobreposição de áreas. E: olho; EL: pálpebra; FL: membros anteriores; H: cabeça; HL: membros posteriores; J: mandíbula; L: lábios; R: rostro; T: tronco; To: língua; V: vibrissa. Fonte: Hall e Lindholm, 1974.

Neafsey *et al.* (1986) mostraram que além do córtex motor de ratos ser composto pelo córtex motor primário agranular e uma grande extensão do córtex somatossensorial, existe uma representação motora cortical mais rostral dos membros anteriores, posteriores e tronco. Esta região é somatotopicamente organizada e pode representar a área motora suplementar de ratos.

Uma particularidade encontrada nos sistemas motores de ratos em diversos estudos é que há uma pequena ou nenhuma projeção direta de centros supraespinhais para as lâminas VIII e IX de Rexed (Liang *et al.*, 1991;

Yang e Lemon, 2003; Alstermark *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2007; Al-Izki *et al.*, 2008; Lemon, 2008). Este fato nos leva a pensar que as projeções corticoespinhais diretas, mais para níveis cervicais de primatas, estão relacionadas com a habilidade e destreza manual.

De acordo com Metz e Whishaw (2000), apesar de os roedores possuírem um rico repertório motor principalmente com as suas patas anteriores, eles não as usam para caça e para mover rapidamente a presa como os felinos, ou para subir e se pendurar em galhos de árvores como os macacos, ou até mesmo para manipular objetos de forma precisa como os humanos. Segundo estes autores, os ratos realizam os movimentos de alcançar e pegar objetos com as patas anteriores, porém este movimento é pouco flexível quando há mudanças rápidas das condições iniciais dele. Os roedores realizam somente tarefas sensório-motoras rudimentares de agarrar e segurar com as patas dianteiras, uma vez que não possuem movimento digital fracionado e nem a oposição (Darian-Smith, 2009).

Por outro lado, Alstermark e colaboradores (2004) acreditam que a capacidade dos ratos de segurar o alimento tem sido subestimada. Eles acreditam que os ratos possuem destreza ao manipular objetos, mas que essa atividade não é mediada por conexões córtico-espinhais monossinápticas, todavia, os movimentos digitais habilidosos podem ser controlados por conexões dissinápticas ou polissinápticas. A maioria das projeções córtico-espinhais em ratos trafega pelas colunas dorsais e terminam na região dorso-medial da substância branca em uma posição ventral às colunas dorsais (Courtine *et al.*, 2007; Lemon, 2008; Figura 10). Portanto, pode-se dizer que a organização das colunas dorsais da medula espinhal de ratos é

fundamentalmente diferente de primatas, pois inclui tanto as fibras sensoriais ascendentes como as fibras motoras descendentes (Kaas *et al.*, 2008).

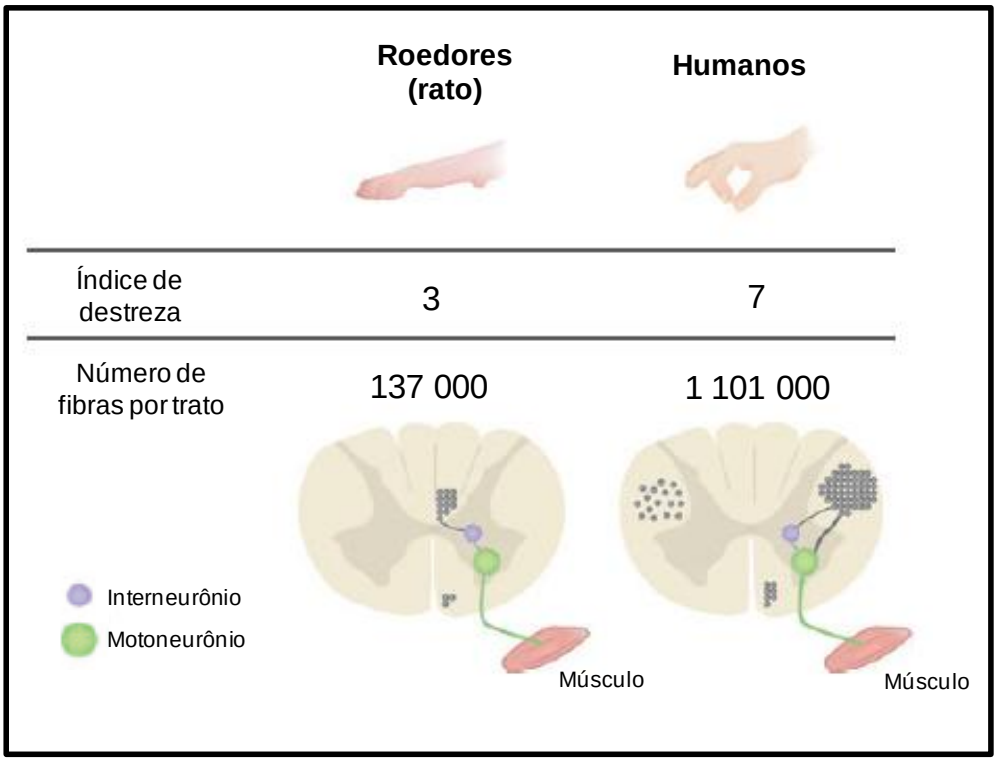

Figura 10 - Relação entre o desenvolvimento do trato córtico-espinhal e controle motor em ratos e humanos. Não há conexões diretas de neurônios córtico-espinhais e motoneurônios cervicais que inervam os membros anteriores. Os motoneurônios recebem aferências do tronco encefálico e interneurônios na medula espinhal. A maioria das fibras do trato córtico-espinhal de ratos trafega pelas colunas dorsais. O trato córtico-espinhal de humanos trafega predominantemente pelas colunas laterais e uma porção significativa das fibras (aproximadamente 10%) descendem ipsilateralmente. O desenvolvimento do trato córtico-espinhal está correlacionado com a melhora do índice de destreza, particularmente com a precisão do movimento de oponência. Fonte: modificado de Lemon, 2008.

A divisão da substância cinzenta da ME de ratos em lâminas também é usada e muito semelhante à de humanos (Figura 11A). Em 1985, Hardman e Brown identificaram uma organização topográfica dos motoneurônios localizados no corno ventral da medula espinhal de ratos, assim como em humanos (Figura 11B). Eles mostraram que os motoneurônios laterais inervam músculos derivados da região dorsal e os motoneurônios mais mediais inervam músculos derivados da região ventral.

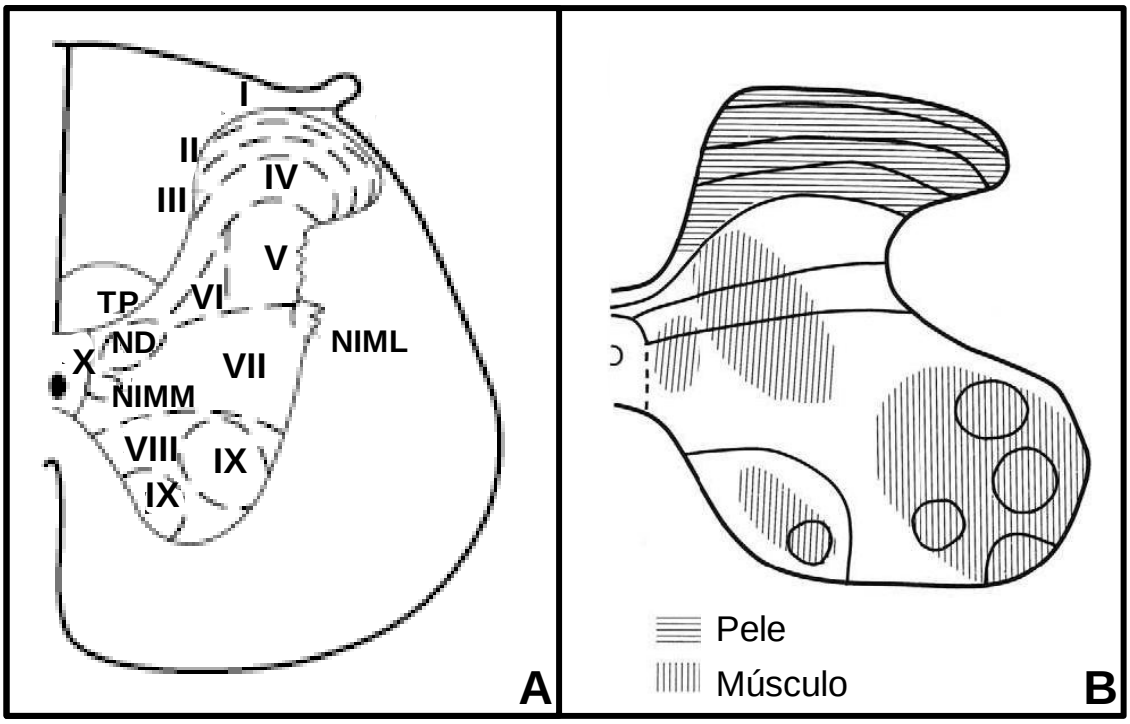

Figura 11 - Desenho esquemático de cortes transversais da medula espinhal do rato no nível da 10ª vértebra torácica (A) e nível lombar baixo (B). Demonstração das lâminas de Rexed (I - X); núcleos: intermédio lateral (NIML), intermédio medial (NIMM), dorsal (ND); e trato piramidal (TP) (A). Demonstração das terminações principais das fibras aferentes da pele e músculo (B). Fonte: modificado de Paxinos, 2004.

Diversos autores já mostraram que o segmento tóraco-lombar da medula espinhal de ratos apresenta um papel fundamental na geração de padrões locomotores, sendo que as regiões mais caudais estão relacionadas com ritmicidade dos movimentos (Cazalets *et al.*, 1995; Kjaerulff e Kiehn, 1997; Bertrand e Cazalets, 2002; Fouad e Pearson, 2004; Rossignol, 2006). Além disso, segundo Edgerton *et al.* (2004), em mamíferos e seres não humanos, os *CPG* localizados dentro do segmento lombossacral da medula espinhal representam um componente importante da circuitaria que gera e controla a postura e a locomoção.

2.2. Lesão medular

2.2.1. Aspectos macroscópicos

A lesão medular afeta a condução de informações sensoriais e motoras, por um rompimento total ou parcial dos tratos espinhais ascendentes e descendentes, levando à perda da percepção adequada dos estímulos sensoriais (sensações epicríticas e protopáticas) e à imprecisão na organização do comportamento motor (movimentação ativa abaixo do nível de lesão) (Lu *et al.*, 2005).

Indivíduos com lesão medular podem ser paraplégicos ou tetraplégicos, completos ou incompletos (Schwab, 2002; Bareyre, 2008). Indivíduos paraplégicos apresentam diminuição ou perda da função motora e sensorial dos segmentos torácicos, lombares ou sacrais, devido à perda de componentes neurais da medula espinhal decorrente da lesão. Na paraplegia, a função dos membros superiores está preservada, mas dependendo do nível de lesão, o tronco, os órgãos pélvicos e os membros inferiores podem estar comprometidos (Wilkinson e Lennox, 2005).

Indivíduos tetraplégicos apresentam diminuição ou perda da função sensorial e motora nos segmentos cervicais da medula espinhal, devido a danos aos elementos neurais dentro do canal medular. A tetraplegia resulta em diminuição funcional dos membros superiores assim como do tronco, dos órgãos pélvicos e dos membros inferiores. Pessoas com lesões acima de C4 não conseguem respirar independentemente, porque o diafragma é inervado

pelo nervo frênico (C3 a C5), e os músculos abdominais e intercostais são inervados por nervos torácicos (Lundy-Ekman, 2004).

Em uma lesão parcial, algumas vias ascendentes e descendentes são preservadas. Função parcial é mantida, mas alguns sinais sensoriais e motores são evidentes. A lesão medular incompleta é aquela em que há função sensorial e/ou motora preservada abaixo do nível de lesão e isso inclui a parte mais inferior do segmento sacral. Uma profunda sensação anal é característica desse tipo de lesão e a contração voluntária da musculatura do esfíncter anal é utilizada para demonstrar se a função está preservada ou não (Kandel *et al.*, 2000; Wilkinson e Lennox, 2005).

Lesados medulares completos apresentam ausência da função motora e sensitiva no segmento sacral inferior. O nível neurológico é dado como sendo o nível mais baixo, no qual ainda é encontrada alguma evidência de função ou sensação muscular, sem preservação, no entanto, da funcionalidade da área sacral (Kandel *et al.*, 2000; Lundy-Ekman, 2004).

Lesões na medula espinhal isolam os neurônios de seu controle voluntário normal, produzindo uma série de sinais clínicos. Inicialmente esses sinais incluem paralisia flácida, reflexos musculares diminuídos e diminuição do tônus muscular abaixo do nível de lesão. Essa condição é conhecida como choque medular. Esses sinais surgem devido à ampla interrupção das fibras córtico-espinhais, além dos danos das fibras córtico-pontinas e córtico-reticular (Kandel *et al.*, 2000; Lyalka *et al.*, 2005).

Poucas semanas após o acontecimento da lesão podem ser notados aumento do tônus muscular, reflexo de estiramento muscular exagerado e clônus nos músculos abaixo do nível de lesão. A presença destes

sinais clínicos decorrentes da hiperexcitabilidade dos motoneurônios é denominada como espasticidade. A espasticidade acomete aproximadamente 70% dos indivíduos com lesões torácicas e cervicais com um ano de lesão e pode impactar negativamente na recuperação funcional (Adams *et al.*, 2007).

Por outro lado, Gorgey *et al.* (2010) mostraram que indivíduos com lesão completa podem apresentar efeitos desejáveis em relação à composição corporal e perfil metabólico em resposta à espasticidade presente em músculos esqueléticos. Segundo os autores, a espasticidade pode ser usada como uma ferramenta para proporcionar tensão periódica e proteger contra as complicações musculares decorrentes da lesão.

Essas complicações compreendem a inativação de músculos esqueléticos abaixo do nível de lesão, uma vez que muitos motoneurônios morrem em decorrência do trauma. Conseqüentemente, o controle voluntário dos músculos é eliminado, há ausência de descarga de peso nos membros afetados, o que leva a uma diminuição da área seccional do músculo (Castro *et al.*, 1999; Gerrits *et al.*, 1999; Dupont-Versteegden *et al.*, 2000; Giangregorio e McCartney, 2006; Grumbles *et al.*, 2009).

De acordo com Biering-Sorensen *et al.* (2009), alterações musculares também podem ser notadas em modelos experimentais de lesão medular. Ratos começam a apresentar uma hipotrofia muscular cinco dias após uma transecção da medula espinhal e em quatro semanas ocorre uma diminuição de 20 a 40% da massa muscular. Segundo eles, as propriedades contráteis dos músculos também sofrem alterações importantes a partir da terceira semana.

Devido à ausência de movimentos dos segmentos corporais abaixo do nível de lesão e ausência de descarga de peso, a densidade óssea diminui significativamente. Deste modo, o índice de fraturas na LM com movimentos que normalmente não causariam uma fratura (em transferências da cadeira para cama, mudanças de decúbito, ao se vestir) é muito maior do que em indivíduos não lesados (Giangregorio e McCartney, 2006; Dudley-Javoroski e Shields, 2008).

Outro sinal clínico evidenciado tanto em estudos com pacientes como em modelos experimentais é a supressão do sistema imunológico. Já foi demonstrado que há uma diminuição dos monócitos e linfócitos circulantes dias após o trauma. As alterações do sistema imunológico necessitam uma atenção especial, uma vez que o indivíduo fica mais susceptível às infecções (pneumonia, pancreatite, infecção urinária), que são a maior causa de morte na fase crônica (Riegger *et al.*, 2007; Riegger *et al.*, 2009; Popovich e McTigue, 2009).

As disfunções sexuais e urinárias estão presentes quando a lesão ocorre acima dos níveis medulares responsáveis por regularem estas funções. Problemas nestes sistemas apresentam grande impacto socialmente (Ibrahim *et al.*, 2009; Brackett *et al.*, 2010; David e Stewart, 2010). Herrera *et al.* (2010) demonstraram níveis significativos de proteínas presentes na urina de ratos com LM crônica, sugerindo que as mudanças patológicas precoces na bexiga podem persistir até uma fase crônica.

Em relação aos sistemas sensoriais, indivíduos lesados medulares são incapazes ou possuem grandes limitações na discriminação de diferentes texturas, frequência, duração e intensidade do toque, e

direcionamento de um estímulo tátil em movimento (Kaas *et al.*, 2008). Além disso, uma consequência incapacitante da lesão medular completa ou parcial é a dor crônica (Hutchinson *et al.*, 2004; Hains e Waxman, 2006). Estima-se que um terço dos indivíduos com lesão medular completa desenvolve dor neuropática central, difusa no nível da lesão e perda sensorial abaixo da lesão (Gustin *et al.*, 2008).

A dor neuropática central pode tomar diversas formas incluindo ausência sensitiva, alodínea (resposta dolorosa a estímulos não nocivos) ou hiperalgesia (resposta dolorosa exagerada a estímulos nocivos) (Hutchinson *et al.*, 2004; Gwak *et al.*, 2006; Defrin *et al.*, 2007). Em modelos animais lesados medulares com dor neuropática são investigados os mecanismos relacionados a esta condição, fornecendo importantes resultados aplicados à prática clínica (Drew *et al.*, 2004; Kloos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Erschbamer *et al.*, 2006; Keer e David, 2007; Gwak *et al.*, 2008).

De acordo com Hulsebosh *et al.* (2009), uma série de mecanismos de sinalização intracelular contribui para o desenvolvimento da dor neuropática crônica, sendo eles: aumento da sensibilidade devido a perda das aferências nervosas; ausência das influências inibitórias; aumento da eficácia de sinapses anteriormente ineficazes; hiperexcitabilidade por deaferentação dos neurônios medulares e talâmicos; alterações dos canais iônicos que mudam as propriedades da membrana celular; alterações de transporte e atividade, como reversão induzida pela LM dos transportadores de glutamato, que levam ao aumento de glutamato extracelular; e plasticidade de receptores de glutamato.

Além desses fatores, Yezierski (2005) aponta que as complicações da LM, como a dor neuropática, espasticidade, sensações anormais são consequência de uma série de eventos que ocorrem após a LM, como por exemplo, a liberação de mediadores tóxicos, que são produtos de processos inflamatórios e excitoxidade. Detalhes sobre os eventos decorrentes da lesão medular serão descritos no próximo item.

2.2.2. Aspectos microscópicos

Em um trauma medular, a lesão pode ser de vários tipos e estar relacionada a diversos fatores, como maceração do tecido medular, na qual a morfologia da medula é intensamente distorcida; laceração medular (por armas brancas ou de fogo); contusão que leva a uma hematomielia central, podendo desenvolver seringomielia (expansão progressiva da lesão, que pode ocorrer em mais de um segmento da medula); e lesão medular sólida, na qual não há foco central de necrose como na contusão (Hulsebosch, 2002).

Em humanos, a lesão medular normalmente ocorre a partir de um trauma repentino e direto na medula, que fratura e desloca as vértebras. No instante do impacto, fragmentos de ossos, material do disco vertebral e os ligamentos esmagam a medula espinhal, danificando as membranas das células neuronais, levando a uma lesão parcial (Verma *et al.*, 2008). Esse impacto direto na medula espinhal desencadeia uma série de eventos celulares e moleculares em resposta à lesão. Muitos neurônios locais e células da glia são destruídos durante e logo após o trauma. Essa perda neuronal que ocorre

durante as primeiras 18 horas, corresponde à fase primária da lesão medular (Fawcett e Asher, 1999; Hulsebosch, 2002).

A perda celular, no entanto, não se limita a este mecanismo, sendo exacerbada por eventos secundários, que podem durar semanas e progredir rostral e caudalmente ao foco de lesão (Hulsebosch, 2002; Zai e Wrathall, 2005; Afshari *et al.*, 2009). Os danos secundários envolvem uma cascata de eventos vasculares, bioquímicos e celulares. As mudanças vasculares incluem inflamação, edema, isquemia, hipóxia e perfusão medular reduzida. No nível bioquímico existem alterações excitotóxicas, a liberação de proteases e formação de óxido nítrico e radicais livres (Fawcett e Asher, 1999).

No nível celular, os macrófagos invadem o local de lesão para realizar a limpeza dos *debris* teciduais, formando diversas cavidades císticas e os segmentos distais dos axônios retraem em relação aos neurônios pós-sinápticos (muitas vezes, sendo estes, os motoneurônios) e sofrem degeneração Walleriana. Os segmentos proximais dos axônios lesados, apesar de se manterem íntegros na maioria das vezes, têm capacidade limitada em regenerar devido à presença de diversos fatores inibitórios no foco de lesão e ao redor dela (Schwab, 2002; Bradbury e McMahon, 2006; Afshari *et al.*, 2009; Figura 12).

Além disso, durante este período, importantes mudanças reativas ocorrem na morfologia e função das células da glia (Verma *et al.*, 2008). Estudos mostram que 24 horas após a LM, 50% dos astrócitos e oligodendrócitos, presentes no local da lesão, morrem. O processo de morte celular ao redor do foco, principalmente, por mecanismos apoptóticos

(mecanismo em que ocorre fragmentação do DNA dos núcleos celulares) se prolonga por várias semanas (Hulsebosch, 2002).

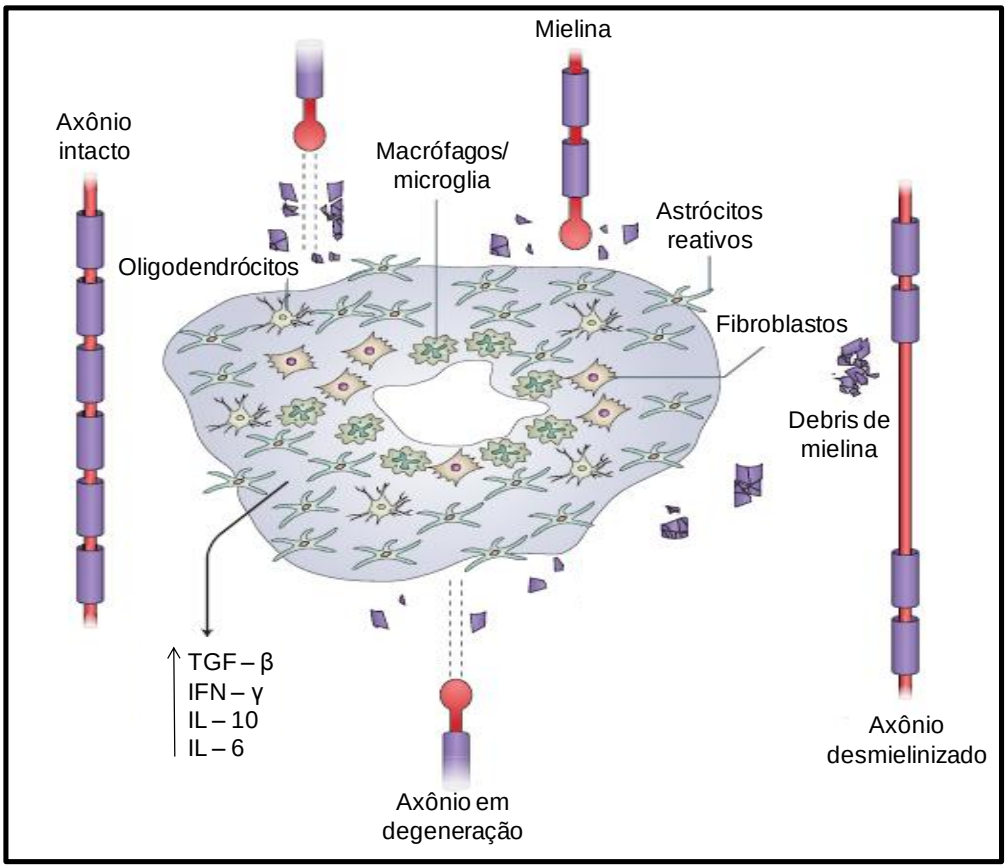

Figura 12 - Representação de alguns eventos secundários da lesão medular, que contribuem para formação de cicatriz glial e ativação de moléculas inibitórias, como TGF-β, IFN-γ, IL-10, IL-6, que se tornam uma barreira física e química ao crescimento axonal. Células inflamatórias rodeiam a cavidade central e oligodendrócitos ficam mais esparsos. Fibroblastos estão presentes normalmente no centro da lesão, afetando a barreira hemato-encefálica. Astrócitos proliferam e apresentam hipertrofia. Os axônios no foco de lesão passam por degeneração Walleriana e desmielinização. Fonte: modificado de Afshari *et al.* (2009).

A perda de astrócitos leva a uma homeostase iônica anormal. A apoptose normalmente promove uma gliose reativa, a qual inclui aumento da expressão de proteína glial fibrilar ácida (*glial fibrillary acidic protein, GFAP*) e mais tardiamente, proliferação astrocitária (Hulsebosch, 2002). A repopulação glial pode ocorrer devido migração de células para o local da lesão. Além disso, acredita-se que população de progenitores celulares divide-se, com

consequente reposição da macroglia na LM crônica (Bregman, 1998; Giovanni *et al.*, 2005; Zai e Wrathall, 2005).

Ainda na fase secundária da LM, acredita-se que células do sistema imunológico, como os monócitos e macrófagos, emitem sinais químicos por meio de sinalizadores de proteína (citocinas e quimiocinas*)* que agem nos neurônios e oligodendrócitos e desencadeiam a apoptose (Hulsebosch, 2002; Afshari *et al.*, 2009).

A perda de oligodendrócitos causa uma mielinização não eficiente, prejudicando a transmissão axonal (Zai e Wrathall, 2005). A desmielinização é um dos vários fatores que dificulta ou impede a regeneração da medula espinhal e, consequentemente, a recuperação das funções sensorial e motora após a lesão medular (Guertin, 2005; Schwab, 2007). Entretanto, também existem muitas proteínas associadas à mielina (Nogo-A, MAG, OMgp), proteoglicana sulfato de condroitina e outras moléculas inibitórias, como a tenascina e a semaforina 3A que são parcialmente responsáveis pela inibição da regeneração após a LM (Bradbury e McMahon, 2006; Schwab, 2007; Blesch e Tuszynski, 2009; Verma *et al.*, 2008).

Essas substâncias inibitórias contribuem para a formação de cicatriz glial no local da lesão, que resulta da complexa relação entre as células inflamatórias e os astrócitos. Elas formam estruturas mecânicas densas com múltiplas camadas de astrócitos, criando uma barreira física para o crescimento dos axônios através do local da lesão (Guertin, 2005; Schwab, 2007; Blesch e Tuszynski, 2009).

2.2.3. Tratamento

Diversos trabalhos têm direcionado esforços para promover a recuperação funcional de lesados medulares, uma vez que a condição em que esses indivíduos se encontram é extremamente debilitante. Hoje, as pesquisas têm sido focadas em quatro grandes áreas: neuroproteção, regeneração, transplantes de diferentes tipos celulares e reabilitação (Craig *et al.*, 2002).

2.2.3.1. Neuroproteção, regeneração e transplante celular

Como já foi demonstrado (ver item lesão medular), a regeneração axonal pós LM é limitada, parcialmente porque os neurônios possuem uma pobre capacidade de regenerar, mas também porque existem diversos fatores inibitórios no foco e ao redor da lesão que não permitem ou dificultam muito a regeneração (Bradbury e McMahon, 2006). Neste sentido, as pesquisas têm sido voltadas para estratégias terapêuticas de neutralização e degradação das moléculas inibitórias, na tentativa de diminuir a formação de cicatriz glial e de cavidades císticas (Schwab, 2002; Ianotti *et al.*, 2004).

Basicamente, os tratamentos neuroprotetores visam prevenir os eventos secundários da lesão. Com este objetivo, altas doses do esteróide metilprednisolona têm sido administradas dentro de poucas horas após a lesão. Segundo Chang *et al.* (2009), os efeitos da metilpredinisolona são: inibição da peridoxidação e hidrólise de lipídeos, manutenção do fluxo sanguíneo tecidual e do metabolismo aeróbico, reversão do acúmulo de cálcio ionizado

intracelular, redução da degradação de neurofilamentos e melhora da excitabilidade neuronal e transmissão axonal.

Apesar de este tratamento farmacológico promover bons resultados em relação à neuroproteção tanto na medula espinhal como no cérebro (Basso, 2000; Hulsebosch, 2002; Craig *et al.*, 2002; Lim e Tow, 2007; Can *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009), ele tem falhado em produzir uma recuperação funcional em modelos experimentais (Takami *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2009).

Diversas substâncias, dentre elas os bloqueadores de receptores AMPA de glutamato, inibidores de agentes pró-inflamatórios como a inibição de receptores de interleucina-1β e degradadores de moléculas inibitórias de matriz celular como as condroitinases, têm sido aplicadas experimentalmente de forma bem sucedida como estratégias terapêuticas para diminuir a cascata de eventos secundários, incluindo os processos inflamatórios e formação de cicatriz glial (Hulsebosh 2002; Craig *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005; Barrit *et al.*, 2006; Kaas *et al.*, 2008; Blesch e Tuszynski, 2009; Bradbury e Carter, 2011).

Além das moléculas mencionadas acima, diferentes tipos celulares têm sido implantados no local da lesão com o objetivo de reconstituir a matrix celular que pode sustentar o crescimento axonal, dentre elas estão: células fetais do SNC, fibroblastos, células tronco, células embainhantes olfatórias, células Schwann (Cao *et al.*, 2001; Hulsebosch, 2002; Lu *et al.*, 2005). Os fibroblastos são células normalmente encontradas na pele, e formam uma “ponte” através da medula espinhal, estimulando novas conexões (Craig *et al.*, 2002).

Os diversos tipos de células tronco (embrionárias humanas, neurais, mesenquimais, endógenas e progenitoras) têm sido investigados em diferentes modelos de lesão medular. Apesar de estudos pré-clínicos usando animais terem desenvolvido padrões de procedimentos operacionais para utilização destas células, mais pesquisas na área de segurança no seu uso precisam ser realizadas (Coutts e Keirstead, 2008).

Em uma revisão feita por Frassen e colaboradores (2007), cinco efeitos benéficos do implante de células embainhantes olfatórias foram evidenciados e todos contribuem para uma melhor recuperação funcional, sendo eles: estimulação do crescimento axonal; preservação tecidual e axonal; habilidade que as células embainhantes olfatórias têm de migrar para o foco de lesão no local da cicatriz glial; promoção da angiogênese; e remielinização dos axônios da medula espinhal. Em modelos experimentais, as mudanças na recuperação funcional e histológica são notáveis após o transplante destas células (Gorrie *et al.*, 2010).

Além das células embainhantes olfatórias, estudos têm utilizado o implante de células de Schwann, mostrando que elas preenchem as cavidades císticas, preservam maior quantidade de substância branca e promovem a remielinização após lesões nervosas, o que permite o re-estabelecimento de uma condução axonal mais eficaz (Craig *et al.*, 2002; Fortun *et al.*, 2009).

Em 2008, Saberi *et al.* realizaram implante de células de Schwann em 29 indivíduos com LM. Os autores obtiveram resultados positivos de 27 pacientes, sugerindo, portanto, que a combinação do implante com o

programa de reabilitação pode ter diminuído as deficiências dos pacientes estudados.

No entanto, recentemente, Wewetzer e colaboradores (2011) constataram a partir de uma revisão de literatura e da análise dos seus próprios dados que os efeitos *in vivo* do transplante de células de Schwann e embainhantes olfatórias em animais de grande porte e humanos ainda são pouco conhecidos. Eles afirmam que mais estudos com estas espécies são necessários para definir o verdadeiro potencial de promover regeneração axonal a partir destas células.

Pequenas proteínas, secretadas por diversos tipos de células, que potencializam o crescimento da fibra nervosa durante o desenvolvimento embrionário também têm sido estudadas na tentativa não somente de promover a regeneração axonal, mas também a recuperação funcional, sendo elas os fatores neurotróficos (Schwab, 2002; Blesch *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008).

Em um adulto normal, os neurônios e as células da glia da medula espinhal e do encéfalo produzem neurotrofinas e/ou mostram respostas mediadas por receptores para as neurotrofinas, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derivated neurotrophic factor, BDNF*), o fator de crescimento de nervo (*nerve growth factor, NGF*) e a neurotrofina-3 (*neurotrophin-3, NT-3*) (Dougherty *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2006).

Quando ocorrem danos ao sistema nervoso central ou periférico, a introdução de fatores neurotróficos no foco lesão, ou até mesmo administração oral ou intraperitoneal de estimuladores de síntese desses fatores, têm mostrado resultados benéficos na indução de crescimento

neuronal, tanto proximal como distalmente ao corpo do neurônio, reduzindo a atrofia dos neurônios que se projetam para a medula e promovendo a regeneração axonal (Jakeman *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2002; Zhou e Shine, 2003; Brown *et al.*, 2004).

A presença abundante de neurotrofinas é capaz de promover não somente uma neuroproteção e potencialização de atividades regenerativas, mas também uma reorganização sináptica (Qin *et al.*, 2006). O aumento dos fatores neurotróficos induz uma reativação mitótica nas células precursoras de oligodendrócitos, o que serve como uma nova fonte celular de oligodendrócitos e, consequentemente, de mielinização (Zai e Wrathall, 2005).

Alguns exemplos de neuroproteção e neuroregeneração podem ser dados a partir de estudos experimentais. Segundo Ianotti *et al.* (2004), o fator neurotrófico derivado da linhagem de célula glial (*glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF*) além de promover a recuperação funcional de ratos lesados medulares, possui um papel importante na preservação e regeneração de axônios de neurônios proprioespinhais e supraespinhais na substância branca.

Em um estudo experimental, o *BDNF* foi introduzido, continuamente, no córtex motor de ratos após lesão do trato córtico-espinhal. Os resultados mostraram um crescimento significativo da quantidade de prolongamentos axonais rostralmente ao local de lesão. Com este experimento pode-se concluir que o *BDNF* regula moléculas de crescimento neuronal, potencializa sua habilidade de regeneração e pode prevenir a morte induzida de axônios dos neurônios do trato córtico-espinhal (Zhou e Shine, 2003).

Por outro lado, Brown *et al.* (2004) ressaltam a importância de se tomar cuidados com a introdução de alguns fatores neurotróficos, como o *NGF*, para não gerar prejuízos (exacerbação dos eventos secundários), ao invés de promover melhor regeneração de neurônios sensoriais. Para isso é necessário controlar a transcrição e/ou a translação do *NGF* em tipos celulares específicos.

2.2.3.2. Reabilitação

A reabilitação é vista como uma parte crucial das estratégias de tratamento após lesão do SNC. Os programas de fisioterapia e outras práticas de cuidados à saúde não estão mais focados em "usar o que ainda restou de função do indivíduo", mas sim em estratégias para restaurar funções perdidas (Craig *et al.*, 2002; Lim e Tow, 2007). Para isto é necessário que as pesquisas desenvolvam procedimentos que possam ser aplicados de forma segura e efetiva em humanos (Fouad e Pearson, 2004).

A identificação de longas vias responsáveis pela iniciação de locomoção espontânea é crítica para a formulação de estratégias de reparo da lesão medular (Loy *et al.*, 2002). O importante papel dos neurônios motores espinhais no controle e manutenção das unidades motoras sugere que esforços específicos devem ser focados na modificação de processos degenerativos ou lesão dos neurônios motores espinhais que causam disfunção motora (Liebermann *et al.*, 2006).

Segundo Cotman e Berchtold (2002), o exercício pode aumentar os níveis de fatores neurotróficos, estimular a neurogênese,

aumentar a resistência a danos cerebrais e melhorar a aprendizagem e o desempenho mental. Acredita-se que o exercício possui influências sobre o circuito básico requerido para produção e controle da atividade motora, ou seja, nas complexas interrelações de estruturas do SNC (córtex cerebral, tálamo, núcleos da base e cerebelo), que junto com os circuitos neuronais espinhais (*CPG*) executam atividade motora e comportamentos específicos (Dietz e Harkema, 2004).

A estimulação elétrica funcional (*functional electrical stimulation, FES*) é uma abordagem que tem sido adotada para melhorar tanto o comportamento motor como o condicionamento cardiovascular (Hulsebosch, 2002). Já em 1989, Bajd e colaboradores mostraram que com o uso de *FES* em paciente com LM, incompleta, pode haver uma redução das contraturas, aumento da mobilidade e menor espasticidade. A contração muscular provocada pelo *FES*, por estimular a circulação, indiretamente gerou melhoria das condições de pele, além de prevenir alterações de pressão arterial.

Outros benefícios foram evidenciados por Mangold *et al.* (2005) após aplicação da *FES* em período agudo da lesão. Eles verificaram aumento da força muscular e facilitação da atividade motora voluntária para uso funcional (por exemplo: pacientes tetraplégicos pegarem objetos) e com isso uma melhora das atividades de vida diária, deixando o paciente lesado medular mais independente.

Além da estimulação elétrica funcional, outros modelos de estimulações, como a estimulação magnética ou epidural, são aplicadas diretamente na medula de ratos lesados com o objetivo de melhorar os aspectos negativos decorrentes da lesão (Gerasimenko *et al.*, 2007; Ahmed e

Wieraszko, 2008; Ahmed *et al.*, 2011). Apesar de estes trabalhos terem associado a estimulação elétrica com treinamento motor ou tratamento farmacológico, os animais que foram submetidos à estimulação apresentaram uma recuperação funcional maior.

De acordo com Gerasimenko e colaboradores (2007), a estimulação elétrica pode ativar circuitos neurais intraespinhais que coordenam e recrutam as unidades motoras com a precisão necessária para o andar. Ela permite que a medula espinhal responda de forma apropriada aos estímulos proprioceptivos associados à descarga de peso durante um treinamento motor na esteira, por exemplo.

Ahmed e Wieraszko (2008) associaram a estimulação magnética (diferentes frequências) com exercícios acrobáticos, obtendo uma melhora significativa do comportamento motor de camundongos lesados. A estimulação produziu um efeito protetor para o não desenvolvimento de espasticidade e uma correlação positiva entre a área de substância branca residual no foco de lesão e a recuperação funcional também foi encontrada após este tipo de tratamento. Porém, ainda não está claro se a estimulação deixou a medula espinhal mais vulnerável às ações benéficas dos exercícios, ou se os exercícios acrobáticos criaram um ambiente, no qual a estimulação pode apresentar estímulos mais fortes (Ahmed e Wieraszko, 2008; Ahmed *et al.*, 2011).

Um modelo de reabilitação que também visa o contato com diferentes objetos, assim como os exercícios acrobáticos, é no ambiente enriquecido. Esta estratégia terapêutica foi adotada por alguns pesquisadores para verificar a recuperação funcional de ratos lesados (Lankhorst *et al.*, 2001;

Meeteren *et al.*, 2003; Fisher e Peduzzi, 2007; Berrocal *et al.*, 2007). Apesar de Erschbamer *et al.* (2006) não terem apontado efeitos positivos nos animais expostos ao ambiente enriquecido, outros estudos verificaram melhoras tanto na atividade motora grossa e fina, como no comportamento sensorial, reduzindo a alodínea para níveis próximos aos de antes da lesão. Além das melhoras funcionais, foram observadas melhoras histológicas com diminuição das cavidades císticas e aumento do volume das substâncias branca e cinzenta residuais (Berrocal *et al.*, 2007).

Fisher e Peduzzi (2007) atribuíram as melhoras observadas nos animais expostos ao ambiente enriquecido às interações sociais, ao exercício e ao interesse pelos novos itens naquele ambiente. Eles acreditam que a plasticidade ocorre continuamente em ratos com LM crônica após esta estratégia terapêutica, que pode, portanto, ser considerada uma boa intervenção para indivíduos com lesão medular. Para humanos podem ser usados diferentes estímulos por meio de objetos, sons, desenhos, luz, cheiros que podem estimular a recuperação funcional.

Outro tipo de tratamento que tem sido investigado intensivamente pelo grupo de Magnunson é a natação em modelos experimentais de lesão medular (Smith *et al.*, 2006; Magnunson *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Esses trabalhos demonstraram que os animais treinados a nadar apresentam melhora deste comportamento depois da LM. Porém, quando colocados em um campo aberto não há diferença na locomoção dos animais treinados em relação aos controles, mostrando que este tipo de treinamento promove melhora específica da tarefa.

Smith *et al.* (2006) mostraram que quando o treinamento de ratos, com lesão medular contusa, realizado na água fornecia retroalimentação sensorial na superfície plantar das patas (através de tubos de centrífuga invertidos presos ao chão da piscina), o processo de recuperação era potencializado na fase aguda da lesão. No entanto, ao final do experimento, não houve diferença estatística significativa entre animais treinados que receberam e não receberam retroalimentação sensorial, sugerindo que este estímulo esteja relacionado com os mecanismos iniciais de recuperação após a lesão.

Se algumas fontes sensoriais proprioceptivas e extereoceptivas ainda forem mantidas após a lesão, assim como no modelo de contusão, uma adaptação neural pode ser esperada como compensação de déficits no sistema sensório-motor. A melhora da retroalimentação (fontes sensoriais proprioceptivas e extereoceptivas para conscientizar e corrigir voluntariamente movimentos e postura) das modalidades sensorial e cognitiva é extremamente importante para uma reabilitação de sucesso (Liebermann *et al.*, 2006).

A informação proprioceptiva fornece base para a representação consciente do corpo no espaço e do corpo em movimento (Dietz, 2002; Bosco e Poppele, 2001). Ela é crucial para facilitar a retroalimentação de informações, como força, velocidade, deslocamento ou a posição de um segmento em relação ao outro, ou de todo corpo em relação à gravidade (Schwab, 2002; Liebermann *et al.*, 2006).

Cada vez mais, o treino motor que otimiza as informações sensoriais associadas à locomoção após a lesão medular é visto como uma das estratégias mais eficazes na indução da neuroplasticidade e recuperação

motora. Os principais objetivos deste treino são desenvolver a independência, diminuir os gastos energéticos e incluir o indivíduo lesado medular na sociedade (Behrman e Harkema, 2000; Basso, 2000; Kaegi *et al.*, 2001; Jayaraman *et al.*, 2008).

A integridade do sistema sensorial é crítica para a reabilitação motora, uma vez que a locomoção depende de informações aferentes de diversas fontes, como a visual, vestibular e de sistemas proprioceptivos, utilizadas pelos *CPG* (Dietz, 2003). Os *CPG* são de grande importância, uma vez que recebem, interpretam e predizem as sequências apropriadas de ações durante qualquer fase do ciclo de marcha, gerando ciclos sucessivos (Edgerton *et al.*, 2004). Eles são multifuncionais e podem produzir uma variedade de comportamentos motores (Basso, 2000).

O treino de marcha por meio de uma esteira promove uma exposição repetitiva da medula espinhal a padrões de informações aferentes provenientes de estímulos realizados nos membros, o que parece treinar a circuitaria dos *CPG* a produzir padrões de marcha organizados, rítmicos e coerentes (Harkema, 2001; Coté e Gossard, 2004; Behrman *et al.*, 2005; Magnunson *et al.*, 2009). Como já foi dito no início da introdução, o treinamento na esteira é uma forma de atividade física intensamente investigada em estudos experimentais, tanto em humanos (Behrman e Harkema, 2000; Dobkin *et al.*, 2003; Hutchinson *et al.*, 2004; Giangregorio *et al.*, 2005; Dietz, 2009; Duschau-Wicke *et al.*, 2010), como em modelos animais (Kunkel-Bagden *et al.*, 1993; De Leon *et al.*, 1998; Edgerton *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2006; Bigbee *et al.*, 2007; Barriere *et al.*, 2008; Heng e De Leon, 2009; Andrade *et al.*, 2010).

Blicher e Nielsen (2009) realizaram um estudo com indivíduos saudáveis que usaram uma órtese para desencadear a marcha de forma passiva em uma esteira. O objetivo era determinar se este treinamento influenciava a excitabilidade córtico-espinhal em indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos confirmaram que o treinamento na esteira é capaz de induzir mudanças na excitabilidade cortical e medular em indivíduos saudáveis, portanto, este tipo de reabilitação possui um grande potencial para ser aplicado em indivíduos que perderam os movimentos dos membros inferiores.

Já foi demonstrado que tanto em humanos como em ratos lesados medulares, o treinamento na esteira com suporte de peso resulta na melhora da habilidade de andar, e em alguns casos, os padrões de ativação muscular e a cinemática se aproximam daqueles de antes da lesão (Behrman e Harkema, 2000; Nooijen *et al.*, 2009; Heng e De Leon, 2009). Além da melhora motora, Ditor *et al.* (2005) notaram um aumento da complacência arterial, melhora da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial em indivíduos com LM completa. As melhoras cardiovasculares promovidas devem encorajar a aplicação deste tratamento, principalmente, em indivíduos que não toleram ou não têm acesso à *FES*.

Jayaraman *et al.* (2007) mostraram mudanças funcionais significativas nos músculos esqueléticos dos membros inferiores de indivíduos com LM incompleta após nove semanas de treinamento locomotor. As principais mudanças foram o aumento da área seccional muscular e melhor habilidade de gerar torque isométrico sobre as articulações do joelho e tornozelo, sendo isto fundamental para geração de força propulsora e descarga de peso durante a locomoção.

Em estudos realizados com gatos que foram submetidos à transecção medular no nível torácico baixo, o treino locomotor por meio da esteira foi utilizado para a reabilitação. Os animais apresentaram uma melhora significativa na capacidade de andar, o que pode ser interpretado como uma mudança na probabilidade de neurônios apropriados serem ativados no tempo certo (Hodgson *et al.*, 1994; De Leon *et al.*, 1998). Os resultados mostraram, ainda, que este tipo de reabilitação facilitou ou potencializou a função das vias sensoriais remanescentes, ao invés de promover a geração de novas vias.

Andrade *et al.* (2010) constataram recentemente que o treinamento na esteira protege a medula espinhal dos efeitos secundários à lesão por contusão, diminuindo o seu volume. Os autores sugerem ainda que o treinamento estimula a atividade neuronal e promove adaptações fisiológicas na medula espinhal, influenciando nos padrões de recuperação motora espontânea no período agudo da lesão.

Cha *et al.* (2007) controlaram o número de passos dados durante o treinamento na esteira e verificaram que a qualidade dos passos realizados pelos membros posteriores de ratos lesados é dependente do uso. Isto é, os animais que tiveram que dar mais passos na sessão de treino apresentaram maior descarga de peso nos membros posteriores em diferentes velocidades. Desta forma, os autores acreditam que estes resultados indicam que a habilidade da medula espinhal lombar de se ajustar aos estímulos sensoriais relacionados com carga e velocidade da marcha depende do número de repetições de uma mesma atividade, imposta na circuitaria medular durante o treinamento na esteira.

Ao entendermos melhor a relação entre o nível de atividade motora e plasticidade do sistema sensório-motor, estratégias terapêuticas mais eficazes e eficientes podem ser desenvolvidas para a melhora de indivíduos lesados medulares. As adaptações que ocorrem tanto microscopicamente na medula espinhal, como macroscopicamente nos sinais clínicos sensoriais e motores de animais lesados medulares após a submissão a diferentes tipos de tratamento (neuroprotetores, neuroregenerativos, transplantes de células e reabilitação) foram apontadas neste item. Porém, um tópico ainda não abordado, mas de extrema relevância para este trabalho, refere-se às alterações corticais decorrentes da lesão e após algum procedimento terapêutico.

2.2.4. Alterações corticais

Diversos estudos já comprovaram que ocorre uma reorganização cortical sensório-motora imediatamente após a lesão medular e continuamente no decorrer do tempo (Jain *et al.*, 1997; Lotze *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Fouad e Tse, 2008; Bareyre, 2008). Após a LM, muitas regiões dentro do córtex somatossensorial são deaferentadas e áreas dentro do córtex motor são deferentadas do sistema motor descendente. Consequentemente, os pacientes apresentam diversas alterações na representação do corpo associadas com alterações na excitabilidade cortical (Lotze *et al.*, 2006).

Jain *et al.* (1997) mostraram que logo após uma secção completa das colunas dorsais da medula espinhal no nível cervical, neurônios da área 3b não respondem a estímulos realizados nas mãos. No entanto, após

uma lesão parcial desta região, as fibras residuais das colunas dorsais continuam a ativar os neurônios dentro de seus territórios corticais. Porém, com o passar de algumas semanas a área de ativação apresenta uma expansão, isto é, a área de representação da mão se torna responsiva a estímulos aplicados na face (região não afetada pela lesão), por exemplo. A reorganização pode ocorrer devido a diversos fatores, tais como: desinibição de aferências suprimidas, potenciação de aferências que antes não eram eficientes, crescimento de prolongamentos dendríticos e axonais, e plasticidade de mecanismos moleculares (Jain *et al.*, 1998).

Fouad e Tse (2008) relatam que o re-mapeamento após a LM ocorre devido ao brotamento dos axônios rostrais à lesão, que estabelecem novos contatos com diferentes alvos corticais. Kim *et al.* (2006) observou mudanças mais finas após a lesão que também estão relacionadas com a reorganização cortical, sendo elas: redução significativa da densidade dos espinhos dendríticos de neurônios corticais pós-sinápticos, dentro de sete dias pós LM, com uma recuperação parcial no 28º dia; após este período nota-se um aumento da proporção de dendritos longos; e marcadores de remodelação sináptica ativa também têm sua expressão aumentada após 14 dias. Esses dados sugerem eliminação e formação de sinapses em diferentes períodos.

Diferentes métodos de avaliação têm sido utilizados para investigar a reorganização cortical após uma lesão do SNC, tais como ressonância magnética funcional, oxigenação sanguínea nível dependente, estimulação magnética transcraniana, estimulação intracortical, tomografia por emissão de pósitron (Curt *et al.*, 2002; Hamzei *et al.*, 2006; Sydekum *et al.*, 2009; Kokotilo *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2010). No entanto, existe um método que

tem sido pouco explorado nesta área, mas que pode trazer grandes benefícios, sendo ele a eletrofisiologia (Hebert *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2010; Gourab e Schmidt, 2010).

Até hoje, somente dois estudos utilizando implante de micro-elétrodos em ratos lesados medulares foram publicados (Aguilar *et al.*, 2010; Yague *et al.*, 2011). Apesar de, em ambos os trabalhos, os registros terem sido realizados com animais anestesiados, os autores mostraram que existem mudanças na atividade do córtex somatossensorial imediatamente após a lesão. Segundo Aguilar e colaboradores (2010), o córtex começa a oscilar em uma frequência mais lenta, parecida com atividade do sono de ondas lentas. Yague *et al.* (2011) mostraram que uma hemisecção da medula espinhal produz hiperexcitabilidade espino-talâmica que se estende ao córtex somatossensorial.

Além de a reorganização cortical acontecer após uma lesão, já foi demonstrado claramente por Kleim e colaboradores (1998; 2002a; 2002b; 2004) que o aprendizado motor também é capaz de induzí-la. Nestes trabalhos, os autores demonstraram que existe uma remodelação do mapa motor de uma determinada região do corpo, quando esta é estimulada a realizar um determinado movimento. Além disso, foram identificados um aumento da densidade das veias sanguíneas dentro da camada V do córtex motor e a formação de novas sinapses na consolidação da nova habilidade motora.

Molina-Luna e colaboradores (2008) também verificaram uma expansão da área motora correspondente à pata dianteira de ratos, após o treinamento de alcançar objetos. Eles notaram que essa expansão é importante para o aprendizado devido a sua magnitude estar correlacionada

com melhora do desempenho da tarefa, mas que ela é transitória e rapidamente reversível após um pequeno período sem treinar o movimento.

Kao e colaboradores (2009) relataram dados importantes sobre a funcionalidade do córtex somatossensorial de ratos neonatais com transecção em T8/T9 submetidos a treinamento na esteira. Os autores identificaram aumento na porcentagem de células que respondem à estimulação sensorial e na magnitude da resposta destas células. Eles mostraram que após a lesão medular há diminuição da representação cortical dos membros anteriores, que é revertida com treinamento na esteira. A estimulação sensório-motora promovida pela esteira é capaz de induzir mudanças no mapa somatotópico do córtex. Um dado ainda mais interessante, é que o aumento na magnitude da atividade neuronal está diretamente relacionado com a porcentagem de passos realizados com descarga de peso pelos animais, nos levando a pensar mais uma vez que a plasticidade cortical induzida por um treinamento é fundamental para a recuperação funcional.

Uma diferente estratégia terapêutica utilizada pelo grupo de Martinez (2009) também foi capaz de promover mudanças no mapa cortical somatossensorial. Os ratos com hemisecção na altura de C4/C5 foram treinados em um aparato em que eles precisavam andar consecutivamente por 30 minutos em uma velocidade constante por diferentes texturas. Esse treinamento proporcionou não só importante recuperação funcional da sensibilidade tátil, mas também uma reativação da área cortical correspondente ao membro anterior prejudicado pela lesão. Os autores acreditam que este fato sugere reforço sináptico induzido pelo treinamento ou sinaptogênese presente em redes neuronais pré-existentes, que por sua vez, permitiram que vias

sensoriais substitutas pudessem manter a distribuição somatotópica de fibras da raiz dorsal que entram na medula espinhal.

Apesar de mais recentemente muitos dos pesquisadores, citados acima, terem voltado esforços para identificação das alterações corticais após a lesão medular ou aprendizado motor, poucos estudos têm investigado as alterações corticais após a LM e uma intervenção terapêutica (Winchester *et al.*, 2005; Cramer *et al.*, 2007; Kao *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009) e nenhum deles utilizou como avaliação a eletrofisiologia.

2.3. Eletrofisiologia cortical

A eletrofisiologia consiste no registro de sinais elétricos associados às mudanças de voltagens das membranas neuronais. Este método nos permite estudar tanto as propriedades de um único canal iônico até fenômenos mais complexos, assim como a atividade de centenas de células integradas em redes neurais (Scanziani e Häusser, 2009).

Diferentes métodos eletrofisiológicos podem ser utilizados para monitorar a atividade cerebral tanto em humanos como em modelos animais, tais como magnetoencefalograma (MEG), eletroencefalograma (EEG), eletrocorticograma (ECoG) e registros extracelulares. Essas avaliações diferem da ressonância magnética funcional ou da tomografia por emissão de pósitron (técnicas também usadas para avaliar a função cerebral) por medirem diretamente a atividade dos neurônios e não alterações no fluxo sanguíneo ou no metabolismo cerebral (Bear *et al.*, 2008; Mitra e Bokil, 2008). O MEG consiste no registro de minúsculos sinais magnéticos gerados pelas correntes

elétricas cerebrais, por meio de detectores magnéticos sensíveis (Trindade, 2004). O EEG e o ECoG consistem no registro da atividade elétrica por meio de elétrodos posicionados no escalpo e na superfície cortical, respectivamente (MacKay, 2005).

O registro extracelular é um método invasivo, no qual micro-elétrodos são introduzidos no espaço extracelular do tecido cerebral. Nesta metodologia podem ser registrados tanto potenciais de campo local (*local field potentials, LFP*), como potenciais unitários, isto é, potenciais de ação de neurônios individuais (*spikes*; Mitra e Bokil, 2008). A origem do potencial de campo local é complexa, sendo que o conhecimento atual indica que ela se deve mais às correntes sinápticas (potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios) e menos à somatória de potenciais de ação de neurônios distantes (Mitra e Bokil, 2008; Sauseng e Klimesch, 2008). O *LFP* é modulado pelo comportamento e codifica tanto propriedades de redes locais como aspectos globais da dinâmica cerebral (Stamoulis e Richardson, 2010).

Em 1875, Richard Caton apresentou os primeiros resultados obtidos a partir de registros da atividade elétrica cortical em animais. Os experimentos dele foram realizados com elétrodos unipolares posicionados na superfície de ambos os hemisférios ou um elétrodo posicionado no córtex cerebral e outro na superfície do crânio. As correntes eram medidas por um galvanômetro. Os registros identificaram o aumento das correntes durante o sono e variações na atividade cortical basal que não estavam relacionadas com os ritmos cardíacos e respiratórios. Caton também mostrou que as correntes eram vulneráveis aos procedimentos anestésicos e de anóxia (Haas, 2003).

Os primeiros estudos eletrofisiológicos em humanos também datam de muito tempo atrás e surgiram com o interesse do professor de neurologia e psiquiatria da Universidade de Jena, Alemanha, Doutor Hans Berger, em investigar a correlação entre atividade cerebral objetiva e os fenômenos psíquicos subjetivos, inclusive a telepatia (Chancellor, 2009). Em 1924, Hans Berger registrou o primeiro eletroencefalograma de um humano e sua primeira evidência foi a existência de um ritmo de grande amplitude (aproximadamente 10 ondas por segundo, ou seja, 10 Hertz (Hz)), que era induzido pelo fechamento dos olhos do indivíduo em repouso, porém acordado. Este ritmo foi chamado de *alfa*, pois foi o primeiro ritmo observado pelo pesquisador. Hans Berger nomeou ondas mais rápidas de menor amplitude de *beta*, estando esta, presente na atividade cerebral de indivíduos com os olhos abertos (Buzsáki, 2006).

Desde as descobertas de Hans Berger, oscilações em cérebros de diversas espécies têm sido documentadas, variando de muito baixas com períodos de minutos a muito rápidas com frequências alcançando até 600 Hz (Buzsáki e Draguhn, 2004; Figura 13). As bandas de frequências descobertas após os estudos de Berger, também foram nomeadas por letras gregas, sendo elas: *delta*, *theta* e *gamma*. Frequências abaixo de 0,5 Hz não foram incluídas na nomenclatura, pois se devem a polarização dos elétrodos e artefactos de movimento (Buzsáki, 2006).

As frequências médias das classes oscilatórias observadas experimentalmente formam uma progressão linear em uma escala logarítmica natural com proporção constante entre frequências vizinhas, levando a separação das bandas de frequência (Busáki e Draguhn, 2004). Bandas de

frequência vizinhas dentro de uma mesma rede neural estão tipicamente associadas a diferentes estados cerebrais e competem umas com as outras. Por outro lado, muitos ritmos podem coexistir temporalmente nas mesmas ou diferentes estruturas e interagir uns com os outros (Csicsvari *et al.*, 2003).

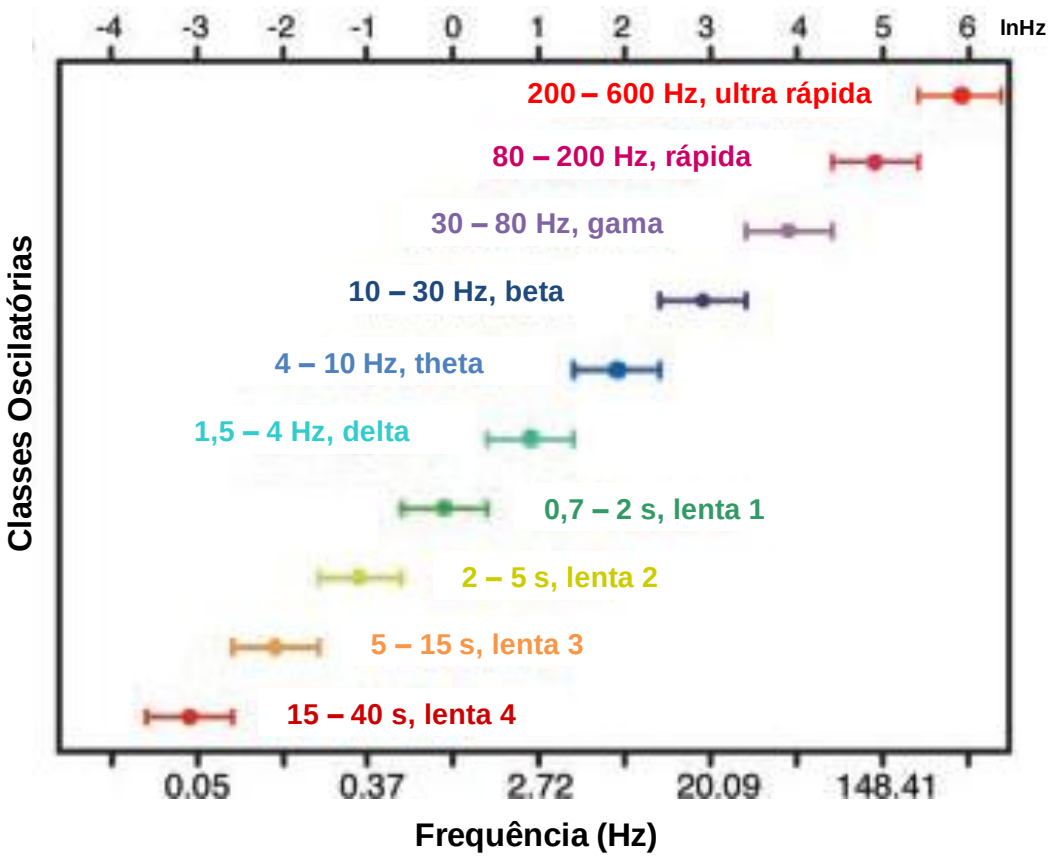

Figura 13 - Classes oscilatórias do córtex do rato. Há uma progressão linear das classes de frequência, como demonstrado pela escala em Hertz linear (lnHz). Para cada banda é mostrado o intervalo da frequência, junto com o seu termo comumente usado (por exemplo: no intervalo de 4 a 10 Hz, o termo usado é *theta*). Fonte: modificado de Buzsáki e Draguhn, 2004.

O tipo de oscilação está relacionado ao tamanho da rede neural envolvida em determinado processo. As redes podem consistir de populações neuronais restritas regionalmente, interconectadas por alças de retroalimentação intra-corticais, mas também podem estar distribuídas por diferentes partes do cérebro contendo um grande número de neurônios, como

por exemplo, as redes corticais controladas por alças de retroalimentação tálamo-cortical (Neuper e Pfurtscheller, 2001). Oscilações mais rápidas estão relacionadas a um menor espaço neural, enquanto que as oscilações mais lentas recrutam amplas redes neurais (Csicsvari *et al.*, 2003). Essas relações entre a arquitetura anatômica e os padrões oscilatórios permitem que as operações cerebrais possam ser realizadas simultaneamente em múltiplos níveis temporais e espaciais (Buzsáki e Draguhn, 2004).

Além dessa relação, a potência e a amplitude de uma determinada banda de frequência estão relacionadas com o nível de sincronia entre os neurônios. Por exemplo, a diminuição da potência e atenuação da amplitude de uma frequência ocorre devido à uma diminuição da sincronia entre população neuronal responsável por aquela oscilação, sendo este fenômeno chamado de dessincronização relacionada ao evento (*event-related desynchronization, ERD*). Já o aumento da potência e da amplitude de uma frequência é chamado de sincronização relacionada ao evento (*event-related synchronization, ERS;* Neuper e Pfurtscheller, 2001).

As oscilações são geradas por uma combinação de mecanismos. Muitos neurônios corticais possuem propriedades de membrana de marcapassos, de modo que podem produzir potenciais oscilatórios em diversas frequências. Normalmente, quanto maior a despolarização, maior será a frequência. Para que as oscilações sejam mantidas é necessário que circuitos adjacentes sejam recrutados. Estes circuitos envolvem interneurônios inibitórios que reforçam a alternância entre excitação e inibição (MacKay, 2005).

Nos últimos anos tem ocorrido um crescente interesse em analisar a atividade cerebral oscilatória para caracterizar mecanismos neurais relacionados a processos cognitivos e emocionais tanto em indivíduos sadios, como em indivíduos com alguma patologia. Frequentemente, a caracterização dos mecanismos neurais é feita a partir da análise das bandas de frequência da atividade cortical (Shackman *et al.*, 2010). Cada banda de frequência está relacionada a comportamentos específicos como demonstrado já nos estudos de Berger (Buzsáki, 2006). Uma breve descrição das bandas de frequência *delta*, *theta* e *beta* será feita, devido à relevância destas para este trabalho.

As oscilações *delta* são caracterizadas por alta amplitude e baixa frequência e têm origem, principalmente, no tálamo e no córtex. Essas estruturas foram identificadas como geradoras deste ritmo após estudos feitos com lesões (talamectomia e decorticação; Steriade, 2005). A oscilação *delta* está particularmente presente na região cortical durante o sono de ondas lentas, estado em que há uma redução da atividade cerebral (Greene e Frank, 2010). Porém, como revisto por Sauseng e Klimesch (2008), esta banda participa também de processos atencionais, de linguagem sintática e integração cortical. Ainda existem alguns trabalhos que associam a frequência *delta* a condições patológicas, tais como isquemia da artéria cerebral média (Lukashevich *et al.*, 1999), doença de Parkinson associada a demência (Stoffers *et al.*, 2007) e lesão medular (Aguilar *et al.*, 2010).

Fontes proeminentes da oscilação *theta* estão localizadas nas camadas corticais superficiais II e III, tendo como origem a camada V e no hipocampo (MacKay, 2005; Sauseng e Klimesch, 2008). Já foi extensivamente mostrado que a frequência *theta* está relacionada com os estados de atenção,

alerta e memória (Steriade, 2005; Machado *et al.*, 2007; Baumeister *et al.*, 2008; Sauseng e Klimesch, 2008; Kuo *et al.*, 2010).

No contexto de movimento, as oscilações *theta* podem ocorrer simultaneamente a ritmos mais rápidos (MacKay, 2005). De acordo com Caplan e colaboradores (2003), esta frequência possui um importante papel na coordenação de atividades motora e sensorial de diversas áreas cerebrais para facilitar o aprendizado espacial em humanos. Os autores acreditam que o ritmo *theta* facilita a integração sensório-motora que ocorre durante atividades motoras dinâmicas. Também já foi demonstrado que esta banda pode influenciar redes pré-motoras, envolvidas na preparação de um comportamento motor (Turak *et al.*, 2001).

A oscilação *beta* é gerada corticalmente, possui baixa amplitude e frequência maior do que as outras oscilações mencionadas (Neuper e Pfurtscheller, 2001; Salenius e Hari, 2003). Esse ritmo se assemelha muito à oscilação *mu* (frequência determinada como entre *theta* e *beta*), sendo que há relatos de que estas frequências se comportam da mesma maneira para determinados comportamentos, não podendo ser claramente distinguidas, mais especificamente, no sulco central (MacKay, 2005). Por este motivo, essas bandas foram analisadas conjuntamente neste trabalho.

Muitos trabalhos relacionam a oscilação *beta* com o movimento (Parkes *et al.*, 2006; Keinrath *et al.*, 2006; Erbil e Ungan, 2007; Gulyás *et al.*, 2009). Esses trabalhos mostram que existe um aumento da potência de *beta* antes do início do movimento (*ERS*) e assim que ele é iniciado ocorre uma diminuição significativa (*ERD*). Quando o movimento é cessado há um novo aumento da potência, chamado de rebote (*beta rebound*). Portanto, para os

autores, o aumento da frequência *beta* é responsável pelo início e término de uma atividade motora. Já foi constatada também a presença da frequência *beta* durante as contrações isométricas (Androulidakis *et al.*, 2007; Chakarov *et al.*, 2009). Segundo MacKay (2005) isso ocorre devido ao estado de equilíbrio da atividade cortical durante o movimento sustentado, que permite uma sincronização da população neuronal.

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- avaliar a recuperação funcional de ratos *Wistar* com lesão medular contusa, submetidos a treinamento motor;
- avaliar as alterações corticais decorrentes da lesão medular e do treinamento;
- avaliar as alterações medulares decorrentes da lesão medular e do treinamento.

Objetivos específicos:

- verificar a eficácia do treinamento no desempenho motor e na evolução da dor;
- correlacionar alterações eletrofisiológicas corticais com a recuperação funcional;
- correlacionar alterações histológicas na medula espinhal com a recuperação funcional.

4. MÉTODOS

4.1. Local de pesquisa

O projeto de pesquisa foi realizado em quatro laboratórios: Laboratório de Neurociências, ‘Prof. Dr. César Timo-Iaria’ - Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês (IEP/HSL), sob chefia do Prof. Dr. Koichi Sameshima; Laboratório de Neuromodulação e Dor Experimental - IEP/HSL, sob chefia da Dra. Camila Squarzoni Dale; Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos (LETRAN) - Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas (IOT/HC), sob chefia do Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho; e Laboratório de Neurobiologia Celular - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), sob chefia do Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto.

No primeiro laboratório mencionado foram realizadas as cirurgias de implante de matriz e perfusão, as avaliações eletrofisiológicas e motoras, partes das análises histológicas e imunohistoquímicas e as análises estatísticas dos dados. No laboratório de Neuromodulação e Dor Experimental foram realizadas as avaliações de dor neuropática (mecânica e térmica). No LETRAN foram realizadas as cirurgias de lesão medular contusa. E no laboratório de Neurobiologia Celular foram realizadas partes das análises histológicas e imunohistoquímicas.

4.2. Comissão de ética

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês, obtendo aprovação em 17 de outubro de 2008 (Apêndice A) e à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), obtendo aprovação no dia 16 de dezembro de 2008, protocolo de pesquisa número 1079/08 (Apêndice B).

4.3. Análise de risco

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

4.4. Sujeitos experimentais

Neste estudo foram utilizados 26 ratos *Wistar* machos, com o peso entre 300 e 350 g no início do experimento, provenientes do Centro de

Bioterismo da FMUSP (número de protocolo 044/09, Apêndice C). Dos 26 animais, cinco foram utilizados para padronizar a lesão, um foi a óbito no dia seguinte ao procedimento cirúrgico de implante de matriz de micro-elétrodos (devido ao tratamento com antibiótico pós procedimento cirúrgico), um foi a óbito no dia do procedimento de lesão medular, e dois animais foram sacrificados no 14º dia pós-operatório (dPO) devido a autofagia, não sendo considerados todos estes para análise das avaliações comportamentais. Restaram 17 animais que foram acompanhados até o final do experimento. Estes animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: treinado (TR, n = 6), controle (CTL, n = 7) e sham (n = 4).

Todos os animais ficaram acomodados em caixas individuais, sendo água e comida oferecidas *ad libitum*. Os animais provenientes da FMUSP foram levados para o Biotério do IEP/HSL, onde ficaram acomodados durante todo o período do experimento. Antes de ser realizado qualquer procedimento experimental, eles foram manipulados pela experimentadora por 10 minutos em dois dias consecutivos, com o objetivo deles se acostumarem com a experimentadora. Os animais do grupo controle e sham não foram submetidos ao treinamento, mas foram avaliados com a mesma periodicidade do grupo treinado.

4.5. Linha de tempo do experimento

Uma linha do tempo (Figura 14) foi desenhada com o objetivo de demonstrar em que ordem os eventos experimentais ocorreram. Todos os eventos estão descritos em detalhes ao longo dos métodos.

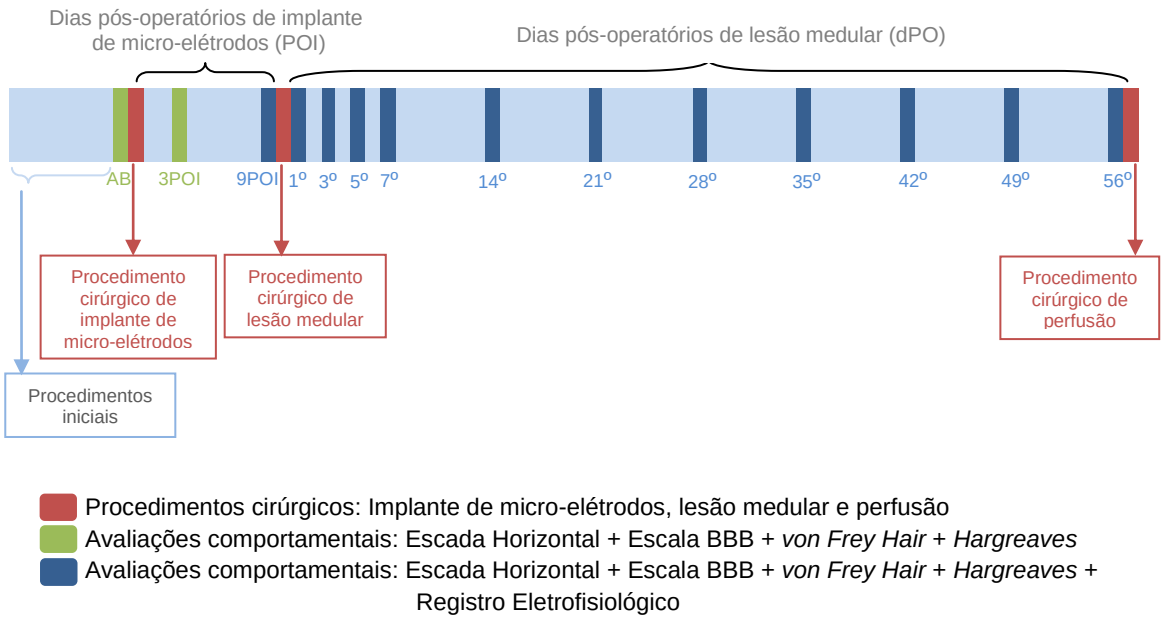

Figura 14 - Linha do tempo mostra os diferentes procedimentos realizados ao longo do experimento. As abreviações utilizadas foram: AB para avaliação basal; 3POI e 9POI para 3º e 9º dia pós-operatório de implante da matriz de micro-elétrodos. Essas abreviações serão utilizadas no decorrer do texto também.

Os procedimentos iniciais consistiram em: chegada do animal ao Biotério do IEP/HSL; manipulação do animal; habituação aos aparatos das avaliações comportamentais; habituação e aprendizado da tarefa no aparato de treinamento para os animais treinados; e confecção das matrizes de micro-elétrodos.

4.6. Confecção da matriz de micro-elétrodos

Para a construção das matrizes de micro-elétrodos foram utilizados fios de tungstênio revestidos com Teflon (*California Fine Wire Company*), de 50 µm de diâmetro para registro da atividade cortical (n = 31) e de 75 µm de diâmetro para registro da atividade muscular (n = 1). Os fios para registro cortical foram estendidos sobre uma madeira com fenda para encaixe

de uma das lâminas da tesoura e segurando as duas pontas firmemente, eles foram cuidadosamente cortados, um a um, formando um ângulo agudo para formação de uma ponta semelhante a um bisel de agulha. Posteriormente, foi construído um molde em papel perfurado de acordo com planejamento realizado para a estrutura anatômica do córtex sensório-motor do rato *Wistar*, utilizando o atlas de Paxinos e Watson (2007; Figura 15).

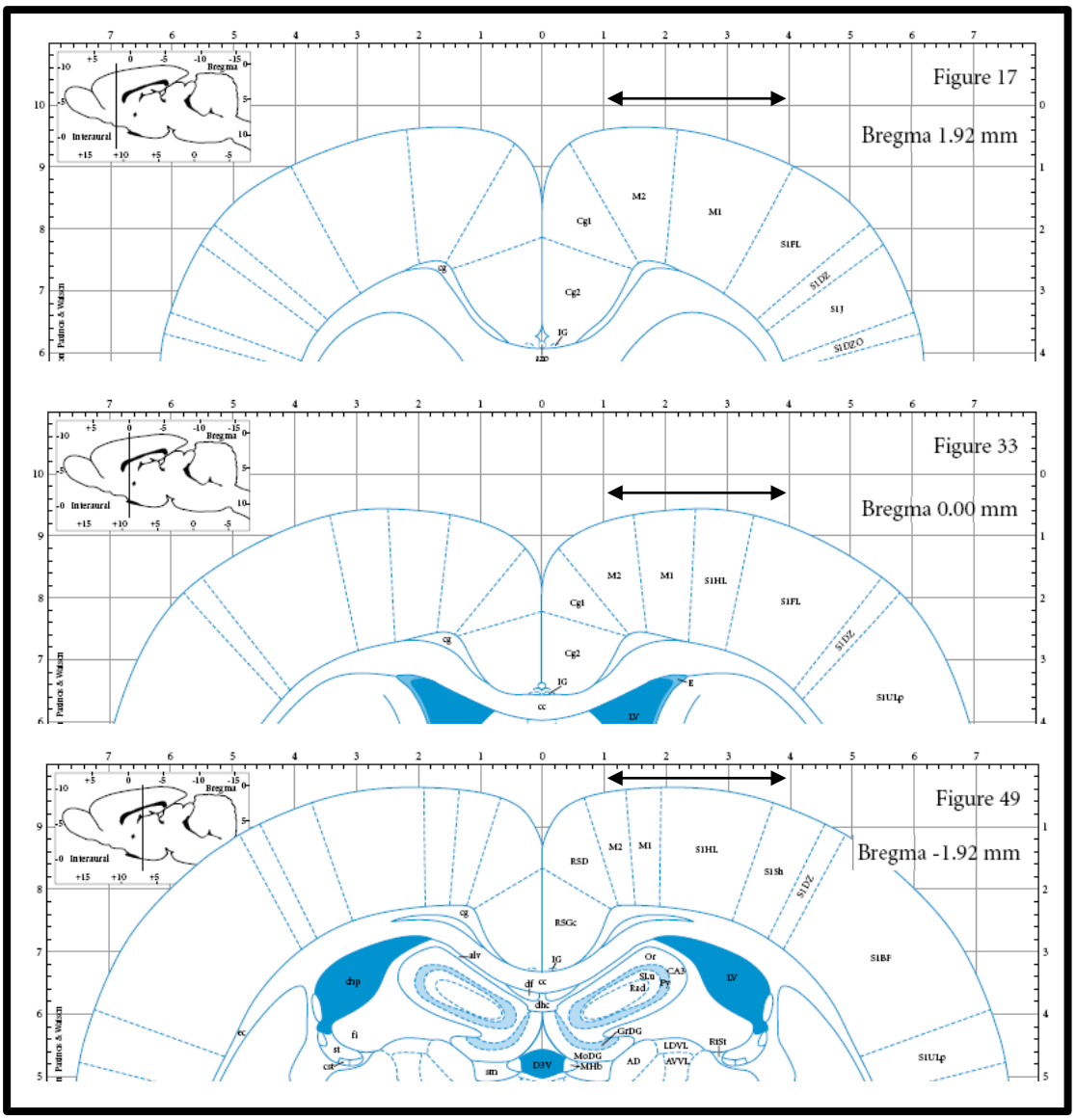

Figura 15 - Três imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007) mostrando cortes coronais da região cortical no sentido rostro-caudal (de cima para baixo). As coordenadas em relação ao Bregma estão apontadas no canto superior direito de cada imagem, correspondendo à área de implante da matriz de micro-elétrodos no sentindo rostro-caudal e também no sentido látero-lateral, apontado pelas setas.

Para a construção do molde foi utilizado equipamento específico, constituído por uma base fixa transladável, com dois eixos de precisão micrométrica (*XY Translation Stage Model 401,* Newport, Irvine, Califórnia) e uma furadeira de alta precisão (*Servo Products Company Model 7000*) com broca de cobalto de 0,7 mm de diâmetro na ponta (*Titex Plus*, Alemanha; Figura 16).

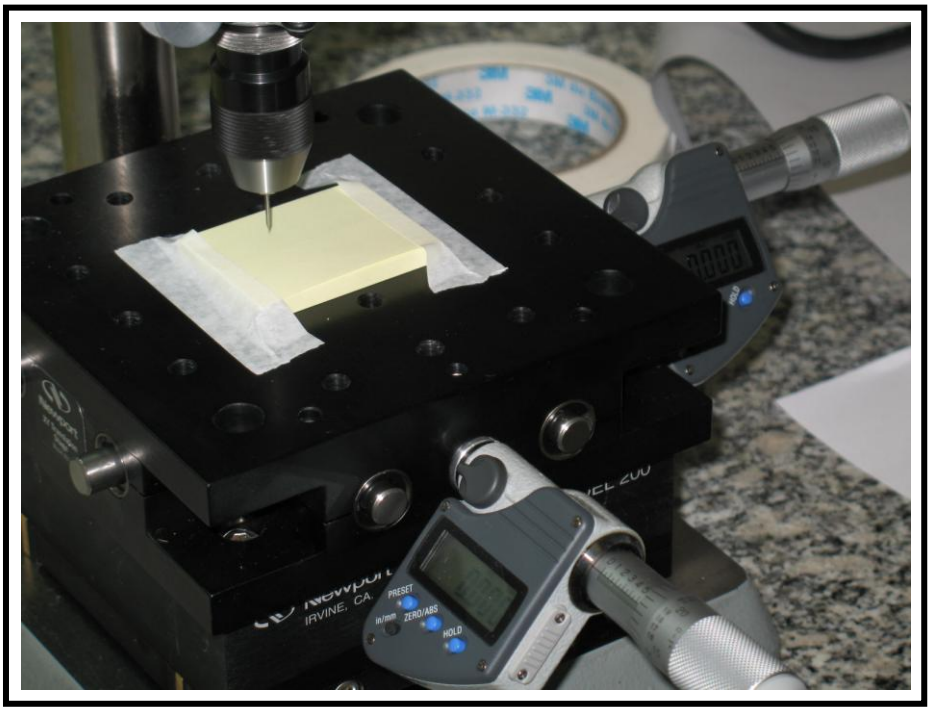

Figura 16 - Equipamento utilizado para realização de furos em folhas de papel, que servem de molde para construção das matrizes. O equipamento possui dois eixos com precisão micrométrica, permitindo movimentar a base que apóia as folhas de papel em dois sentidos. A cada posição desejada utiliza-se a broca para perfurar diversas folhas do bloco, criando, portanto, moldes idênticos.

Uma placa plástica com trilhas metálicas condutivas para 32 fios, feitas sob encomenda (*Printed Circuit Boards - PCBoards*) foi soldada a um micro-conector (*Omnetics*®) a ser fixado na cabeça do animal (Nicolelis *et al.*, 2003; Figura 17A). Cada um dos 32 pontos de solda foi testado com auxílio de um multímetro, para confirmar a passagem de corrente em todos e a inexistência de curto-circuito entre quaisquer pontos.

Paralelamente, os fios foram então colocados no molde, passando-os por duas folhas de papel perfuradas, mantidas paralelas entre si (Figura 17B). Após o ajuste de todos os 31 fios em suas posições, o feixe foi colado com cola epóxi (*5 Minute Epoxy, Devcon®, Scientific Yet Simple*), tornando-se firme e estável sem que os fios pudessem mover-se entre si (Figura 17C). Este feixe foi, então, cuidadosamente posicionado sobre a placa plástica, onde foi colado na posição desejada com cola epóxi e sob visualização no microscópio, cada um dos fios foi inserido em seu respectivo local da placa (Figura 17D). Além disso, o fio a ser implantado na região anterior do músculo quadríceps da pata posterior direita foi soldado na placa plástica em um local correspondente a um dos canais de registro (Figura 17E). A matriz recebeu ainda o fio terra, que foi soldado no local adequado da placa plástica, onde se situa sua trilha metálica (Figura 17E).

Depois de passados todos os fios, um lado da matriz é finalizado com o revestimento de cola epóxi (Figura 17F). No outro lado da matriz, todos os fios foram então cortados e desencapados um a um na ponta a ser conectada à placa com tinta metálica condutiva (*High Purity Silver Paint, SPI Supplies*; Figuras 17G e 17H), criando um circuito condutivo desde as pontas a serem implantadas no córtex e no músculo e os 32 pontos machos do conector a ser fixado na cabeça do animal, que puderam então ser conectados ao cabo durante as sessões de registro, ficando o animal livre nos demais momentos.

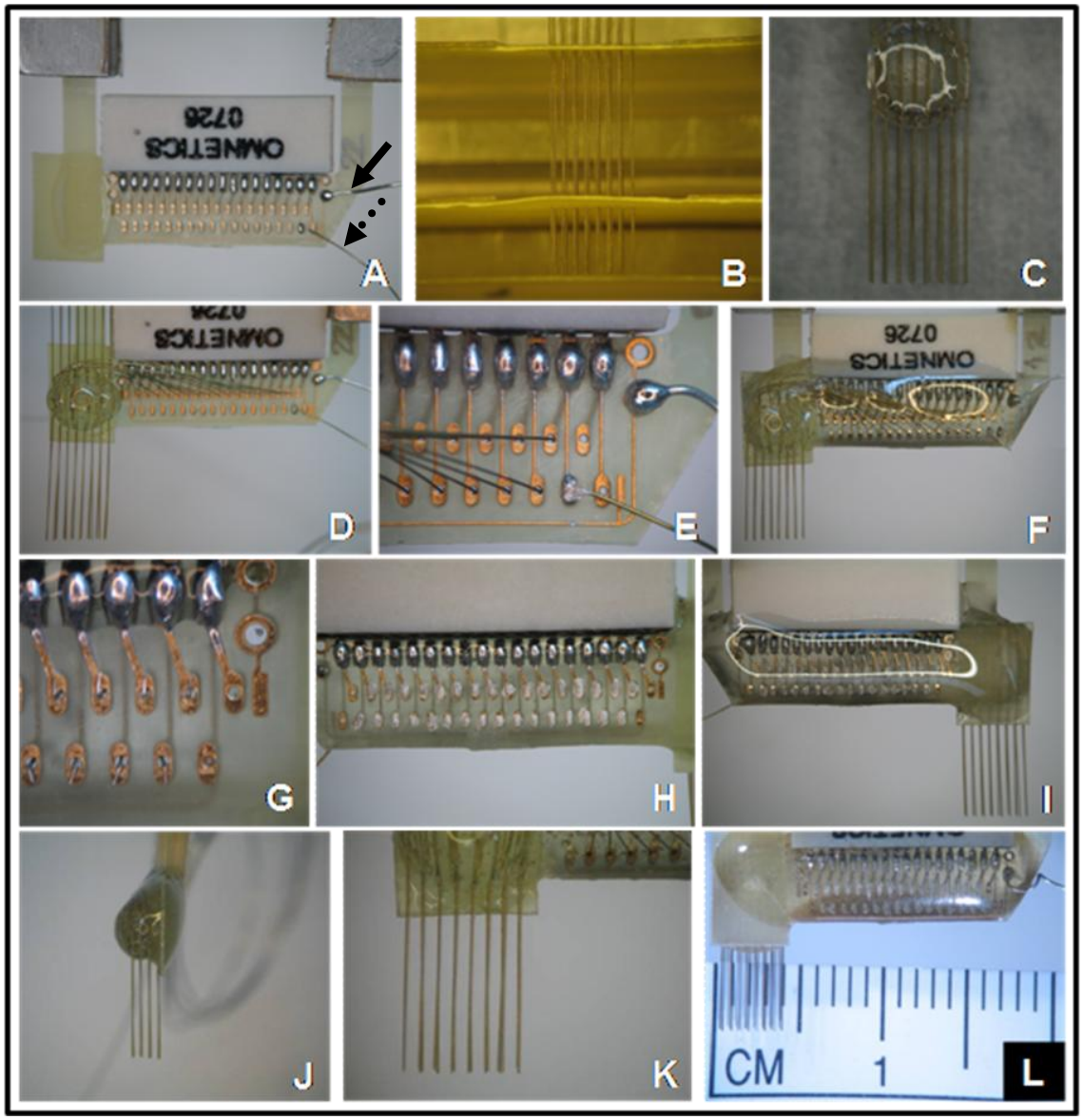

Figura 17 - Sequência de fotos da construção de matriz de micro-elétrodos. Placa com trilha metálica soldada ao conector da *Omnectis*®, fio terra apontado por ➡ e elétrodo para registrar a atividade muscular apontado por •••▶, soldados a trilha metálica da placa amarela (A). Fios passados por duas folhas de papel perfuradas como molde da matriz de elétrodos (B). Fios fixados entre si pela cola epóxi (C). Fios colados na placa amarela também com cola epóxi e os 16 primeiros fios já foram passados nos seus respectivos furos (primeira fileira; D). Detalhe de alguns fios de micro-elétrodos, passados pelos buracos e os fios do eletromiograma e terra além de passados foram soldados também (E). Finalização do lado anterior da matriz, sendo que todos os fios passados foram recobertos com cola epóxi (F). Vista posterior da matriz com os fios que foram passados para este lado já cortados, descascados e dobrados para fazerem contato físico com a trilha metálica (G). O contato elétrico entre os fios e a placa amarela foi feito com o *silver paint* mostrado na imagem por pontos em prata (H). Finalização do lado posterior da matriz com cola epóxi (I). Vista lateral da matriz finalizada, mostrando as quatro fileiras de micro-elétrodos no sentido látero-lateral (J). Oito fileiras de micro-elétrodos no sentido céfalo-caudal (K). Tamanho (em centímetros) ântero-posterior da região da matriz que foi introduzida na camada V do córtex sensório-motor dos ratos (aproximadamente 0,4 cm; L).

Depois de montada e conectada à placa com tinta condutiva, a passagem de corrente por cada um dos 32 fios da matriz foi verificada, inserindo-se os fios em água e passando-se corrente, canal por canal, a partir do respectivo pino macho do conector. Pequenas bolhas de ar ao redor da ponta do fio ligado ao respectivo canal do conector puderam ser observadas. Este processo permitiu conferir se todos os fios estavam conectados aos canais planejados e se não havia curto-circuito na matriz. Após o teste em água, a matriz foi toda selada e protegida com cola epóxi, restando exposta apenas a pequena parte a ser inserida no córtex e o fio a ser inserido no músculo durante a cirurgia (Figuras 17I a 17L). A impedância final de cada elétrodo foi de cerca de 1,0 MΩ a 1,0 kHz.

4.7. Procedimento cirúrgico de implante crônico da matriz de micro-elétrodos

O procedimento cirúrgico e o registro multi-unitário de neurônios do córtex sensório-motor seguiram uma metodologia intensivamente publicada (Shin e Chapin, 1990; Nicolelis *et al.*, 1993; Nicolelis *et al.*, 1995; Chapin e Nicolelis, 1996; Nicolelis *et al.*, 1997a; Nicolelis *et al.*, 1997b; Chapin *et al.*, 1999; Nicolelis e Chapin, 2002). Os elétrodos foram implantados na camada V do córtex motor primário e no córtex somatossensorial primário esquerdo, correspondente aos membros anteriores e posteriores direitos (Hall e Lindholm, 1974; Donoghue e Wise, 1982; Gioanni e Lamarche, 1985; Neafsey *et al.*, 1986; Figura 18).

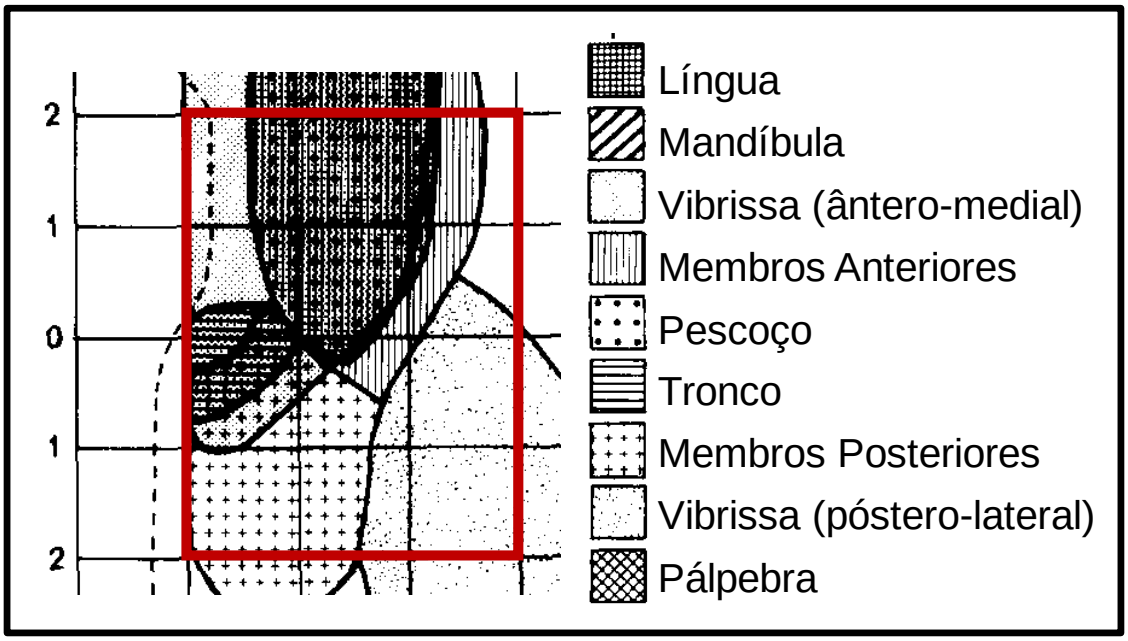

Figura 18 - Desenho esquemático da área cortical sensório-motora (quadrado em vinho) em relação ao Bregma (0), onde foi implantada a matriz de micro-elétrodos e a delimitação mais detalhada das áreas do córtex responsáveis pelas diferentes regiões do corpo do rato. Fonte: modificado de Gioanni e Lamarche (1985).

O animal foi primeiramente pesado e em seguida anestesiado com 100 mg/kg de ketamina (cloridrato de S(+) cetamina, Ketamin–S(+)®, Cristália) e 5 mg/kg de xilazina (cloridrato de xilazina, Anasedan®, Vetbrands) intraperitonealmente (ip), após uma prévia indução anestésica com halotano 5%. Atropina (sulfato de atropina, Atropion®, Ariston) foi injetada ip logo após a anestesia inicial para prevenir arritmia cardíaca e salivação excessiva durante o procedimento cirúrgico. Para suplementação, doses adicionais de ketamina ip foram administradas sempre que necessário, de acordo com os seguintes critérios: tensão na cauda, movimentação de vibrissas, movimentação de patas. Em poucos casos, nos quais se notou tensão muscular excessiva após quatro a seis horas da anestesia inicial, foi utilizada suplementação com dose muito pequena de xilazina (0,1 mg/kg). A figura 19 mostra a mesa cirúrgica com todos os instrumentos necessários para iniciar o procedimento cirúrgico de implante de micro-elétrodos.

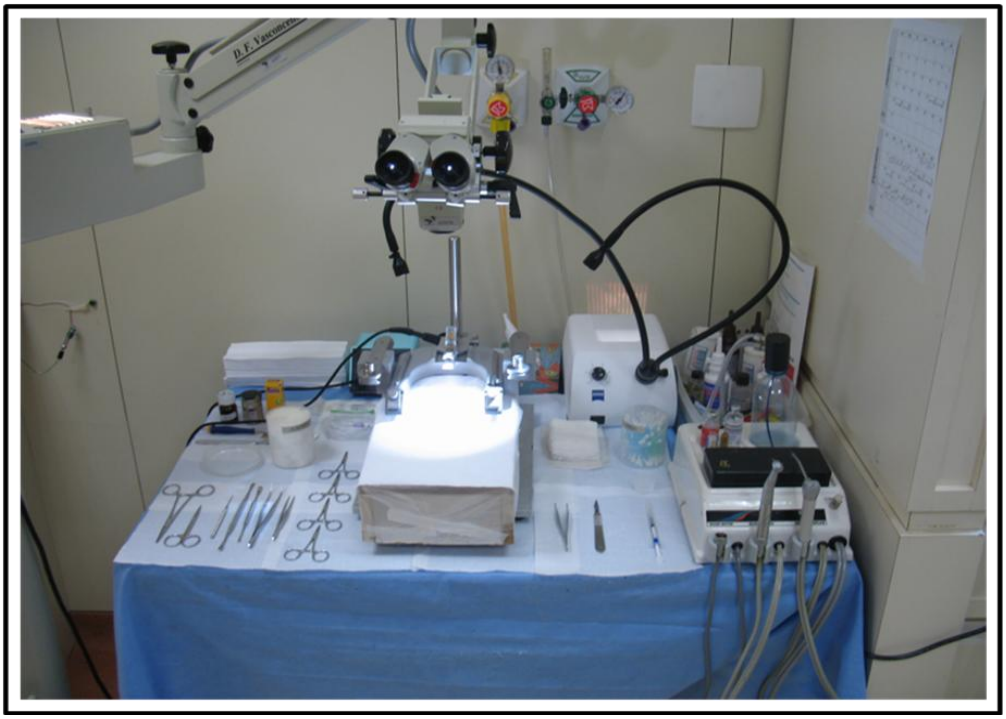

Figura 19 - Mesa cirúrgica preparada para o início do procedimento cirúrgico de implante crônico da matriz de micro-elétrodos.

Após verificação do estado anestésico inicial por pinçada na pata traseira sem que ocorresse retirada da mesma, e da cauda sem que houvesse qualquer reflexo, a região dorsal da cabeça e do pescoço e as regiões anteriores e laterais do membro posterior direito foram tricotomizadas e o animal foi posicionado no aparelho estereotáxico (*Kopf Intruments, Model 900;* Figura 20A).

Em seguida foi realizada a limpeza da pele na região da cabeça e pata posterior direita com iodopovidona degermante (Riodeine®, Bioquímica) e álcool 70%, seguido de injeção subcutânea de anestésico local e vasoconstritor, cloridrato de lidocaína com epinefrina (Xylestesin®, 2%, Cristália). A proteção ocular foi feita com pomada oftálmica estéril (Epitezan®, Allergan), com posterior cobertura com gaze no rostro (Figura 20B).

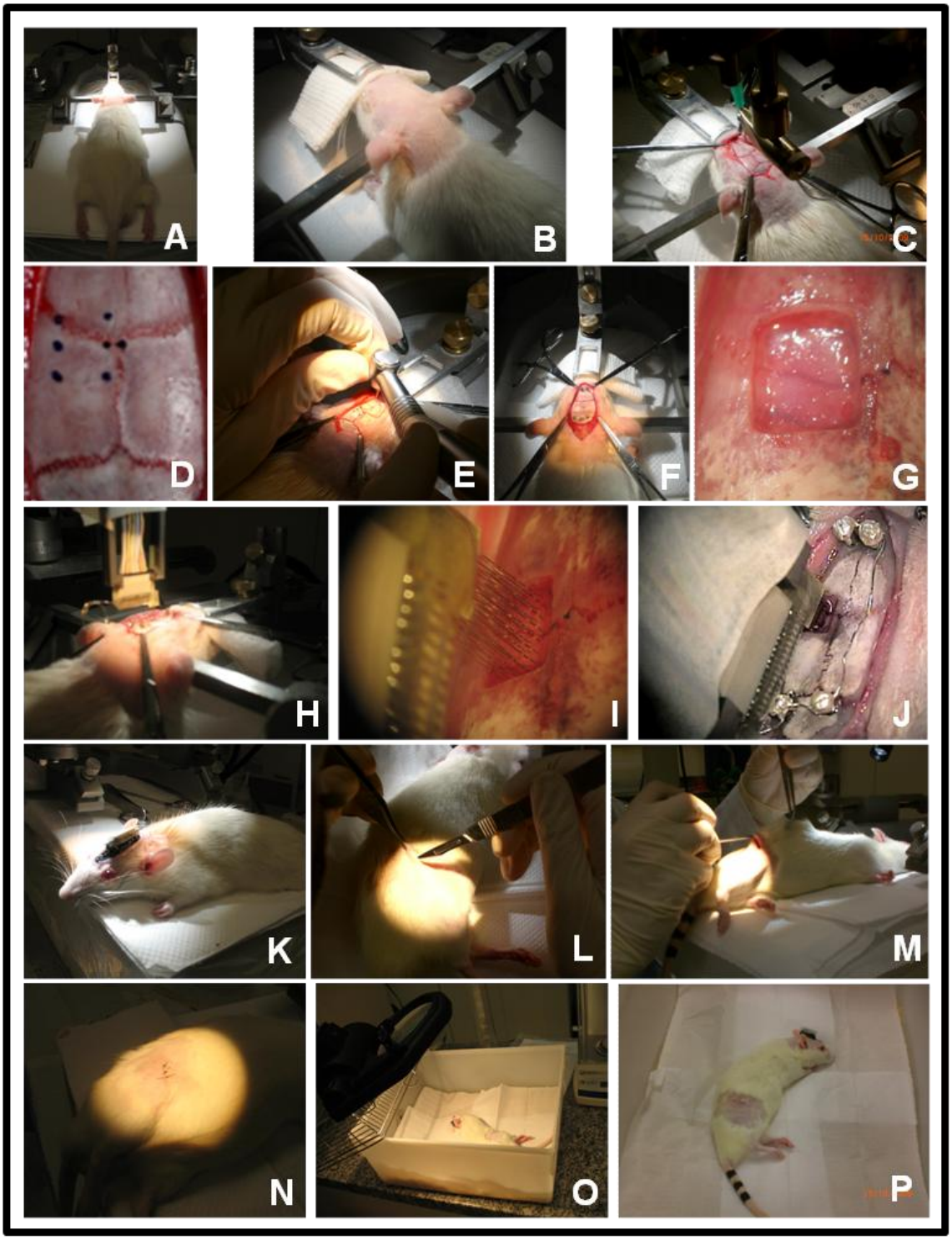

Figura 20 - Sequência de fotos da cirurgia de implante de micro-elétrodos. Animal posicionado no aparelho estereotáxico (A). Proteção ocular com pomada oftálmica e do rostro e vibrissas com gaze (B). Alinhamento do crânio feito a partir da medição do Bregma e Lambda com a torre móvel do aparelho estereotáxico (C). Marcações da janela que será aberta para implante da matriz de micro-elétrodos (D). Utilização da broca dentária para realizar os furos de colocação dos parafusos (E). Animal já com os quatro parafusos fixados no crânio, antes de ser realizada a craniotomia (F). Janela de implante da matriz de micro-elétrodos aberta, com exposição da dura-máter (G). Introdução da matriz de micro-elétrodos nas camadas corticais (H). Visualização dos micro-fios sendo inseridos no córtex após a retirada da dura-máter (I). Fio terra ligando os quatro parafusos, sendo feito o contato com a tinta metálica condutiva (J). Finalizado o implante que é fixado com a cola de cianoacrilato (em preto), o animal é retirado

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

Depois foram feitos: incisão na pele, da altura dos olhos até o final do crânio, retirada do periósteo e leve raspagem do crânio. Sempre que necessário foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9% para limpeza do local cirúrgico. Pequenos sangramentos no crânio foram contidos por leve raspagem adicional e se necessário foram estancados por rápida cauterização.

Após o alinhamento do crânio pelo Bregma e Lambda (Figura 20C), as marcações da janela para implante da matriz no córtex sensório-motor foram realizadas utilizando-se as coordenadas estereotáxicas definidas na construção das matrizes, sendo estas: 1 mm para o lado esquerdo em relação ao Bregma, a partir deste ponto 2 mm para cima e 2 mm para baixo e 3 mm para o lado esquerdo (Figura 20D). Com uma broca dental foram realizados quatro pequenos orifícios para fixação dos parafusos de sustentação e aterramento em lugares pré-determinados (dois frontais e dois occipitais) e abertura da janela para implante da matriz de micro-elétrodos no córtex (Figuras 20E a 20G).

Em seguida, as bordas da janela foram “alisadas” com o auxílio de uma micro-cureta e a dura-máter foi retirada para facilitar a entrada da matriz sem que houvesse um afundamento importante do córtex, o que poderia prejudicar o posicionamento final dos elétrodos. Para que não houvesse rompimento de vasos a dura-máter foi cuidadosamente retirada com auxílio de agulhas de insulina levemente entortadas.

A matriz de micro-elétrodos foi posicionada corretamente para a inserção, utilizando o manipulador estereotáxico e foi introduzida lentamente em coordenadas precisas para minimizar danos cerebrais e sangramento (Figuras 20H e 20I). Um fio de prata para servir de referência (“terra”) foi enrolado em torno dos quatro parafusos e em seguida foi feito o contato com tinta metálica condutiva (Figura 20J). A atividade celular foi monitorada durante o implante para auxiliar na localização da matriz de elétrodos em relação a sua profundidade, variando entre 1700 a 1800 µm, com o objetivo de atingir a camada V do córtex sensório-motor.

Finalizado o implante, a janela com a matriz implantada foi coberta por gelatina absorvível (*Gelfoam®,* Pharmacia) para proteção da superfície cortical e uma camada de supercola instantânea de cianoacrilato foi aplicada ao redor da matriz e dos parafusos para criar uma capa fixada ao crânio. Um catalisador (*cyanoacrylate accelerator, Flashtac™,* NHP Co., Inc.) para supercola foi usado para acelerar o endurecimento da cola e assim diminuir o tempo de cirurgia (Figura 20K).

Em seguida, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico para realizar a passagem do elétrodo muscular, que foi inserido na região anterior do músculo quadríceps direito. Para isto, os procedimentos realizados foram: assepsia do local com povedine e álcool 70%; anestesia local com cloridrato de lidocaína com epinefrina; abertura de aproximadamente 1,5 cm, realizada com o bisturi; divulsionamento da pele da região com tesoura para facilitar a entrada de uma agulha com um tubo guia, que atravessou o corpo do animal com o objetivo de realizar a passagem do elétrodo muscular (Figuras 20L e 20M). Uma vez passado o fio e retirado o tubo guia, ele foi inserido uma

vez na musculatura anterior da coxa do animal para ficar fixado e em seguida, a região do elétrodo que deveria ficar em contato direto com o músculo era descascada (retirada a camada isoladora de Teflon). Mais duas laçadas do fio para dentro do músculo foram realizadas e no fim da ponta do elétrodo um pequeno nó foi dado, para tentar minimizar as chances do mesmo sair do lugar.

Após a limpeza do local, foram dados três pontos na pele com fio de sutura monofilamento 4.0 e após nova limpeza do local, foi aplicada a pomada Fibrase® (Pfizer) na região da cicatriz (Figura 20N). A pele da cabeça com a incisão também foi limpa e dois ou três pontos foram dados com fio de sutura 4.0 na região posterior ao implante, de onde o elétrodo muscular saía e após a limpeza final, uma camada de Fibrase® foi aplicada ao redor de todo o implante.

Ao término da cirurgia de implante, o animal foi colocado em uma gaiola individual limpa (dimensões: 41 x 34 x 26 cm, comprimento x largura x altura) e posicionado sob uma lâmpada de aquecimento, sendo observado até plena recuperação (Figura 20O). Ração e água foram oferecidos logo que o animal ficou totalmente acordado, assim como Tylenol® (15-20 mg/kg) via oral para alívio da dor. No dia seguinte, também era dado o Tylenol®. Quando a cicatriz cirúrgica apresentava sangramento, secreção ou sujeira, o animal era sedado com halotano (5%) e a cicatriz cirúrgica era limpa com solução de cloreto de sódio 0,9% e uma nova camada de Fibrase® era aplicada.

4.8. Procedimento cirúrgico de lesão medular por contusão

O modelo experimental de lesão medular utilizado foi o de contusão padronizado para ratos *Wistar* por meio do equipamento *New York University Spinal Cord Contusion – Impactor* (*NYU-Impactor*, 1993; Figura 21), de acordo com as normas do *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*. Este equipamento estava conectado a um computador que ao final da contusão gerava um gráfico, que permitia verificar se a lesão havia sido eficaz ou não (Figura 22). Vários parâmetros puderam ser observados, tais como: velocidade de queda do peso, deslocamento da medula, posicionamento do peso, entre outros.

Os ratos foram anestesiados com 100 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina, intraperitonealmente, e para anestesia local foi utilizado o cloridrato de lidocaína com epinefrina. O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda e patas traseiras.

Após tricotomia da região dorsal do corpo do animal (Figura 23A), com auxílio de microscópio cirúrgico, uma incisão na linha média dorsal foi feita para expor os processos espinhosos da coluna vertebral, da 8ª vértebra torácica (T8) à 11ª vértebra torácica (T11) (Figura 23B). Os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas da 9ª (T9) e 10ª vértebras torácicas (T10) foram divulsionados e desinseridos. Os processos espinhosos destas vértebras ficaram expostos e em seguida foram removidos, com micro saca-bocados, até expor totalmente a face dorsal da medula espinhal no nível de

T9/T10 (Figura 23C) e permitir o contato pleno da ponta da haste do *NYU-Impactor*.

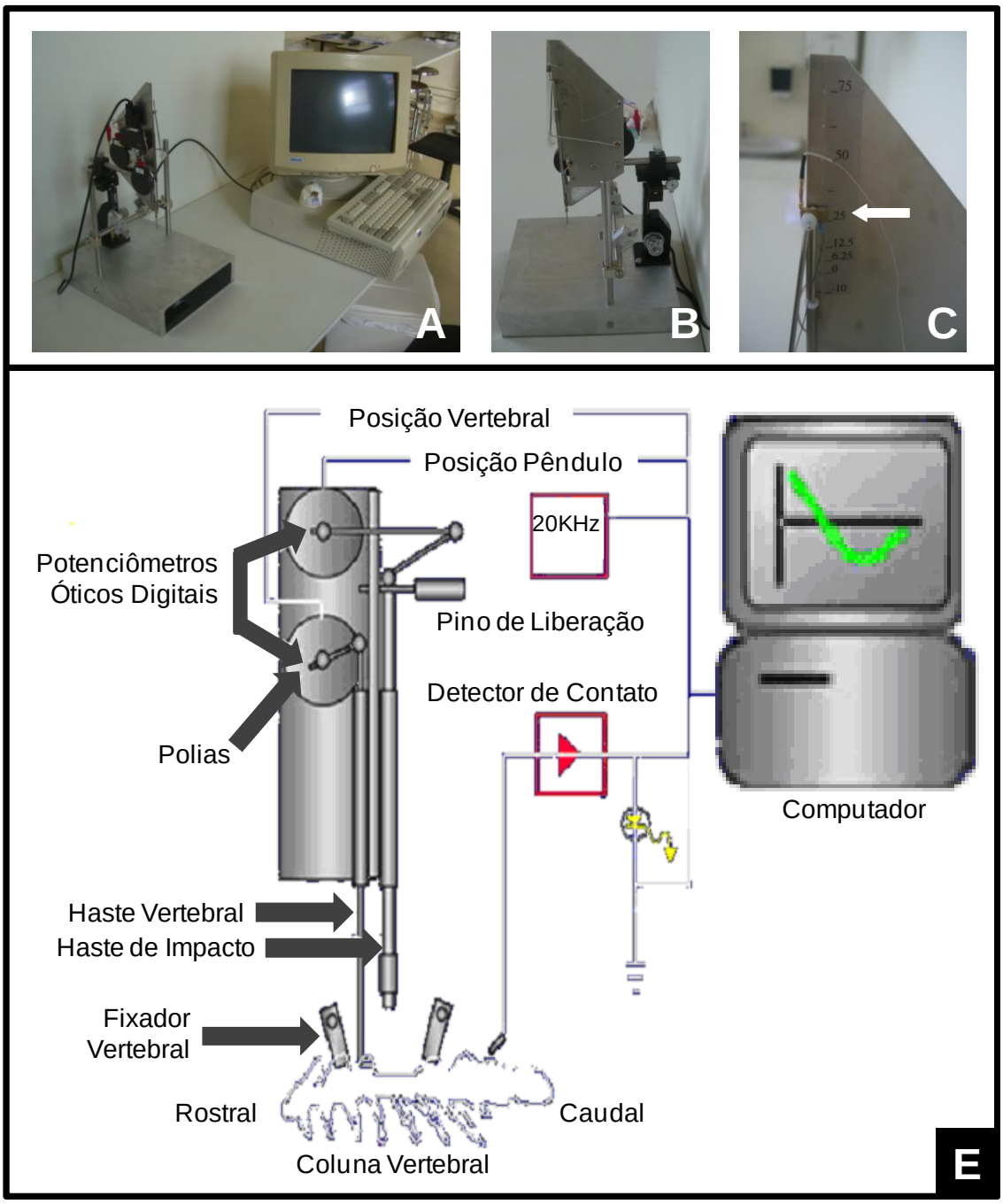

Figura 21 - Imagens do equipamento de lesão, *NYU-Impactor*. O aparelho estava conectado ao computador que armazena os parâmetros da lesão (A). Vista lateral do equipamento (B). Vista lateral do equipamento com aproximação para mostrar a altura pré-determinada de 25 mm (indicada pela seta), para a queda do peso (C). Desenho esquemático do *NYU-Impactor* com as suas estruturas apontadas e nomeadas (E).

Duas garras reguláveis foram ajustadas, para a fixação da coluna vertebral, presas aos processos espinhosos das vértebras T8 e T11. As garras tiveram como objetivo diminuir as deformações do corpo do rato e, consequentemente, o movimento da coluna, que poderia causar uma lesão inconsistente (Figura 23D).

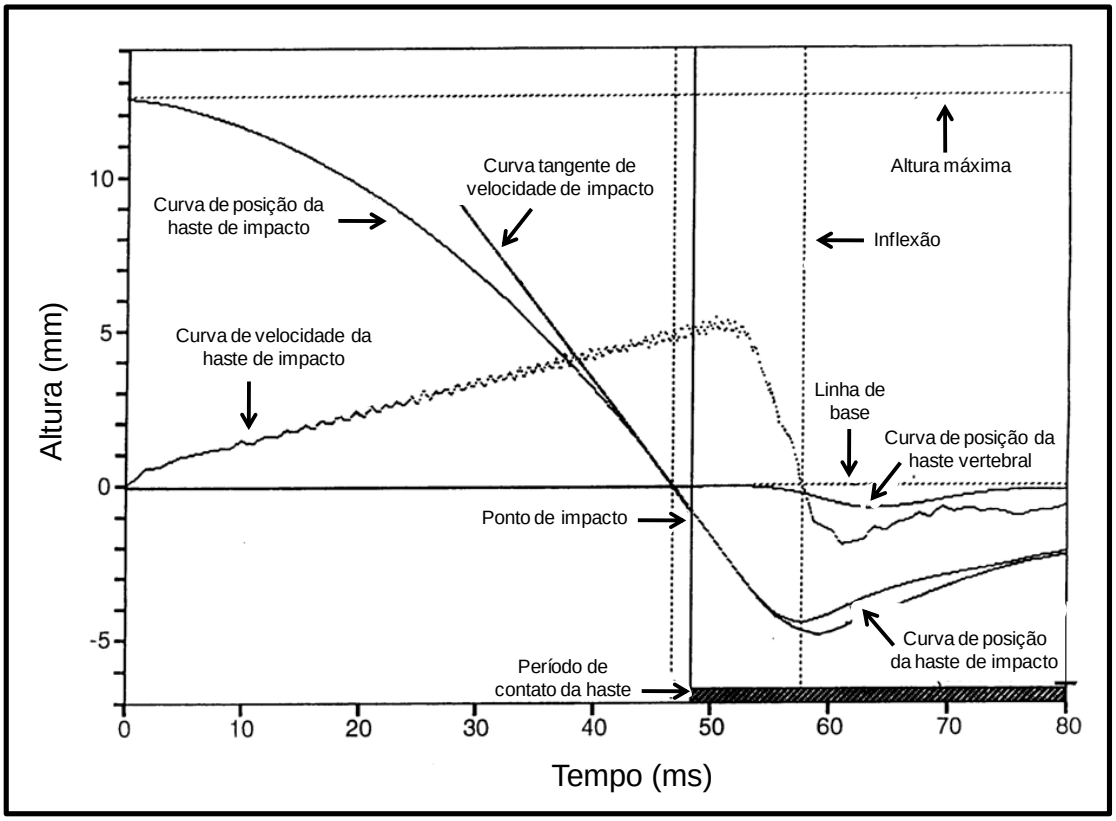

Figura 22 - Desenho esquemático do gráfico gerado ao final da lesão medular por contusão. Neste exemplo, a queda do peso ocorre da altura de 12,5 mm e diversas variáveis que podem ser controladas estão nomeadas e apontadas pelas setas.

O modelo de lesão por impacto consiste na queda de uma haste de ferro de 10 g de peso de uma altura pré-determinada de 25 mm entre a ponta da haste e a superfície da medula espinhal, através de um tubo guia, de maneira a reduzir os fatores de imprecisão. A queda do peso da altura de 25 mm causa uma lesão moderada como descrito por Basso *et al.* (1995). O aparelho foi construído de modo a produzir um impacto direto de alto

rendimento, e a reduzir atritos, causando uma contusão consistente e reproduzível.

Após a contusão, o local foi inspecionado e em seguida, lavado com solução de cloreto de sódio 0,9%, em temperatura ambiente. A aproximação dos planos teciduais musculares e fasciais foi realizada com sutura de dois pontos Donati com fio de nylon monofilamento 4.0 (Figura 23E). Depois, a sutura cutânea foi realizada com pontos simples separados, também com fio de nylon monofilamento 4.0, sendo realizados em média sete pontos (Figura 23F). Após a limpeza da cicatriz cirúrgica foi aplicada uma camada da pomada Fibrase®.

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

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

operatórios. O esvaziamento era realizado até que o animal recuperasse a função de urinar espontaneamente.

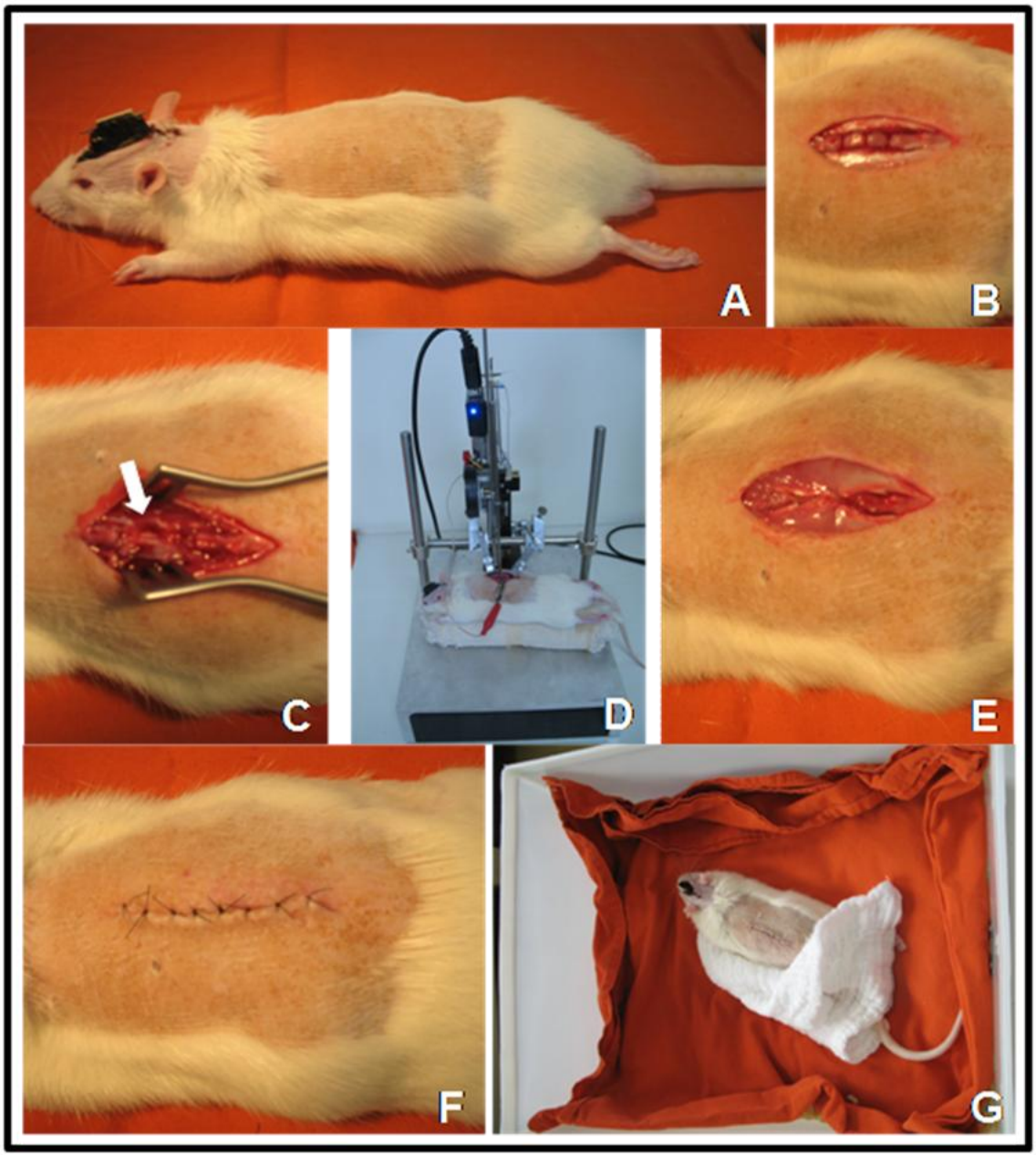

Figura 23 - Sequência de fotos da cirurgia de lesão medular. Animal anestesiado, com a região dorsal tricotomizada (A). Abertura da região de interesse para realizar a LM, sendo separadas as vértebras T9 e T10 (B). Musculatura afastada e processos espinhos das vértebras T9 e T10 retirados, com exposição total da medula espinhal em uma extensão suficiente para permitir o contato da haste de impacto (indicada pela seta; C). Animal posicionado no *NYU-Impactor* (D). Aproximação da musculatura com dois pontos Donati (E). Aproximação da pele com oito pontos simples separados (F). Aspecto final do animal após a cirurgia de lesão, posicionado na caixa moradia (G).

A cor da urina é um indicativo de presença ou ausência de infecção urinária. Deste modo, foi utilizada uma pontuação de acordo com a cor todas as vezes em que era realizada a manobra de esvaziamento vesical. Essa pontuação vai de 0 a 4, sendo que: 0 corresponde à clara ou amarela; 1 corresponde à turva; 2 corresponde à rosada; 3 corresponde à sangue; e 4 corresponde à marrom ou vermelho muito escuro.

4.9. Treinamento motor

Os animais do grupo treinado foram submetidos a treinamento na esteira com controle de velocidade, antes e após a lesão medular. As dimensões externas da esteira são 67 x 31 x 50 cm (comprimento x largura x altura), e as dimensões internas do local de treinamento são 39 x 15 x 30 cm (comprimento x largura x altura; Figura 24). Três treinos anteriores à lesão foram realizados por 15 minutos com os objetivos de adaptar o animal ao ambiente de treinamento, ensinar a tarefa que seria realizada e obter dados sobre a atividade cortical do animal sem lesão durante e após o exercício.

Os treinos posteriores à lesão foram iniciados no 5º dia pós-operatório e se estenderam por oito semanas. Eles foram realizados com uma frequência de cinco vezes na semana, durante 15 minutos cada, até o final do experimento. Devido à ausência de movimentos dos membros posteriores nos primeiros dias após a lesão medular, foi necessário desenvolver um dispositivo auxiliar para que o treinamento fosse realizado de maneira eficaz (Figura 25).

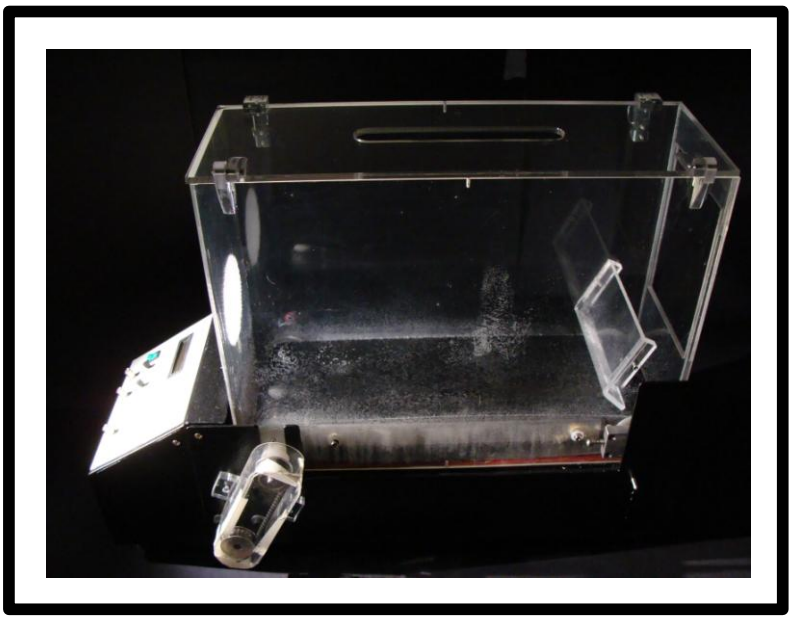

Figura 24 - Esteira motorizada controlada por velocidade utilizada para o treinamento motor dos ratos lesados do grupo treinado.

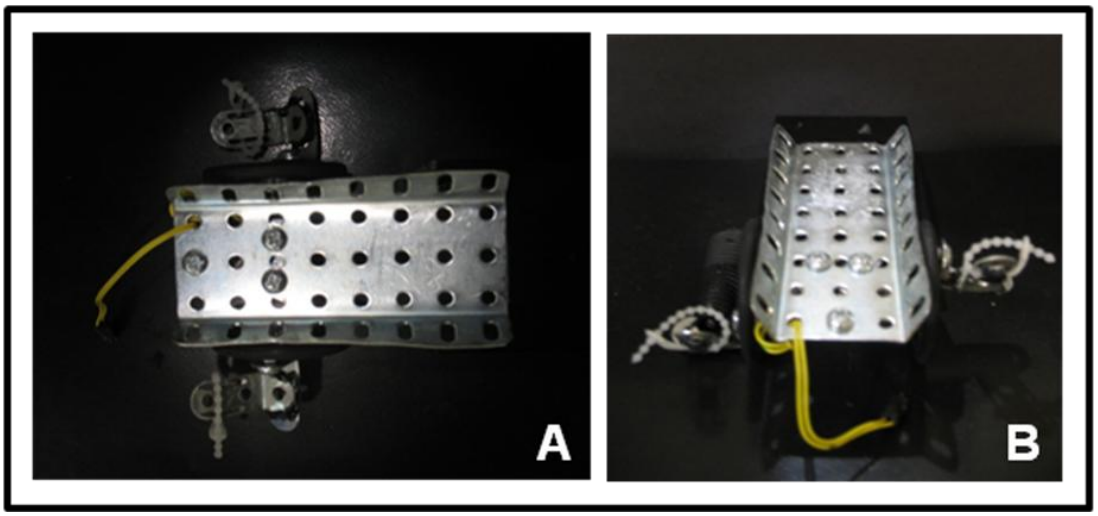

Figura 25 - Vista superior do dispositivo auxiliar, sendo possível observar a superfície plana na qual o abdômen do animal era apoiado e os pedais onde as patas eram posicionadas (A). Vista posterior do dispositivo permite visualizar que quando um pedal está para cima (direito), o outro está para baixo (esquerdo), permitindo que os "passos" passivos dos membros posteriores fossem realizados de forma alternada e rítmica, simulando a marcha (B).

Os animais foram colocados neste dispositivo, de forma que o abdômen ficasse apoiado em uma superfície plana, os membros posteriores (MMPP) presos nos pedais, e o tronco preso por uma fita de velcro. As dimensões deste dispositivo são 10 x 5,5 x 5 cm (comprimento x largura x altura; Figura 26). Além disso, foi utilizada uma coleira para o suporte de peso

do animal, de forma que o dispositivo ficasse somente com suas rodas apoiadas na esteira e o movimento dos membros anteriores do animal pudesse ser realizado livremente.

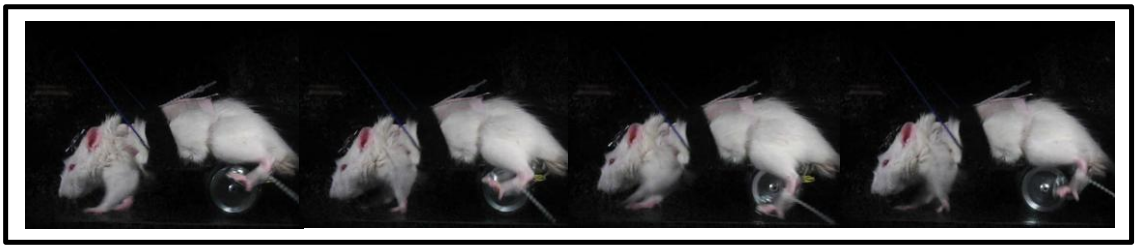

Figura 26 - Animal posicionado no dispositivo desenvolvido para auxiliar no movimento dos membros posteriores no período agudo da lesão medular. As fotos mostram uma sequência de "passos" realizada passivamente.

Quando os animais começavam a apresentar movimentos dos MMPP, o dispositivo era deixado de ser usado. No entanto, nesta fase ainda era necessário o uso do cinto para suporte de peso do tronco, que evitava que ele ficasse arrastado na esteira, e auxílio manual para que o movimento das articulações dos MMPP fosse realizado de maneira mais adequada. Os animais foram treinados a andar na esteira inicialmente com velocidade de 4,5 metros/minuto (m/min) e conforme eles apresentassem movimento extenso das articulações dos MMPP, a velocidade foi aumentada até no máximo 8,5 m/min (metodologia adaptada de Bigbee e colaboradores, 2007). Quando sinais de estresse, tais como aumento da frequência respiratória e defecação, foram notados, a velocidade era diminuída (Hutchinson *et al.*, 2004).

4.10. Avaliações comportamentais

Todas as avaliações comportamentais, exceto o registro eletrofisiológico, foram realizadas uma vez no dia anterior ao procedimento

cirúrgico de implante de elétrodos e no terceiro dia após este procedimento. No 9º dia após cirurgia de implante foram realizadas todas as avaliações comportamentais, inclusive o registro eletrofisiológico com o objetivo de verificar as condições basais de cada animal, isto é, antes da cirurgia de lesão medular que foi realizada no 10º dia pós-cirúrgico de implante. Após a lesão medular, todas as avaliações foram realizadas no 1º, 3º, 5º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º e 56º dias pós-operatórios.

4.10.1. Avaliação comportamental motora: escala BBB

Uma das grandes dificuldades que existia em pesquisas utilizando-se ratos para o estudo da lesão medular era a avaliação da recuperação motora. Assim, Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) desenvolveram uma escala (Anexo A), que avalia a função motora em um campo aberto, para identificar padrões de recuperação motora em ratos lesados medulares (Basso *et al.*, 1995). A escala varia de 0 a 21, sendo que zero corresponde à ausência total de movimentos das patas posteriores e 21 é a pontuação dada ao animal que realiza a locomoção normalmente (Basso *et al.*, 1995).

A avaliação por meio da escala consiste na observação de diversos segmentos corporais, incluindo tronco, abdômen, cauda e MMPP. Deste modo, são observados os movimentos das articulações dos MMPP (quadril, joelho e tornozelo), a instabilidade do tronco, a disposição da musculatura do abdômen, a coordenação entre membros anteriores e posteriores, a posição da cauda, o tipo e frequência da passada com patas

traseiras e a presença de rotação ou desvio dos MMPP (Basso *et al.*, 1996; Vialle *et al.*, 2002; Zai e Wrathall, 2005).

Todos os animais foram avaliados individualmente em um campo aberto, com dimensões de 52 x 87 x 66 cm (comprimento x largura x altura), onde podiam se locomover livremente. Uma câmera de vídeo foi utilizada para registrar o comportamento motor dos animais durante sete minutos e ao mesmo tempo uma ficha de avaliação da escala BBB (Anexo B) foi preenchida para obter a devida pontuação do comportamento motor de cada animal. Os vídeos foram utilizados para confirmação de dados.

4.10.2. Avaliação comportamental sensório-motora: escada horizontal

Uma escada horizontal (*horizontal ladder*) com 100 cm de comprimento, 35 cm de largura, suspensa a 46 cm do chão e com espaço fixo de 1,5 cm entre cada filete de ferro, foi utilizada para avaliar a função proprioceptiva dos animais (Bolton *et al.*, 2006; Erschbamer *et al.*, 2006; Girgis *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2010). Os animais foram primeiramente treinados a andar na escada por dois dias antes da cirurgia de implante da matriz de micro-elétrodos, sendo necessário atravessá-la cinco vezes. Para que os animais aprendessem a atravessar a escada horizontal foi utilizada como estímulo água com açúcar, que era posicionada nas extremidades. Este estímulo foi mantido nas sessões de avaliação.

Nas avaliações, os animais precisavam andar três vezes voluntariamente ao longo da escada. Todas as sessões de avaliação foram filmadas por duas câmeras (visão frontal e lateral), e a contagem de número de

passos total, de acertos, de escorregadas e de erros foi feita, posteriormente, a partir da análise destes vídeos. Os acertos consistiram em posicionamentos corretos das patas nos filetes de ferro. As escorregadas eram o posicionamento da pata no filete de ferro, seguido da queda da mesma entre os filetes. E dois tipos de erros foram considerados separadamente, sendo eles: o arrastar dos membros posteriores ao longo da escada horizontal e o posicionamento da pata entre os filetes de ferro (Šedý *et al.*, 2008; Krajacic *et al.*, 2010). Os valores das três passagens pela escada horizontal foram obtidos para todos os tipos de respostas (acertos e erros) e foi feita a média deles.

4.10.3. Avaliação comportamental de dor neuropática - alodínea e hiperalgesia mecânica: *von Frey Hair Test*

O teste utilizado para avaliar alodínea e hiperalgesia mecânica foi o *von Frey Hair Test*. Este teste consiste na aplicação de um estímulo na face plantar das patas anteriores e posteriores do rato, por meio de monofilamentos, cujos diâmetros são graduados, gerando diferentes forças em gramas (Figura 27A). A pressão aplicada por meio do monofilamento foi o suficiente para causar uma pequena curvatura do mesmo por três segundos.

Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de plástico invertida (com diâmetro de 18 cm e altura de 22 cm, Figura 27B), apoiada sobre uma grade, suspensa a 176 cm do chão, através da qual foi aplicado o estímulo com os monofilamentos nas superfícies plantares das patas. Os animais foram habituados a esta condição por 30 minutos em dois dias consecutivos, imediatamente anteriores ao primeiro dia do teste. Antes do

início de todas as avaliações, os animais permaneciam nesse ambiente por cinco minutos com o objetivo de aclimatização (Chaplan *et al.*, 1994).

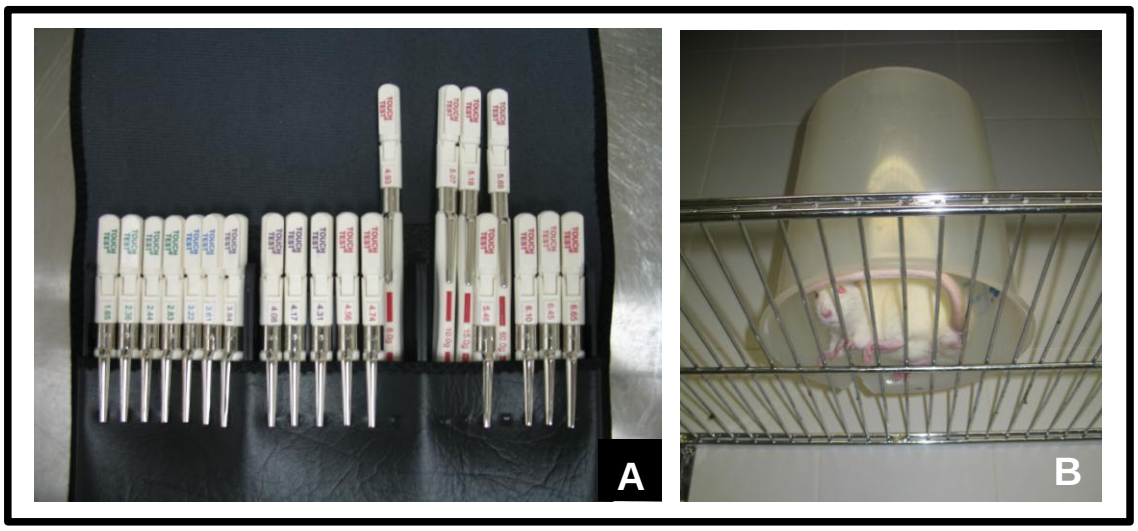

Figura 27 - Kit de monofilamentos do *von Frey Hair Test*, sendo destacados os monofilamentos utilizados na avaliação dos animais deste trabalho (A). Local de avaliação do animal, sendo os estímulos aplicados com os monofilamentos através da grade (B).

Três diâmetros de monofilamentos padronizados para testar diferentes tipos de dor neuropática foram utilizados nesta avaliação, sendo eles para os membros anteriores 4,93 (8,511 g – 0,406 mm), 5,07 (11,749 g – 0,432 mm) e 5,18 (15,136 g – 0,483 mm) e para os membros posteriores 4,93, 5,18 e 5,88 (75,858 g – 0,711 mm) (*Touch Test™ Sensory Evaluators, , Operation Manual,* 2001; Figura 28). O estímulo com cada monofilamento foi aplicado, perpendicularmente, três vezes na face plantar das patas com intervalo de alguns segundos. As respostas a estes estímulos foram pontuadas de 0 a 2, sendo que 0 corresponde à ausência de resposta, 1 corresponde à retirada da pata e 2 corresponde a retirada da pata, seguida imediatamente por um balanço ou lambida da mesma. Para analisar os dados, as pontuações das três respostas foram somadas, sendo seis, portanto, a pontuação máxima

possível que podia ser atingida. Em seguida, estes valores foram convertidos para porcentagem (Takasaki *et al.*, 2001).

O monofilamento de menor diâmetro serviu para avaliar alodínea, ou seja, dor a um estímulo tátil não nocivo. Os monofilamentos seguintes serviram para avaliar dor a um estímulo mecânico nocivo, podendo ser classificada em hiperalgesia leve (4,07 para patas anteriores e 4,18 para patas posteriores) e hiperalgesia intensa (4,18 para patas anteriores e 4,88 para patas posteriores).

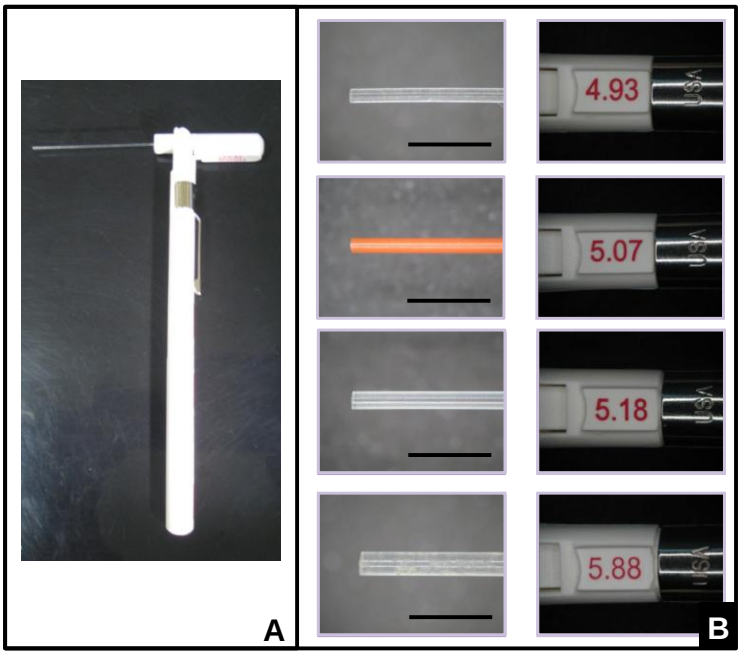

Figura 28 - Um monofilamento aberto, como é aplicado durante a avaliação do animal (A). Detalhe dos monofilamentos utilizados na avaliação de dor dos membros anteriores (4,93; 5,07; 5,18) e posteriores (4,93; 5,18; 5,88) (B). Barra de escala 1 cm.

4.10.4. Avaliação comportamental de dor térmica: *Hargreaves*

A dor térmica foi avaliada por meio de um teste plantar da *Ugo Basile* (*Comerio, Italy*; Figura 29), o qual consiste em aplicar um estímulo de calor radiante nas faces plantares das quatro patas do animal individualmente,

e o tempo de latência (em segundos) para a retirada da pata foi avaliado, como descrito por Hargreaves *et al.*, em 1988.

Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (de dimensões: 20,5 cm comprimento, 10 cm largura e 12,5 cm altura), apoiada sobre um vidro, através do qual era aplicado o estímulo de calor (Figura 29B). Os ratos foram habituados a esta condição por 30 minutos em dois dias consecutivos, imediatamente anteriores ao primeiro dia do teste. Antes do início do teste, os animais permaneceram nesse ambiente por cinco minutos com o objetivo de aclimatização (Chaplan *et al.*, 1994).

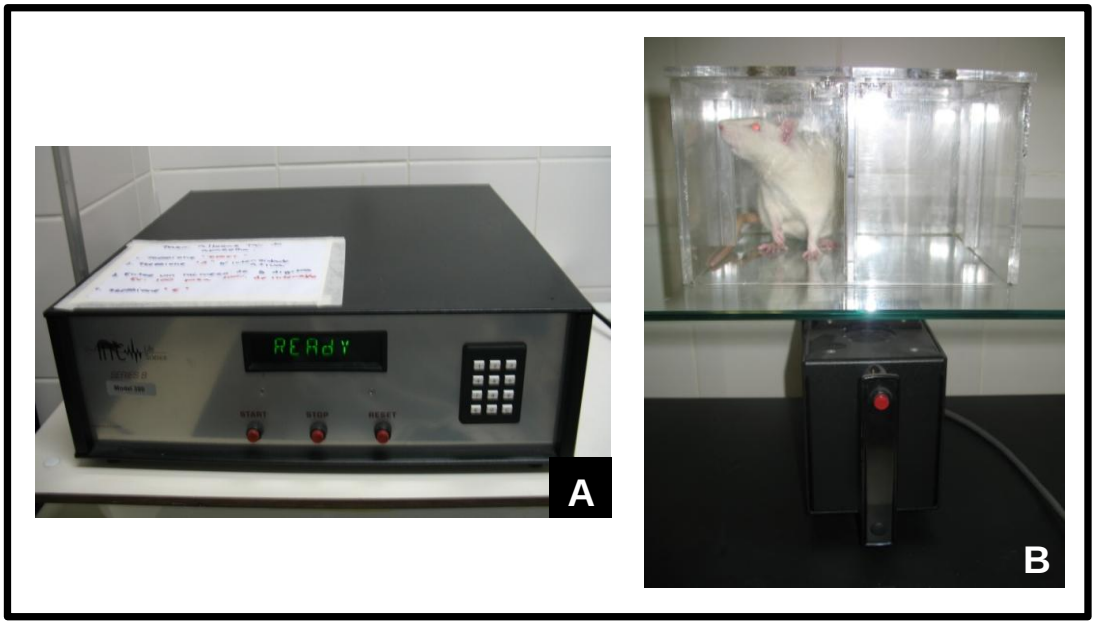

Figura 29 - Equipamento da *Ugo Basile* para avaliar dor térmica (A). Animal posicionado no local de teste em uma caixa de acrílico apoiada sobre o vidro e o feixe de luz é emitido pela caixa preta posiciona abaixo do vidro (B). O botão vermelho era acionado manualmente para que o estímulo iniciasse e também para cessá-lo após a retirada da pata do animal.

As avaliações nas patas posteriores após a lesão medular foram iniciadas quando os animais apresentaram o apoio plantar, e a partir deste momento, elas foram feitas semanalmente até a oitava semana. Caso o animal não retirasse a pata depois de 20 segundos, o feixe de luz parava de ser emitido automaticamente pare evitar ferimentos no animal.

4.10.5. Avaliação comportamental eletrofisiológica

O animal foi primeiramente colocado em uma câmara com halotano (5%) para promover uma leve sedação e permitir um correto e firme acoplamento do conector do cabo com o soquete implantado na cabeça do rato. Após este procedimento, que durava em torno de cinco minutos, o animal era colocado de volta na gaiola até se recuperar dos efeitos do halotano antes do início das sessões de registro (Nishikawa e Maciver, 2000).

Em seguida, o animal era colocado dentro de uma caixa de madeira de dimensões internas 37,5 x 37,5 x 38,5 cm (comprimento x largura x altura) revestida com MDF preto, que era posicionada dentro de uma câmara de registro isolada eletricamente (gaiola de *Faraday*, com dimensões de 52 x 87 x 66 cm; comprimento x largura x altura), e o lado livre do cabo era conectado ao equipamento de aquisição (*Multichannel Acquisition Processor – Plexon Inc.*; Figura 30).

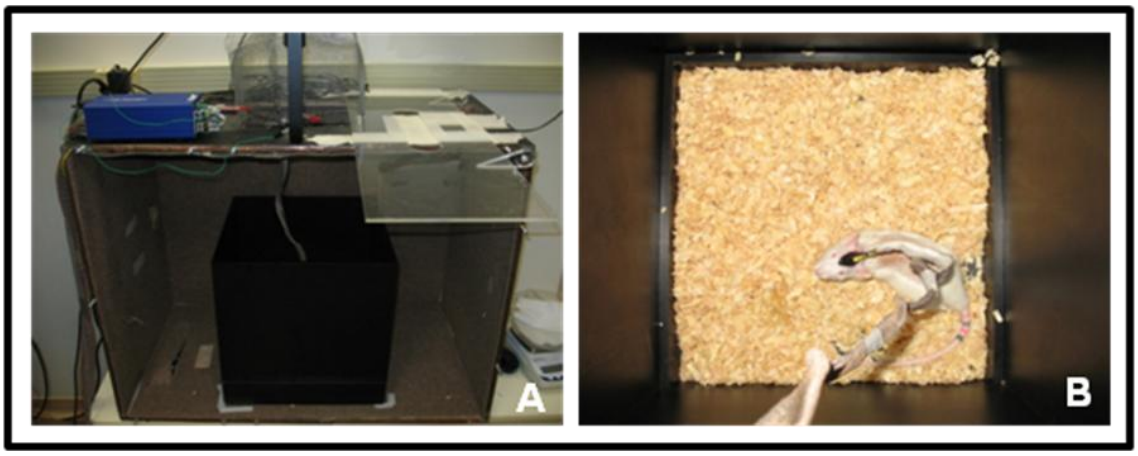

Figura 30 - Caixa preta posicionada dentro da gaiola de *Faraday*, local onde eram realizados os registros dos animais. A caixa azul, em cima da gaiola de *Faraday,* é o pré-amplificador ao qual o cabo de registro era conectado e o pré-amplificador, por sua vez, era conectado ao sistema de aquisição da *Plexon Inc.* (A). Animal com o cabo de registro conectado, dentro da caixa preta (B).

Entre o cabo de registro e o capacete do animal foi utilizado um pré-amplificador (*Plexon Headstage 0.8 Hz VLSI AC Coupled*, com impedância de entrada 22 MΩ a 1 kHz). Os sinais foram, então, amplificados e filtrados em cada canal de aquisição, sendo que continuamente foram armazenados no computador com o *software Rasputin* (*Plexon Inc.*) e a interface de aquisição *Multichannel Acquisition Processor* (*MAP®, Plexon Inc;* Figura 31). Os dados registrados foram analisados posteriormente em outro computador com o *software Matlab* e *Neuroexplorer* (*Plexon Inc.*).

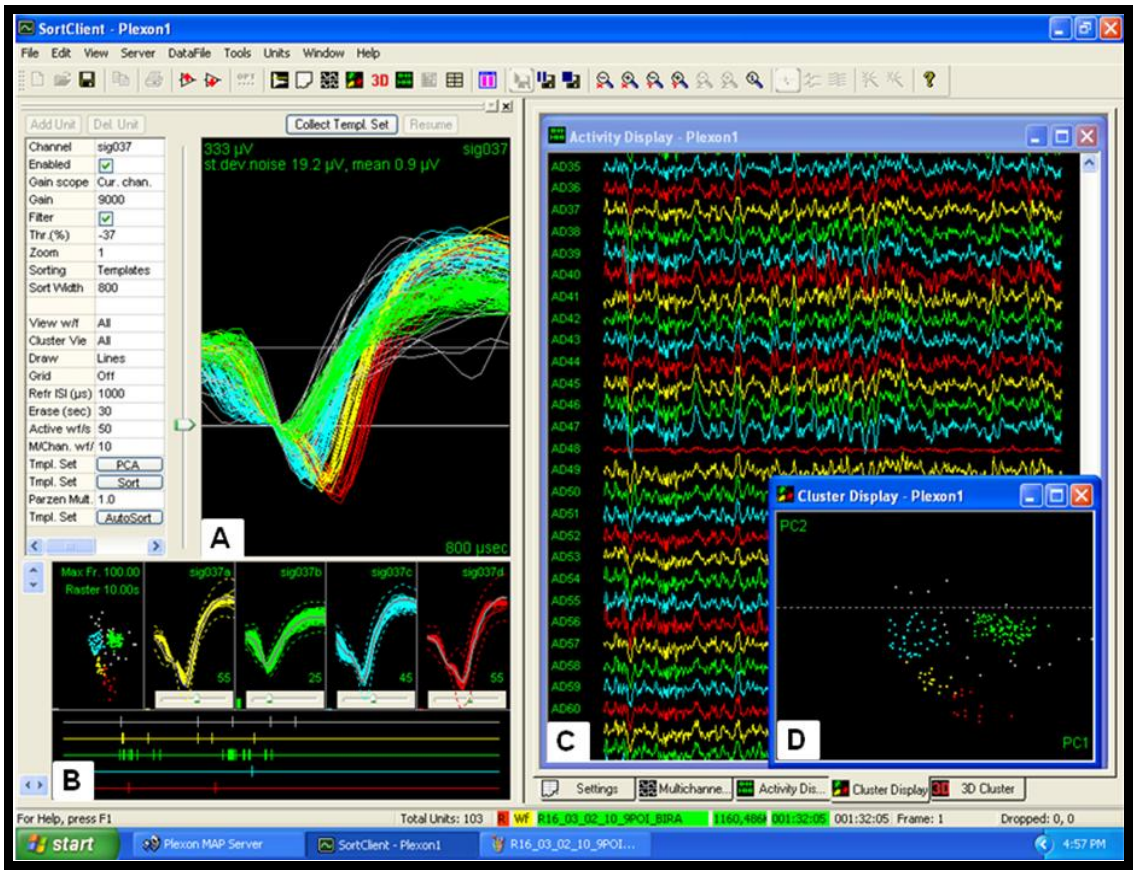

Figura 31 - Imagem do sinal eletrofisiológico de um animal treinado, no 9POI, coletado com o *software da Plexon Inc.*. Disparo individual de quatro neurônios representados por diferentes cores (amarelo, verde, azul e vermelho) registrados por um micro-elétrodo (A). As linhas coloridas na horizontal correspondem a cada neurônio selecionado, e as linhas verticais indicam os disparos ao longo do tempo (B). Registro de campo local para cada canal, sendo que o canal 48 é do eletromiograma e por isso apresenta uma amplitude diferente (C). *Clusters* formados pelos disparos de cada um dos neurônios selecionados (D).

A primeira sessão de registro iniciou-se com a discriminação da atividade celular do córtex sensório-motor após nove dias da cirurgia de implante. Nesta fase, com duração de duas horas, um grande número de sinais eletrofisiológicos de neurônios foram reconhecidos e marcados no *software* do sistema de registro. Uma vez que todos os sinais relevantes fossem identificados, o aparato era organizado para registrar tais sinais de forma contínua durante as avaliações comportamentais.

Os animais foram filmados por câmera de vídeo (Panasonic wv-BP334) conectada a sistema digital de aquisição de imagens (Ethovision XT®, Noldus Information Technology) durante toda a duração dos registros. Um *Light-Emitting Diode* (*LED*) vermelho posicionado no canto da caixa comportamental era acionado manualmente, enviando simultaneamente pulsos *Transistor-Transistor Logic* (*TTL*) para o sistema de registro eletrofisiológico, permitindo sincronizar os sinais registrados ao vídeo comportamental.

Os registros eletrofisiológicos de todos os animais foram coletados inicialmente durante o comportamento livre dentro da caixa preta por 15 minutos. Em seguida, os animais foram colocados no campo aberto, onde foi avaliado o comportamento motor e ao mesmo tempo foram registrados por sete minutos. Logo após, os animais treinados realizavam o treinamento motor, durante o qual também eram registrados por 15 minutos (Figura 32). E por fim, os animais treinados eram colocados de volta na caixa preta para serem registrados por mais 15 minutos.

Os animais controles, após a avaliação comportamental motora, eram colocados diretamente de volta na caixa preta, onde foram registrados por 15 minutos também. Em resumo, os animais controles foram

registrados por 37 minutos e os treinados por 52 minutos em todos os dias de avaliação (exceto nos 1º e 3º dPO, quando o treinamento não foi realizado, sendo registrados pela mesma duração de tempo que os animais controles).

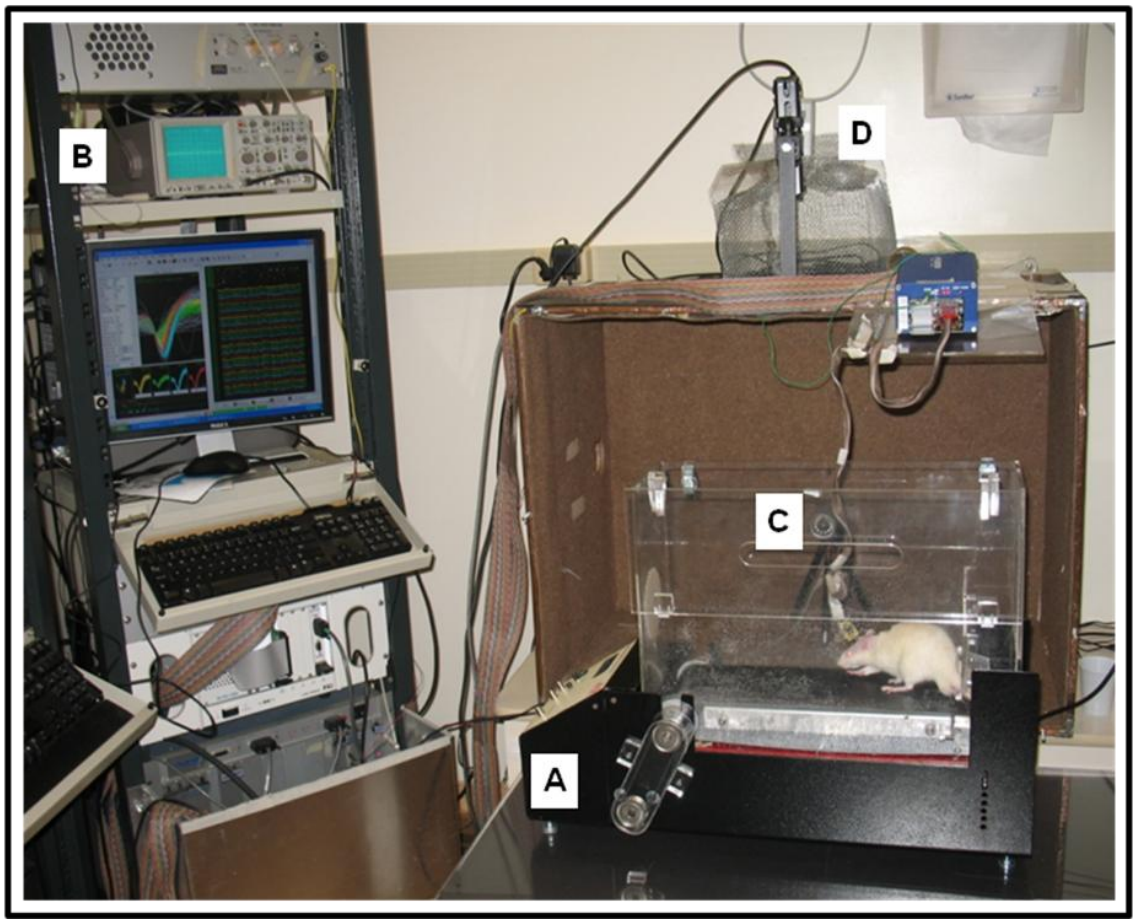

Figura 32 - Animal sendo registrado durante o treinamento na esteira, no 9POI (A). Equipamento de aquisição do sinal eletrofisiológico (B). Câmera de vídeo para filmar animal sendo treinado, posicionada dentro da gaiola de *Faraday* (C). Câmera de vídeo para filmar animal quando o registro era realizado dentro da caixa preta (D).

4.11. Perfusão

Todos os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca no 57º dia pós-operatório. Antes do procedimento os animais foram colocados em uma câmara com halotano (5%) para promover uma leve sedação, seguido de dose letal de ketamina e xilazina, ip. Além disso, foi administrado 0,05 ml de

heparina sódica (100 UI/ml, pH 6,18) ip, para prevenir a formação de coágulos. Apenas após observação de anestesia profunda por fortes pinçadas na cauda, patas e externo, sem que se observasse qualquer reação do animal, a perfusão foi iniciada. Em casos em que o animal demonstrou qualquer sensibilidade, foram aguardados aproximadamente cinco minutos e caso a resposta tivesse persistido, dose adicional de anestésico era aplicada e o procedimento repetido.

O tórax foi aberto com tesoura de pontas arredondadas e uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo. Com uma tesoura pontiaguda realizou-se leve corte no átrio direito e o animal foi então perfundido com solução tampão fosfato 0,2 M a 36 ºC em pH 7,4 (necessária para remover o sangue preservando ao máximo a estrutura dos vasos sanguíneos), seguido de solução de paraformaldeído (PFA) tamponado 4%, em pH 7,4 (100ml/100g, necessária para fixação das estruturas a serem coletadas).

Após finalização da perfusão do animal, um segmento de 2,5 cm da medula espinhal (incluindo o foco de lesão) e os encéfalos dos animais foram cuidadosamente extraídos e colocados em PFA tamponado 4% e solução tampão 0,1 M, respectivamente, por 24 horas e em seguida na sacarose 20%. O encéfalo permaneceu nesta solução até que afundasse (aproximadamente 48 horas) e em seguida foi congelado a - 80 ºC até serem realizados os cortes histológicos. A medula foi mantida na sacarose 20% até serem realizados os cortes histológicos.

4.12. Análise histológica e imunohistoquímica

A análise histológica do encéfalo foi feita para verificar o posicionamento dos micro-elétrodos e da medula espinhal para caracterizar a lesão e verificar quantidade de neurônios residuais no corno ventral após os procedimentos de lesão e reabilitação.

4.12.1. Encéfalo

Os encéfalos foram cortados no micrótomo deslizante de congelamento (*Leica* SM2000R), sendo realizados cortes transversais de 30 µm, que foram coletados em placa de cultivo de seis unidades com solução fosfato tamponada 0,1 M (*phosphate buffer, PB*). Em seguida, os cortes foram colocados em solução de montagem para serem posicionados nas lâminas histológicas gelatinizadas, obedecendo a ordem no sentido rostro-caudal. As lâminas ficaram em uma placa quente (37 ºC, por 48 horas) para fixar melhor o tecido antes de ser realizada a coloração com hematoxilina-eosina.

A hematoxilina cora intensamente os núcleos celulares em azul e a eosina cora o citoplasma e todo o tecido adjacente em vermelho (Leung e Wrathall, 2006). As lâminas foram lavadas em água corrente da torneira por cinco minutos, e em seguida, foram imersas em hematoxilina por cinco minutos para iniciar a coloração. Após este período, foi feita a imersão das lâminas no ácido acético, que aumenta a especificidade da hematoxilina em corar o núcleo. Uma nova lavagem com água corrente foi realizada por cinco minutos. Em seguida foi feita a diferenciação com a solução de álcool 75% (250 ml) e

ácido clorídrico (1,25 ml). Depois, as lâminas foram lavadas com água destilada também por cinco minutos para ser realizada a contra-coloração com a eosina por quatro minutos.

Após a contra-coloração, foi realizada a desidratação das lâminas em álcool 70%, 95%, 100% e 100%, por cinco minutos cada. Por fim, as lâminas foram colocadas no xilol I (cinco minutos) e II, sendo que permaneceu no último até a montagem. Para finalizar o procedimento foi realizada montagem com lamínulas fixadas com *Permount*® (Fisher).

4.12.2. Medula Espinhal

Todas as medulas espinhais foram emblocadas em *Tissue Tek*® *OCT™ Compound* (Sakura) para serem cortadas no criostato (*Leica* CM3050), onde foram realizados cortes transversais com 14 µm de espessura. Os cortes coletados foram distribuídos em 20 lâminas histológicas gelatinizadas de maneira que em cada lâmina houvesse cortes representativos dos segmentos rostral a lesão, da lesão propriamente dita e caudal a lesão. A cada 20 cortes coletados (cada um posicionado em uma lâmina histológica), eram descartados 30 cortes. Deste modo, cada lâmina histológica ficou com aproximadamente 36 cortes. Após coletados todos os cortes, as lâminas foram colocadas em uma placa quente (37 ºC) para melhor fixação do tecido na lâmina por 24 horas, antes de serem guardadas no freezer - 20 ºC, onde permaneceram até serem coradas.

A segunda lâmina de cada animal foi escolhida para realizar a imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal de camundongo dirigido contra

a proteína *Neuronal Nuclei* (*NeuN;* Chemicon, Temecula, CA, EUA), em uma concentração de 1:1000. *NeuN* é expressado quase que exclusivamente no sistema nervoso, aparecendo precocemente durante o desenvolvimento e persiste até a fase adulta. A expressão do *NeuN* está confinada a tipos específicos de células neuronais, sendo que as células gliais presentes na medula espinhal são negativas a imunoreatividade deste anticorpo. O *NeuN* marca principalmente o núcleo neuronal, embora o citoplasma também seja imunoreativo em uma menor proporção. A maior parte marcada do citoplasma corresponde ao corpo do neurônio, mas pode haver uma pequena expansão para os processos (principalmente para os dendritos; Mullen *et al.*, 1992).

As lâminas histológicas, retiradas do freezer - 20ºC, foram colocadas na placa quente por uma hora antes de serem iniciados os procedimentos da imunohistoquímica. Primeiramente foram realizadas duas lavagens das lâminas histológicas, de 10 minutos cada, com *PB* 0,1 M. Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo primário monoclonal dirigido contra a proteína *NeuN*. Este anticorpo foi diluído em *PB,* contendo 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de cabra (*normal goat serum, NGS*). A incubação foi conduzida por 48 horas à temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas três vezes de 10 minutos cada com *PB* e depois incubadas com o anticorpo secundário biotinilado anti-camumdongo feito em burro para o anti-*NeuN* diluído a 1:200 em *PB*, contendo 0,3% de Triton X-100, por duas horas à temperatura ambiente.

As lâminas foram então lavadas novamente em *PB* (três vezes de 10 minutos cada) e incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, *Elite Kit, Vector Labs*) diluído em *PB* contendo 0,3% de Triton X-100

ABC, por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, após três lavagens em *PB* de 10 minutos, foi feita a reação com 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) e uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03% em *PB*. Nesta etapa da imunohistoquímica, as lâminas foram colocadas nesta solução por cinco minutos e em seguida a reação era "cortada" pelo *PB* e a marcação era verificada em um microscópio. Caso a marcação não estivesse evidente, as lâminas eram novamente colocadas na solução de DAB. Esse procedimento foi repetido até atingir uma boa marcação do anticorpo.

Atingida a marcação, mais seis lavagens em *PB* (de cinco minutos cada) foram realizadas e as lâminas foram colocadas por cinco minutos na água destilada para retirar os resíduos restantes. Depois foi feita a intensificação e fixação da coloração no tetróxido de ósmio 0,05% diluído em água, por 40 segundos. Novamente as lâminas foram colocadas na água destilada por cinco minutos antes de iniciar a desidratação à temperatura ambiente. Os procedimentos de desidratação foram cinco minutos em cada concentração de álcool: 70%, 90%, 100% e 100%. Em seguida, as lâminas foram colocadas em duas cubas de xilol por 10 minutos cada. E por fim, foi feita a montagem com lamínulas, utilizando *Permount*® (Fisher).

Após todo o procedimento de imunohistoquímica, dois tipos de análises foram realizadas: morfometria da medula espinhal e contagem dos neurônios presentes no corno ventral da medula espinhal. A morfometria foi feita em sete cortes de cada animal, representativos de toda a extensão da medula espinhal, seguindo a metodologia utilizada por Magnunson e colaboradores (2005). O primeiro corte definido, corte central (0 cm), foi considerado aquele em que estivesse o epicentro da lesão, ou seja, o corte

com maior área de tecido lesado. Em seguida, três cortes rostrais e três caudais ao epicentro, com o mesmo espaçamento (1,2 cm; 0,8 cm; 0,4 cm; e -0,4 cm; -0,8 cm; -1,2 cm, respectivamente), foram selecionados para a análise morfométrica.

Imagens destes sete cortes foram capturadas com uma câmera digital *AxioCam MRc5* acoplada ao microscópio *AxioScope.A1* (*Carl Zeiss*), utilizando um aumento de 2,5x, com o objetivo de capturar toda a área da medula espinhal. As bordas externas das substâncias branca e cinzenta residuais e de toda a medula espinhal foram traçadas manualmente, e utilizando o *software Axio Vision 4.8,* as áreas puderam ser determinadas em μm^2. A precisão dos traçados foi conferida visualizando as imagens em maior aumento. A área de lesão foi calculada a partir da subtração da área total da medula espinhal pelas áreas de subtâncias branca e cinzenta residuais.

A contagem dos neurônios foi realizada em 15 cortes da medula espinhal, sendo que foram selecionados cinco cortes para cada segmento: rostral a lesão, no foco de lesão e caudal a lesão. Os neurônios contados estavam presentes no corno ventral da medula espinhal, sendo esta região definida como a região da medula espinhal ventral a uma linha transversal que passa imediatamente abaixo do canal central (metodologia adaptada de Grossman *et al.*, 2001; Figura 33). Somente os neurônios com diâmetro igual ou maior do que 15 µm foram considerados para contagem (Chopek e Gardiner, 2010).

Para esta análise foram capturadas imagens também com a câmera digital *AxioCam MRc5* acoplada ao microscópio *AxioScope.A1* (*Carl Zeiss*), mas com aumento de 5x, de forma que os cornos ventrais direito e

esquerdo aparecessem em uma mesma imagem. A contagem foi feita utilizando o *software Axio Vision 4.8*, no qual foi possível determinar uma automatização para definir a estrutura neuronal a partir de seus pixels e diâmetros. Devido às variações individuais de intensidade de coloração entre os animais, para cada animal foi desenvolvido uma rotina automática, e para todos os cortes do mesmo animal foi rodado o mesmo programa sem alterações para manter o mesmo padrão de contagem.

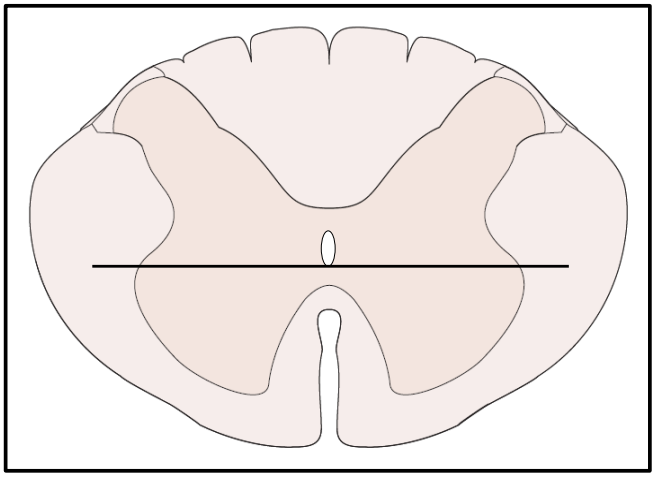

Figura 33 - Desenho esquemático da medula espinhal com a área do corno ventral delimitada por uma linha transversal logo abaixo do canal central. Essa área foi selecionada para a contagem dos neurônios.

4.13. Análise dos dados

Os dados resultantes das avaliações comportamentais foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas com o pós-teste de Tukey para investigar significância entre o treinamento e a recuperação funcional (motora e sensorial) e alterações histológicas. Quando utilizados diferentes testes estatísticos, eles foram mencionados nos resultados. As variáveis independentes consideradas para todas as avaliações

comportamentais foram tempo (dias pós-operatórios) e grupos (treinado, controle e sham), sendo considerado como nível de significância $p < 0,05$. Nos resultados serão apresentadas as médias e erros padrão dos dados analisados. Os testes utilizados na análise estatística foram realizados com auxílio do programa *Statistical Package for Social Sciences* 15.0 (*SPSS*) e *Matrix Laboratory* 7.6 (*MATLAB*).

4.13.1. Análise do registro eletrofisiológico

Os dados dos potenciais de campo local (*LFP*) escolhidos para as análises corresponderam a trechos dos animais andando no campo aberto e na esteira. Para isso foram assistidos os vídeos da avaliação motora no campo aberto e do treinamento na esteira e foram coletados de três a seis trechos (com duração de três a dez segundos) somente dos animais andando, para todos os dias de avaliação. Após a seleção destes trechos, os dados foram extraídos do sistema de registro da *Plexon Inc.* e convertidos em arquivos com extensão binária – formato compacto para armazenamento e compatível com o *software MATLAB* 7.6.

Neste *software* foi desenvolvida uma rotina (Anexo C) para estimativa dos espectros de potência do sinal eletrofisiológico selecionado, com base no periodograma de Welch (Welch, 1967). É importante ressaltar que estas estimativas foram realizadas sem nenhum procedimento de filtragem do sinal. Porém, os 31 canais de registro da atividade cortical sensório-motora foram analisados para verificar a qualidade dos mesmos.

Para esta etapa foi desenvolvida uma nova rotina (Anexo D) com quatro critérios de reprovação de canais com “baixa qualidade” de sinal. Um critério foi feito com base no *LFP* de cada canal e os outros três com base nos respectivos espectros de potências. O *LFP* é composto por diferentes frequências e o espectro corresponde à decomposição dessas frequências, indicando o quanto cada uma delas contribui para o sinal (*LFP*) em forma de potência. Três bandas de frequências foram consideradas nesta análise: *delta* (0,5 - 4 Hz), *theta* (4 - 10 Hz) e *beta* (10 - 25 Hz).

Para a elaboração da rotina, os dados completos (de todos os dias de avaliação) dos *LFP* e dos espectros de seis animais (dois de cada grupo) foram observados cuidadosamente, de forma que padrões de qualidade pudessem ser estabelecidos. A partir desta observação, os critérios de reprovação dos canais foram:

a) A amplitude do sinal foi definida como inferior / superior a 1 mV / -1 mV, sendo reprovados todos os canais que tivessem amplitude maior ou menor do que a determinada (Figura 34A);

b) A potência do pico da banda *theta* foi definida como maior ou igual a 20 mV^2, sendo reprovados todos os canais em que a potência do pico da banda *theta* fosse menor do que a determinada (Figura 34B);

c) Determinadas as potências dos picos das bandas *delta*, *theta* e *beta*, era necessário que a potência do pico da banda delta e/ou da beta correspondesse a no máximo 65% da potência do pico da banda *theta*, sendo reprovados todos os canais que tivessem a potência do pico de *delta* e/ou *beta* maior do que 65% da potência do pico de *theta* (Figura 34C e 34D);

d) Determinado o último valor da potência da banda *delta* e o primeiro da banda *theta*, era necessário que o valor da potência *delta* fosse maior ao de *theta*, sendo reprovados todos os canais em que o valor da potência de *delta* fosse menor ou igual o da potência *theta* (Figura 34E).

A avaliação dos canais foi feita para cada dia de registro eletrofisiológico e para cada trecho dos dias. A figura 34F mostra como exemplo um canal aprovado de acordo com a rotina elaborada para seleção dos canais. Este possui todas as características dentro dos padrões estabelecidos como de "boa qualidade". Após a seleção padronizada dos canais e os respectivos cálculos dos espectros de potência, uma matriz com os canais aprovados para cada trecho e de cada dia foi gerada para cada animal.

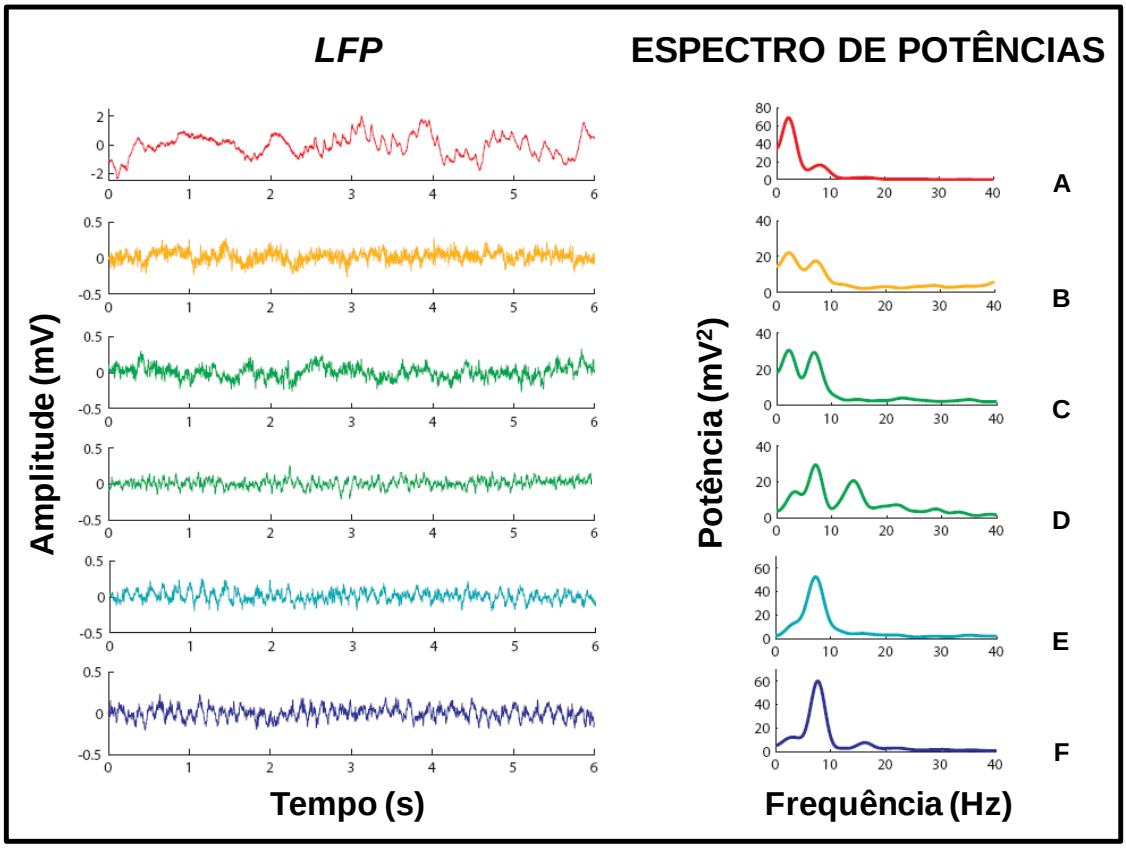

Figura 34 - Representação dos canais que foram reprovados de acordo com os critérios da rotina de seleção de canais (A, B, C, D, E). Canal aprovado pela mesma rotina (F). Note que as escalas do eixo "y" diferem para ressaltar as diferenças encontradas em cada critério.

Outra rotina (Anexo E) foi elaborada para avaliar o sinal eletrofisiológico a partir das matrizes com os canais aprovados. Nesta rotina, os sinais foram submetidos a um procedimento que determinou energia média das bandas de frequências *delta*, *theta* e *beta* para cada trecho. A energia representa toda a área abaixo da linha da curva do espectro correspondente a cada banda de frequência, como demonstrado na figura 35. A energia média é definida pela correção dessa área com o tamanho da respectiva banda.

Em seguida, este procedimento foi repetido para cada dia de avaliação. Deste modo, obteve-se a energia média de cada banda de frequência, em cada dia de avaliação para cada animal tanto dos dados do campo aberto, como para os dados do treinamento na esteira. E, por fim, foi feita a média destes resultados para cada grupo experimental. A figura 36 resume todas as etapas realizadas para análise do registro eletrofisiológico.

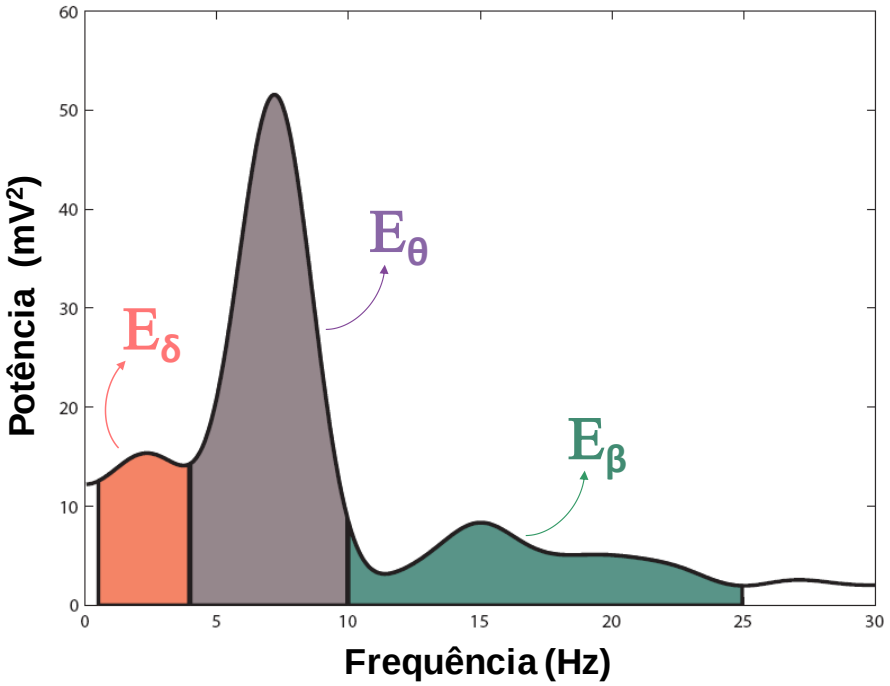

Figura 35 - Imagem ilustrativa de um espectro de potência com a representação das energias das bandas *delta* (E_δ), *theta* (E_θ) e *beta* (E_β). Note que a potência para cada uma das frequências difere de forma importante, sendo a da *theta* maior.

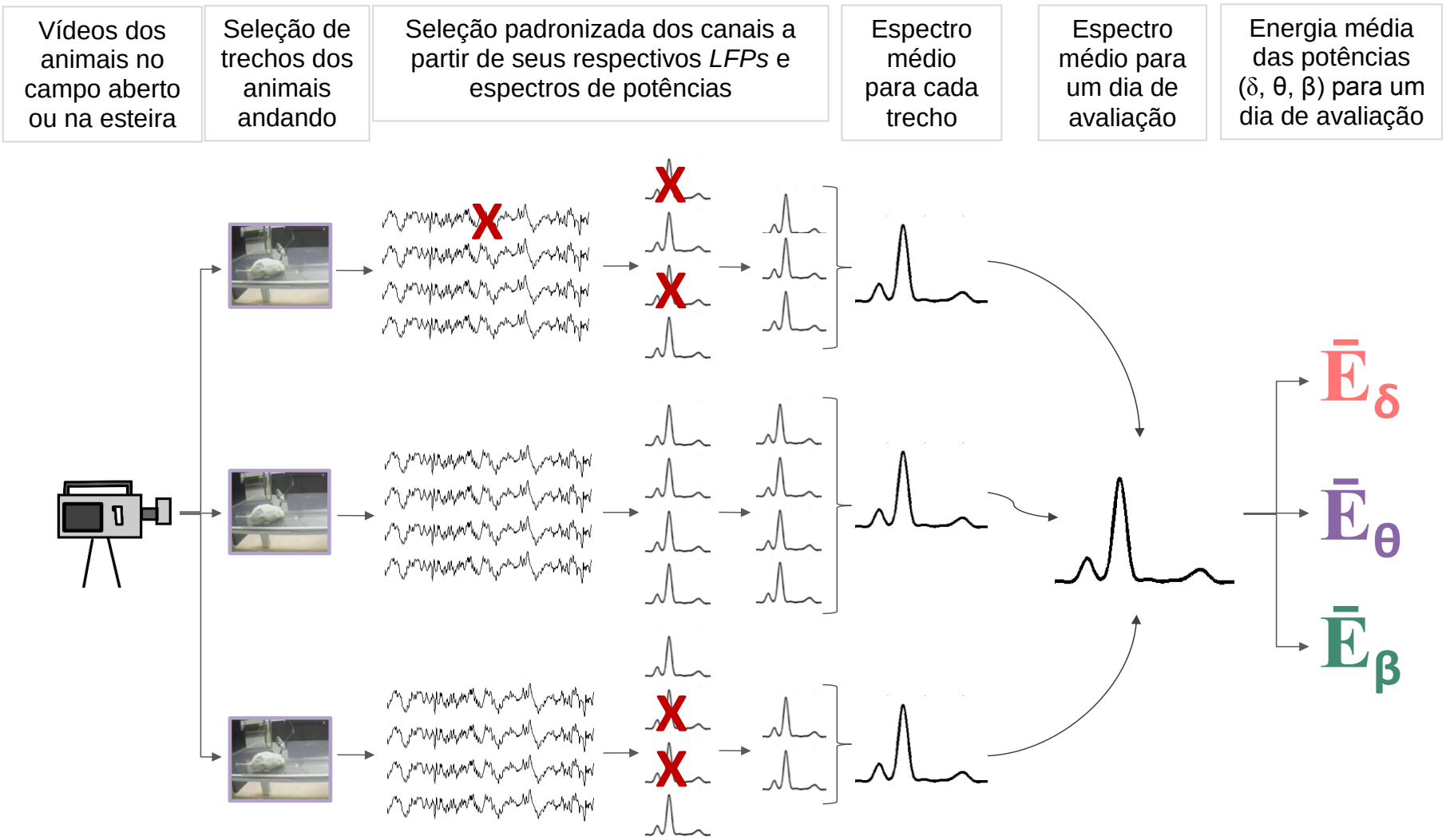

Figura 36 - Desenho esquemático da sequência das etapas realizadas para a análise dos registros eletrofisiológicos coletados durante a avaliação locomotora realizada no campo aberto e o treinamento realizado na esteira. Estes procedimentos foram realizados para todos os dias de avaliações para todos os animais. Energias médias: *delta* ($\bar{E}_\delta$), *theta* ($\bar{E}_\theta$) e *beta* ($\bar{E}_\beta$).

5. RESULTADOS

Neste trabalho foi utilizado o modelo animal de lesão medular por contusão, uma vez que é clinicamente relevante e permite a avaliação da recuperação locomotora pós-lesão. A padronização deste modelo de lesão por meio do equipamento *NYU-Impactor* está bem descrita na literatura, sendo encontradas pequenas variações de lesão entre os animais. Todos os animais lesionados neste estudo apresentaram uma paraplegia moderada e foram sacrificados no 57º dPO.

Durante todo experimento foi feito o controle de peso dos animais e foi possível notar que no 3º dia após o procedimento cirúrgico de implante da matriz de micro-elétrodos (3POI), o peso dos animais se manteve muito próximo ao da avaliação basal (AB), portanto a cirurgia de implante de matriz de micro-elétrodos não interferiu na ingestão de alimento e água (**AB:** 334,7 g ± 9,2; **3POI:** 338,4 g ± 8,9). Do 3POI até o 9POI houve redução do peso não significativa dos animais (**9POI:** 326,8 g ± 9,7). Portanto, não houve diferença significativa de peso entre AB, 3POI e 9POI ($F_{2,14} = 0,29$, $p = 0,87$).

Após a lesão medular, os animais perderam peso significativamente quando comparados com os animais do grupo sham ($F_{2,14} = 3,79$, $p = 0,05$), sendo que a redução aconteceu até a segunda semana e depois começou a haver o ganho de peso novamente. Os grupos treinado (TR) e controle (CTL) se comportaram de forma semelhante em relação ao peso ao longo do tempo, portanto pode-se dizer que o treinamento não interferiu nesta variável (Gráfico 1). Apesar do grupo sham ter atingido um peso maior ao final

do experimento ($F_{2,13}$ = 9,62, p = 0,04), o ganho a partir do 14º até o 56º dPO (R^2 = 0,902) foi muito próximo daquele recuperado pelos grupos lesados neste período (**TR:** R^2 = 0,974 e **CTL:** R^2 = 0,945).

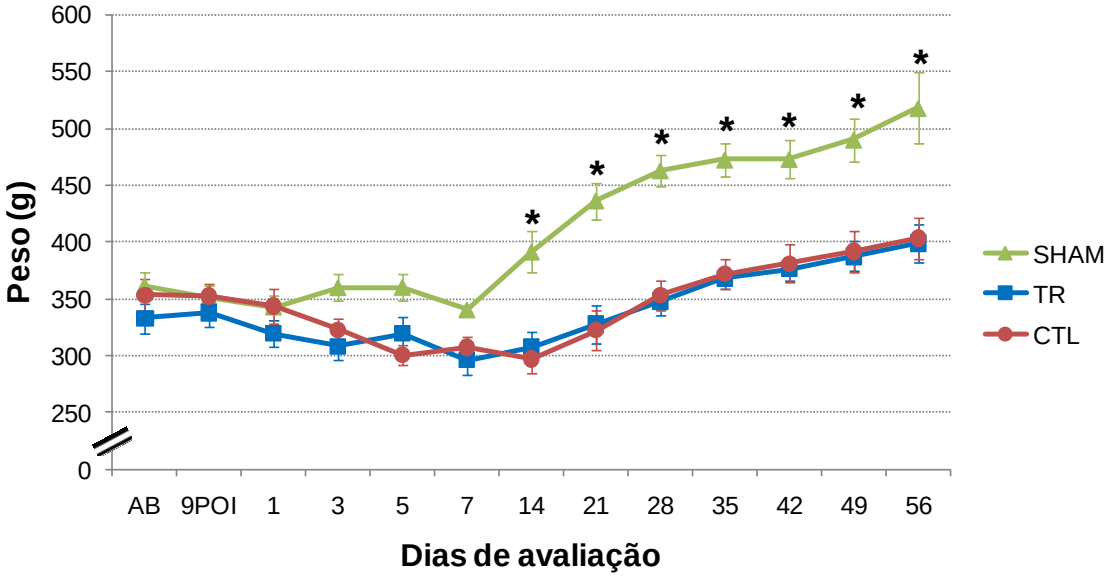

Gráfico 1 - Controle de peso dos animais ao longo do experimento. Nas duas primeiras avaliações o peso é mantido e logo após a lesão medular, no 1º dPO, os animais dos grupos controle e treinado começam a perder peso. O peso começa a ser recuperado a partir do 14º dPO, não havendo diferença entre os grupos lesados. No entanto, o grupo sham, apresentou peso significativamente maior a partir do 14º dPO, que se manteve até o 56º dPO (*p = 0,04).

A lesão medular no nível torácico acarreta perda temporária do reflexo de urinar, sendo necessário realizar a manobra de esvaziamento vesical manual nos primeiros dias após a lesão. A fim de tentar prevenir ou diminuir a infecção urinária foi feito tratamento com antibiótico por quatro dias, incluindo o dia em que o animal foi lesado. No entanto, dois animais do grupo treinado apresentaram infecção persistente (avaliação pela cor da urina), sendo o tratamento com antibiótico estendido por mais um dia.

O esvaziamento vesical foi feito em média duas vezes ao dia para ambos os grupos, por cinco dias nos animais treinados e por três dias nos controles, incluindo o dia de lesão. Os animais treinados apresentaram uma cor

de urina mais escura quando comparados com os controles. Vale ressaltar que apesar dos animais treinados terem apresentado um pior quadro de infecção urinária, o treinamento não influenciou neste parâmetro, uma vez que ele foi iniciado somente no 5º dPO, e a infecção persistiu até o 4º dPO.

5.1. Avaliação comportamental motora: escala BBB

Os dados da escala BBB foram analisados como descrito por Sheff e colaboradores (2002). As avaliações realizadas foram entre grupos em função do tempo e da escala BBB.

A evolução da recuperação locomotora ao longo do tempo foi diferente entre os grupos. De maneira geral, é possível observar no gráfico 2 que o grupo sham apresentou a pontuação máxima da escala BBB desde o 1º dPO; não houve diferença entre os grupos lesados no 1º dPO, mostrando a consistência do modelo de contusão; o grupo treinado atingiu uma pontuação maior do que o controle, sendo que a diferença mostrou-se estatisticamente significativa a partir do 28º dPO e permaneceu até o final do experimento ($F_{10,24} = 2,74$, $p = 0,0028$).

Os animais lesados ficaram com pontuação igual a zero no 1º dPO, ou seja, não havia movimento observável dos membros posteriores, que apresentaram flacidez. A cauda ficou abaixada, o abdômen ficou em contato com a superfície (arrastado) e os membros posteriores adotaram um padrão de apoio dorsal (Figura 37A). Nos dias seguintes, movimentos suaves das articulações dos membros posteriores puderam ser notados, mas o apoio dorsal das patas permaneceu. Deste modo, o dispositivo auxiliar precisou ser

utilizado nas primeiras sessões de treinamento na esteira, uma vez que ele foi iniciado no 5º dPO. Esse dispositivo permitiu a realização de um movimento rítmico e coordenado dos membros posteriores de forma passiva.

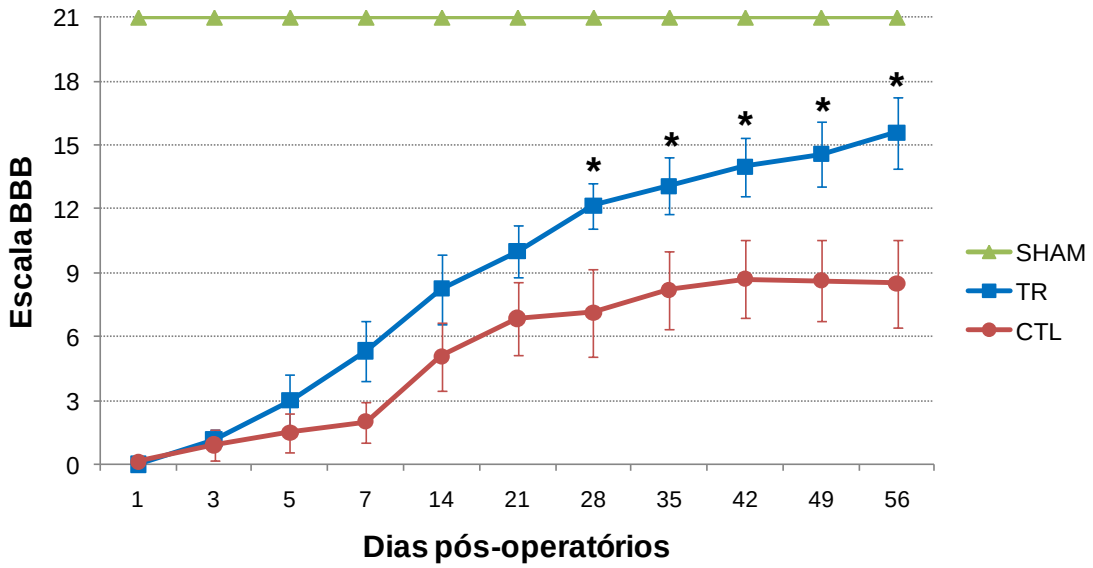

Gráfico 2 - Recuperação motora dos diferentes grupos ao longo do tempo de acordo com a escala BBB. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos treinado e controle começa a aparecer a partir do 28º dPO e se mantém até o final do experimento (*p = 0,0028).

Os treinamentos foram realizados cinco vezes por semana, por 15 minutos até o 56º dPO, sendo que ao final do experimento, todos os animais completaram 38 sessões. Assim que o animal começava a adquirir movimentos mais extensos dos MMPP ou apoio plantar mesmo sem descarga de peso (Figura 37B), o dispositivo não era mais usado, sendo retirado do treinamento em média no 10º dPO. Depois disso foi dado auxílio manual através do movimento das patas posteriores ou segurando a cauda do animal até que ele conseguisse desempenhar a tarefa de maneira independente. A velocidade da esteira variou de 4,5 a 8,5 m/min no período pós-operatório, de acordo com o controle motor apresentado pelo animal.

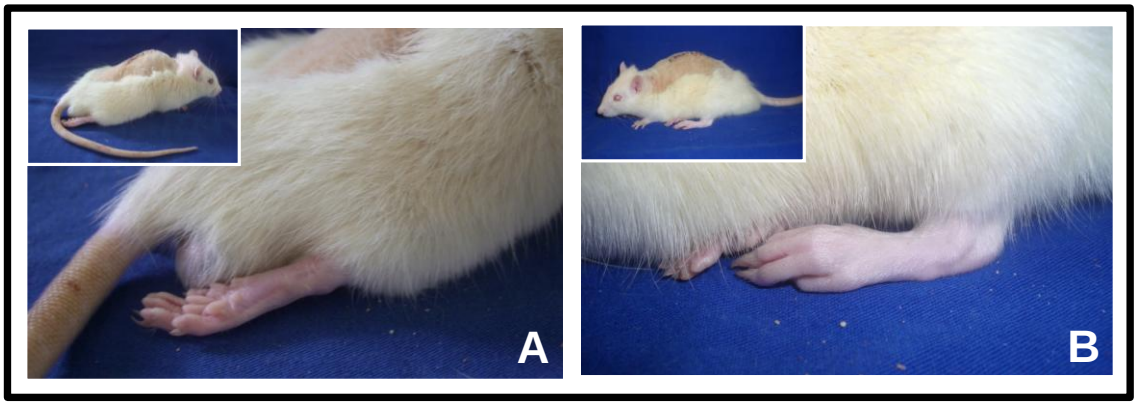

Figura 37 - Animal controle no 1º dPO de lesão medular por contusão, com as seguintes características: cauda baixa, abdômen arrastado e membros posteriores em posição dorsal (A). Animal controle no 35º dPO, com apoio plantar da pata com descarga de peso quando o membro está apoiado na superfície (B).

Apesar de o grupo treinado ter alcançado uma pontuação maior, o grupo controle também apresentou uma melhora motora. Até o 7º dPO essa melhora foi discreta, sendo que os animais apresentaram movimento suave de uma ou duas articulações, normalmente do quadril e/ou joelho (pontuação dois da escala BBB). Entre os 7º e 21º dPOs ocorreu a maior recuperação do comportamento motor desses animais. No entanto, a partir do 35º dPO houve uma estabilização da recuperação (R^2 = 0,21), enquanto os animais treinados continuaram a melhorar (R^2 = 0,991). A pontuação final atingida pelos controles foi entre oito e nove, que corresponde à posição plantar da pata com descarga de peso somente quando o membro está apoiado (sem movimento) ou descarga de peso ocasional, frequente ou consistente na passada dorsal e sem passada plantar (Vídeo 1, Anexo F). Essa pontuação final dos controles foi atingida no 14º dPO pelo grupo que treinou na esteira.

Os animais treinados apresentaram uma evolução do comportamento motor mais linear ao longo do tempo, isto é, a recuperação foi progressiva sem períodos de estabilização, sendo possível identificar um efeito

significativo de treinamento ($F_{5,11}$ = 20,34, p = 0,0034). Assim como o grupo controle, até a primeira semana o ganho motor foi pequeno, sendo que os animais apresentavam suave movimento de duas articulações e extenso de uma terceira (pontuação cinco da escala BBB). No entanto, a pontuação atingida por este grupo ao final do experimento foi significativamente maior, entre 15 e 16, que significa uma passada plantar e coordenação entre membros anteriores e posteriores (MMAA - MMPP) consistente durante o andar; consistente liberação dos dedos das patas posteriores; e posição predominante das patas paralela ao corpo no contato inicial com a superfície e rodada ao levantar (Vídeo 1, Anexo F).

Deste modo, o treinamento na esteira promoveu um maior controle motor nos animais treinados, permitindo que eles realizassem uma marcha mais funcional. Isso pôde ser notado, claramente, no desempenho dos animais durante os treinamentos com o decorrer do tempo. A cada avaliação, menos suporte era dado aos animais para que o treinamento fosse efetivo. No final do experimento, o grupo treinado foi capaz de andar independentemente na esteira (Vídeo 2, Anexo F).

5.2. Avaliação comportamental sensório-motora: escada horizontal

A escada horizontal avalia a função proprioceptiva dos animais, isto é, a interação entre os componentes motores e sensoriais. Três tipos de respostas foram consideradas para verificar o desempenho dos diferentes grupos no decorrer do tempo (Vídeo 3, Anexo F), sendo elas: *acerto*, quando o animal posicionava a pata corretamente no filete de ferro da escada (Figura

38A); *erro*, quando o animal arrastava os membros posteriores pela escada (Figura 38B) ou posicionava a pata diretamente no buraco (Figura 38C); e *escorregada*, quando o animal posicionava a pata no filete de ferro e em seguida ela escorregava para o buraco entre os filetes (Figura 38D). A escorregada, apesar de não ser a resposta esperada, significa que o animal está recuperando a sua capacidade de posicionar o membro corretamente. Deste modo, esta resposta foi considerada como intermediária entre o acerto e o erro.

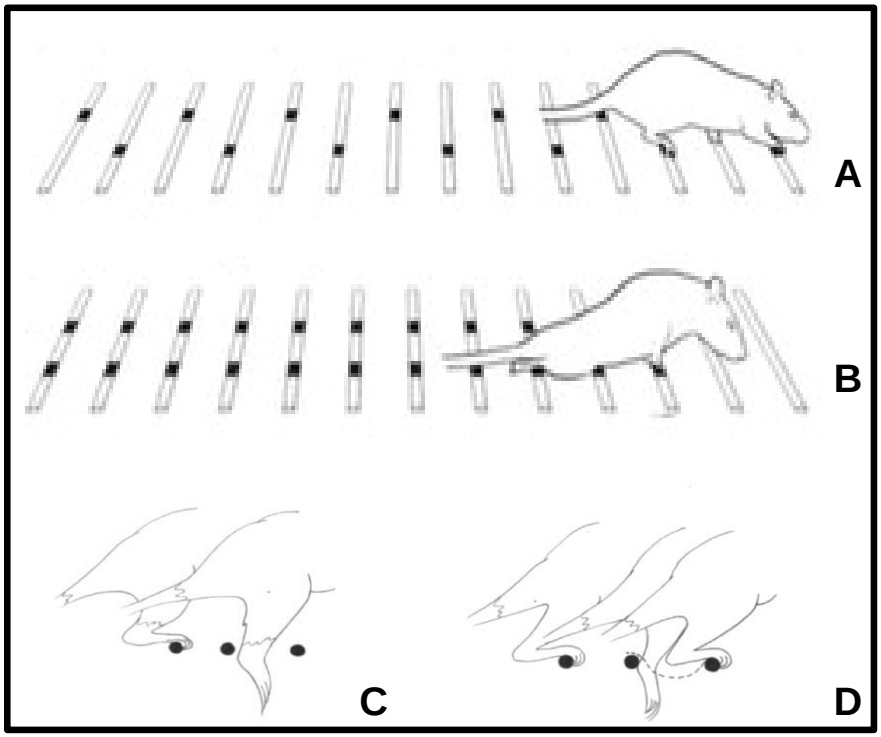

Figura 38 - Desenho esquemático das diferentes respostas do animal durante a avaliação na escada horizontal. Animal sem lesão consegue alternar os passos nos filetes de ferro, posicionando a pata corretamente (A). Logo após a lesão, os animais arrastam os membros posteriores e abdômen, atravessando a escada somente com os movimentos de membros anteriores (B). Após uma melhora motora, os animais conseguem atravessar a escada, porém com muitos erros, posicionando as patas entre os filetes de ferro (C). O posicionamento da pata no filete de ferro e depois sua queda entre os filetes foi chamado de escorregada (D). Fonte: modificado de Šedý *et al.* (2008) e Ghosh *et al.* (2010).

O gráfico 3 mostra que os animais antes da lesão apresentaram, aproximadamente, 99% de acertos e 1% de escorregadas.

Também foi possível observar que o grupo sham manteve este resultado durante todo o período de experimento, sem erro algum (Tabelas 1, 2, 3). Mesmo no 1º dPO da cirurgia sham não houve diferença do desempenho destes animais ao atravessar a escada horizontal.

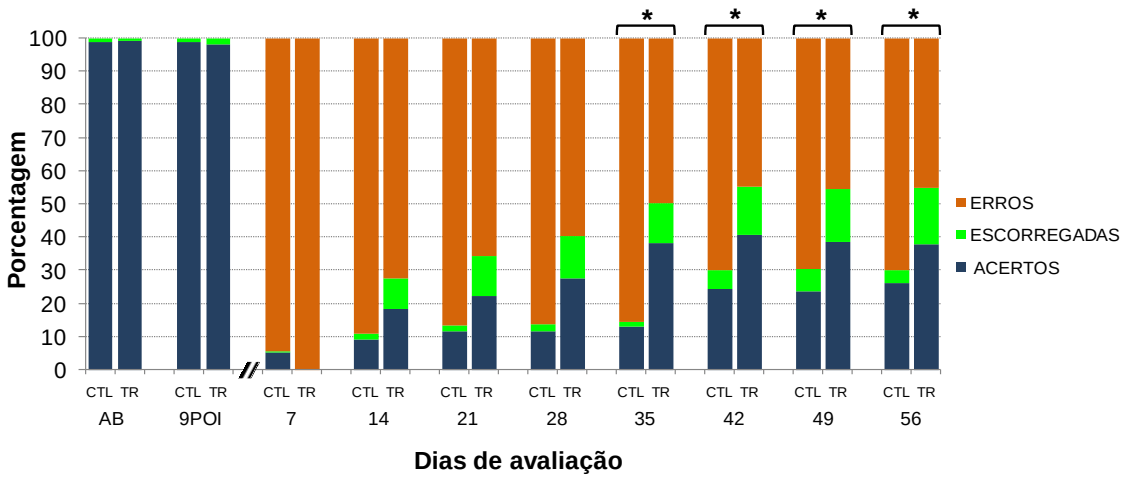

Gráfico 3 - Porcentagem de acertos, escorregadas e erros dos grupos controle e treinado ao atravessar a escada horizontal. As avaliações do 1º, 3º e 5º dPOs não estão representadas neste gráfico (representação no eixo "x" por //). Antes da lesão medular, os animais apresentam cerca de 99% de acertos. A partir do 7º dPO, os animais controles começam a apresentar algumas respostas corretas. Ao longo dos dias os animais treinados apresentam melhora do seu desempenho, realizando mais escorregadas e posicionamentos corretos do que os animais controles. Isso se torna significativo no 35º dPO e permanece até o final do experimento desta maneira (*p = 0,009).

O posicionamento correto no filete requer um controle motor substancial, que logo após a cirurgia de LM é perdido (Figura 38B, Tabelas 1 e 3). No entanto, com o treinamento na esteira que exige passos rítmicos e coordenados, os animais treinados começaram a apresentar uma melhora da propriocepção mais precoce, apresentando maior quantidade de escorregadas e acertos já no 14º dPO quando comparados com os controles. O desempenho do grupo treinado se torna significativamente melhor do que o do grupo controle a partir do dia 35º dPO e se mantém até o final do experimento ($F_{6,30}$ = 3,54, p = 0,009).

Tabela 1 - Média e erro padrão da resposta de acertos em porcentagem dos grupos sham, treinado e controle para os diferentes dias de avaliação na escada horizontal

ACERTOS						
DIAS/ GRUPOS	SHAM		TREINADO		CONTROLE	
	Média (%)	Erro Padrão	Média (%)	Erro Padrão	Média (%)	Erro Padrão
AB	98,67	1,15	99,12	0,40	98,67	0,56
9POI	99,40	0,52	98,17	0,70	98,85	0,55
1	98,72	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00
3	99,33	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
5	98,26	0,81	0,00	0,00	0,00	0,00
7	98,78	0,53	0,00	0,00	4,98	4,98
14	100,00	0,00	18,14	9,66	9,13	9,13
21	99,40	0,52	22,32	12,00	11,61	11,61
28	100,00	0,00	27,58	14,88	11,56	11,56
35	98,72	1,11	37,96	13,88	13,00	13,00
42	97,55	1,30	40,59	12,90	24,33	15,41
49	98,85	1,00	38,55	11,50	23,72	14,21
56	100,00	0,00	37,62	13,16	25,99	16,32

Tabela 2 - Média e erro padrão da resposta de escorregadas em porcentagem dos grupos sham, treinado e controle para os diferentes dias de avaliação na escada horizontal

ESCORREGADAS						
DIAS/ GRUPOS	SHAM		TREINADO		CONTROLE	
	Média (%)	Erro Padrão	Média (%)	Erro Padrão	Média (%)	Erro Padrão
AB	1,33	1,15	0,88	0,40	1,33	0,56
9POI	0,60	0,52	1,83	0,70	1,15	0,55
1	1,28	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,67	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,74	0,81	0,00	0,00	0,00	0,00
7	1,22	0,53	0,00	0,00	0,38	0,38
14	0,00	0,00	9,19	4,82	1,79	1,79
21	0,60	0,52	11,96	4,07	1,61	1,61
28	0,00	0,00	12,52	4,85	2,21	2,21
35	1,28	1,11	12,38	3,17	1,28	1,28
42	2,45	1,30	14,62	3,09	5,54	3,36
49	1,15	1,00	16,00	3,70	6,71	3,27
56	0,00	0,00	17,25	4,72	3,95	2,25

Apesar de o grupo treinado ter apresentado melhora motora progressiva na escala BBB, o mesmo não aconteceu para a escada horizontal. A partir do 42º dPO não houve diminuição da quantidade de erros cometidos pelo grupo treinado ($F_{3,14} = 1,19$, $p = 0,34$; Tabela 3).

Tabela 3 - Média e erro padrão da resposta de erros em porcentagem dos grupos sham, treinado e controle para os diferentes dias de avaliação na escada horizontal

ERROS						
DIAS/ GRUPOS	**SHAM**		**TREINADO**		**CONTROLE**	
	Média (%)	**Erro Padrão**	**Média (%)**	**Erro Padrão**	**Média (%)**	**Erro Padrão**
AB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9POI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
3	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
5	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
7	0,00	0,00	100,00	0,00	94,64	31,55
14	0,00	0,00	72,66	13,39	89,09	29,70
21	0,00	0,00	65,72	15,55	86,79	32,80
28	0,00	0,00	59,89	16,56	86,22	32,59
35	0,00	0,00	49,66	15,32	85,71	32,40
42	0,00	0,00	44,79	14,72	70,13	26,51
49	0,00	0,00	45,45	13,68	69,57	26,29
56	0,00	0,00	45,13	14,80	70,05	26,48

5.3. Avaliação comportamental de dor neuropática - alodínea e hiperalgesia mecânica: *von Frey Hair Test*

Três monofilamentos foram utilizados no *von Frey Hair Test* para avaliar dor neuropática abaixo do nível de lesão (nos membros posteriores), sendo eles: 4,93 para alodínea, 5,18 para hiperalgesia mecânica leve e 5,88 para hiperalgesia mecânica intensa. O *von Frey Hair Test* foi realizado em todos os dias pós-operatórios de avaliação, no entanto, logo após

a lesão os animais apresentaram paralisia flácida e, portanto, não responderam aos estímulos feitos com os monofilamentos. Deste modo, as respostas aos estímulos tátil e mecânicos foram consideradas a partir do dia em que os animais apresentavam pontuação da escala BBB acima de oito. Quando o animal apresenta esta pontuação, ele possui movimentos extensos das articulações de quadril, joelho e tornozelo, sendo capaz de realizar o movimento de retirada da pata quando aplicados os estímulos com os monofilamentos.

O dia em que houve pelo menos cinco animais que respondessem ao *von Frey Hair Test* para o grupo treinado foi o 28º dPO e para o grupo controle foi o 42º dPO. Na análise estatística foi feita a comparação entre a média dos valores obtidos (em porcentagem) nas avaliações antes da lesão medular (AB, 3POI e 9POI) e a média dos valores obtidos nas três últimas avaliações após a lesão medular (42º, 49º e 56º dPOs), pois foi quando se teve um número de animais suficiente para análise estatística para todos os grupos (TR e CTL com n = 5 cada, sham com n = 4). A hipótese de normalidade desses dados foi rejeitada, sendo utilizado para análise o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Além da análise intra-grupo (antes e após a LM) foi feita a análise entre grupos para os valores antes da lesão e para os valores depois da lesão separadamente. Nesta análise foi utilizada ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Os grupos não diferiram nas três avaliações feitas antes da lesão para os três monofilamentos (**4,93:** $F_{2,42}$ = 1,463, p = 0,244; **5,18:** $F_{2,42}$ = 1,304, p = 0,283; **5,88:** $F_{2,42}$ = 0,336, p = 0,717). Este dado mostra que o limiar de sensibilidade tátil e de dor antes da lesão era igual para todos os grupos.

Não foram identificadas também alterações significativas após o procedimento cirúrgico de implante de matriz de micro-elétrodos (comparação dos valores entre a AB e o 3POI) para todos os grupos nas avaliações com os três monofilamentos ($F_{2,42}$ = 0,529, p = 0,59). Deste modo, pode-se afirmar que as alterações notadas nos animais treinados e controles foram decorrentes da lesão medular e do treinamento realizado na esteira.

O grupo sham não apresentou alterações para todas as respostas na comparação dos valores obtidos antes e após a cirurgia sham. Os resultados deste grupo foram: para alodínea t = - 2,13, df = 11, p = 0,06 (Gráfico 4), para hiperalgesia mecânica leve t = - 1,33, df = 11, p = 0,226 (Gráfico 5) e para hiperalgesia mecânica intensa t = - 0,702, df = 11, p = 0,497 (Gráfico 6). Note que para o teste de dor ao estímulo tátil, o valor foi quase significativo, indicando um aumento do limiar de sensibilidade para este estímulo nos animais sem lesão (Gráfico 4).

Os grupos controle e treinado, por outro lado, apresentaram algumas alterações após a lesão medular. Em relação à avaliação feita com o monofilamento 4,93 (Gráfico 4) foi possível notar uma diminuição do limiar de sensibilidade tátil para os animais lesados (**CTL:** t = - 3,83, df = 14, p = 0,008; **TR:** t = - 3,83, df = 14, p = 0,002). Na comparação dos valores pós-lesão entre grupos foi encontrado que os grupos lesados diferem do grupo sham ($F_{2,42}$ = 4,321, p = 0,02). Estes dados evidenciam presença de dor ao estímulo tátil após a lesão medular moderada por contusão.

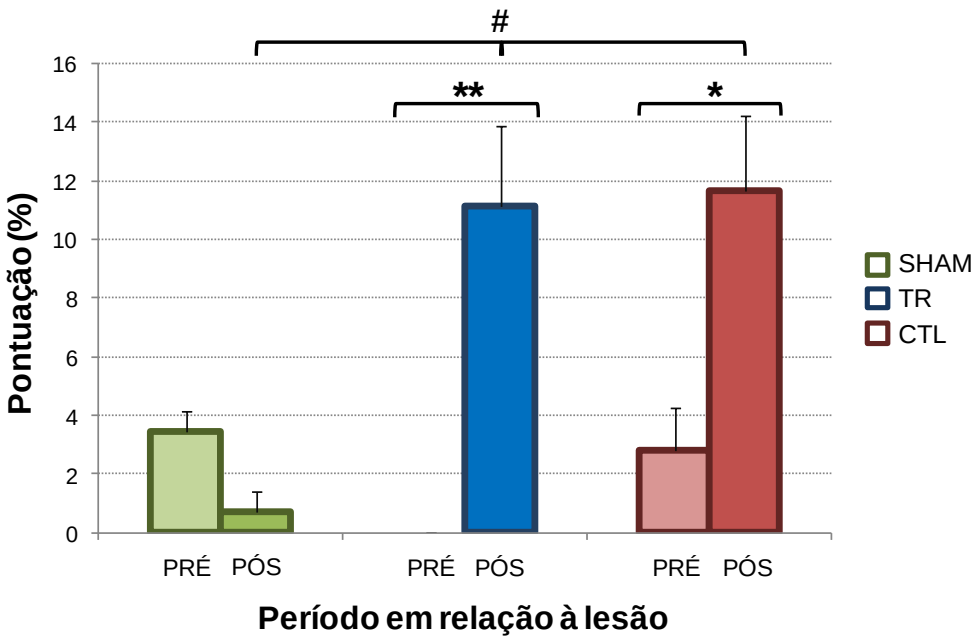

Gráfico 4 - Comparação das pontuações pré-lesão (média das pontuações da AB, do 3POI e do 9POI) e pós-lesão (média das pontuações dos 42º, 49º e 56º dPOs) para o monofilamento **4,93**. Há diferença estatística significativa das pontuações antes e após a LM para os grupos treinado (**p = 0,002) e controle (*p = 0,008), indicando a presença de alodínea após a LM. Na comparação dos valores pós lesão entre grupos, os lesados diferem do sham ($^{\#}$p = 0,02).

Ao analisar as pontuações dos grupos antes e após a LM para o monofilamento 5,18 (Gráfico 5) verificou-se diferença significativa das pontuações do grupo controle (t = - 2,31, df = 14, p = 0,036), mostrando um aumento da hiperalgesia mecânica leve neste grupo. Para o grupo treinado não houve diferença nesta resposta (t = - 1,03, df = 14, p = 0,37). Esses dados indicam uma possível influência do treinamento na melhora da resposta a um estímulo doloroso leve. Interessantemente, é possível observar ainda no gráfico 5 que a pontuação do grupo treinado diminuiu ao longo do tempo após a lesão em relação aos valores anteriores a LM e quando foi feita a comparação entre grupos para os valores pós lesão, o grupo treinado é estatisticamente diferente dos outros grupos (F2,42 = 8,271, p = 0,001).

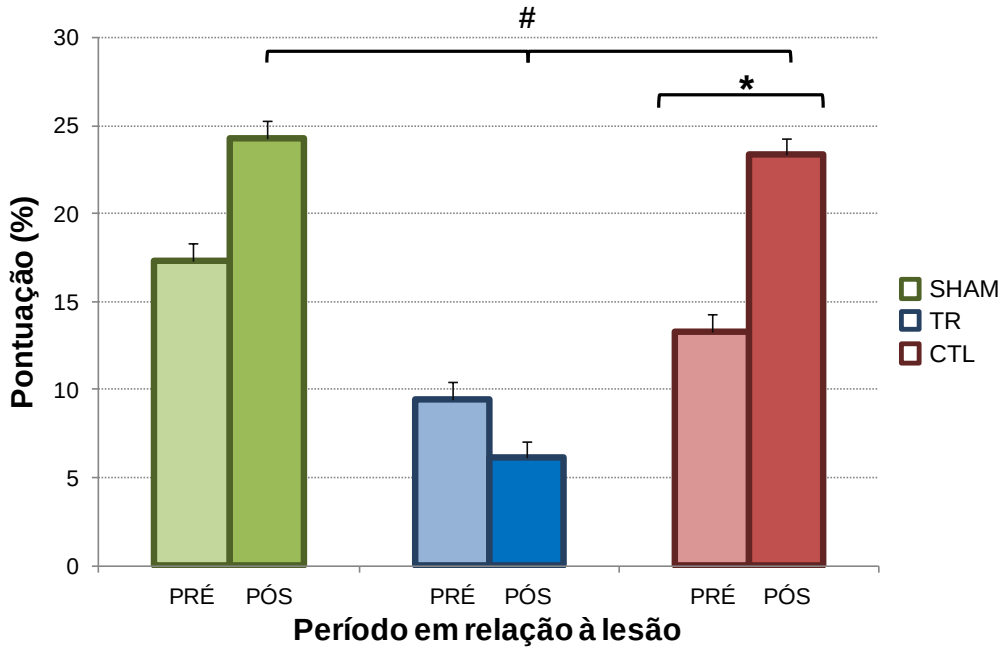

Gráfico 5 - Comparação das pontuações pré-lesão (média das pontuações da AB, do 3POI e do 9POI) e pós-lesão (média das pontuações dos 42º, 49º e 56º dPOs) para o monofilamento **5,18**. Há diferença estatística significativa das pontuações antes e após a LM para o grupo controle (*p = 0,036), indicando a presença de hiperalgesia mecânica leve após a LM. Após a lesão o grupo treinado difere dos grupos sham e controle ($^{\#}$p = 0,001).

O gráfico 6 mostra os resultados obtidos no teste com o monofilamento 5,88. Não foi encontrada diferença para todos os grupos antes e após a lesão (**TR:** t = - 0,346, df = 14, p = 0,735; **CTL:** t = - 1,94, df = 14, p = 0,07; Gráfico 9), diferentemente do que ocorreu para o monofilamento 5,18. Apesar disso, ao observarmos o gráfico 6 é possível notar que o grupo controle apresentou maior tendência ao aumento de hiperalgesia intensa e quando foram comparados os valores pós-lesão entre grupos, os animais controles diferiram dos animais treinados, apresentando um maior nível de dor ao estímulo mecânico intenso ($F_{2,42}$ = 4,222, p = 0,022).

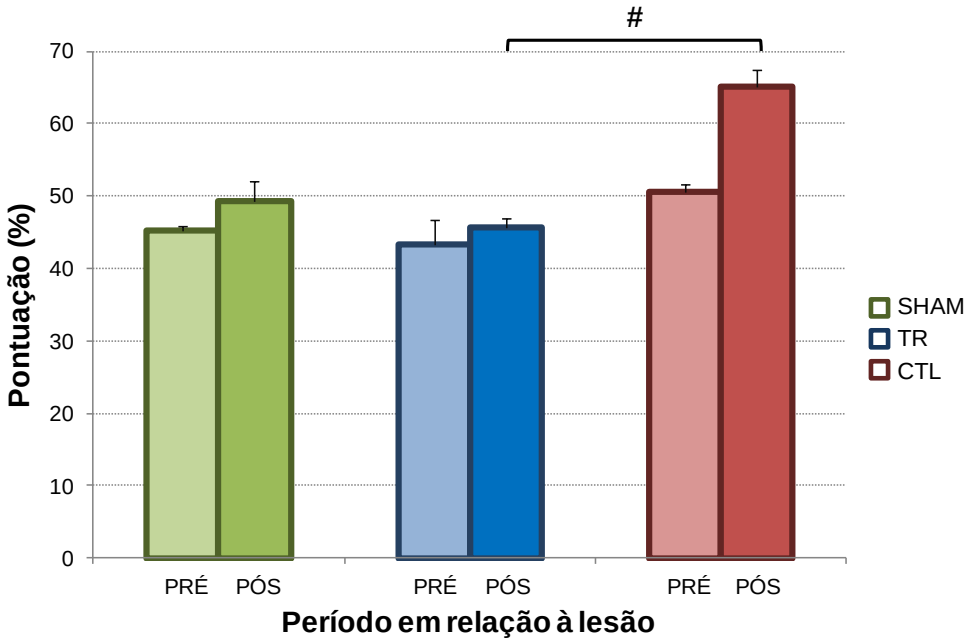

Gráfico 6 - Comparação das pontuações pré-lesão (média das pontuações da AB, do 3POI e do 9POI) e pós-lesão (média das pontuações dos 42º, 49º e 56º dPOs) para o monofilamento **5,88**. Não há diferença estatística significativa das pontuações antes e após a LM para todos os grupos. Após a lesão o grupo controle difere do grupo treinado ($^{\#}p = 0,022$).

5.4. Avaliação comportamental de dor térmica: *Hargreaves*

Após a lesão medular, os animais apresentaram ausência de movimentos dos MMPP, que ficaram com apoio dorsal, não sendo possível realizar a avaliação de dor térmica. Os dias selecionados para análise estatística (AB, 3POI e 9POI, e 42º, 49º e 56º dPO) foram aqueles em que havia resultados de um número de animais suficiente para todos os grupos (TR e CTL com n = 5 cada e sham com n = 4).

A avaliação de dor térmica foi realizada para ambos MMPP e os valores do limiar de retirada em segundos (s) para cada um dos membros dos animais lesados mostrou que não houve diferença importante entre eles. Para os animais treinados, a diferença do tempo de retirada do membro posterior direito em relação ao esquerdo foi de 0,69 s e para os animais

controles de 0,73 s, ou seja, menos de um segundo para ambos os grupos. Este dado mostra, mais uma vez, a consistência do modelo de lesão por contusão por meio do *NYU-Impactor*. A média dos valores obtidos para ambos os membros posteriores foi feita, portanto, para poder comparar os grupos antes e após a lesão medular.

Não foi identificada diferença estatística significativa da dor térmica para todos os grupos, na comparação dos valores antes e depois da lesão (análise intra-grupos; $F_{1,39} = 6,79$, $p = 0,13$, Gráfico 7). E também não foi encontrada diferença entre os grupos ($F_{1,39} = 0,38$, $p = 0,96$), mostrando que todos os animais apresentaram o mesmo comportamento para dor térmica durante todo o experimento.

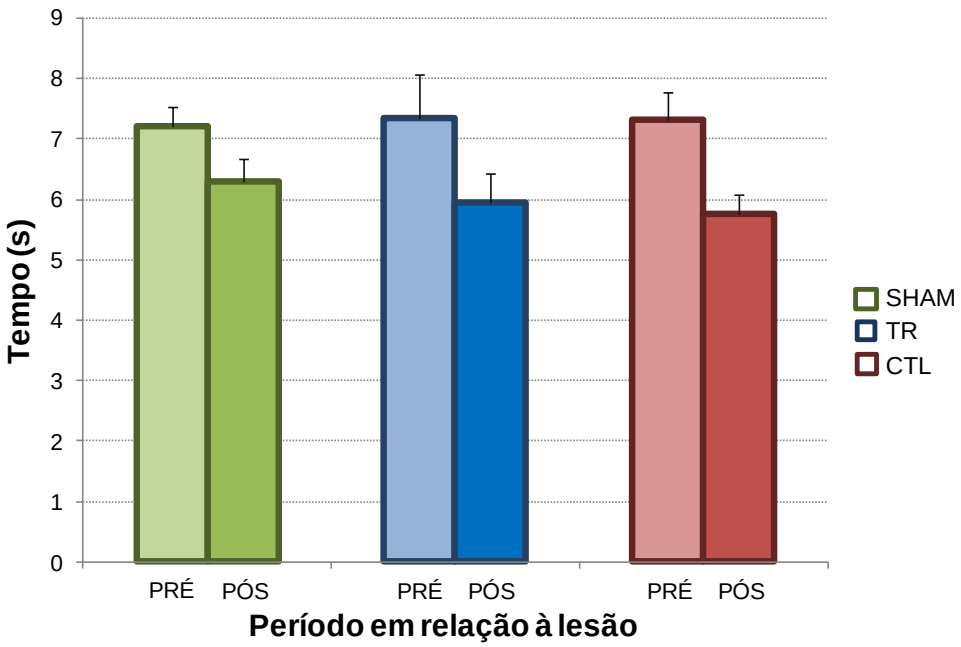

Gráfico 7 - Comparação dos valores pré-lesão (média dos valores da AB, do 3POI e do 9POI) e pós-lesão (média dos valores dos 42º, 49º e 56º dPOs) do tempo de retirada da pata (em s). Não há diferença estatística significativa na latência da resposta ao estímulo térmico antes e após a LM para todos os grupos.

5.5. Avaliação comportamental eletrofisiológica

O registro eletrofisiológico do córtex sensório-motor foi iniciado a partir do 9POI. Os dados apresentados correspondem, exclusivamente, aos trechos dos animais andando, selecionados a partir dos vídeos gravados durante a avaliação comportamental motora no campo aberto e o treinamento na esteira (para o grupo treinado).

Três bandas de frequência foram investigadas, sendo elas: *delta*, *theta* e *beta*. Para comparar essas frequências entre os diferentes grupos foi feito o cálculo da potência média de cada banda, dos canais aprovados para cada trecho, em cada dia de avaliação. A partir dos valores das potências, três análises foram realizadas com objetivos diferentes, sendo elas:

a) Comparação entre os dados antes da lesão (9POI) e após a lesão (1º, 3º e 5º dPOs) para caracterizar o comportamento da atividade cortical sensório-motora após a lesão medular sem qualquer intervenção terapêutica, em um período agudo (n = 10, TR com n = 6 e CTL com n = 4; utilizou-se o Teste t pareado);

b) Comparação entre os grupos lesados ao longo do tempo para investigar o comportamento da atividade cortical sensório-motora na lesão medular crônica e após uma estratégia terapêutica (TR com n = 6, CTL com n = 4; utilizou-se a ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni);

c) Comparação entre os dados do grupo treinado no campo aberto e no treinamento na esteira para verificar efeito do treinamento no comportamento da atividade cortical (n = 6, utilizou-se a ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni).

Nenhuma alteração foi encontrada para banda de frequência *delta* na comparação entre os valores basais (9POI) e 1º dPO (t = - 0,559, df = 9, p = 0,589), 3º dPO (t = - 0,288, df = 9, p = 0,779) e 5º dPO (t = - 0,056, df = 9, p = 0,956; Gráfico 8). Entretanto, no 1º dPO foram identificadas alterações na atividade cortical sensório-motora, para as bandas *theta* e *beta* em relação aos dados de antes da lesão, sendo que os animais lesados apresentaram um aumento da potência da banda *theta* (t = - 2,97, df = 9, p = 0,016; Gráfico 9) e diminuição da potência da banda *beta* (t = 2,28, df = 10, p = 0,046; Gráfico 10). Porém, esta condição não foi mantida por mais dias, não havendo diferenças entre os valores basais destas bandas e do 3º dPO (***theta*:** t = - 0,3, df = 9, p = 0,771; ***beta*:** t = - 0,223, df = 10, p = 0,828) e 5º dPO (***theta*:** t = - 0,263, df = 9, p = 0,799; ***beta*:** t = - 0,693, df = 9, p = 0,506).

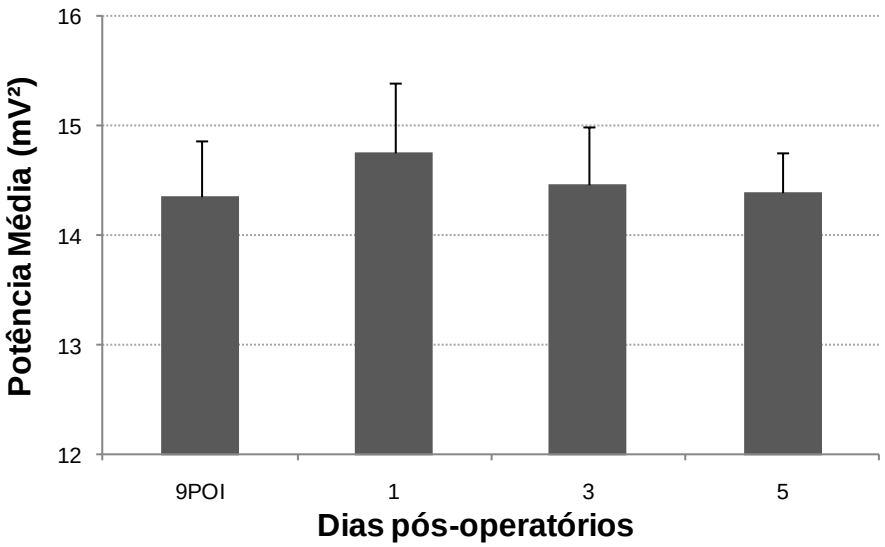

Gráfico 8 - Potência média da banda ***delta*** antes da lesão (9POI) e depois da lesão nos 1º, 3º e 5º dias pós-operatórios. Não houve diferença significativa quando comparados os valores entre o 9POI e os 1º, 3º e 5º dPOs. A potência média está mostrada a partir de 12 mV^2 para poder ressaltar que não houve diferenças entre os dias.

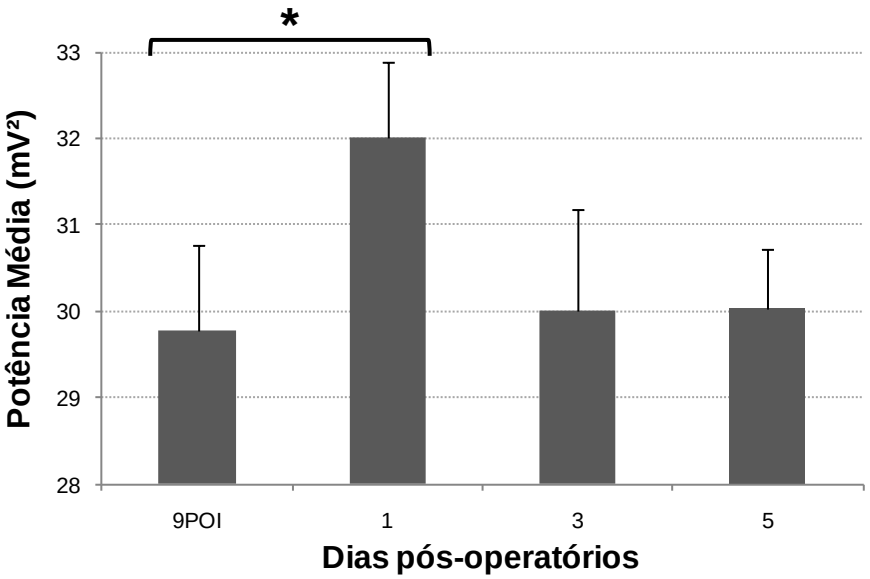

Gráfico 9 - Potência média da banda ***theta*** antes da lesão (9POI) e depois da lesão nos 1º, 3º e 5º dias pós-operatórios. A potência de *theta* aumentou significativamente no 1º dPO em relação ao 9POI (*p = 0,016), mas quando comparados os valores do 9POI com o 3º e 5º dPOs não houve diferenças. A potência média está mostrada a partir de 28 mV^2 para poder ressaltar a diferença encontrada.

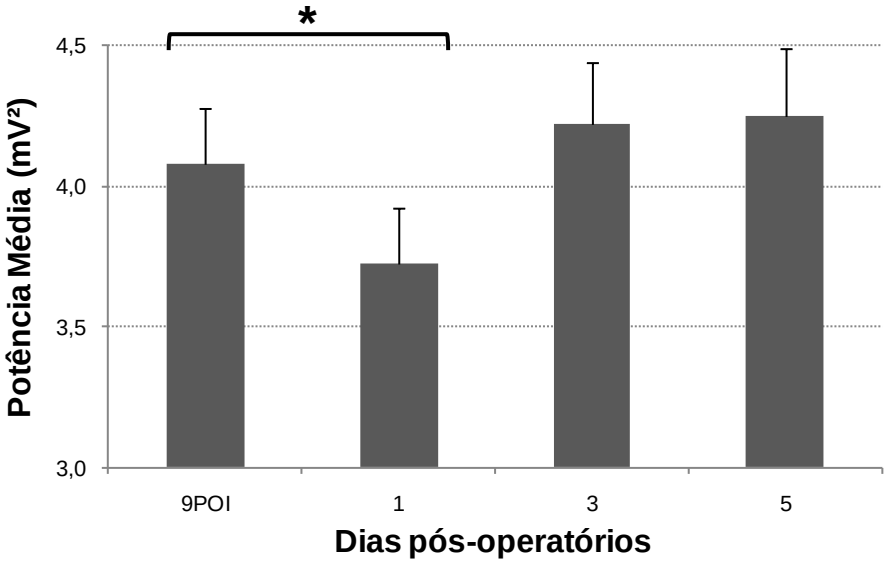

Gráfico 10 - Potência média da banda ***beta*** antes da lesão (9POI) e depois da lesão nos 1º, 3º e 5º dias pós-operatórios. A potência *beta* diminuiu significativamente no 1° dPO em relação ao 9POI (*p = 0,046), mas quando comparados os valores do 9POI com o 3º e 5º dPO não houve diferenças. A potência média está mostrada a partir de 3 mV^2 para poder ressaltar a diferença encontrada.

Na comparação do comportamento eletrofisiológico cortical entre os grupos ao longo do tempo não foram encontradas diferenças para

todas as bandas de frequência (***delta***: $F_{1,7} = 4,454$, $p = 0,073$, Gráfico 11; ***theta***: $F_{1,7} = 0,824$, $p = 0,394$, Gráfico 12; ***beta***: $F_{1,7} = 3,773$, $p = 0,093$, Gráfico 13), porém o resultado da análise estatística indica tendência para aumento da potência da banda *delta* para o grupo controle e aumento da potência da banda *beta* para o grupo treinado nos últimos dias de avaliação. Por este motivo foi feita uma análise entre os dias, na qual se verificou diferença significativa para banda *beta*, que apresentou aumento da potência nos 42º e 49° dPOs em relação ao grupo controle ($F_{10,82} = 2,67$, $p = 0,007$), mas para a banda *delta* não foram encontradas alterações significativas ($F_{7,49} = 2,555$, $p = 0,516$). Apesar de não ter havido diferenças em relação à banda *theta* é possível observar a partir do gráfico 12 uma tendência a diminuição da potência desta frequência para ambos os grupos ao longo do tempo.

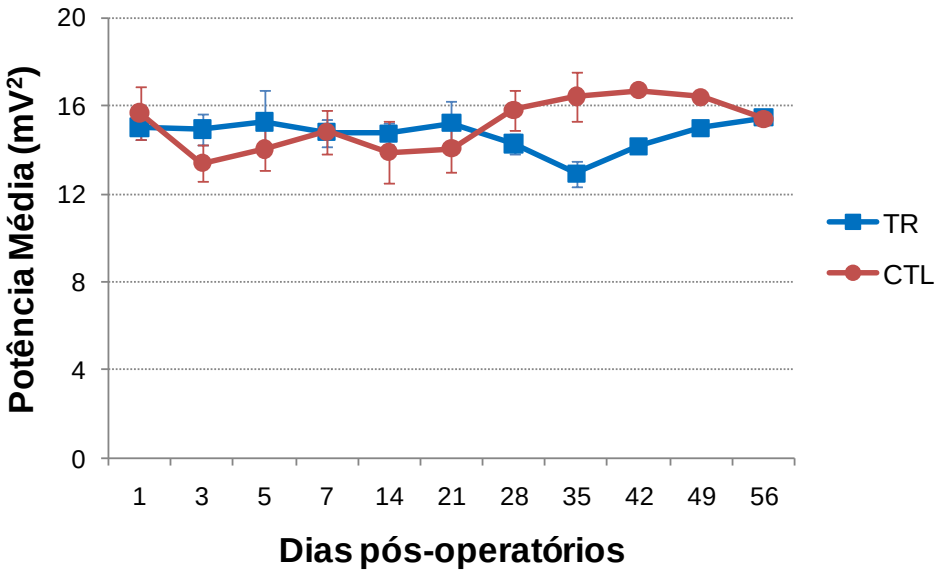

Gráfico 11 - Potência média da banda ***delta*** dos grupos treinado e controle ao longo do tempo. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos, porém nota-se uma tendência ao aumento desta banda para o grupo controle nas últimas avaliações.

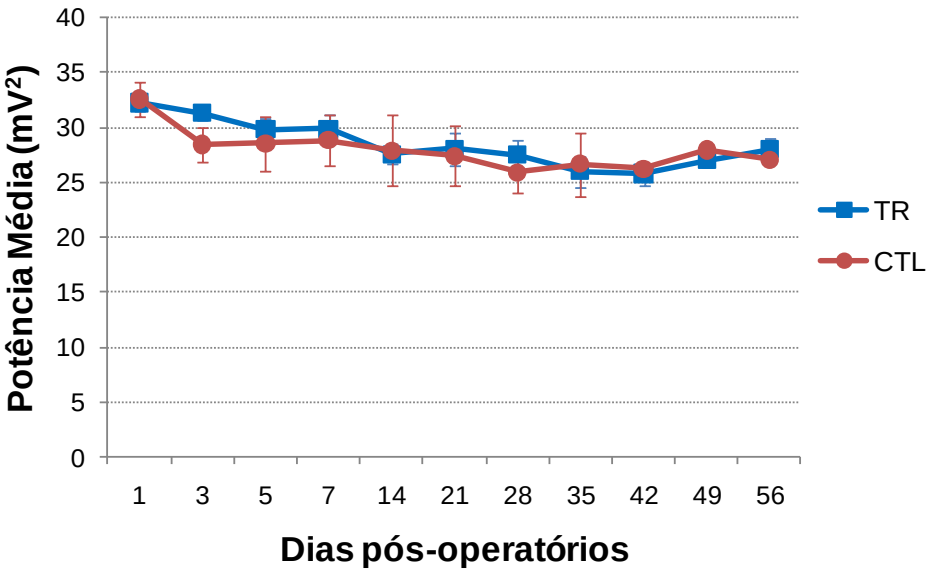

Gráfico 12 - Potência média da frequência ***theta*** dos grupos treinado e controle ao longo do tempo. Não há diferença estatística significativa entre grupos. Porém, nota-se diminuição desta banda de frequência ao longo do tempo para ambos os grupos.

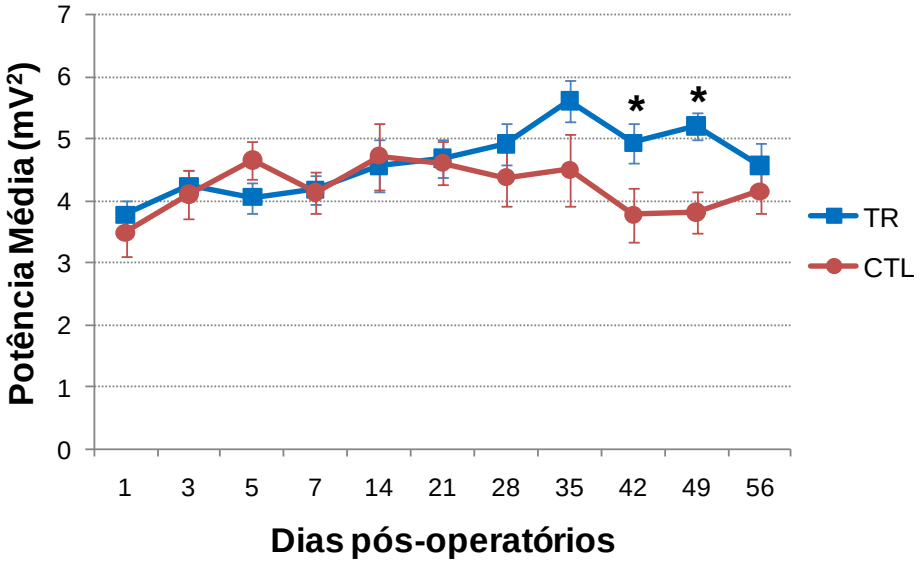

Gráfico 13 - Potência média da frequência ***beta*** dos grupos treinado e controle ao longo do tempo. Há diferença estatística significativa entre os grupos nos 42º e 49º dPOs. Essa diferença ocorreu pelo aumento da potência média da frequência *beta* para o grupo treinado (*p = 0,007).

Ao compararmos os dados do grupo treinado coletados durante a avaliação motora no campo aberto e durante o treinamento na esteira também foram encontradas algumas diferenças, mas agora para as três bandas de frequência: *delta*: $F_{1,5}$ = 14,363, p = 0,013 (Gráfico 14); *theta*: $F_{1,5}$ =

8,48, p = 0,033 (Gráfico 15); e *beta*: $F_{1,5}$ = 6,12, p = 0,05 (Gráfico 16). O pós-teste identificou aumento da banda *delta* nos 7º, 14º, 21º e 35º dPOs enquanto os animais andavam na esteira. Em relação à banda *theta* também houve um aumento dos valores durante o treinamento nos 7º, 14º e 21º dPOs. E, por outro lado, a potência da banda *beta* foi menor nas sessões de treino nos 7° e 21° dPOs.

De uma maneira geral, as diferenças encontradas na atividade eletrofisiológica durante o andar livre (no campo aberto) e o andar imposto (na esteira) ocorreram, principalmente, até o 21º dPO. Interessantemente, até este dia todos os animais (n = 6) foram registrados durante o treinamento na esteira com o dispostivo auxiliar ou com o auxílio manual. A partir do 28º dPO, alguns animais (n = 3) puderam ser treinados sem estes suportes, devido a melhora motora atingida. Este fato pode, possivelmente, ter influenciado nos resultados observados.

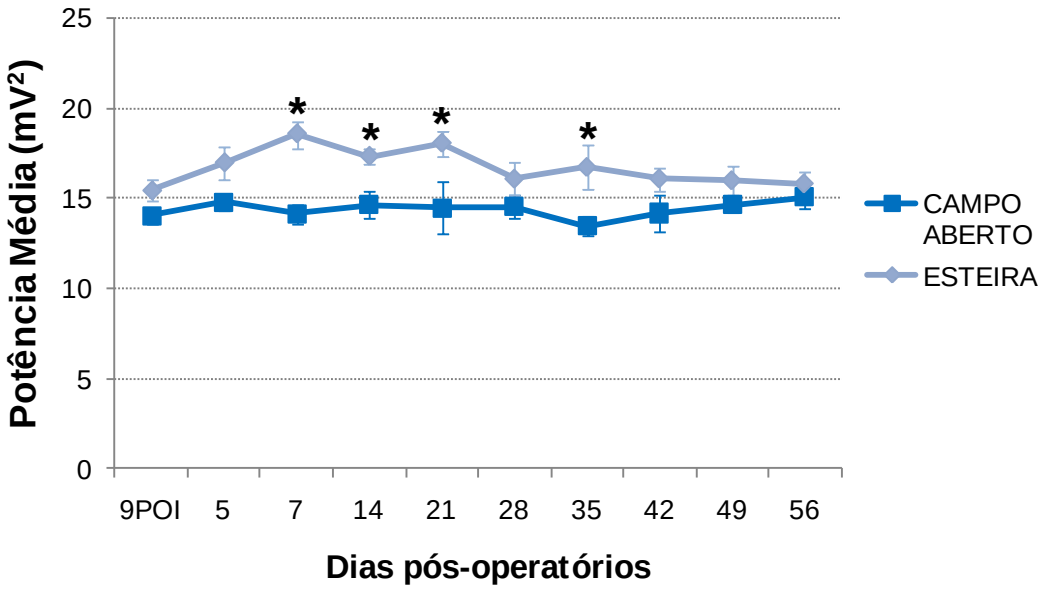

Gráfico 14 - Potência média da banda ***delta*** do grupo treinado andando no campo aberto ou na esteira. Os valores da obtidos a partir dos dados da esteira são estatísticamente maiores do que os do campo aberto nos 7°, 14°, 21° e 35º dPOs.

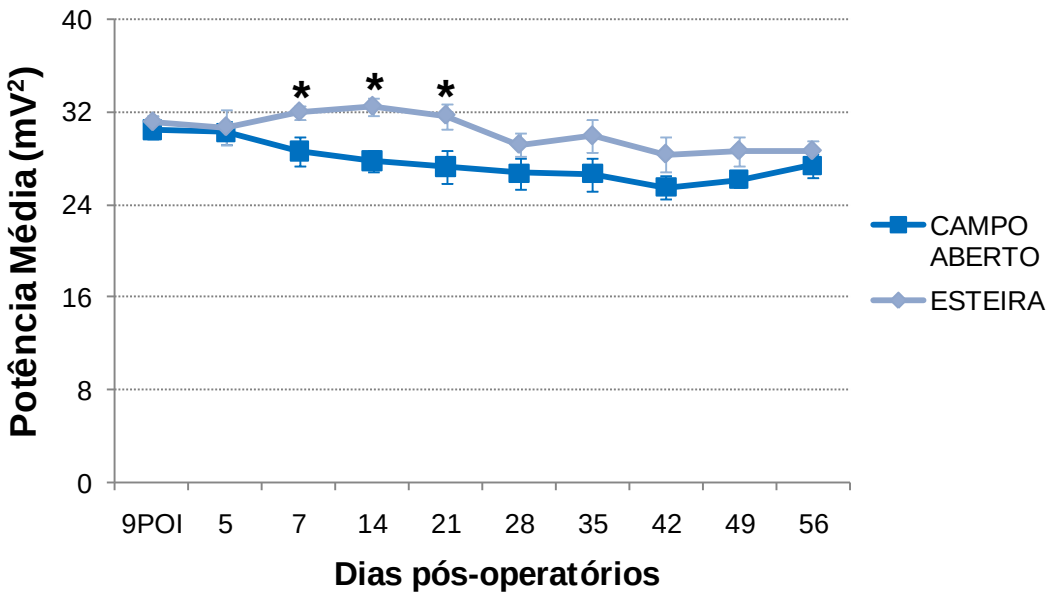

Gráfico 15 - Potência média da banda ***theta*** do grupo treinado andando no campo aberto ou na esteira. Os valores da obtidos a partir dos dados da esteira são estatísticamente maiores do que os do campo aberto nos 7°, 14° e 21° dPOs.

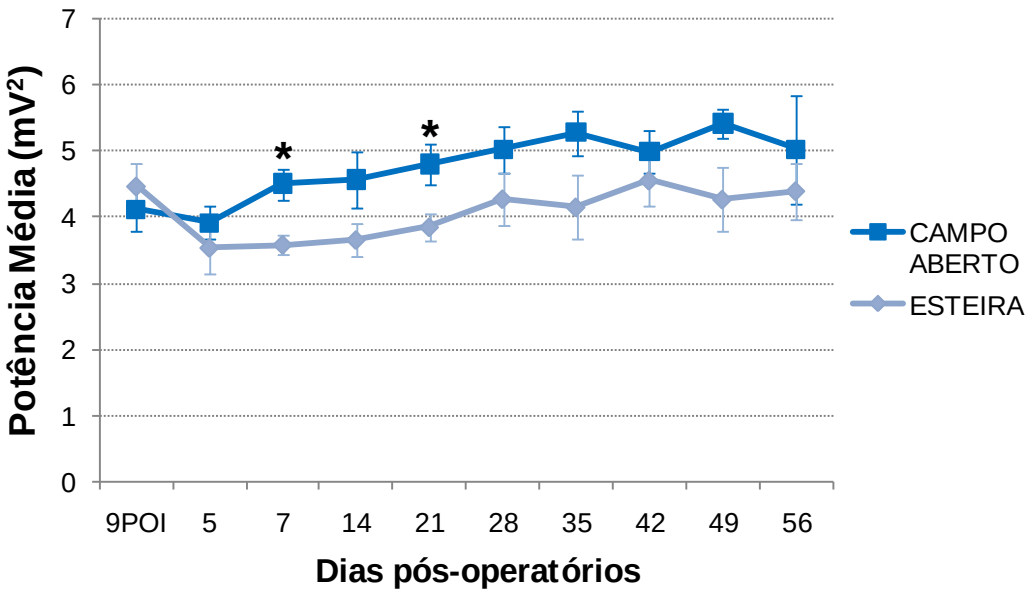

Gráfico 16 - Potência média da banda ***beta*** do grupo treinado andando no campo aberto ou na esteira. Os valores da obtidos a partir dos dados da esteira são estatísticamente menores do que os do campo aberto nos 7° e 21° dPOs.

5.6. Análise histológica e imunohistoquímica

5.6.1. Encéfalo

Após a perfusão dos animais no 57º dPO, os encéfalos foram removidos de forma cuidadosa para minimizar as chances de o tecido encefálico ficar acoplado ao crânio ou de entortar os fios da matriz de micro-elétrodos, o que prejudicaria a histologia desse material. Na figura 39 nota-se o local de implante da matriz com leve afundamento do tecido cortical. A partir da figura 40, que apresenta a matriz de micro-elétrodos acoplada ao crânio, pode-se dizer que houve preservação da posição dos fios em fileiras. Também pode ser notada a presença de *Gelfoam*® ao redor da matriz, que foi colocado antes da fixação do implante com a supercola instantânea de cianoacrilato, protegendo o tecido encefálico.

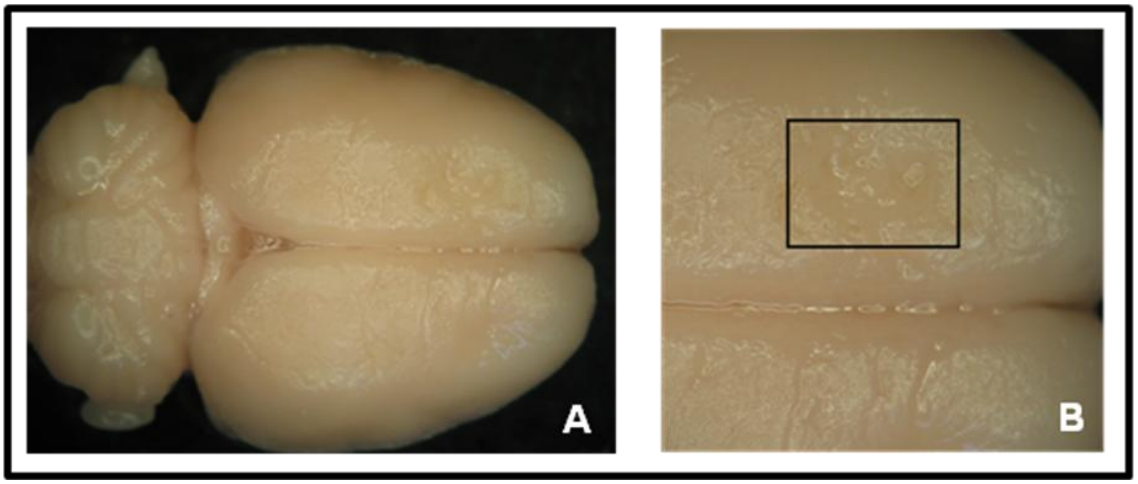

Figura 39 - Vista superior do encéfalo de rato retirado após a perfusão (A). Aproximação da imagem para visualização do local de implante da matriz delimitado pelo quadrado preto (B).

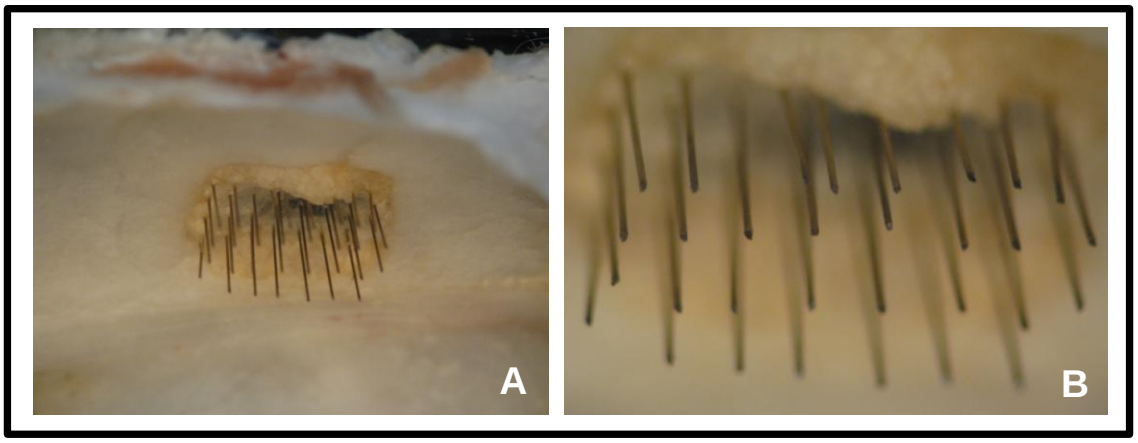

Figura 40 - Vista inferior do crânio com a matriz de micro-elétrodos após a remoção do encéfalo (A). Aproximação da imagem permite a visualização dos 31 fios, sendo que somente a primeira fileira do lado direito da foto possui três fios e as outras sete fileiras possuem quatro fios (B). É possível observar a afiação da ponta de cada um dos fios em formato de bisel.

Os encéfalos foram cortados em um micrótomo, com 30 µm de espessura, e corados com hematoxilina-eosina para verificar a posição dos micro-elétrodos. A figura 41 mostra três cortes coronais do encéfalo com suas imagens, aproximadamente, correspondentes do atlas de Paxinos e Watson (2007). A partir da histologia constatou-se o posicionamento correto da matriz de micro-elétrodos no córtex sensório-motor primário. A figura 42 mostra os rastros de quatro micro-elétrodos em detalhe, sendo uma aproximação do corte histológico apresentado na figura 41B.

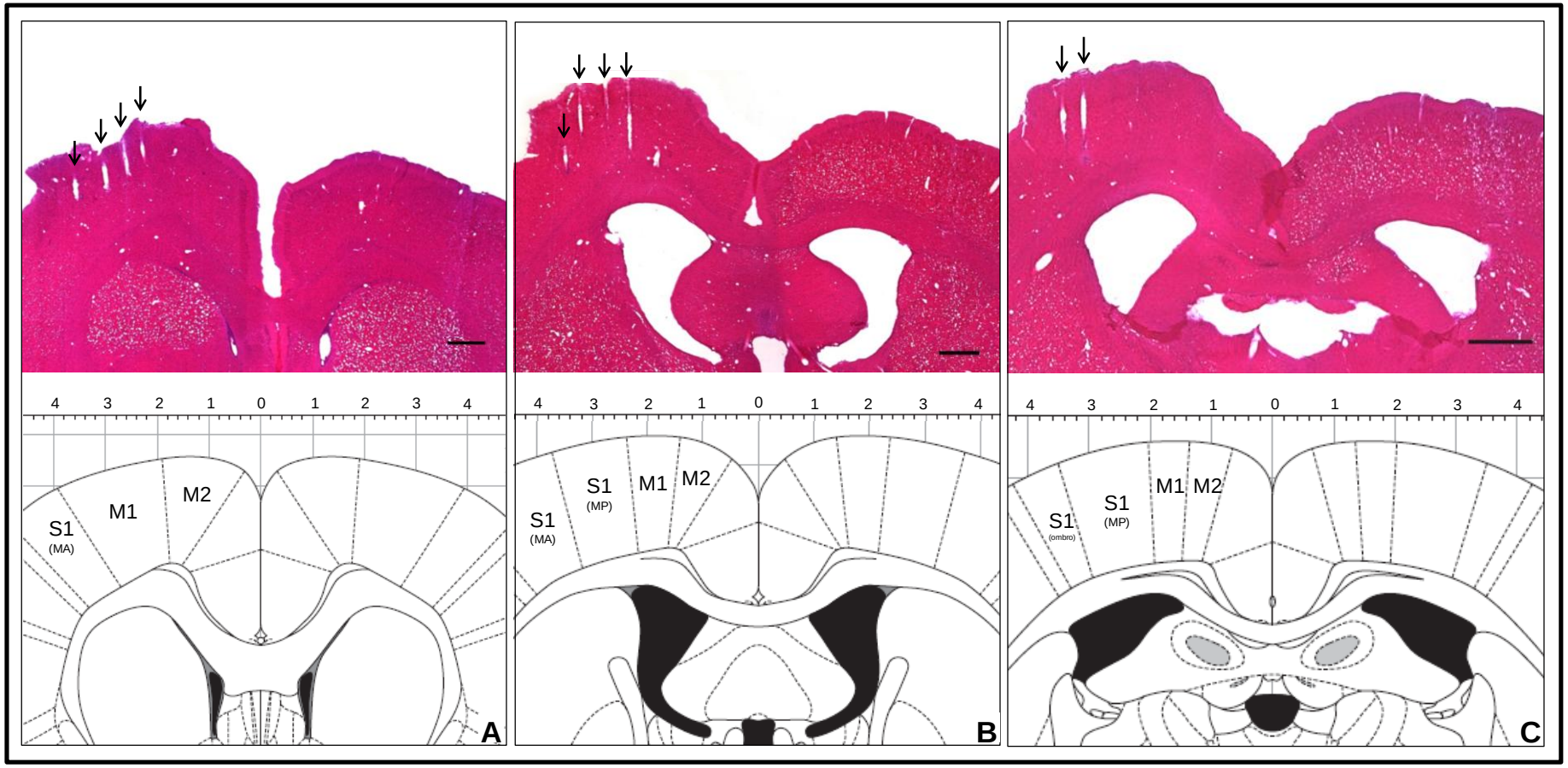

Figura 41 - Cortes coronais (30 µm de espessura) do encéfalo do rato, corados com hematoxilina-eosina, com suas imagens aproximadas do atlas de Paxinos e Watson (2007). Corte com posição cerca de 2,04 mm rostral ao Bregma com a indicação (setas) de quatro micro-elétrodos, que atingem principalmente o córtex motor primário (A). Corte com posição cerca de 0,60 mm caudal ao Bregma com a indicação (setas) de quatro micro-elétrodos, que atingem principalmente o córtex motor primário e somestésico primário correspondente a área de membros posteriores (B). Corte com posição cerca de 1,72 mm caudal ao Bregma com a indicação (setas) de dois micro-elétrodos, que atingem principalmente o córtex somestésico primário correspondente a área de membros posteriores e ombro (C). M1: córtex motor primário; M2: córtex motor secundário; MP: membro posterior; MA: membro anterior; S1: córtex somestésico primário. Barra de escala 500 µm.

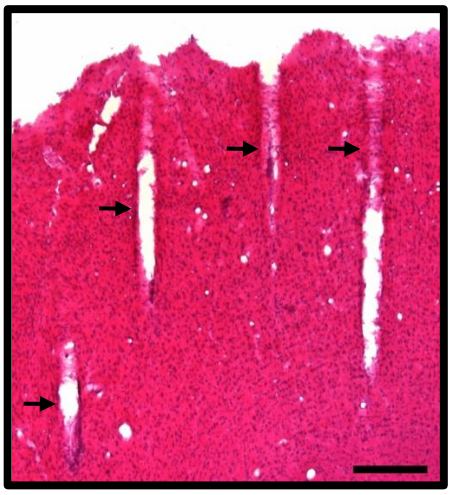

Figura 42 - Corte coronal (30 µm de espessura) do encéfalo do rato na região do córtex sensório-motor, corado com hematoxilina-eosina. As setas indicam rastros dos quatro micro-elétrodos correspondentes as fileiras no sentido látero-lateral. Barra de escala 200 µm.

5.6.2. Medula espinhal

Além dos encéfalos, as medulas espinhais dos ratos foram coletadas após a perfusão. A figura 43 mostra o segmento de três centímetros de medula espinhal de um animal sham, sendo possível notar a sua integridade macroscopicamente.

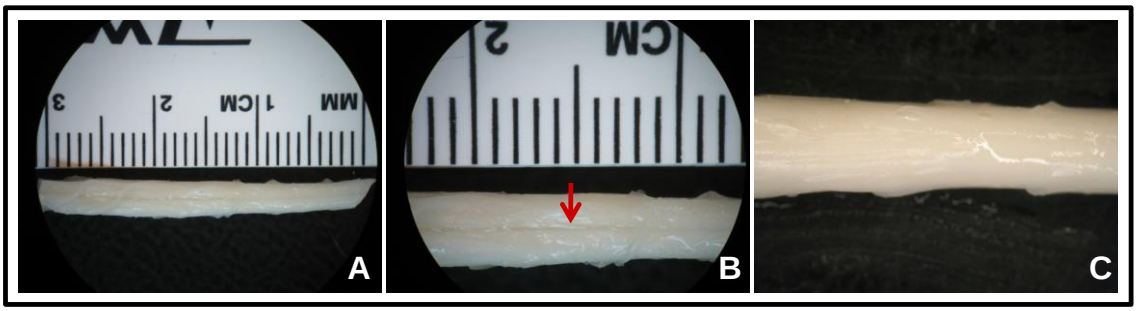

Figura 43 - Três imagens da medula espinhal de um animal sham. Vista dorsal do segmento de três centímetros coletados (A). Aproximação da imagem para visualização da integridade da linha que divide as colunas dorsais, indicada pela seta vermelha (B). Vista lateral da medula espinhal sem alteração da sua espessura (C).

Após a lesão, a região em que a haste de impacto tocou a medula espinhal é facilmente identificada (Figura 44). Uma perda de tecido

medular é mostrada por meio de uma transparência e achatamento da estrutura anatômica nas vistas dorsal (Figura 44A e 44B) e lateral (Figura 44C e 44D).

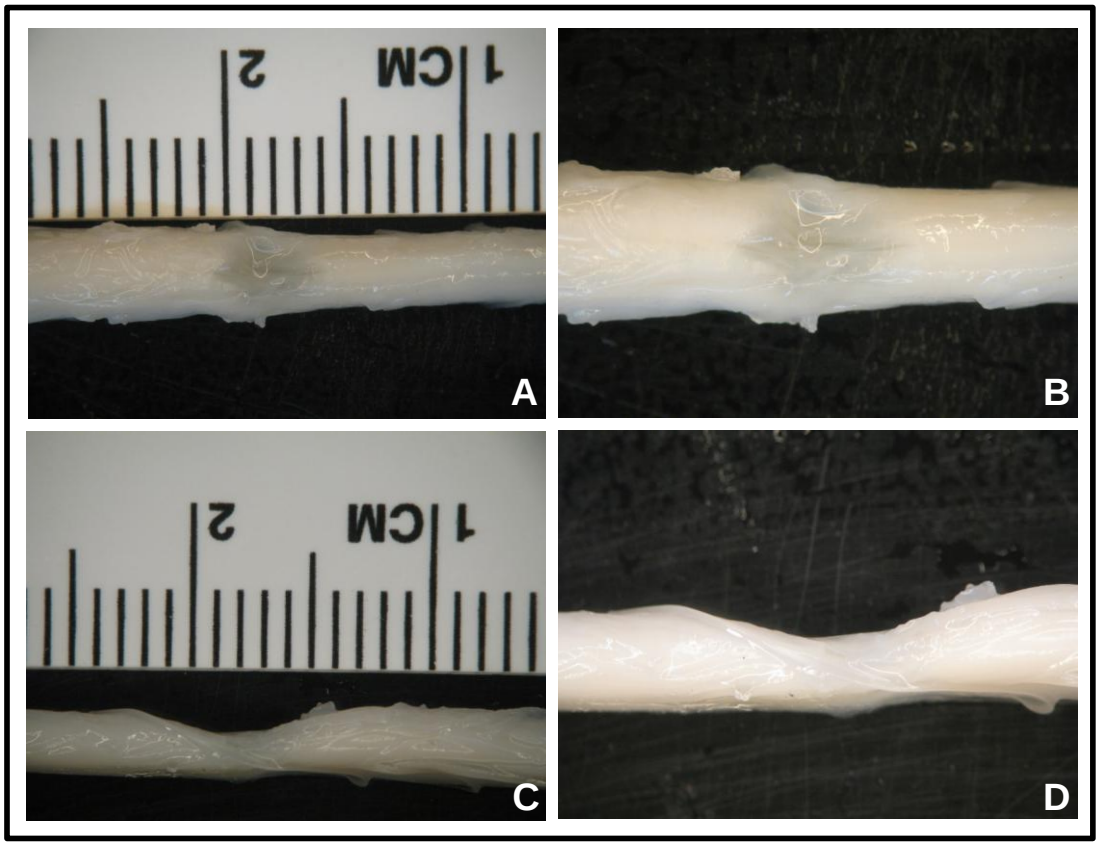

Figura 44 - Medula espinhal de um animal lesado em vista dorsal (A, B), com perda de continuidade da linha de separação das colunas dorsais e em vista lateral (C, D) com visível achatamento em uma extensão de, aproximadamente, um centímetro.

5.6.2.1. Morfometria

Para análise morfométrica da medula espinhal de todos os animais do experimento foram utilizados sete cortes transversais de 14 µm de espessura imunomarcados para *NeuN*. Os valores das áreas em μm^2 de toda a medula, das substâncias cinzenta e branca residuais e da lesão puderam ser obtidos a partir do *software Axion Vision 4.8* (*Carl Zeiss*), como demonstrado

na figura 45. Os animais do grupo sham apresentaram preservação morfológica da estrutura medular, ou seja, a integridade das substâncias branca e cinzenta foi mantida após a cirurgia sham (Figura 45A).

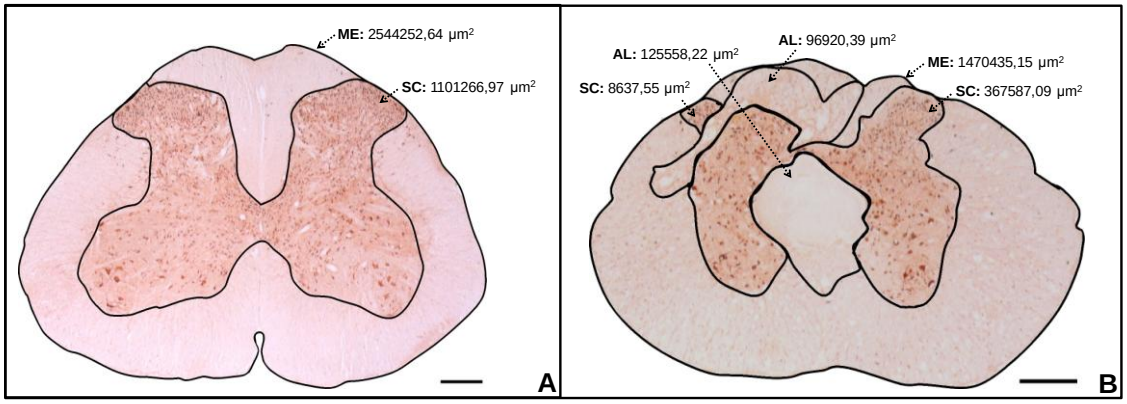

Figura 45 - Cortes transversais de 14 µm da medula espinhal de um animal sem lesão (A) e com lesão (B), marcados para *NeuN*. As áreas da medula espinhal total (ME), da substância cinzenta (SC) e de lesão (AL) foram delimitadas por linhas pretas. A área da substância branca foi obtida por meio da subtração da área total da medula espinhal pelas áreas de substância cinzenta e lesão. Barra de escala 200 µm.

Por outro lado, os animais lesados apresentaram diversas alterações morfológicas (Figura 45B e 46). A proporção da área de lesão para cada corte foi calculada da seguinte maneira: (somatória das áreas de lesão em um corte x 100) / área total da medula espinhal. O epicentro da lesão foi definido como o corte histológico da medula espinhal que apresentou maior proporção de área de lesão. A análise morfométrica mostrou que não houve diferença significativa do tamanho da lesão para os grupos lesados ($F_{1,11}$ = 0,56, p = 0,47), confirmando consistência da lesão por contusão causada pelo *NYU-Impactor* (Figura 46 e Gráfico 17).

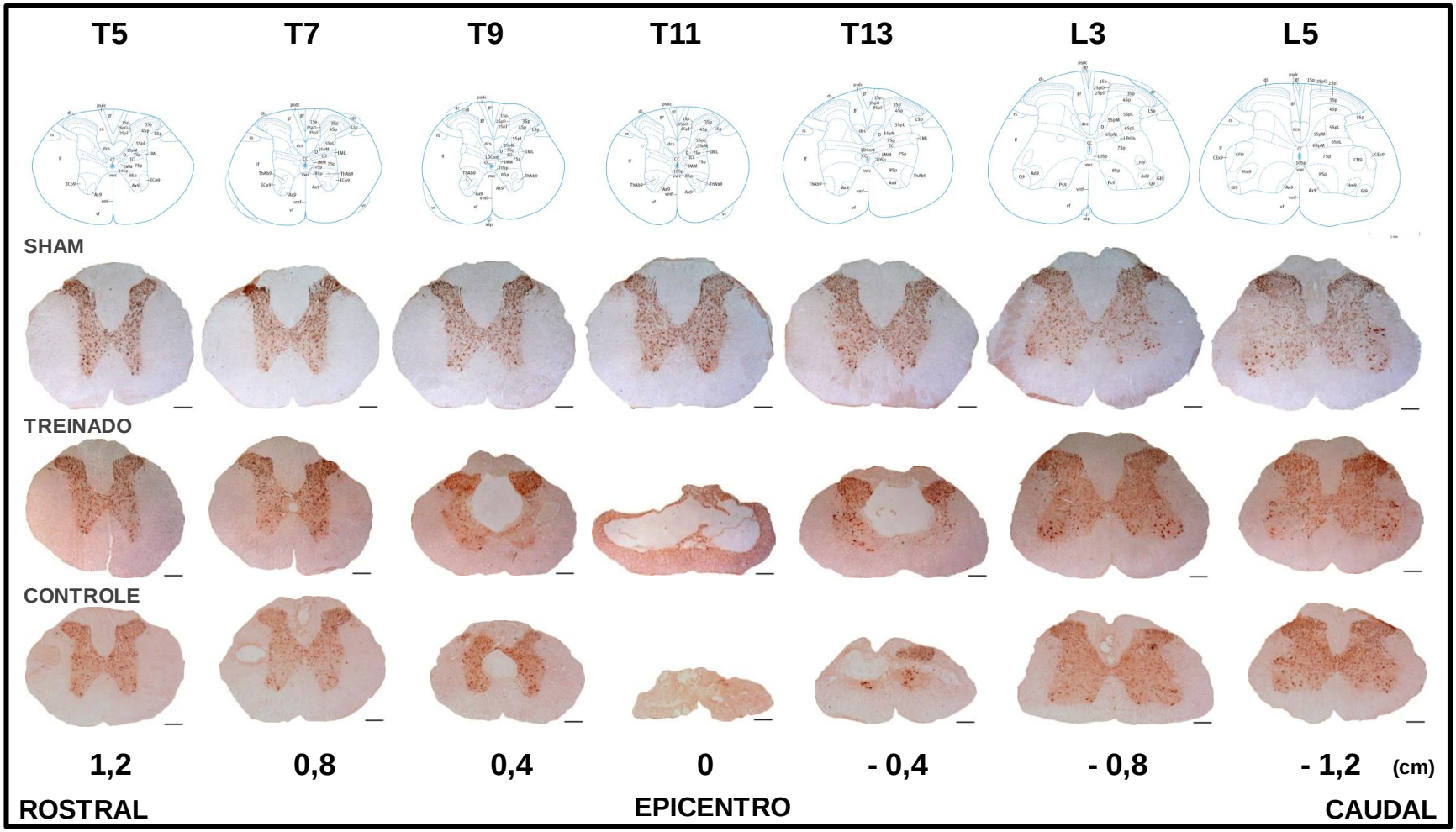

Figura 46 - Sete cortes transversais (de 14 µm de espessura, imunomarcados para *NeuN*) da medula espinhal de um animal de cada grupo com suas imagens aproximadas do atlas de Watson e colaboradores (2009). Os cortes foram centrados no epicentro da lesão, 0 cm, e a análise morfométrica foi realizada até 1,2 cm rostral e caudal ao epicentro. Essa distância compreende segmentos torácicos (aproximadamente T5, T7, T9, T11 e T13) e lombares (aproximadamente L3 e L5). Barra de escala 200 µm para as fotos e 1 mm para as figuras do atlas.

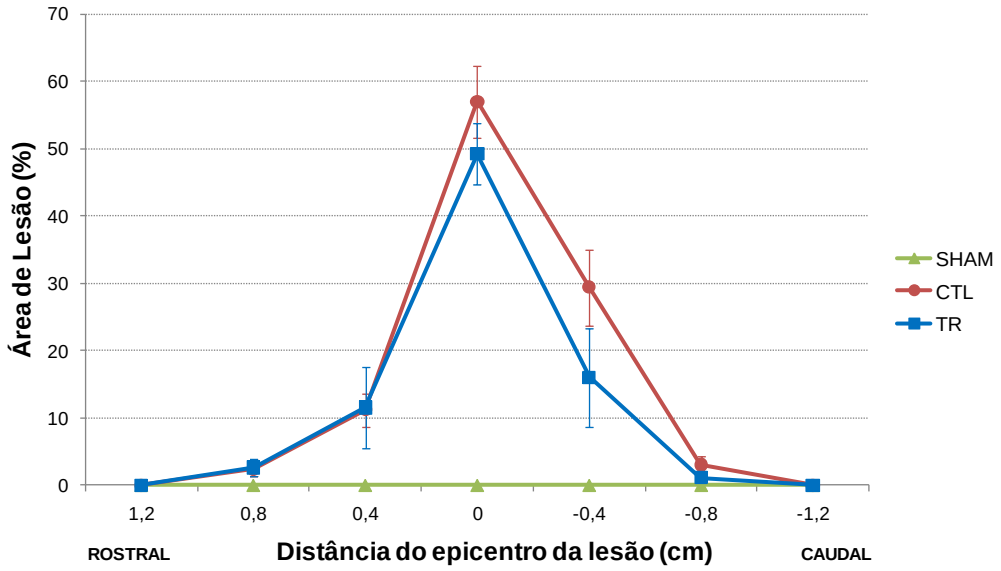

Gráfico 17 - Distribuição da área de lesão em sete cortes transversais da medula espinhal no sentido rostro-caudal, sendo o epicentro correspondente ao corte com maior proporção de área de lesão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos lesados.

Alguns aspectos característicos da lesão puderam ser observados como demonstrado na figura 47, entre eles, as cavidades císticas e perda da estrutura tecidual geral, que pode ser notada tanto na substância branca como na cinzenta no epicentro da lesão e ainda em muitos milímetros rostrais e caudais ao epicentro. As grandes cavidades císticas foram notadas em regiões que eram ocupadas anteriormente por substância cinzenta. O tecido residual apresentou uma coloração mais clara, e zonas de microcistos e áreas de desmielinização parcial ficaram evidentes. Em alguns cortes histológicos uma pequena região de substância cinzenta ficou preservada nos cornos dorsais.

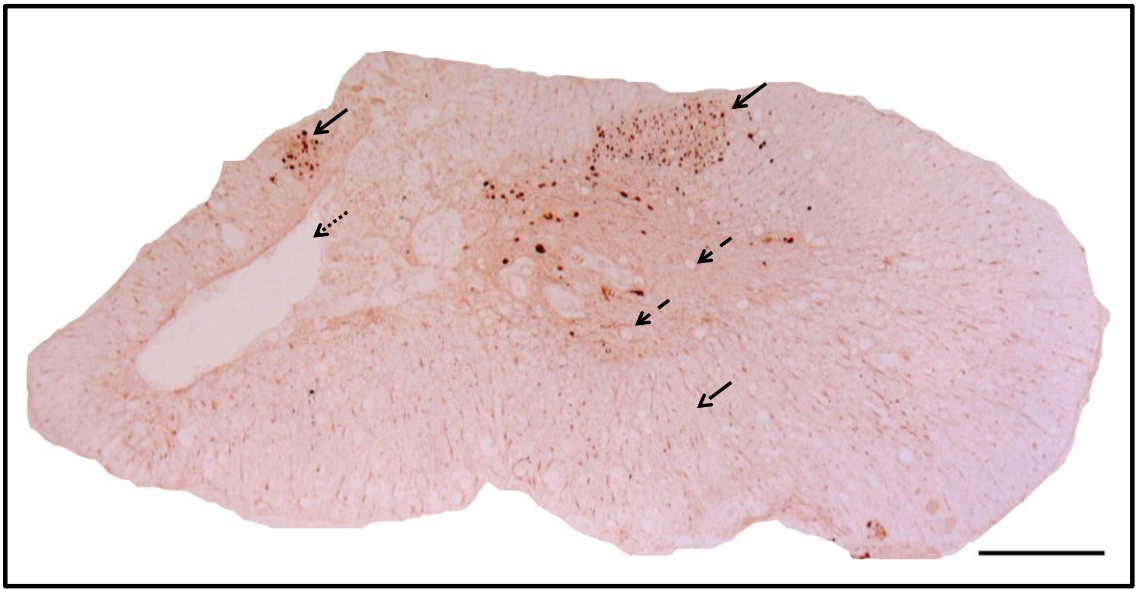

Figura 47 - Corte transversal da medula espinhal com lesão, 14 µm de espessura, imunomarcado para *NeuN*, com as setas indicando as alterações morfológicas, tais como: ····> grande cavidade cística, - - > microcistos, ——> região de substância cinzenta parcialmente preservada no corno dorsal. Também pode ser identificada área de substância branca preservada (——>). Barra de escala 200 µm.

5.6.2.2. Contagem de neurônios

Os neurônios que foram contados precisavam estar presentes no corno ventral da medula espinhal, como demonstrado na figura 48. Embora o *NeuN* seja um marcador principalmente de núcleo neuronal, foi possível observar também a marcação dos corpos e dos processos dos neurônios (Figura 48). Deste modo, os neurônios considerados para contagem precisavam ter no mínimo 15 µm de diâmetro, tamanho considerado por Chopek e Gardiner (2010) para contagem de motoneurônios cujos corpos foram corados. Apesar de alguns neurônios que só tivessem o núcleo corado não terem entrado para a contagem (subestimação do valor real de neurônios), o diâmetro de 15 µm foi determinado na tentativa de somente selecionar os motoneurônios e excluir interneurônios também presentes no corno ventral.

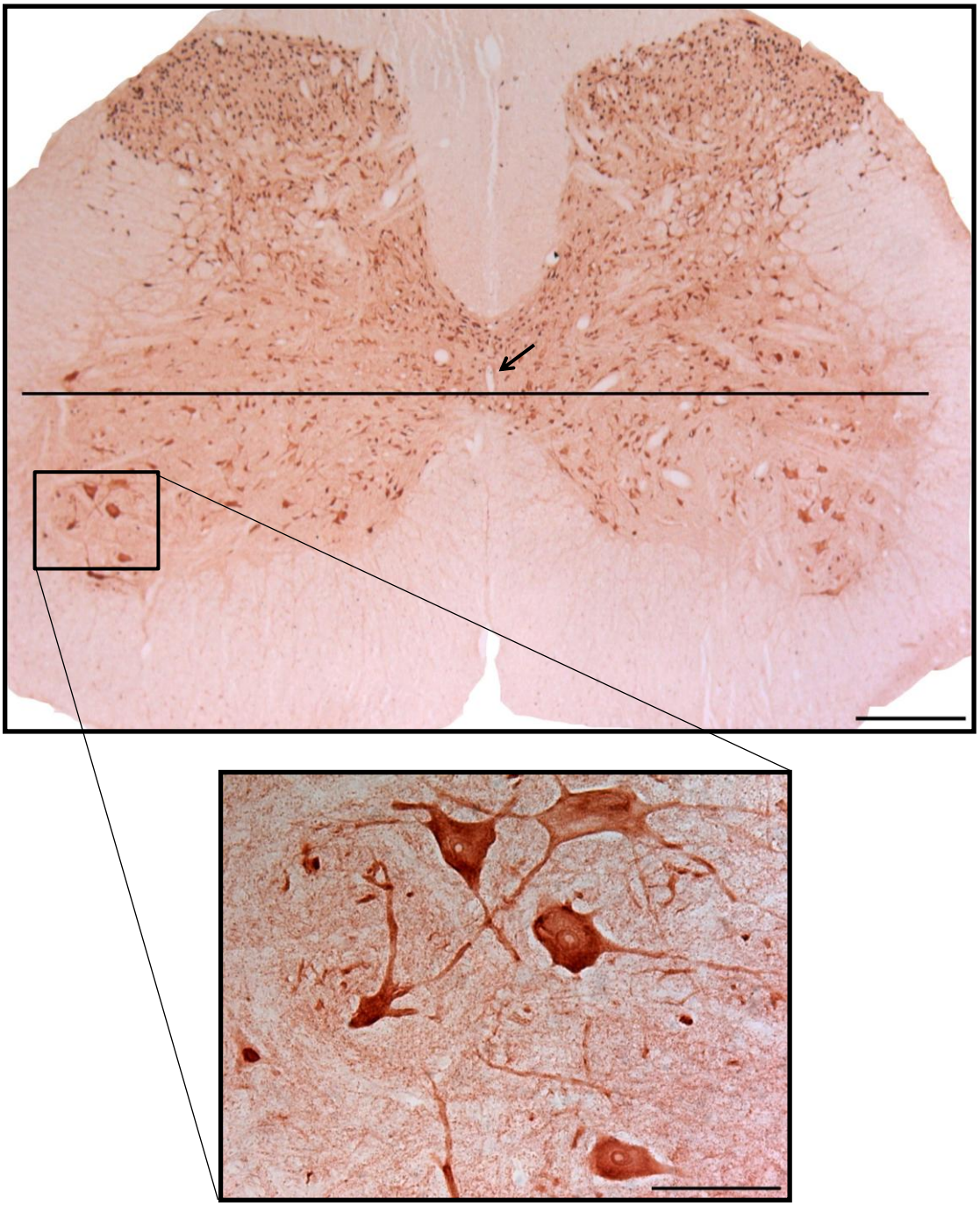

Figura 48 - Corte transversal (14 µm de espessura, imunomarcado para *NeuN*) da medula espinhal de um animal sham, no nível de L5. Em cima, delimitação da área do corno ventral considerada para contagem dos neurônios. A delimitação foi feita por uma linha que passa logo abaixo do canal central, indicado pela seta. Barra de escala 200 µm. Em baixo, ampliação de uma área de dentro do corno ventral, mostrando os detalhes dos neurônios. Nucléolo, núcleo, corpo e processos podem ser identificados a partir da coloração marrom escura. Barra de escala 50 µm.

A contagem de neurônios foi realizada em 15 cortes histológicos de cada animal (TR com n = 5, CTL n = 6 e sham com n = 4),

sendo cinco de cada região da medula espinhal: rostral a lesão, no foco da lesão e caudal a lesão (Gráfico 18). No segmento rostral a lesão não houve diferença estatística significativa do número de neurônios do corno ventral entre os grupos ($F_{1,9}$ = 1,97, p = 0,36), sendo a média para o sham de 13,05 (± 2,61), para o TR de 10,32 (± 1,5) e para o CTL de 9,63 (± 2,76) (Gráfico 19). No foco de lesão houve uma redução significativa do número de neurônios dos animais lesados em relação aos animais do grupo sham ($F_{1,9}$ = 3,69, p = 0,04), mas não houve diferença entre os controles e os treinados ($F_{1,9}$ = 1,09, p = 0,32).

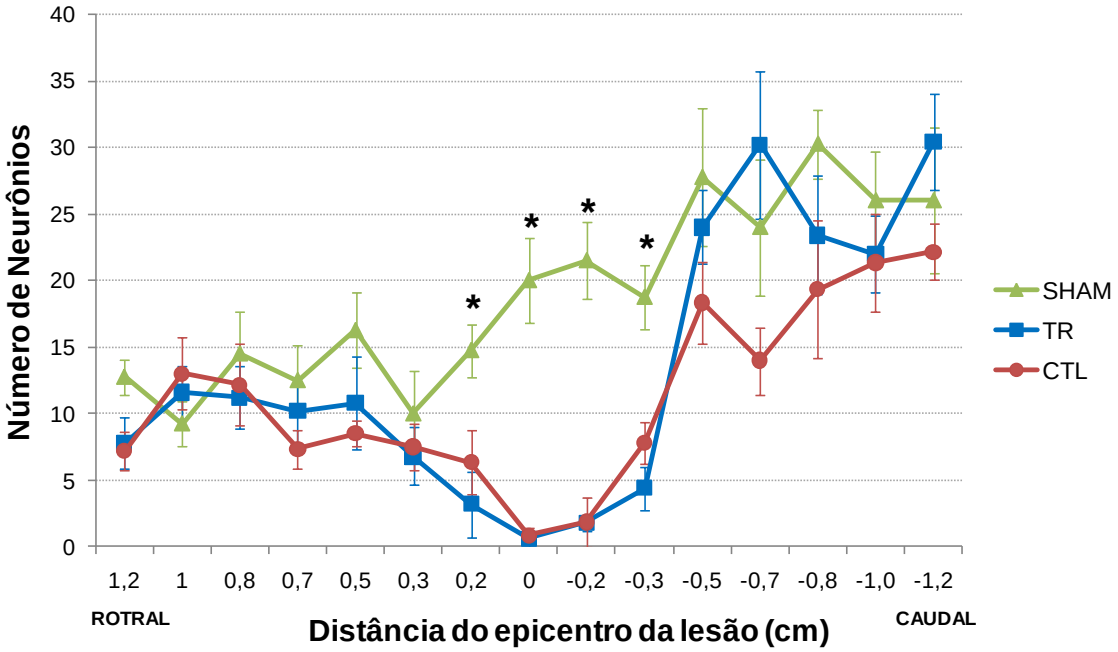

Gráfico 18 - Distribuição do número de neurônios em 15 cortes histológicos no sentido rostro-caudal. Há diminuição significativa do número de neurônios dos grupos lesados em relação ao grupo sham nos cortes ao redor do epicentro de lesão (*p = 0,004).

O gráfico 19 mostra também um menor número de neurônios no segmento caudal a lesão para o grupo CTL quando comparado com os grupo sham e TR ($F_{1,9}$ = 5,57, p = 0,018), os quais apresentaram, aproximadamente, a mesma quantidade de neurônios (**sham:** 26,8 ± 2,34; **TR:**

26 ± 3,99). Outro resultado que pôde ser observado, por meio dos dados do grupo sham, foi o aumento do número de neurônios de acordo com o segmento da medula espinhal no sentido rostro-caudal. Esse resultado era esperado, uma vez que os segmentos lombares apresentam intumescência com grupos de motoneurônios relacionados aos músculos quadríceps e adutores (nível L2-L3), glúteos e isquiostibiais (nível L4-L5).

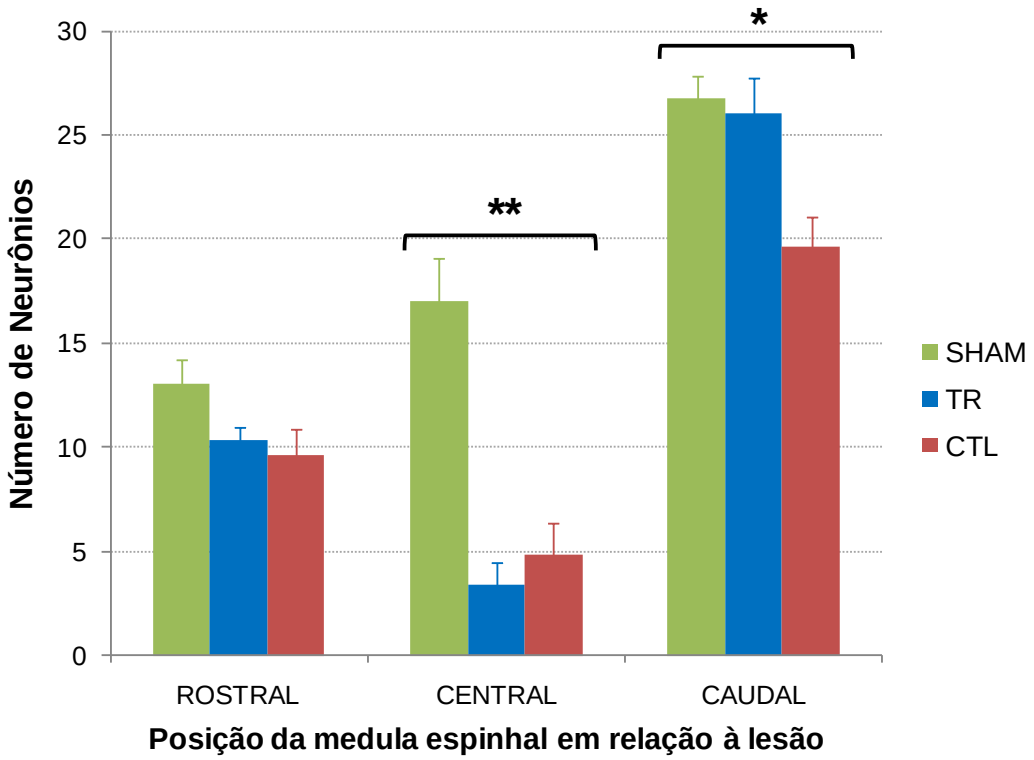

Gráfico 19 - Distribuição do número de neurônios no corno ventral de acordo com o segmento da medula espinhal em relação à lesão medular. Houve diminuição significativa do número de neurônios na região central da lesão para os grupos treinado e controle quando comparados com o grupo sham (**p = 0,004). E no segmento caudal a lesão houve uma diminuição significativa do número de neurônios para o grupo controle em relação aos grupos treinado e sham (*p = 0,018).

5.7. Correlações

A correlação dos dados do volume de lesão foi feita com: o comportamento motor (escala BBB e escada horizontal), considerando todos

os animais lesados; e o comportamento de dor neuropática (alodínea, hiperalgesia mecânica leve e hiperalgesia mecânica intensa), considerando os dados de cinco animais de cada grupo com lesão (animais que apresentaram respostas na avaliação de dor). Os valores do volume de lesão de cada animal foram obtidos a partir da somatória das proporções das áreas de lesão dos sete cortes analisados morfometricamente. Vale lembrar que o cálculo das proporções considera a área total da medula espinhal de cada corte. Os resultados do comportamento motor (escala BBB) também foram correlacionados com os de dor neuropática.

Todos os coeficientes de correlação foram realizados com os valores da última avaliação (realizadas no 56º dPO). Esta análise foi feita a partir de uma função do *MATLAB*, que calcula o coeficiente de correlação e seu respectivo valor de significância. Os valores dos coeficientes foram interpretados da seguinte maneira: entre 0 e 0,3 – fraca correlação; entre 0,31 e 0,7 – correlação moderada; e entre 0,71 e 1,0 – forte correlação (Triola, 1999).

Uma correlação negativa moderada foi encontrada entre o volume de lesão e as avaliações comportamentais motoras (Gráfico 20). Quanto maior a lesão do animal, menor a pontuação da escala BBB ($r = -0,558$, $p = 0,048$) e menor a porcentagem de acertos na escada horizontal ($r = -0,673$, $p = 0,012$). Esse dado indica que quanto mais tecido for preservado, melhor poderá ser a recuperação motora do animal.

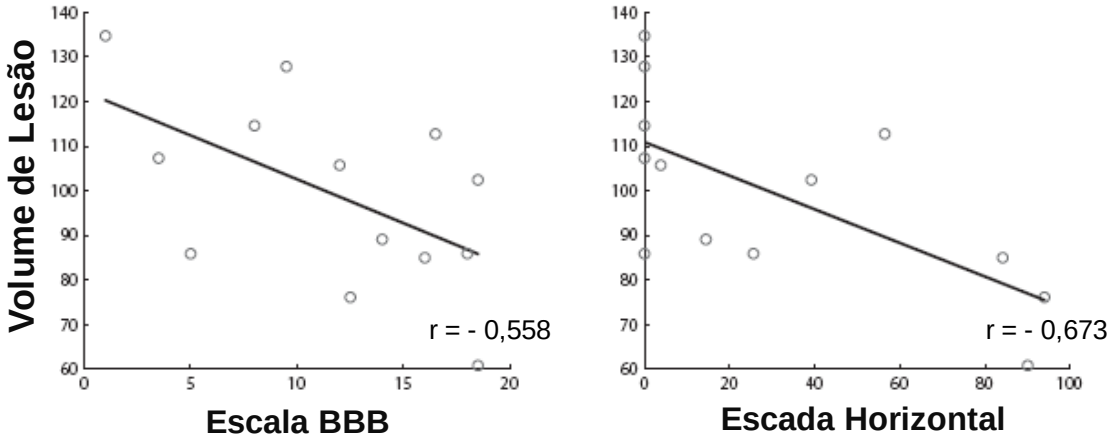

Gráfico 20 - Correlação negativa moderada entre o volume de lesão e as avaliações motoras: escala BBB e escada horizontal, com os valores de "r" indicados, sendo ambas as correlações significativas (p = 0,048 e p = 0,012, respectivamente).

Na correlação feita entre o volume de lesão e as pontuações (em porcentagem) das avaliações de dor (Gráfico 21), verificou-se forte correlação positiva para hiperalgesia intensa (r = 0,825, p = 0,003) e moderada para hiperalgesia leve (r = 0,604, p = 0,065) e alodínea (r = 0,507, p = 0,135), sendo estas duas últimas não significativas. Portanto, pode-se dizer que quanto maior a lesão, maior a dor a um estímulo mecânico intenso.

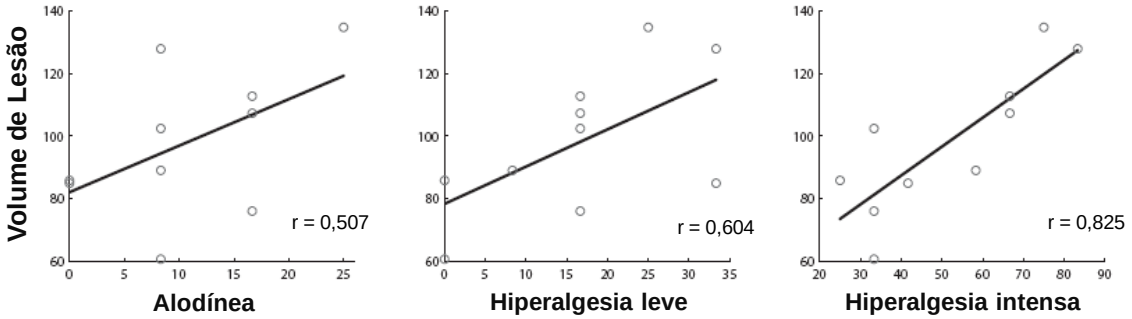

Gráfico 21 - Correlação positiva moderada entre o volume de lesão e alodínea e hiperalgesia mecânica leve, com os valores de "r" indicados. E forte correlação positiva entre o volume de lesão e hiperalgesia mecânica intesa, sendo estatisticamente significativa (p = 0,003).

Quando analisados os dados da pontuação da escala BBB e de dor (Gráfico 22), encontrou-se forte correlação negativa para alodínea (r = - 0,71, p = 0,022) e hiperalgesia intensa (r = - 0,71, p = 0,0215); e moderada não

significativa para hiperalgesia leve (r = - 0,438, p = 0,205). Os animais que apresentaram melhor recuperação motora foram aqueles que o nível de dor a um estímulo tátil ou nocivo intenso foi mais baixo.

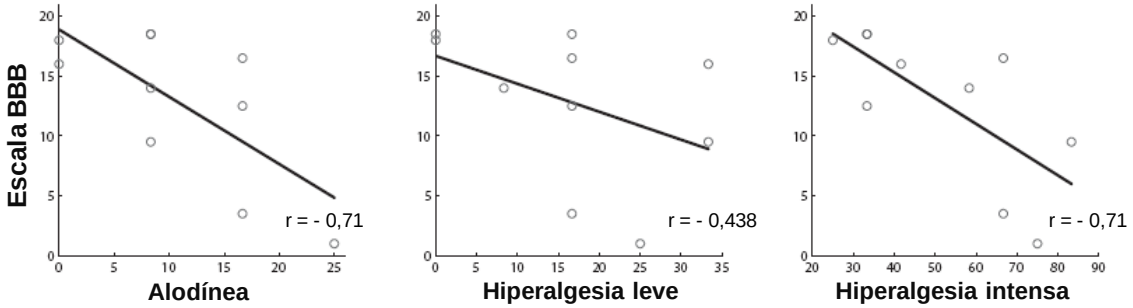

Gráfico 22 - Correlação negativa moderada entre ocomportamento motor e hiperalgesia mecânica leve. E forte correlação positiva entre o comportamento motor e alodínea e hiperalgesia mecânica intesa, com os valores de "r" indicados (p = 0,022 para ambas as correlações).

5.8. Regressões

Os dados eletrofisiológicos também foram analisados de forma conjunta com a escala BBB. Isto é, foi investigada a variação do comportamento motor (definido pelas pontuações da escala BBB) em função das variações da atividade cortical (representada pelos espectros de potência das bandas de frequência). Para isso foi feita uma regressão linear múltipla dos dados dos grupos treinado e controle.

Nesta análise assume-se que existe uma relação linear entre uma variável "*Y*" (a variável dependente) e "*k*" variáveis independentes. Neste trabalho, as pontuações da avaliação motora foram consideradas como variáveis dependentes e as potências médias das bandas de frequência *delta* e *beta* foram consideradas como variáveis independentes. As variáveis independentes são também chamadas variáveis explicativas ou regressores,

uma vez que são utilizadas para explicarem a variação de "*Y*". Ou podem ser chamadas ainda de variáveis de predição, devido à sua utilização para se predizer "*Y*".

Para a regressão, a banda *theta* não foi considerada, pois três dos critérios de seleção dos canais a partir dos espectros de potência foram elaborados com base nos parâmetros desta banda, de modo que ela acabou sendo definida como uma variável com relação invariante entre os grupos, no que diz respeito à influência dela na variação da pontuação da escala BBB. Além disso, quando foi feita a análise das potências médias, a banda *theta* foi a única qua não apresentou tendência a diferenças entre os grupos treinado e controle. Deste modo, a análise de regressão foi realizada na tentativa de entender o quanto a potência *delta* e *beta* explicam o desempenho motor apresentado pelos animais lesados ao longo do tempo (foram considerados os dados de todas as avaliações após a lesão).

O resultado da regressão feita para o grupo controle foi significativo (R^2 = 0,813; p = 0,001), mostrando que o aumento da potência da banda *delta* contribui para desempenho motor apresentado pelo grupo controle (p = 0,0004), enquanto que a banda *beta* não (p = 0,272). Para o grupo treinado, o resultado da regressão também foi significativo (R^2 = 0,903; p = 0,001), sendo encontrado o comportamento oposto do grupo controle, ou seja, o aumento da potência banda *beta* contribui significativamente para o desempenho motor dos animais que treinaram na esteira (p = 0,0001), e a banda *delta* não interfere no desempenho deste grupo (p = 0,262). O gráfico 23 mostra a evolução da pontuação na escala BBB e das potências das bandas

delta e *beta* ao longo do tempo para ambos os grupos, sendo possível observar os resultados encontrados.

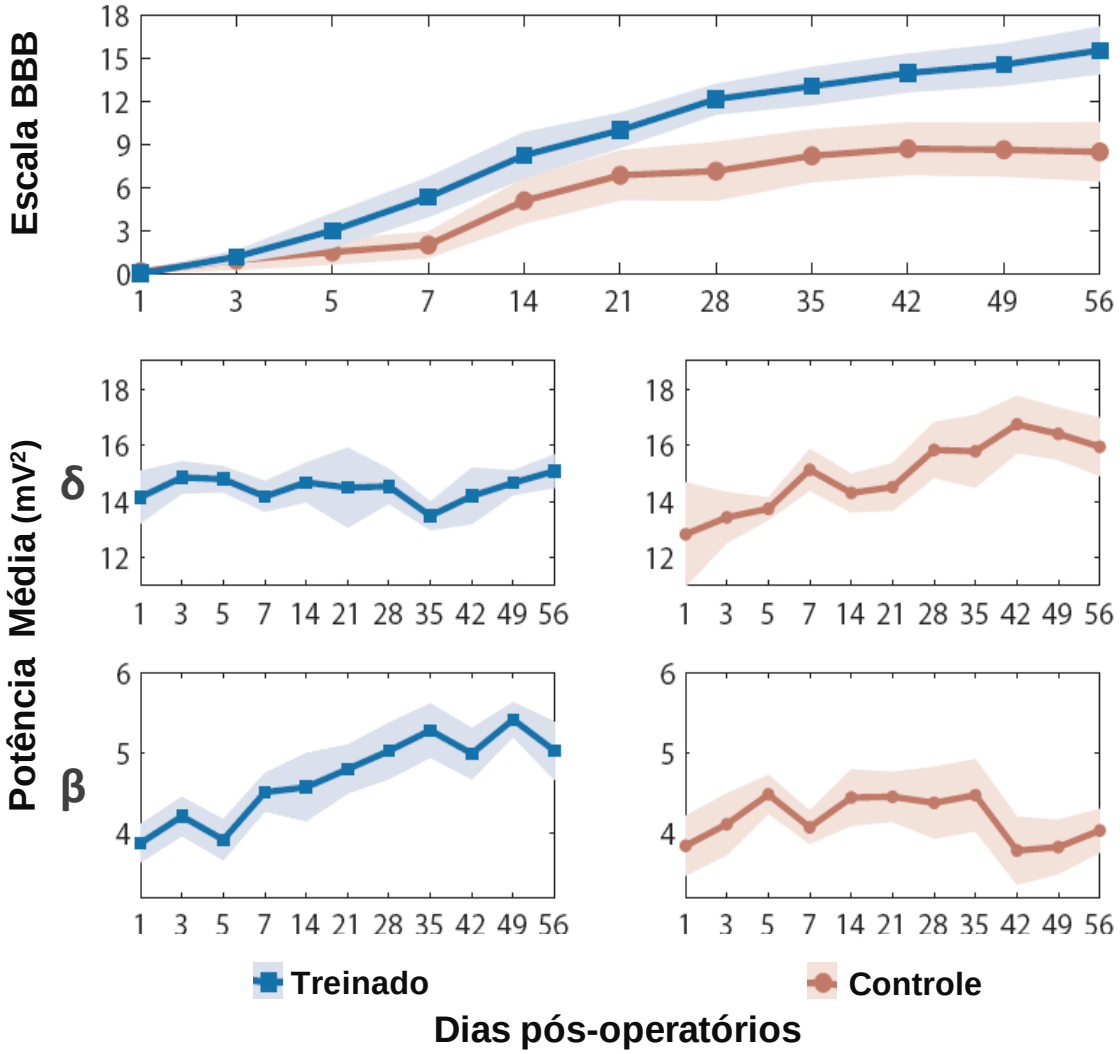

Gráfico 23 - Aumento da banda *beta* (β) para o grupo treinado e aumento da banda *delta* (δ) para o grupo controle contribuem para o desempenho motor observado nestes grupos. As áreas sombreadas correspondem ao erro padrão.

O gráfico 24 apresenta três imagens tridimensionais (com as variáveis: pontuação da escala BBB, potência da banda *delta* e potência da banda *beta*), em diferentes posições, que correspondende às regressões propriamente ditas, para ambos os grupos, mostradas conjuntamente. A partir deste gráfico pode ser identificada uma área de intersecção dos grupos. Esta

área corresponde aos valores das primeiras avaliações após a lesão medular, quando as pontuações da escala BBB são baixas para ambos os grupos. Neste gráfico fica claro que a potência *delta* contribui para o desempenho motor do grupo controle e que a banda *beta* contribui para o desempenho motor do grupo treinado.

A análise de regressão também foi feita para os dados coletados durante o treinamento na esteira, havendo uma repetição do resultado encontrado no campo aberto. O resultado obtido nesta análise também foi significativo (R^2 = 0,867, p = 0,002). Durante o exercício há aumento da potência da banda *beta* na atividade cortical (p = 0,007) que influencia o desempenho motor dos animais treinados. A banda *delta*, por sua vez, não apresenta alterações e, portanto, não contribui para o comportamento motor deste grupo (p = 0,702).

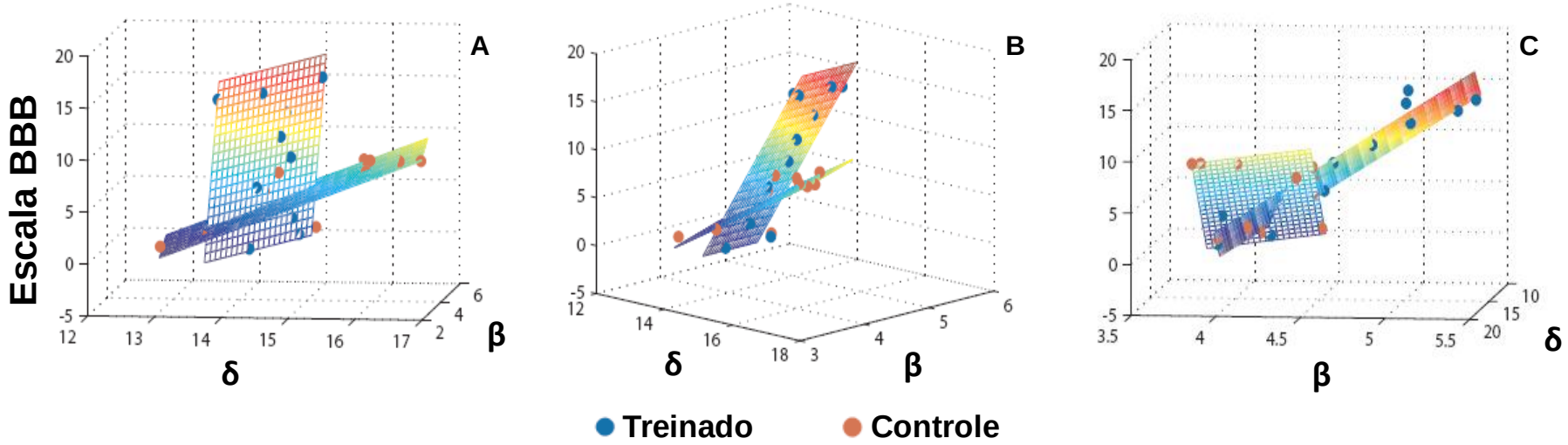

Gráfico 24 - Representação gráfica da regressão dos valores da pontuação da escala BBB em função das potências das bandas *delta* e *beta* para os grupos treinado e controle. Cada ponto corresponde aos resultados de um dia de avaliação após a lesão medular, havendo, portanto, 11 pontos para cada grupo (nem todos são identificados nesta figura devido à posição deles no espaço tridimensional). Há aumento da potência *delta* conforme aumenta a pontuação da escala BBB para o grupo controle e não há relação desta banda de frequência com o comportamento motor do grupo treinado (A). Há intersecção da regressão dos grupos em pontos que os valores da escala BBB são baixos (B). Há aumento da potência *beta* conforme aumenta a pontuação da escala BBB para o grupo treinado e não há relação desta banda de frequência com o comportamento motor do grupo controle (C).

6. DISCUSSÃO

O objetivo principal do tratamento de indivíduos lesados medulares é promover a recuperação funcional, visando uma maior independência e, consequentemente, melhor qualidade de vida. Deste modo, estudos experimentais são de grande importância na tentativa de mimetizar as implicações clínicas da lesão medular, entender melhor os mecanismos envolvidos nesta lesão e traçar estratégias terapêuticas mais eficazes.

A maioria das lesões medulares em humanos envolve dano tecidual devido a rápidos movimentos da coluna vertebral com impacto ósseo contra a medula, assim como o modelo de contusão medular em ratos (Basso, 2000; Vialle *et al.*, 2002; Basso *et al.*, 2002; Ianotti *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2011) que possibilita um controle do grau da lesão com reprodutibilidade consistente (Basso *et al.*, 1995). Este fato é relevante, uma vez que a identificação de protocolos de tratamento é de grande necessidade, exigindo o uso de modelos experimentais padronizados que possam ser comparados em relação a diferentes tipos de abordagens terapêuticas.

Dentre as várias alterações decorrentes da lesão medular, a perda de peso tem sido relatada como uma alteração de rápida instalação (Erschbamer *et al.*, 2006; Baastrup *et al.*, 2010; Ramsey *et al.*, 2010). Corroborando com os resultados apresentados na literatura, neste trabalho os animais submetidos à lesão medular moderada apresentaram perda de peso no primeiro dia após o trauma. De acordo com Ramsey e colaboradores (2010), a perda aguda (primeiro e segundo dia após a lesão) de peso resulta

principalmente da diminuição de ingestão de água e comida. Nos dias seguintes, uma rápida e progressiva atrofia dos músculos dos membros posteriores também começa a contribuir para perda de peso.

O comportamento motor e sensorial em modelos experimentais após a LM por contusão sofre diversas alterações que podem ser quantificadas a partir de escalas padronizadas e testes específicos, tais como: resposta reflexa, análise de pegadas, cinemática (Kunkel-Bagden *et al.*,1993), escala BBB (Basso *et al.*, 1995), atividade exploratória em campo aberto (Metz e Whishaw, 2000), *von Frey Hair Test* (Hutchinson *et al.*, 2004; Kloos *et al.*, 2005), *grid walking* (Ma *et al.*, 2001; Erschbamer *et al.*, 2006; Bigbee *et al.*, 2007), eletromiografia (Bolton *et al.*, 2006), escada horizontal (Cummings *et al.*, 2007; Girgis *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2011), entre outros (para revisão ver Šedý *et al.*, 2008).

A escala BBB e a escada horizontal foram utilizadas para verificar o desempenho sensório-motor dos animais no decorrer de 56 dias pós-operatórios. A escala BBB mostrou-se precisa e detalhada em relação aos aspectos motores envolvidos na lesão medular, sendo confiável na quantificação da recuperação motora do modelo experimental utilizado. O grupo sham apresentou pontuação máxima da escala desde o primeiro dia pós-operatório, demonstrando que o procedimento cirúrgico sem a LM não causa comprometimento motor. Na escada horizontal, este grupo também manteve um bom desempenho ao longo do experimento, apresentando poucas ou nenhuma escorregada ao atravessar a escada tanto antes como após a cirurgia sham de lesão medular. Deste modo, pode-se afirmar que as alterações no comportamento sensório-motor observadas nos animais dos

grupos controle e treinado foram exclusivamente provenientes da lesão por contusão e não do procedimento cirúrgico para realizar a lesão.

O grupo controle apresentou uma recuperação motora no decorrer dos dias sem ter sido submetido a qualquer tipo de treinamento. Este dado indica que existe uma recuperação espontânea após a lesão medular experimental. Isto já foi descrito por Kim *et al.* (2006), ao afirmarem que algum grau de recuperação funcional pode ser observado sem intervenções. Esta recuperação é mediada por uma reorganização estrutural do sistema motor residual. A remodelação compensatória pode ocorrer em múltiplos níveis neurais, incluindo córtex motor, tronco cerebral, centros motores espinhais e tratos motores supra-espinhais descendentes (Hulsebosch, 2002; Bareyre, 2008).

Dietz e Curt (2006) disseram que apesar de existir uma recuperação espontânea, ela é retardada pela habilidade limitada do sistema nervoso central dos mamíferos em restabelecer conexões neuronais funcionais. Isto está de acordo com os nossos dados, uma vez que a pontuação atingida na escala BBB no 35º dPO pelos animais controles foi a mesma apresentada pelos animais treinados já no 14º dPO. No entanto, do 7º até o 28º dPOs houve uma melhora importante do grupo controle, seguida por praticamente uma estabilização. Um platô da pontuação da escala BBB já foi notado também em diferentes trabalhos quando os animais não são submetidos a alguma estratégia terapêutica, ou até mesmo quando são submetidos a um tratamento ineficaz (Loy *et al.*, 2002; Basso *et al.*, 2002; Houle e Tessler, 2003; Kloos *et al.*, 2005; Erschbamer *et al.*, 2006).

Em relação à avaliação proprioceptiva na escada horizontal, Cummings *et al.* (2007) mostraram que ela é capaz de discriminar níveis mais finos de recuperação motora do que as avaliações em campo aberto. Os animais lesados arrastaram os membros posteriores durante a primeira semana depois da lesão e após este período começaram a posicionar as patas nos filetes de ferro ou entre eles. Apesar de alguns trabalhos, que adotaram diferentes tratamentos, não terem identificado diferenças entre os grupos tratados e os controles (Erschbamer *et al.*, 2006; Girgis *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009), o treinamento na esteira realizado neste estudo proporcionou uma melhor interação entre os componentes motores e sensoriais, induzindo uma resposta mais adequada dos animais treinados no desempenho desta avaliação.

Girgis e colaboradores (2007) acreditam que os animais que são treinados a realizar uma tarefa motora após a lesão medular apresentam melhora específica no desempenho dessa tarefa, mas não de outra tarefa que exija um comportamento motor semelhante. Esses autores ainda comparam os seus resultados com tratamento de pacientes lesados medulares incompletos que treinam andar para frente, e quando são testados a andar para trás, apresentam pior desempenho do que pacientes que não treinam nada, mostrando novamente melhora específica da tarefa treinada.

Os animais treinados apresentaram uma melhora no desempenho da tarefa na esteira, identificada pela diminuição progressiva de auxílios fornecidos durante o treinamento. Além disso, a atividade física proposta mostrou que também é capaz de promover tanto melhora no comportamento motor geral (escala BBB), como em uma tarefa motora mais

refinada (escada horizontal), não sendo um treinamento que impõe limitações na recuperação. Este tipo de estratégia terapêutica deve ser adotado quando pensamos em pacientes com comprometimentos motores. É preciso sempre otimizar as informações sensoriais e motoras durante um programa de reabilitação, para que resultados benéficos sejam atingidos, de forma a aumentar a independência e, consequentemente, a qualidade de vida do indivíduo lesado medular.

A medula espinhal possui uma extensa capacidade de aprender novas tarefas motoras, como dar passos com descarga peso, na ausência de aferências supra-espinhais (Bigbee *et al.*, 2007). Segundo Dietz e Harkema (2004), *input* sensorial adequado durante o treinamento é de importância crítica para alcançar um *output* motor eficaz da circuitaria neuronal espinhal residual. A interação entre informações sensoriais específicas com o *CPG* é essencial para uma locomoção de sucesso após a LM. Com isso, acreditamos que o treinamento na esteira pode ativar as redes neuronais por meio de *input* sensorial fornecido, principalmente nas sessões iniciais, quando o treinamento foi realizado com auxílio de um dispositivo ou auxílio manual.

O dispositivo auxiliar, utilizado nos treinamentos dos animais deste trabalho logo após a LM, realizava os movimentos dos membros posteriores de forma padronizada, mantendo ritmicidade, coordenação e amplitude de movimento a cada ciclo da marcha. Quando os animais começaram a apresentar movimentos dos membros posteriores, eles não se adequavam mais ao treinamento com o dispositivo auxiliar, sendo necessária a realização do treinamento com auxílio manual até que eles se tornassem independentes.

Nos dias de hoje, muitos trabalhos têm feito uso de auxílio robótico durante o treinamento na esteira com suporte de peso tanto em humanos (Winchester *et al.*, 2005; Duschau-Wicke *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2011), como em modelos animais (Fong *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011). Neste tipo de treinamento não há assistência manual do terapeuta ou experimentador. Segundo Lee e colaboradores (2011), o treinamento robótico executa padrões de movimentos rígidos dos membros, o que pode ser vantajoso na geração de padrões precisos de *input* sensorial que são críticos para o aprendizado da marcha após a lesão medular.

Por outro lado, os mesmos autores reforçam a idéia de que o auxílio manual permite a variabilidade do movimento dos membros durante as passadas e o terapeuta pode ajustar a quantidade de auxílio durante o treinamento, o que pode encorajar um maior esforço para gerar uma marcha mais independente. A variabilidade da cinemática e a participação ativa são consideradas promotoras do aprendizado motor e reabilitação (Duschau-Wicke *et al.*, 2010). O protocolo de treinamento adotado neste trabalho abordou as duas estratégias mencionadas e provou ser eficaz na recuperação funcional dos animais treinados, que ao final do experimento mostraram aprendizado motor.

A partir do estudo de Duschau-Wicke *et al.* (2010) pode-se dizer que o programa de reabilitação adotado no nosso trabalho (com diminuição progressiva da quantidade de auxílio fornecida), talvez seja o melhor para indivíduos com lesão medular. Eles sugerem que o treinamento robótico pode ser mais eficaz para pacientes com lesões mais graves, que estão no início do programa de reabilitação e pode não ser o ideal para

pacientes que estejam em uma fase mais adiantada da recuperação. Os autores ressaltam ainda, que aqueles pacientes que estão na fase de transição requerem um suporte físico durante o treinamento. Este fato reforça a idéia de que avaliar e comparar o comportamento sensório-motor dos animais treinados com os animais controles deste trabalho pode ajudar no entendimento dos mecanismos envolvidos na lesão medular e no processo de reabilitação, podendo trazer benefícios aos pacientes que se encontram nesta condição

Liebermann *et al.* (2006) afirmam que a recuperação funcional após uma lesão ou doença depende de diversos fatores, tais como a frequência, a duração e a intensidade de esforço oferecido pela reabilitação e não somente do tipo de treinamento que é realizado. De Leon e colaboradores (2011) mostraram isso em um trabalho feito com ratos lesados medulares que foram submetidos ao treino na esteira com 100 passos ou 1000 passos. Para eles ficou evidente que as melhorias na marcha (maior descarga de peso principalmente) do grupo treinado com 1000 passos ocorreram devido à maior intensidade de treino.

Nós também pudemos observar isso ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com um anterior feito pelo nosso grupo, no qual os animais tinham que subir e descer uma rampa durante 12 minutos. (Miranda *et al.*, 2010). O treino foi realizado duas vezes na semana por cinco semanas. Uma melhora funcional de ratos lesados após treinamento motor foi observada em comparação ao grupo controle (sem exercício). Apesar de os animais terem atingido uma pontuação maior do que os controles na escala BBB, principalmente no início do experimento, a diferença não foi significativa no final do experimento. Quando esses dados são comparados com os dados

dos animais treinados no presente trabalho, há uma recuperação motora superior do grupo treinado na esteira. Isso nos mostra que apesar do treinamento motor influenciar de forma importante na recuperação funcional do animal logo após a lesão, é necessário que ele seja realizado de maneira eficiente, levando em consideração a frequência, intensidade e duração, para atingir uma melhora contínua a longo prazo.

Além do comportamento motor, a evolução da dor neuropática e térmica após o procedimento de lesão foi avaliada por meio de dois testes, *von Frey Hair Test* e *Hargreaves*, respectivamente. Diferentes metodologias estão descritas na literatura para avaliar dor após lesão medular experimental por meio do *von Frey Hair* (Drew *et al.*, 2004; Hutchinson *et al.*, 2004; Kloos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Gwak *et al.*, 2006; Gwak *et al.*, 2008), tais como: uso dos monofilamentos em ordem crescente; ou em ordem decrescente; ou início no monofilamento intermediário e dependendo da resposta do animal, o próximo monofilamento a ser utilizado pode ser de diâmetro maior ou menor; ou até mesmo, o uso de somente um monofilamento. Além da ordem em que os monofilamentos são usados para dar o estímulo, a quantidade de vezes, o local exato em que se deve aplicar o estímulo, e as respostas dos animais (retirada, lambida ou chacoalhada da pata, vocalização, andar, morder o monofilamento) também são apresentados de formas diferentes. Este fato dificulta a comparação dos dados obtidos entre as diferentes pesquisas.

A metodologia adotada no nosso trabalho para avaliar a dor neuropática foi usar três monofilamentos que indicam a presença de alodínea, hiperalgesia mecânica leve e hiperalgesia mecânica intensa (Takasaki *et al.*, 2001). Vale ressaltar que para avaliar dor abaixo do nível de lesão é preciso

utilizar métodos que levem em consideração o substrato neuronal supostamente envolvido neste tipo de dor. Isto é, acredita-se que a dor abaixo do nível de lesão possua componentes tanto espinhais, como supra-espinhais (Bennet *et al.*, 2000; Hulsebosh, 2002; Yezierski, 2005; Baastrup *et al.*, 2010). Deste modo, as avaliações de dor precisam incluir a observação de comportamentos para ambos os componentes. O método utilizado neste trabalho considera a presença de dor por alterações na medula espinhal (retirada da pata) e em segmentos supra-espinhais (lambida da pata).

Devido aos estímulos terem sido aplicados nas patas posteriores (abaixo do nível de lesão), a obtenção de respostas foi dificultada, uma vez que os animais perdem os movimentos dos membros posteriores logo após a LM. Deste modo, os dados anteriores à lesão só puderam ser comparados com os resultados das três últimas avaliações realizadas no experimento, correspondentes aos 42º, 49º e 56º dPOs. O grupo sham não apresentou alterações aos estímulos tátil e mecânicos após o procedimento cirúrgico sem a lesão medular, indicando que as alterações encontradas nos grupos lesados foram decorrentes da LM e do programa de reabilitação.

O primeiro resultado observado nos animais lesados foi um aumento da resposta dolorosa ao estímulo tátil, isto é, presença de alodínea. Este resultado está de acordo com vários estudos que relataram aumento da dor a um estímulo não nocivo após a lesão medular por contusão (Hutchinson *et al.*, 2004; Kloos *et al.*, 2005; Hulsebosch *et al.*, 2009; Baastrup *et al.*, 2010). O treinamento realizado na esteira não influenciou na resposta a este estímulo, de forma que os animais treinados não diferiram dos controles.

Por outro lado, os animais lesados treinados não apresentaram hiperalgesia mecânica, diferentemente dos animais lesados controles. Já foi demonstrado que há aumento da atividade elétrica dos neurônios centrais envolvidos nas vias de dor, em níveis espinhais e supra-espinhais após a LM (Bennet *et al.*, 2000; Hulsebosh, 2002). Essas alterações podem ser causadas diretamente pela lesão na medula (excitação dos neurônios espinhais de projeção e/ou morte de neurônios inibitórios), ou indiretamente pelos efeitos centrais patológicos (hiperexcitabilidade por deaferentação dos neurônios de ordem superior ou ativação glial; Bedi *et al.*, 2010). Intervenções neuroprotetoras que limitam a perda neuronal resultam na prevenção ou no início tardio dos comportamentos de dor (Yezierski, 2005). Deste modo, acreditamos que o treinamento na esteira possa ter sido neuroprotetor, evitando o surgimento de hiperalgesia mecânica.

Os diferentes resultados encontrados para alodínea e hiperalgesia pode ser devido aos diferentes mecanismos envolvidos nestes tipos de dor neuropática. O estímulo para testar alodínea foi tátil (não nocivo – sensação epicrítica) e o para testar hiperalgesia foi mecânico (nocivo leve ou intenso – sensação protopática), portanto, diferentes tipos de sistemas somatossensoriais foram ativados inicialmente, o sistema coluna dorsal-lemnisco medial (ativação de fibras de limiar baixo, altamente mielinizadas, do tipo Aβ) e o ântero-lateral (ativação de fibras de limiar alto, amielínicas, do tipo C e/ou pouco mielinizadas, do tipo Aδ), respectivamente (Berger *et al.*, 2011; Woolf, 2011). Para entender como um estímulo não nocivo gera dor, é preciso entender o mecanismo de sensibilização central que ocorre após a LM.

A sensibilização central é um dos fenômenos mais relevantes para a produção de respostas anormais a estímulos nocivos e não nocivos, que se estendem para além do foco de lesão (Hulsebolsch *et al.*, 2009; Latremoliere e Woolf, 2009). Este fenômeno corresponde a potencialização do estado funcional dos neurônios e circuitos envolvidos nas vias nociceptivas, causada por aumento da excitabilidade da membrana ou da eficiência sináptica, e/ou por redução da inibição (Hulsebolsch *et al.*, 2009; Latremoliere e Woolf, 2009).

A maioria das aferências sinápticas aos neurônios é abaixo do limiar, agindo subliminarmente devido à aferência sináptica ser muito fraca ou por a excitabilidade da membrana ser restringida por aferências inibitórias. Com a sensibilização central, as aferências subliminares se tornam supraliminares, produzindo profundas mudanças nas propriedades sinápticas funcionais (Hulsebolsch *et al.*, 2009; Woolf, 2011). Perda de aferências pré-sinápticas ocorre pela degeneração das fibras do tipo C na lâmina II de Rexed e há o aumento da capacidade de crescimento axonal intrínseco, desencadeado pelas respostas regenerativas dos neurônios lesados. Essas modificações fornecem um ambiente favorável e bases moleculares para as fibras do tipo Aβ “brotarem” das lâminas III e IV para as lâminas I e II, fazendo contato com os neurônios nociceptivos-específicos. Assim sendo, as duas vias sensoriais paralelas agora convergem, fazendo com que o estímulo tátil não nocivo produza uma resposta dolorosa (Latremoliere e Woolf, 2009; Woolf, 2011).

Berger e colaboradores (2011) também descrevem que os neurônios espinhais do corno dorsal contêm um circuito “silente” entre as fibras

de baixo limiar (Aβ) e os neurônios de projeção específicos de dor (fibras do tipo C), que quando ativados, supostamente ‘tornam toque em dor’. Segundo os autores, a composição deste circuito ainda não é totalmente conhecida. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o treinamento na esteira pode não fornecer os estímulos necessários para modular esta via, uma vez que os animais treinados apresentaram alodínea após a lesão, assim como os animais controles.

Sabe-se que a LM traumática causa uma diminuição do tônus GABAérgico e glicinérgico na medula espinhal, em grande parte devido à apoptose de interneurônios inibitórios, resultando frequentemente em dor neuropática (Drew *et al.*, 2004; Gwak *et al.*, 2006; Gwak *et al.*, 2008). Já foi mostrado também que o treinamento na esteira é capaz de modular a inibição mediada por GABA e glicina na medula espinhal adulta de gatos lesados (Maier e Schwab, 2006). Além disso, Hutchinson e colaboradores (2004) verificaram retorno da expressão de *BDNF* ao nível normal na medula espinhal e normalização ou aumento da expressão de *NT-3* no músculo sóleo e na medula espinhal em animais que foram treinados na esteira após a LM. Os autores atribuíram a diminuição de hiperalgesia abaixo do nível de lesão a estes efeitos, uma vez que os animais não treinados não apresentaram estas alterações na expressão dos fatores neurotróficos e apresentaram dor. Esses estudos mostram que o treinamento na esteira realizado neste trabalho pode ativar mecanismos moleculares necessários para equilibrar os processos sensoriais, que estão envolvidos na geração da hiperalgesia, resultando em uma diminuição da mesma.

Evidências de que um maior nível de dor está relacionado com um pior desempenho motor foram encontradas, a partir da forte correlação negativa existente entre o comportamento motor e a dor neuropática (alodínea e hiperalgesia intensa) apresentada pelos animais lesados deste trabalho. Este dado corrobora com o estudo de Ferguson e colaboradores (2006), no qual é mostrado que um estímulo periférico incontrolável (como por exemplo: choque não contingente, inflamação) resulta em más adaptações espinhais plásticas, que levam à sensibilização central. Esta, por sua vez, limita a recuperação motora por gerar um déficit no aprendizado espinhal.

Em relação à avaliação da dor térmica, apesar de alguns pesquisadores terem encontrado diminuição na latência da resposta ao estímulo térmico após a LM (Christensen *et al.*, 1996; Hoschouer *et al.*, 2010), não foram encontradas alterações nas respostas dos animais no presente trabalho nem após as cirurgias sham e de lesão medular propriamente dita e nem após o procedimento de reabilitação. Portanto, pode-se dizer que a dor térmica não contribui para o entendimento dos outros resultados obtidos neste trabalho. Igualmente aos nossos dados, Maier e colaboradores (2009) não observaram diferenças nos limiares de dor térmica antes e após a lesão e nem diferenças entre os grupos que foram submetidos ao treinamento, o controle e o sham, utilizando a mesma metodologia para avaliar a dor térmica (*Hargreaves*).

Pesquisadores afirmam que a plasticidade de centros neuronais na medula espinhal pode ser potencializada por meio de um treinamento específico tanto em humanos, como em modelos experimentais (Bregman, 1998; Basso, 2000; Dietz, 2002; Houle e Tessler, 2003; Dietz,

2003). De acordo com Norrie *et al.* (2005), o treinamento precoce facilita as sinapses que estão mais plásticas antes do desenvolvimento de conexões reflexas aberrantes. Eles afirmam também que a plasticidade neural induzida pelo treinamento ocorre em locais que estão distantes do foco de lesão, tais como medula espinhal lombar, tronco cerebral e córtex sensório-motor.

Embora a lesão medular não afete diretamente os neurônios corticais, já foi demonstrado que ela afeta áreas sensório-motoras conectadas à área lesada e pode resultar em uma reorganização destas regiões com o objetivo de compensar a perda sensório-motora (Tran *et al.*, 2004; Maier e Schwab, 2006). A reorganização do córtex pode ocorrer por mudanças tanto estruturais como funcionais. Alterações estruturais envolvem mudanças sinápticas, como aumento do diâmetro e comprimento de dendritos, fornecendo novas oportunidades de conexões. E, funcionalmente, alterações podem incluir modificação da eficácia sináptica ou da atividade neuronal (Kokotilo *et al.*, 2009).

A eletrofisiologia é uma ferramenta importante para o estudo da plasticidade cortical, que permite a identificação de padrões patológicos da atividade cerebral (Herbert *et al.*, 2007). Aguilar e colaboradores (2010) mostraram com este tipo de avaliação, que imediatamente após a transsecção da medula espinhal em ratos (ainda anestesiados devido ao procedimento cirúrgico de LM) há mudanças na atividade cortical somatossensorial. Também foi encontrado no presente trabalho alterações eletrofisiológicas no córtex sensório-motor, em um período agudo da lesão, no 1° dPO. Especificamente, houve aumento da potência da banda *theta* e diminuição da potência da banda *beta* quando comparados os valores de antes com os após a contusão. No

entanto, essas alterações não foram mantidas por muito tempo, havendo um retorno da atividade cortical basal nos 3° e 5° dPOs.

Na literatura está consolidado que logo após o trauma ocorre o choque medular (Nacimiento e Noth, 1999; Ditunno *et al.*, 2004; Boland *et al.*, 2011). Esta condição foi revista por Ditunno e colaboradores em 2004, e segundo os autores ela pode ser divida em quatro estágios principais: o primeiro compreende às 24 horas iniciais, nas quais há arreflexia ou hiporreflexia, e paralisia flácida; o segundo ocorre do primeiro ao terceiro dia após a LM e há um retorno dos reflexos; o terceiro se extende até o primeiro mês, sendo caracterizado por hiperreflexia precoce; e por fim, o quarto estágio que pode se prolongar até o primeiro ano após a lesão e tem como característica a hiperreflexia tardia.

Cada um desses estágios possivelmente possui um mecanismo neuronal envolvido. Imediatamente após a lesão dos animais deste trabalho, foi feita a pinçada da pata posterior para verificar o reflexo de retirada, e foi constatada a ausência do mesmo para todos os animais. Apesar de no 1º dPO não ter sido testado o reflexo novamente, foi notada total ausência de movimentos dos membros posteriores, como demonstrado por meio da avaliação motora no campo aberto, indicando a presença da primeira fase do choque medular nestes animais.

Já no 3º dPO, alguns movimentos suaves, principalmente das articulações proximais dos MMPP puderam ser observados. Esses dados sugerem a presença da fase dois do choque medular, quando há uma recuperação dos reflexos. Talvez as alterações encontradas na atividade cortical se devam aos mecanismos neuronais responsáveis pelas fases do

choque medular. De acordo com Ditunno *et al.* (2004), nas primeiras 24 horas após a lesão, a principal causa da arreflexia é a perda da excitação normal supraespinhal. Nós podemos interpretar que da mesma forma que a medula espinhal perde as informações supraespinhais, o córtex deixa de receber as aferências medulares. Deste modo, a atividade cortical pode sofrer adaptações em um período agudo, como apresentado pela eletrofisiologia.

Maier e Schwab (2006) afirmam que as modificações corticais que ocorrem minutos a horas após uma deaferentação, em humanos, podem ser mediadas por uma ativação das conexões previamente existentes, porém funcionalmente inativas. Segundo os autores, o "despertar" das sinapses silentes é causado por aumento da liberação de transmissores excitatórios, aumento da densidade de receptores pós-sinápticos e mudanças na condutância das membranas por diminuição das aferências inibitórias. Esses fatores podem ter contribuído para as alterações eletrofisiológicas encontradas no córtex sensório-motor dos ratos lesados medulares.

A frequência *theta* está relacionada com os estados de alerta e atenção (MacKay, 2005; Machado *et al.*, 2007; Baumeister *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2010). O aumento da potência desta banda no 1º dPO pode estar relacionado com o aumento destes estados nos animais lesados, uma vez que eles têm que se adaptar a nova condição de marcha. Após o trauma, antes de o comportamento motor ser re-adquirido, é preciso que os animais gerem estratégias para se locomoverem, o que também pode exigir maior nível de atenção dos animais.

A banda *beta*, por outro lado, apresentou uma diminuição de sua potência no primeiro dia após a LM em relação aos valores basais. Uma

perda da sincronização em *beta* já foi notada em humanos com lesão medular por Gourab e Schmit (2010), que relacionam a este fato o aumento da dificuldade de movimentar a extremidade paralisada, resultando em maior comando motor. Cassim e colaboradores (2001) também verificaram a abolição da sincronização em *beta* durante o movimento passivo do dedo indicador de indivíduos com bloqueio do nervo induzido por isquemia, enquanto que ela estava presente durante o movimento passivo realizado em sujeitos intactos. Os autores sugeriram que uma sincronização adequada da banda *beta* não está relacionada somente com aspectos motores, requisitando também aferências sensoriais adequadas da periferia. Estes estudos ajudam na compreensão dos nossos dados, visto que os animais lesados apresentaram grandes alterações dos comportamentos motores e sensoriais logo após o trauma.

Interessantemente, ao longo do tempo ocorreu o inverso do notado no 1º dPO para a banda *beta* do grupo treinado, ou seja, houve um aumento da potência desta frequência. Kokotilo e colaboradores (2009) constataram, a partir de uma revisão de literatura, que no período subagudo da lesão há maior ativação de áreas pré-motoras que podem refletir o planejamento de novas estratégias motoras, enquanto que a atividade em M1 diminui. Segundo os autores, conforme as estratégias vão sendo aprendidas, a ativação segue em direção ao córtex motor primário. A diferença tardia encontrada entre os grupos após a LM pode ter ocorrido devido à reorganização cortical em áreas primárias surgirem também de forma tardia.

Um aumento da frequência *beta* já foi demonstrado por Herbert e colaboradores em 2007, em um estudo feito com indivíduos lesados

medulares. No entanto, a atividade cortical desses indivíduos foi registrada com eles de olhos fechados, sem realizar nenhuma atividade por dois minutos. Deste modo, os autores atribuíram esse aumento de *beta* a uma hiperexcitabilidade que é produzida pelo desequilíbrio entre excitação e inibição que pode existir no cérebro de indivíduos após a LM.

Porém, os nossos dados mostraram que com o treinamento houve um aumento da potência de *beta*, no 42º e 49º dPOs, em relação aos animais controle, e a melhora do comportamento motor dos animais treinados foi significativamente maior também. Este fato indica que essa banda pode ter alguma influência na reorganização cortical responsável por mediar uma melhora funcional, corroborando com estudos que mostram que a banda *beta* está relacionada com uma regulação das aferências sensoriais que são relevantes para a organização da resposta motora (Cassim *et al.*, 2001; MacKay, 2005; Kristeva *et al.*, 2007; Lalo *et al.*, 2007).

Além disso, após a lesão medular os centros superiores ficaram desconectados das circuitarias medulares abaixo do nível de lesão responsáveis por coordenar os movimentos. Com isso a frequência *beta* pode permanecer presente, refletindo a tentativa de iniciar e parar o movimento, uma vez que existem diversos estudos que relacionam a presença desta oscilação cortical em áreas motoras com o início e término do movimento (Parkes *et al.*, 2006; Keinrath *et al.*, 2006; Erbil e Ungan, 2007; Gulyás *et al.*, 2009; Gourab e Schmit, 2010).

Kristeva e colaboradores (2007), ao realizarem registro cortical e eletromiográfico de indivíduos, sem lesão, durante uma tarefa visuo-motora verificaram que o aumento da frequência *beta* estava relacionado com a

melhora do desempenho motor. Os autores acreditam que a alteração cortical encontrada possa refletir uma melhor integração sensório-motora. Os nossos dados da regressão estão de acordo com o achado de Kristeva e colaboradores (2007), visto que houve uma influência significativa do aumento da potência *beta* na melhora do comportamento motor dos animais treinados. Estes animais também apresentaram melhor desempenho da tarefa realizada na esteira (diminuição dos auxílios fornecidos) e ao atravessar a escada horizontal (maior porcentagem de acertos) ao longo do tempo, o que sugere uma facilitação da integração sensório-motora promovida pelo treinamento realizado na esteira.

Os resultados obtidos por meio da análise regressão mostraram também um aumento da potência de *delta*, que contribuiu para a recuperação motora limitada dos animais do grupo controle. Huang *et al.* (2009) e Lu *et al.* (2011) mostraram aumento desta banda de frequência em casos de lesões cerebrais traumáticas e atribuíram a este resultado o fato de após o trauma haver anormalidades nas vias de substância branca, resultando em aferências corticais anormais. Huang e colaboradores (2009) citam ainda o trabalho de Shaul *et al.*, feito em 1978, no qual atropina foi administrada em animais para bloquear as aferências e um aumento das ondas *delta* foi notado na camada V do córtex. Já naquela época, os autores sugeriram que aumento desta banda podia estar relacionado com as alterações das aferências colinérgicas ao córtex. Os nossos dados corroboram com estes relatos, e indicam que o treinamento motor pode ter gerado uma reorganização das vias aferentes, que refletiu na reorganização cortical, uma vez que os animais treinados não apresentaram a oscilação *delta* “patológica”.

Outro fato que pode estar relacionado com a contribuição da potência de *delta* para o desempenho motor dos animais controles é a presença de maior sensibilidade dolorosa nestes animais. Sabe-se que a dor abaixo do nível após a LM envolve mecanismos cerebrais, pois pacientes com lesão medular completa também vivenciam este tipo de dor (Baastrup *et al.*, 2010). As diversas alterações intrínsecas decorrentes da LM fornecem substratos para amplificação das aferências anormais aos centros processadores de dor corticais e subcorticais (Smeal *et al.*, 2006). Sarnthein e colaboradores (2006) mostraram, assim como os nossos dados, um aumento da potência de frequências mais baixas em pacientes com dor neurogênica, incluindo lesão medular.

Algumas diferenças foram encontradas para o grupo treinado entre os dados eletrofisiológicos coletados durante o andar no campo aberto e na esteira, especialmente até o 21º dPO. Após este período, a atividade cortical durante a locomoção nos diferentes ambientes se comportou de maneira semelhante. Como mencionado, o 28º dPO foi o primeiro dia de avaliação em que os animais começaram a se tornar mais independentes no treinamento, não necessitando do dispositivo auxiliar ou auxílio manual. Talvez, o treinamento inicial com bastante suporte estimule circuitos corticais diferentes daqueles ativados durante o andar livre no campo aberto ou mais independente na própria esteira A atividade cortical sensório-motora durante o exercício passa por uma importante reorganização, que pareceu ser necessária para a estabilização observada em um período crônico da lesão, quando os dados da esteira se assemelharam aos do campo aberto.

Curiosamente, a potência da banda *theta* aumentou nos primeiros dias de treinamento após a lesão durante o andar na esteira. Esta banda de frequência não está relacionada somente com os estados de alerta e atenção como mencionado anteriormente, mas também com a preparação motora (MacKay, 2005). De acordo com Neuper e Pfurtscheller (2001), a atenção antecipatória e a preparação motora podem produzir padrões eletrofisiológicos replicáveis nas áreas motoras e sensoriais primárias. Este fato é relevante, quando notamos que durante o andar na esteira (tarefa simples para animais sem lesão) logo após a lesão há um aumento desta potência, que com o tempo passou a apresentar valores próximos ao do andar no campo aberto. Talvez isso indique que com recuperação motora, o andar forçado durante o treinamento não exija o mesmo nível de preparação motora que é exigido logo após a lesão.

A compreensão das mudanças na potência dos sinais eletrofisiológicos associadas ao comportamento motor é de extrema relevância, devido ao potencial desses sinais como controladores de comando para interfaces cérebro-máquina (Gourab e Schmit, 2010). Os nossos dados indicam uma importante relação da banda *beta* com a melhora do comportamento motor e da banda *delta* com a recuperação limitada do comportamento motor. O aprofundamento dessas informações pode ajudar, futuramente, na melhoria de estratégias terapêuticas, desenvolvimento de neuropróteses que poderão ser adotadas em pacientes com lesão medular.

Além das alterações corticais sabe-se que, após a lesão medular, há uma reorganização signifitiva das vias sensório-motoras caudalmente à lesão. Algumas dessas mudanças são inevitáveis, devido à

perda de algumas ou de todas as fibras descendentes. Como encontrado em outros estudos de lesão medular experimental (Vialle, *et al.*, 1999; Basso, 2000; Basso *et al.*, 2002; Hutchinson *et al.*, 2004; Zai e Wrathall, 2005), neste trabalho a lesão afetou tanto a substância cinzenta quanto a branca. Estes mesmos estudos afirmam que, quanto mais grave a lesão, menos substância branca residual, com cavidades císticas maiores existirá. Segundo Loy *et al.* (2002), o rompimento de tratos da substância branca é a causa primária dos déficits motores persistentes observados nos MMPP.

Cavidades císticas foram encontradas nos cortes histológicos da medula espinhal dos animais lesados. Esses vacúolos já foram observados por Vialle *et al.* (1999), que verificaram indícios de vacuolização intraneuronal após 24 horas da lesão e uma intensificação desta após 48 horas. A presença de vacúolos ocorre conforme as camadas de mielina se separam (Cao *et al.*, 2005). De acordo com Graça *et al.* (2001) e Gomes-Leal *et al.* (2004), essa perda de mielina deve-se à morte precoce de células da glia.

Nesta pesquisa, os treinos na esteira foram iniciados precocemente (cinco dias após a LM), realizados de forma frequente (cinco vezes por semana) e por um longo período de tempo (oito semanas). Alguns pesquisadores como Reier *et al.* (1992) e Coumans *et al.* (2001) sugerem que um pequeno intervalo (duas semanas, fase subcrônica) entre a lesão e a intervenção pode ser mais favorável para a regeneração axonal e recuperação comportamental. Kozlowski *et al.* (1996) também afirmaram que a atividade física forçada iniciada na primeira semana pós-lesão, exacerba lesões no córtex sensório-motor.

Por outro lado, muitos autores concordam que a intervenção precoce é uma estratégia eficaz para a reabilitação (Bregman, 1998; Houle e Tessler, 2003; Norrie *et al.*, 2005; Dietz e Curt, 2006). Eles afirmam que a capacidade de regeneração diminui com o tempo tanto em humanos, como em modelos experimentais, por diversos motivos, tais como a desmielinização axonal, o aumento da área de lesão, a perda de neurônios e/ou a incapacidade destes regenerarem seus axônios, astrócitos e oligodendrócitos, a formação de cicatriz glial, entre outros.

Norrie *et al.* (2005), em um estudo com ratos, realizaram o mesmo treinamento específico em dois grupos com diferentes tempos de início de atividade - após um dia e após três semanas da lesão medular. O grupo com atraso de três semanas para o início do treinamento apresentou uma melhora motora significativamente menor em relação ao grupo tratado precocemente. No entanto, a distribuição do tamanho de lesão foi semelhante nos dois grupos. Liebermann e colaboradores (2006) afirmam que uma reabilitação motora eficiente depende dos processos sensório-motores facilitadores que são ofertados no seu decorrer, e os nossos dados mostram que isso deve acontecer já na fase aguda da lesão.

Apesar de terem sido notadas grandes modificações na conformação da medula espinhal, tanto macroscopicamente como microscopicamente neste trabalho, algumas áreas de substância branca foram preservadas. Isto é de grande importância para interpretação dos nossos dados, uma vez que autores relatam que somente 5 a 10% de substância branca residual após a LM é suficiente para promover melhora do padrão locomotor, devido à reorganização que ocorre nos sistemas abaixo da lesão

(Basso *et al.*, 1996; Basso, 2000; Dietz, 2003; Hutchinson *et al.*, 2004; Kloos *et al.*, 2005). Nós pudemos observar isso a partir da recuperação espontânea apresentada pelos animais controles.

No entanto, está claro na literatura que quanto maior a quantidade de tecido residual, melhor é a recuperação funcional de um animal com lesão medular (Basso *et al.*, 1996; Magnunson *et al.*, 2005; Kloos *et al.*, 2005; Yezierski, 2005; Singh *et al.*, 2011; Hoschouer *et al.*, 2011). O resultado encontrado neste trabalho, correlacionando o menor volume lesão com a melhora sensório-motora (menor nível de dor e melhor desempenho motor), retrata exatamente o exposto acima.

Embora tenha sido encontrada uma correlação significativa entre volume de lesão e a recuperação funcional, não foi identificada diferença no tamanho das áreas de lesão da medula espinhal entre os grupos lesados. Esse dado corrobora com os estudos de Siegenhalter e colaboradores (2008), que não demonstraram diferença estatística para o tamanho total da medula espinhal entre os grupos sedentário e treinado (roda de atividade) e com o de Hutchinson e colaboradores (2004) que não verificaram diferença na porcentagem de substância branca residual no epicentro de lesão entre os grupos treinados (esteira, natação e ficar em pé com descarga de peso) e o grupo não treinado. Ahmed e Wieraszko (2008) também identificaram valores similares para a área total do epicentro de lesão e de tecido residual entre os grupos experimentais (exercício acrobático associado à estimulação magnética, exercício acrobático sozinho, estimulação magnética sozinha e controle). No entanto, todos esses trabalhos relataram melhora motora

significativa dos grupos treinados em comparação aos controles, assim como os nossos dados apresentados.

Apesar de não ter sido identificada diferença na análise histológica morfométrica entre os grupos lesados deste trabalho, na análise de contagem dos neurônios presentes no corno ventral foi observada uma diminuição significativa na quantidade de neurônios presentes no segmento caudal à lesão para o grupo controle, quando comparado com os grupos sham e treinado. Este resultado sugere uma possível preservação da integridade da circuitaria responsável por gerar padrões locomotores (*CPG*) com o treinamento na esteira, uma vez que os animais treinados apresentaram maior controle motor em relação aos controles.

A perda neuronal ocorre pelo impacto direto contra a medula espinhal no modelo de lesão por contusão que causa dano mecânico ao tecido minutos após o trauma; e ocorre como evento secundário à lesão medular que é resultante da hiperexcitabilidade pela liberação excessiva de glutamato e da morte retardada dos oligodendrócitos, que podem levar dias para acontecer (Liu *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2005). O treinamento na esteira pode ter exercido um efeito protetor aos eventos secundários, preservando os neurônios presentes no corno ventral nos segmentos lombares.

Muitos pesquisadores já estudaram a morte neuronal após a lesão medular (Liu *et al.*, 1997; Grossman *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005; Ek *et al.*, 2010). De acordo com os dados publicados por eles, a perda de neurônios rostral e caudal à lesão é simétrica em relação ao epicentro. Além disso, Ek e colaboradores (2010) mostraram que a morte ocorre, principalmente, nas primeiras 24 horas após a lesão, não havendo uma perda neuronal significativa

quando comparados os valores de um dia com quatro dias, e com quatro e dez semanas. No entanto, os segmentos de medulas espinhais analisados por estes autores variou de 0,4 a 0,8 cm, enquanto que no presente trabalho o segmento de medula possuía 2,4 cm. Os resultados encontrados para o segmento de aproximadamente 0,6 cm centrados no epicentro de lesão (segmento considerado central neste trabalho, ver gráfico 18) foi igual ao relatado pelos autores citados, ou seja, no centro da lesão houve uma perda simétrica de neurônios rostral e caudal à lesão. E os valores dos grupos lesados não diferiram neste segmento, o que indica que os neurônios desta região podem ter morrido no período logo após a lesão (nas primeiras 24 horas), não podendo o treinamento influenciar nesta perda.

De acordo com Bigbee e colaboradores (2007), na ausência de conexões supra-espinhas, o aprendizado motor deve resultar da natureza das aferências periféricas fornecidas para a medula espinhal, e da plasticidade celular dinâmica que ocorre dentro da circuitaria neural abaixo do nível de lesão. Os dados obtidos a partir da quantificação de neurônios em segmentos mais distantes da lesão corroboram com essa afirmação e nos ajudam a interpretar a melhora funcional observada nos animais treinados, uma vez que os neurônios do corno ventral dos segmentos lombares são responsáveis por controlar os músculos dos membros posteriores.

Segundo Magnunson e colaboradores (2005), os *CPG* estão localizados nos segmentos de L1 e L2, e os segmentos lombares mais caudais possuem elementos responsáveis pela manutenção da ritmicidade motora em ratos. Com a lesão por contusão no nível de T9 e T10, como realizado neste trabalho, estes circuitos podem permanecer “intactos”, mas as vias de

comando locomotor e as vias modulatórias descendentes, que fazem contato com os circuitos, são interrompidas. Petruska e colaboradores (2007) sugerem que o treinamento motor pode habilitar os circuitos medulares ou a execução de um programa medular intrínseco. Acreditamos que o treinamento na esteira possa ter fornecido estímulos sensoriais e motores adequados, de modo que a circuitaria neuronal fosse ativada e modulada de maneira mais eficaz, o que foi fundamental para a melhora funcional atingida pelos animais lesados medulares treinados.

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho contribuem para o entendimento das respostas do sistema sensório-motor após uma lesão e um procedimento de reabilitação. A demonstração das mudanças corticais por meio da eletrofisiologia apresenta claras implicações clínicas para se entender como o córtex funciona em resposta a um trauma após um programa de reabilitação. Isso pode levar a terapias futuras que potencializem o processo de regeneração, recuperação funcional. O treinamento motor realizado na esteira parece ter facilitado a reorganização do córtex sensório-motor e da medula espinhal após a lesão medular por contusão e potencializou a recuperação das funções motoras, proprioceptivas e sensoriais, resultando em uma melhora funcional dos animais treinados. Este fato é fundamental, uma vez que quanto mais funcional for a recuperação dos pacientes lesados medulares, maior será a independência alcançada e, portanto, melhor será a qualidade de vida destes indivíduos.

Anexo A - Pontuação Escala BBB

PONTUAÇÃO ESCALA BBB	
0	Nenhum movimento observável dos membros posteriores;
1	Movimento suave de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e suave de uma outra;
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento suave de todas as três articulações do membro posterior;
5	Suave movimento de duas articulações e extenso movimento de uma terceira;
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento suave de uma terceira;
7	Extenso movimento de três articulações do membro posterior;
8	Arrastar da pata sem descarga de peso ou posição plantar da pata sem descarga de peso;
9	Posição plantar da pata com descarga de peso somente quando o membro está apoiado (sem movimento) ou descarga de peso ocasional, freqüente ou consistente na passada dorsal e sem passada plantar;
10	Descarga de peso ocasional na passada plantar e nenhuma coordenação entre membros anteriores-membros posteriores (MMAA-MMPP);
11	Descarga de peso freqüente a consistente na passada plantar e nenhuma MMAA-MMPP coordenação;
12	Descarga de peso freqüente a consistente na passada plantar e coordenação ocasional entre MMAA-MMPP;
13	Descarga de peso freqüente a consistente na passada plantar e coordenação freqüente entre MMAA-MMPP;
14	Descarga de peso consistente na passada plantar , coordenação consistente entre MMAA-MMPP; e posição da pata predominante ao andar é rodada (internamente ou externamente) no contato incial com a superfície, assim como quando está levantada no final da fase de balanço; ou passada plantar freqüente, coordenação consistente entre MMAA-MMPP e passada dorsal ocasional;
15	Passada plantar consistente, coordenação consistente entre MMAA-MMPP, e nenhuma liberação de dedos ou liberação ocasional durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato incial com a superfície;
16	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre freqüentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato incial e rodada ao levantar;
17	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre freqüentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato incial e ao levantar;
18	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre consistentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato incial e rodada ao levantar;
19	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre consistentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato incial e ao levantar; e a posição da cauda é baixa parte do tempo ou todo tempo;
20	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar; liberação de dedos ocorre consistentemente durante o movimento de avançar do membro; posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato incial e ao levantar; e a posição da cauda é consistentemente para cima e há instabilidade de tronco;
21	Passada plantar consistente, coordenação consistente entre MMAA-MMPP durante o andar, liberação de dedos consistente, posição da pata predominante é paralela ao corpo no contato incial e ao levantar, a posição da cauda é consistentemente para cima e estabilidade de tronco consistente.

Anexo B - Ficha de avaliação da Escala BBB

ESCALA BBB DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

"BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S. E BRESNAHAN, J.C., 1995"

Animal:_____ Data:_____ Dias Pós-Operatório: _____ Pontuação Membro Posterior Esquerdo (E): _____ Direito (D): _____

Movimento do Membro Posterior						Posição do Tronco		Abdome	Movimento da pata Dianteira						Pisada				Coordenação	Liberação dos dedos		Posição Predominante da Pata				Instabilidade do Tronco	Cauda
Quadril		Joelho		Tornozelo					Balanço		Apoio de Pata				Dorsal		Plantar					Contato Inicial		Elevação			
E	D	E	D	E	D	Lado	Apoio				Sem Suporte de Peso	Com Suporte de Peso			E	D	E	D		E	D	E	D	E	D		
0	0	0	0	0	0	E	D								0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I		Para Cima
S	S	S	S	S	S	Central		E	D	Arrastado	E	D	E	D	E	D	O	O	O	O	O	O	O	E	E	E	E		(elevada)
E	E	E	E	E	E					Paralelo							F	F	F+	F+	F	F**	F**	P	P	P	P		Para Baixo
										Alto							C	C	C	C	C	C	C						(abaixada)

Comentários:_____

Movimento
0 Nenhum
S Suave (discreto)
E Extenso

+ Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior
* Liberação < 50%
** Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior

0 Nunca (0%)
O Ocasionalmente (<50%)
F Frequente (51-94%)
C Consistente (95-100%)

I Rotação Interna
E Rotação Externa
P Paralela

Anexo C - Rotina para estimativa do espectro com base no periodograma de Welch

```
function [freq, power] = psdwelch(x, nyquist, ell, overlap,
                                  freqmax, win)

x       = transformer(x, win);
nfft    = 20 * nyquist;
power   = zeros(1, fix(nfft / 2));
overlap = overlap * ell;
nseg    = fix((numel(x) - overlap) / (ell - overlap));
start   = ((1 : nseg) - 1) * (ell - overlap) + 1;
wHann   = 0.5 * (1.0 - cos(2 * pi * (1 : ell) / ell));

for i = 1 : nseg
    y     = fft(wHann .* x(start(i) : start(i) + ell - 1)',
            nfft);
    y(1)  = [];
    power = power + abs(y(1 : numel(power)) .^ 2) / ell;
end

freq    = (1 : numel(power)) * nyquist / (2 *
numel(power));
indfreq = find(freq == freqmax);
freq    = freq (1 : indfreq);
power   = power / nseg;
power   = power(1 : indfreq);
```

Anexo D - Rotina para seleção de canais

```
function matriz = select_canais(LFPdata, LFPcoord,
                   canal_start,ncanais, trechos, emg_canal)

% PRÉ-DEFINIÇÕES
 nl = size(LFPdata, 1);
ind = canal_start : canal_start + ncanais - 1;
% PRÉ-DEFINIÇÕES - BANDAS
delta_range = [ 0.5  4.0];
theta_range = [ 4.0 10.0];
 beta_range = [10.0 25.0];
% PRÉ-DEFINIÇÕES - ESPECTRO DE POTÊNCIAS
nyquist = 2000;
    ell = 1000;
overlap = 0.50;
freqmax = 75;
    win = 500;
% PRÉ-DEFINIÇÕES - FILTROS
 mint_default = 20;
lim_deltabeta = 0.65;
         step = 2.50;
    mincanais = 15;

% INÍCIO ROTINA
h = waitbar(0, 'Please wait...');
for i = 1 : nl
    data = load(LFPdata(i, :));
    for k = 1 : numel(ind) % temos somente um canal de EMG
        if k == 1
            temp = eval(['data.' 'AD' num2str(ind(k))]);
        elseif ind(k) ~= emg_canal
            temp = [temp eval(['data.' 'AD'
                    num2str(ind(k))])];
        end
    end
      data = temp;
     coord = eval(['trechos.' LFPcoord(i, :)]);
    ncoord = size(coord, 1);
    for j = 5 : ncoord
              cont = 1;
        contcanalb = 0;
        contcanalc = 0;
        for k = 1 : size(data, 2)
            xtrecho = data(coord(j, 1) : coord(j, 2), k);
            [Fw, Pw] = psdwelch(xtrecho, nyquist, ell,
                        overlap, freqmax, win);
```

```
id = find(Fw >= delta_range(1) & Fw <
      delta_range(2));
maxd = max(Pw(id));
imaxd = find(Pw == maxd);
it = find(Fw >= theta_range(1) & Fw <
      theta_range(2));
maxt = max(Pw(it));
imaxt = find(Pw == maxt);
ib = find(Fw >= beta_range(1) & Fw <
      beta_range(2));
maxb = max(Pw(ib));
imaxb = find(Pw == maxb);
if max(xtrecho) >= 1 || min(xtrecho) <= -1
    color = [1 0 0];
  % reprovação 1 - vermelho
else
    if maxt <= mint_default
        color = [1 0.4 0];
  % reprovação 2 - laranja
    else
        if max(maxd, maxb) >= lim_deltabeta *
                                  maxt
            color = [0 0.8 0.2];
  % reprovação 3 - verde
        else
            minPw = min(abs(Pw(it(1) : imaxt) -
                     maxd));
  % minimo da Pw maxd com [theta(1) maxt]
            imin_dt = find(abs(Pw - maxd) ==
                     minPw);
  % indice dentro de [theta(1) maxt] / Pw =
     minPw
            if imaxd == imin_dt - 1
                color = [0 1 1];
  % reprovação 3 - ciano
  % não ocorrência de "vale" maxd e maxt
            else
                color = [0 0 1];
  % aprovação - azul
            end
        end
    end
end
if nnz(color - [0 0 1]) == 0
    contcanalb = contcanalb + 1;
    if k <= 15
         canaisb(contcanalb) = k + 32;
        specb(contcanalb, :) = Pw(1 : ib(end));
    else
         canaisb(contcanalb) = k + 33;
```

```
                specb(contcanalb, :) = Pw(1 : ib(end));
            end
        end
        if sum(color - [0 1 1]) == 0
            contcanalc = contcanalc + 1;
            if k <= 15
                 canaisc(contcanalc) = k + 32;
                specc(contcanalc, :) = Pw(1 : ib(end));
            else
                 canaisc(contcanalc) = k + 33;
                specc(contcanalc, :) = Pw(1 : ib(end));
            end
        end
        if k <= 4
            subplot(4, 2, 2 * k - 1)
            h1 = plot(xtrecho);
            set(h1, 'Color', color)
            xlim([1 numel(xtrecho)])
            title([[LFPcoord(i, 1 : 3) '/d' LFPcoord(i,
                 5 : 6)] ' - trecho' int2str(j) ' - '
                 'AD' int2str(k + 32)], 'FontSize',
                 14)
            subplot(4, 2, 2 * k)
            h2 = plot(Fw, Pw, 'LineWidth', 2);
            set(h2, 'Color', color)
            axis([0 freqmax (min(Pw) - 5) (max(Pw) +
             5)])
        end
        if k > cont * 4 && k <= (cont + 1) * 4
            if k == cont * 4 + 1
                pause(step)
            end
            subplot(4, 2, 2 * k - 2 * (cont * 4) - 1)
            h1 = plot(xtrecho);
            set(h1, 'Color', color)
            xlim([1 numel(xtrecho)])
            if k <= 15
                title([[LFPcoord(i, 1 : 3) '/d'
                     LFPcoord(i, 5 : 6)] ' - trecho'
                     int2str(j) ' - ' 'AD' int2str(k +
                     32)], 'FontSize', 14)
            else
                title([[LFPcoord(i, 1 : 3) '/d'
                     LFPcoord(i, 5 : 6)] ' - trecho'
                     int2str(j) ' - ' 'AD' int2str(k +
                     33)], 'FontSize', 14)
            end
            subplot(4, 2, 2 * k - 2 * (cont * 4))
            h2 = plot(Fw, Pw, 'LineWidth', 2);
            set(h2, 'Color', color)
```

```
            axis([0 freqmax (min(Pw) - 5) (max(Pw) +
             5)])
            if k == (cont + 1) * 4
                cont = cont + 1;
            end
        end
    end
    pause(step)
    if contcanalb == 0 && contcanalc == 0
        matriz.(['d' LFPcoord(i, end - 1 : end) 'tr'
        int2str(j)]) = [];
    else
        if contcanalc == 0
            matriz.(['d' LFPcoord(i, end - 1 : end)
            'tr' int2str(j)]) = canaisb;
        elseif contcanalb == 0
            if contcanalc <= mincanais
                matriz.(['d' LFPcoord(i, end - 1 : end)
                'tr' int2str(j)]) = canaisc;
            else
                    speccm = mean(specc);
                    speccm = repmat(speccm, contcanalc,
                              1);
                  difspecc = speccm - specc;
                 distspecc = sqrt(sum(difspecc .^ 2,
                              2));
                sdistspecc = sort(distspecc);
                         q = zeros(1, mincanais);
                for p = 1 : mincanais
                    q(p) = find(distspecc ==
                            sdistspecc(p));
                end
                matriz.(['d' LFPcoord(i, end - 1 : end)
                'tr' int2str(j)]) = sort(canaisc(q));
                clear q
            end
        else
            if contcanalb >= mincanais
               matriz.(['d' LFPcoord(i, end - 1 : end)
               'tr' int2str(j)]) = canaisb;
            else
                ncanaisf = mincanais - contcanalb;
                if contcanalc <= ncanaisf
                    matriz.(['d' LFPcoord(i, end - 1 :
                    end)     'tr'     int2str(j)])     =
                    sort([canaisb canaisc]);
                else
                    if contcanalb > 1
                        specref = mean(specb);
                    else
```

```
                                specref = specb;
                            end
                            h3 = figure;
                            plot(Fw(1 : ib(end)), specref, 'b',
                            'LineWidth', 2);
                            axis([1  beta_range(2)
                             (min(specref)              - 5)
                             (max(specref) + 5)])
                            hold on
                            plot(Fw(1 : ib(end)), specc, 'c')
                            specref = repmat(specref,
                             contcanalc,   1);
                            difspec = specref - specc;
                               dist = sqrt(sum(difspec .^ 2,
                                       2));
                              sdist = sort(dist);
                                  n = zeros(1, ncanaisf);
                            for m = 1 : ncanaisf
                                n(m) = find(dist == sdist(m));
                            end
                            plot(Fw(1 : ib(end)), specc(n, :),
                             'k')
                            hold off
                            matriz.(['d' LFPcoord(i, end - 1 :
                             end)     'tr'     int2str(j)])     =
                             sort([canaisb canaisc(n)]);
                            clear n
                            pause(step)
                            close(h3)
                        end
                    end
                end
            end
        clear canaisb canaisc specb specc
    end
    waitbar(i / nl, h)
end
close(h)
```

Anexo E - Rotina para avaliação dos canais aprovados

```
function [pwdelta, pwtheta, pwbeta] = avalia_motor(LFPdata,
                                        LFPcoord,  trechos,
                                        canais)
% PRÉ-DEFINIÇÕES
 nl = size(LFPdata, 1);
% PRÉ-DEFINIÇÕES - BANDAS
delta_range = [ 0.5  4.0];
theta_range = [ 4.0 10.0];
 beta_range = [10.0 25.0];
% PRÉ-DEFINIÇÕES - ESPECTRO DE POTÊNCIAS
  names = fieldnames(canais);
nyquist = 2000;
    ell = 1000;
overlap = 0.50;
freqmax = 75;
    win = 500;

% INÍCIO ROTINA
h = waitbar(0, 'Please wait...');
cont = 0;
pwdelta = zeros(1, nl);
pwtheta = zeros(1, nl);
 pwbeta = zeros(1, nl);
for i = 1 : nl
    data = load(LFPdata(i, :));
    coord = eval(['trechos.' LFPcoord(i, :)]);
    ncoord = size(coord, 1);
    pwdelta(i) = 0;
    pwtheta(i) = 0;
     pwbeta(i) = 0;
   emptyncoord = 0;
     for j = 1 : ncoord
        cont = cont + 1;
        sele = eval(cell2mat(['canais.' names(cont)]));
        if isempty(sele) == 0
            for k = 1 : numel(sele)
                if k == 1
                    temp = eval(['data.' 'AD'
                            num2str(sele(k))]);
                else
                    temp = [temp eval(['data.' 'AD'
                            num2str(sele(k))])];
                end
            end
            datatemp = mean(temp, 2);
            xtrecho = datatemp(coord(j, 1) : coord(j, 2));
```

```
            [Fw, Pw] = psdwelch(xtrecho, nyquist, ell,
                        overlap, freqmax, win);
            id = find(Fw >= delta_range(1) & Fw <
                  delta_range(2));
            pwdelta(i) = pwdelta(i) + mean(Pw(id));
            it = find(Fw >= theta_range(1) & Fw <
                  theta_range(2));
            pwtheta(i) = pwtheta(i) + mean(Pw(it));
            ib = find(Fw >=  beta_range(1) & Fw <
                  beta_range(2));
            pwbeta(i) = pwbeta(i) + mean(Pw(ib));
        else
            emptyncoord = emptyncoord + 1;
        end
    end
    pwdelta(i) = pwdelta(i) / (ncoord - emptyncoord);
    pwtheta(i) = pwtheta(i) / (ncoord - emptyncoord);
     pwbeta(i) =  pwbeta(i) / (ncoord - emptyncoord);
    waitbar(i / nl, h)
end
close(h)
```

Anexo F - Vídeos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MM, Ginis KAM, Hicks AL. The Spinal Cord Injury Spasticity Evaluation Tool: Development and Evaluation. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007;88:1185-1192.

Adkins DL, Boychuk J, Remple MS, Kleim JA. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J Appl Physiol.* 2006;101(6):1776-1782.

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

Aguilar J, Humanes-Valera D, Alonso-Calviño E, Yague JG, Moxon KA, Oliviero A, Foffani G. Spinal Cord Injury Immediately Changes the State of the Brain. *J Neurosci.* 2010;30(22):7528 –7537.

Ahmed Z, Wieraszko A. Combined Effects of Acrobatic Exercise and Magnetic Stimulation on the Functional Recovery after Spinal Cord Lesions. *J Neurotrauma.* 2008;25:1257–1269.

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

Ahn SN, Guu JJ, Tobin AJ, Edgerton VR, Tillakaratne NJ. Use of c-fos to identify activity-dependent spinal neurons after stepping in intact adult rats. *Spinal Cord.* 2006;44(9):547-559.

Akkal D, Dum RP, Strick PL. Supplementary Motor Area and Presupplementary Motor Area: Targets of Basal Ganglia and Cerebellar Output. *J Neurosci.* 2007;27(40):10659 -10673 .

Al-Izki S, Kirkwood PA, Lemon RN, Denton ME. Electrophysiological actions of the rubrospinal tract in the anaesthetised rat. *Exp Neurol.* 2008;212:118-131.

Alstermark B, Isa T, Pettersson LG, Sasaki S. The C3–C4 propriospinal system in the cat and monkey: a spinal pre-motoneuronal centre for voluntary motor control. *Acta Physiol.* 2007;189:123-140.

Alstermark B, Ogawa J, Isa T. Lack of Monosynaptic Corticomotoneuronal EPSPs in Rats: Disynaptic EPSPs Mediated Via Reticulospinal Neurons and Polysynaptic EPSPs Via Segmental Interneurons. *J Neurophysiol*. 2004;91:1832-1839.

Andrade MSR, Mendonça LM, Chadi G. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration. *Brain Res*. 2010;1346:266-278.

Androulidakis AG, Doyle LMF, Yarrow K, Litvak V, Gilbertson TP, Brown P. Anticipatory changes in beta synchrony in the human corticospinal system and associated improvements in task performance. *Eur J Neurosci.* 2007;25(12): 3758-3765.

Baastrup C, Maersk-Moller CC, Nyengaard JR, Jensen TS, Finnerup NB. Spinal-, brainstem- and cerebrally mediated responses at- and below-level of a spinal cord contusion in rats: Evaluation of pain-like behavior. *Pain*. 2010;151(3):670-679.

Bajd T, Kralj A, Turk R, Benko H, Šega J. Use of functional electrical stimulation in the rehabilitation of patients with incomplete spinal cord injuries. *J Biomed*. 1989;11(2):86-102.

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

Barrière G., Leblond H, Provencher J, Rossignol S. Prominent role of the spinal central pattern generator in the recovery of locomotion after partial spinal cord injuries*. J Neurosci*. 2008;28(15):3976-3987.

Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ. Chondroitinase ABC Promotes Sprouting of Intact and Injured Spinal Systems after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. 2006;26(42):10856-10867.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded Histological and Locomotor Outcomes after Spinal Cord Contusion Using the NYU Weight- Drop Device versus Transection. *Exp Neurol*. 1996;139:244-256.

Basso DM. Neuroanatomical Substrates of Functional Recovery After Experimental Spinal Cord Injury: Implications of Basic Science Research for Human Spinal Cord Injury. *Phys Ther*. 2000;80(8):808-817.

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

Baumeister J, Reinecke K, Liesen H, Weiss M. Cortical activity of skilled performance in a complex sports related motor task. *Eur J Appl Physiol*. 2008;104:625-631.

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

Bedi SS, Yang Q, Crook RJ, Du J, Wu Z, Fishman HM, Grill RJ, Carlton SM, Walters ET. Chronic Spontaneous Activity Generated in the Somata of Primary Nociceptors Is Associated with Pain-Related Behavior after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2010;30(44):14870 -14882.

Behrman AL, Lawless-Dixon AR, Davis SB, Bowden MG, Nair P, Phadke C, Hannold EM, Plummer P, Harkema SJ. Locomotor Training Progression and Outcomes After Incomplete Spinal Cord Injury. *Phys Ther*. 2005;85(12):1356-1371.

Bennett AD, Everhart AW, Hulsebosch CE. Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Res*. 2000;859:72-82.

Berger JV, Knaepen L, Janssen SP, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA, Deumens R. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Res Rev*. 2011;67(1-2):282-310.

Berrocal Y, Pearse DD, Singh A, Andrade CM, McBroom JS, Puentes R, Eaton MJ. Social and Environmental Enrichment Improves Sensory and Motor Recovery after Severe Contusive Spinal Cord Injury in the Rat. *J Neurotrauma*. 2007;24:1761-1772.

Bertrand S, Cazalets JR. The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the solated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci*. 2002;16: 1741-1750.

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

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

Blanco JE, Anderson KD, Steward O. Recovery of forepaw gripping ability and reorganization of cortical motor control following cervical spinal cord injuries in mice*. Exp Neurol*. 2007;203(2):333-348.

Blesch A, Tuszynski MH. Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development. *Trends Neurosci*. 2009;32(1):41-47.

Blesch A, Yang H, Weidner N, Hoang A, Otero D. Axonal responses to cellularly delivered NT-4/5 after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci*. 2004;27:190-201.

Blicher JU, Nielsen JF. Cortical and Spinal Excitability Changes After Robotic Gait Training in Healthy Participants. *Neurorehabil Neural Repair*. 2009;23:143-149.

Boland RA, Lin CS, Engel S, Kiernan MC. Adaptation of motor function after spinal cord injury: novel insights into spinal shock. *Brain*. 2011;134(Pt 2):495-505.

Bolton DA , Tse AD, Ballermann M, Misiaszek JE, Fouad K. Task specific adaptations in rat locomotion: Runway versus horizontal ladder. *Behav Brain Res*. 2006;168:272-279.

Bortoff GA, Strick PL. Corticospinal Terminations in Two New-World Primates: Further Evidence That Corticomotoneuronal Connections Provide Part of the Neural Substrate for Manual Dexterity. *J Neurosci*. 1993;73(12):5105-5119.

Bosco G, Poppele RE. Proprioception From a Spinocerebellar Perspective. *Physiol Rev.* 2001;81(2):539-568.

Bostan AC, Dum RP, Strick PL. The basal ganglia communicate with the cerebellum. *PNAS*. 2010;107(18):8452-8456.

Brackett NL, Ibrahim E, Iremashvili V, Aballa TC, Lynne CM. Treatment for Ejaculatory Dysfunction in Men With Spinal Cord Injury: An 18-Year Single Center Experience. *J Urol*. 2010;183:2304-2308.

Bradbury EJ, Carter LM. Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain ResBull*. 2011;10;84(4-5):306-316.

Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(8):644-653.

Bregman BS. Regeneration in the spinal cord. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8:800-807.

Brown A, Ricci MJ, Weaver LC. NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord. *Exp Neurol*. 2004;188:115-127.

Brown KM, Wolfe BB, Wrathall JR. Rapid Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Young Rats. *J Neurotrauma.* 2005;22(5):559-574.

Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science.* 2004;304:1926-1929.

Buzsáki G. A *System of Rhythms: From Simple to Complex Dynamic*s in Rhythms of the Brain. EUA;Oxford University Press, 2006.

Cai LL, Fong AJ, Otoshi CK, Liang Y, Burdick JW, Roy RR, Edgerton RV, Implications of Assist-As-Needed Robotic Step Training after a Complete Spinal Cord Injury on Intrinsic Strategies of Motor Learning. *J Neurosci.* 2006;26(41):10564-10568

Can M, Gul S, Bektas S, Hanci V, Acikgoz S. Effects of dexmedetomidine or methylprednisolone on inflammatory responses in spinal cord injury. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009; 53:1068-1072.

Cao Q, Xu, XM, Vries WH, Enzmann GU, Ping P, Tsouflas P, Wood PW, Bunge MB, Whittemore SR. Functional Recovery in Traumatic Spinal Cord injury after Transplantation of Multineurotrophin-Expressing Glial Restricted Precursor Cells. *J Neurosci*. 2005;25(30):6947-6957.

Cao, QL, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR. Pluripotent Stem Cells Engrafted into the Normal or Lesioned Adult Rat Spinal Cord Are Restricted to a Glial Lineage. *Exp Neurol*. 2001;167:48-58.

Caplan JB, Madsen JR, Schulze-Bonhage A, Aschenbrenner-Scheibe R, Newman EL, Kahana MJ. Human theta oscillations related to sensorimotor integration and spatial learning. *J Neurosci.* 2003;23(11):4726-4736.

Carmena JM, Lebedev MA, Henriquez CS, Nicolelis MA. Stable ensemble performance with single-neuron variability during reaching movements in primates*. J Neurosci*. 2005;25(46):10712-10716.

Cassim F, Monaca C, Szurhaj W, Bourriez JL, Defebvre L, Derambure P, Guieu JD. Does post-movement beta synchronization reflect an idling motor cortex? *Neuroreport*. 2001;12(17):3859-3863.

Castro MJ, Apple DF, Jr., Staron RS, Campos GER, Dudley GA. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle within 6 mo of injury. *J Appl Physiol*. 1999;86:350-358.

Cazalets JR, Borde M, Clarac F. Localization and Organization of the Central Pattern Generator for Hindlimb Locomotion in Newborn Rat. *J Neurosci*. 1995;75(7):4943-4951.

Cha J, Heng C, Reinkensmeyer DJ, Roy RR, Edgerton VR, De Leon RD. Locomotor Ability in Spinal Rats Is Dependent on the Amount of Activity Imposed on the Hindlimbs during Treadmill Training. *J Neurotrauma*. 2007;24(6):1000-1012.

Chancellor A. Electroencephalography: maturing gracefully. *Pract Neurol*. 2009;9:130-132.

Chang CM, Lee MH, Wang TC, Weng HH, Chung CY, Yang JT. Brain protection by methylprednisolone in rats with spinal cord injury. *Neuroreport*. 2009;20(10):968-972.

Chapin JK, Nicolelis MA. Neural network mechanisms of oscillatory brain states: characterization using simultaneous multi-single neuron recordings. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1996;45:113-122.

Chapin JK, Moxon KA, Markowitz RS, Nicolelis MA. Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *Nat Neurosci*. 1999;2(7):664-670.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, YakshTL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55-63.

Chakarov V, Naranjo JR, Schulte-Mönting J, Omlor W, Huethe F, Kristeva R. Beta-range EEG-EMG coherence with isometric compensation for increasing modulated low-level forces. *J Neurophysiol*. 2009;102(2):1115-1120.

Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT, Hulsebosch CE. Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain*. 1996;68:97-107.

Chopek JW, Gardiner PF. Life-long caloric restriction: Effect on age-related changes in motoneuron numbers, sizes and apoptotic markers. *Mechanisms of ageing and development*. 2010;131:650-659.

Coté MP, Gossard JP. Step Training-Dependent Plasticity in Spinal Cutaneous Pathways. *J Neurosci*. 2004;24(50):11317-11327.

Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*. 2002;25(6):295-301.

Coumans JV, Lin TTS, Dai HN, MacArthur L, Macatee M, Nash C, Bregman BS. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci*. 2001;21:9334-9344.

Courtine G, Gerasimenko Y, Brand RVD, Yew A, Musienko P, Zhong H, Song B, Ao Y, Ichiyama RM, Lavrov I, Roy RR, Sofroniew MV, Edgerton VR. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1333-1342.

Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008;209:368-377.

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

Cramer SC, Orr EL, Cohen MJ, Lacourse MG. Effects of motor imagery training after chronic, complete spinal cord injury. *Exp Brain Res*. 2007;177(2):233-242.

Csicsvari J, Henze DA, Jamieson B, Harris KD, Sirota A, Barthó P, Wise KD Buzsáki G. Massively Parallel Recording of Unit and Local Field Potentials With Silicon-Based Electrodes. *J Neurophysiol.* 2003;90:1314-1323.

Cummings BJ, Cesar CE, Cadena G, Anderson AJ. Adaptation of ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behav Brain Res*. 2007;177:232-241.

Curt A, Bruehlmeier M, Leenders KL, Roelcke U, Dietz V. Differential Effect of Spinal Cord Injury and Functional Impairment on Human Brain Activation. *J Neurotrauma*. 2002;19(1):43-51.

Dancause N, Barbay S, Frost SB, Plautz EJ, Popescu M, Dixon PM, Stowe AM, Friel KM, Nudo RJ. Topographically Divergent and Convergent Connectivity between Premotor and Primary Motor Cortex. *Cereb Cortex*. 2006;16:1057-1068.

Darian-Smith C. Synaptic Plasticity, Neurogenesis, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Neuroscientist*. 2009;15(2):149-165.

David BT, Steward O. Deficits in bladder function following spinal cord injury vary depending on the level of the injury. *Exp Neurol*. 2010;226(1):128-135.

De Leon RD, Hodgson JA, Roy RR, Edgerton VR. Locomotor Capacity Attributable to Step Training Versus Spontaneous Recovery After Spinalization in Adult Cats. *J Neurophysiol*. 1998;79(3):1329-1340.

De Leon RD, See PA, Chow CHT. Differential effects of low versus high amounts of weight supported treadmill training in spinal Rats. *J Neurotrauma.* 2011; [Epub ahead of print].

Defrin R, Grunhaus L, Zamir D, Zeilig G. The effect of a series of repetitive transcranial magnetic stimulations of the motor cortex on central pain after spinal cord injury*. Arch Phys Med Rehabil*. 2007;88(12):1574-1580.

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

Dietz V, Harkema SJ. Locomotor activity in spinal cord-injured persons. *J Appl Physiol*. 2004;96:1954-1960.

Dietz V. Proprioception and locomotor disorders. *Nat Rev*. 2002;3:781-790.

Dietz V. Spinal cord pattern generators for locomotion. *ClinNeurophysiol*. 2003;114:1379-1389.

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

Ditor DS, MacDonald MJ, Kamath MV, Bugaresti J, Adams M, McCartney N, Hicks A. The effects of body-weight supported treadmill training on cardiovascular regulation in individuals with motor-complete SCI. *Spinal Cord*. 2005;43:664-673.

Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS. Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord*. 2004;42:383–395.

Dobkin BH, Apple D, Barbeau H, Basso M, Behrman A, Deforge D, Ditunno J, Dudley G, Elashoff R, Fugate L, Harkema S, Saulino M, Scott M. Methods for a randomized trial of weight-supported treadmill training versus conventional training for walking during inpatient rehabilitation after incomplete traumatic spinal cord injury*. Neurorehabil Neural Repair*. 2003;17(3):153-167.

Donoghue JP, Wise SP. The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping*. J Comp Neurol.*1982;212(1):76-88.

Donoghue JP, Leibovic S, Sanes JN. Organization of the forelimb area in squirrel monkey motor cortex: representation of digit, wrist, and elbow muscles. *Exp Brain Res*. 1992;89(1):1-19.

Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Astrocytes, Oligodendrocytes, and Microglia/Macrophages after Spinal Cord Injury. *Neurobiol Dis*. 2000;7:574-585.

Drew GM, Siddall PJ, Duggan AW. Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn*. Pain*. 2004;109(3):379-388.

Drew T, Jiang W, Widajewicz W. Contributions of the motor cortex to the control of the hindlimbs during locomotion in the cat. *Brain Res Rev.* 2002;40:178-191.

Dudley-Javoroski S, Shields RK. Muscle and bone plasticity after spinal cord injury: Review of adaptations to disuse and to electrical muscle stimulation. *J Rehabil Res Dev*. 2008;45(2):283-296.

Dum RP, Strick PL. The Origin of Corticospinal Projections from the Premotor Areas in the Frontal Lobe. *J Neurosci*. 1991;77(3):667-669.

Dum RP, Strick PL. Motor areas in the frontal lobe of the primate. *Physiol Behav*. 2002;77:677-682.

Dupont-Versteegden EE, Murphy RJL, Houlé JD, Gurley CM, Peterson CA. Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(6):1677-1684.

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

Edgerton RV, De Leon RD, Harkema SJ, Hodgson JA, London N, Reinkensmeyer DJ, Roy RR, Talmadge RJ, Tillakaratne NJ, Timoszyk W, Tobin A. Retraining the injured spinal cord. *J Physiol.* 2001;533(1):15-22.

Edgerton RV, Tillakaratne NJK, Bigbee AJ, De Leon RD, Roy RR. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annu Rev Neurosc*. 2004;27:145-167.

Erbil N, Ungan P. Changes in the alpha and beta amplitudes of the central EEG during the onset, continuation, and offset of long-duration repetitive hand movements. *Brain Res*. 2007;1169:44-56.

Erschbamer MK, Pham TM, Zwart MC, Baumans V, Olson L. Neither environmental enrichment nor voluntary wheel running enhances recovery from incomplete spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2006;201:154-164.

Ek CJ, Habgood MD, Callaway JK, Dennis R, Dziegielewska KM, Johansson PA, Potter A, Wheaton B, Saunders NR. Spatio-Temporal Progression of Grey and White Matter Damage Following Contusion Injury in Rat Spinal Cord. *PLoS One*. 2010;5(8):e12021.

Fawcett JW, Ascher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*.1999;49(6):377-391.

Ferguson AR, Crown ED, Grau JW. Nociceptive plasticity inhibits adaptive learning in the spinal cord. *Neuroscience*. 2006;141(1):421-431.

Fischer FR, Peduzzi JD. Functional Recovery in Rats With Chronic Spinal Cord Injuries After Exposure to an Enriched Environment. *J Spinal Cord Med*. 2007;30:147-155.

Fitzsimmons NA, Drake W, Hanson TL, Lebedev MA, Nicolelis MA. Primate reaching cued by multichannel spatiotemporal cortical microstimulation. *J Neurosci*. 2007;27(21):5593-602.

Fogassi L, Luppino G. Motor functions of the parietal lobe. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15:626-631.

Fong AJ, Cai LL, Otoshi CK, Reinkensmeyer DJ, Burdick JW, Roy RR, Edgerton RV. Spinal Cord-Transected Mice Learn to Step in Response to Quipazine Treatment and Robotic Training. *J Neurosci*. 2005;25(50):11738-11747.

Fortun J, Hill CE, Bunge MB. Combinatorial strategies with Schwann cell transplantation to improve repair of the injured spinal cord. *Neurosci Lett*. 2009;456:124-132.

Fouad K, Pearson K. Restoring walking after spinal cord injury. *Prog Neurobiol*. 2004;73(2):107-126.

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

Franssen EH, De Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: Their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev*. 2007;56:236-258.

Gerasimenko YP, Ichiyama RM, Lavrov IA, Courtine G, Cai L, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Epidural Spinal Cord Stimulation Plus Quipazine Administration Enable Stepping in Complete Spinal Adult Rats. *J Neurophysiol*. 2007;98(5):2525-2536.

Gerrits HL, De Haan A, Hopman MT, van Der Woude LH, Jones DA, Sargeant AJ. Contractile properties of the quadriceps muscle in individuals with spinal cord injury. *Muscle Nerve*. 1999;22:1249-1256.

Geyer S, Matelli M, Luppino G, Zilles K. Functional neuroanatomy of the primate isocortical motor system. *Anat Embryol*. 2000;202:443-474.

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

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

Giangregorio LM, Hicks AL, Webber CE, Phillips SM, Craven BC, Bugaresti JM, McCartney N. Body weight supported treadmill training in acute spinal cord injury: impact on muscle and bone. *Spinal Cord*. 2005;43(11):649-657.

Gioanni Y, Lamarche M. A Reappraisal of Rat Motor Cortex Organization by Intracortical Microstimulation. *Brain Res*. 1985;344:49-61.

Giovanni SD, Faden AI, Yakovlev A, Duke-Cohan JS, Finn T, Thouin M, Knoblach S, De Biase A, Bregman BS, Hoffman EP. Neuronal plasticity after spinal cord injury: identification of a gene cluster driving neurite outgrowth. *FASEB J*. 2005;19(1):153-4.

Girgis J, Merrett D, Kirkland S, Metz GAS, Verge V, Fouad K. Reaching training in rats with spinal cord injury promotes plasticity and task specific recovery. *Brain.* 2007;130:2993-3003.

Gomes-Leal W, Corkill DJ, Freire MA, Picanço-Diniz CW, Perry VH. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2004;190:456-467.

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

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

Gourab K, Schmit BD. Changes in movement-related beta-band EEG signals in human spinal cord injury. *Clin Neurophysiol.* 2010;121(12):2017-2023.

Graça DL, Bodan EF, Pereira LA, Fernandes CG, Maiorka PC. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(2-B):358-361.

Graziano MSA, Taylor CSR, Moore T, Cooke DF. The Cortical Control of Movement Revisited. *Neuron*. 2002;36(3):349-362.

Greene RW, Frank MG. Slow Wave Activity During Sleep: Functional and Therapeutic Implications. *Neuroscientist.* 2010;16(6):618-633.

Grillner S, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström MA. Mechanisms for selection of basic motor programs – roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci*. 2005;28(7):364-370.

Grillner S. Biological Pattern Generation: The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron*. 2006;52(7):751-766.

Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall, JR. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. 2001;168(2):273-282.

Grumbles RM, Sesodia S, Wood PM, Thomas CK. Neurotrophic Factors Improve Motoneuron Survival and Function of Muscle Reinnervated by Embryonic Neurons. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(7):736-746.

Guertin PA. Paraplegic mice are leading to new advances in spinal cord injury research. *Spinal Cord*. 2005;43:459-461.

Gulyás S, Szirmai I, Kamondi A. Post-movement beta synchronisation after complex prosaccade task. *Clin Neurophysiol*. 2009;120:11-17.

Gustin SM, Wrigley PJ, Gandevia SC, Middleton JW, Henderson LA, Siddall PJ. Movement imagery increases pain in people with neuropathic pain following complete thoracic spinal cord injury. *Pain*. 2008;137(2):237-244.

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

Gwak YS, Tan HY, Nam TS, Paik KS, Hulsebosch CE, Leem JW. Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(7):1111-1124.

Gwak YS, Crown ED, Unabia GC, Hulsebosch CE. Propentofylline attenuates allodynia, glial activation and modulates GABAergic tone after spinal cord injury in the rat. *Pain*. 2008;138(2):410-422.

Haas LF. Hans Berger (1873–1941), Richard Caton (1842–1926), and electroencephalography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:9.

Hains BC, Black JA, Waxman SG. Primary Cortical Motor Neurons Undergo Apoptosis after Axotomizing Spinal Cord Injury. *J Comp Neurol*. 2003;462:328-341.

Hall RD, Lindholm EP. Organization of Motor and Somatosensory Neocortx in the Albino Rat. *Brain Res*. 1974;66:23-38.

Hamzei F, Liepert J, Dettmers C, Weiller C, Rijntjes M. Two different reorganization patterns after rehabilitative therapy: An exploratory study with fMRI and TMS. *NeuroImage*. 2006;31:710-720.

Hardman VJ, Brown MC. Spatial organization within rat motoneuron pools. *Neurosci Lett*. 1985;60:325-329.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32(1):77-88.

Harkema SJ. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking. *Neuroscientist*. 2001;7(5):455-468.

He SQ, Dum RP, Strick PL. Topographic Organization of Corticospinal Projections from the Frontal Lobe: Motor Areas on the Lateral Surface of the Hemisphere. *J Neurosci*. 1993;133:952-980.

He SQ, Dum RP, Strick PL. Topographic Organization of Corticospinal Projections from the Frontal Lobe: Motor Areas on the Medial Surface of the Hemisphere. *J Neurosci*. 1995;15(5): 3284-3306

Heng C, De Leon RD. The Rodent Lumbar Spinal Cord Learns to Correct Errors in Hindlimb Coordination Caused by Viscous Force Perturbations during Stepping. *J Neurosci*. 2007;7(32):8558-8562.

Herbert D, Tran Y, Craig A, Boord P. Altered Brain Wave Activity in Persons with Chronic Spinal Cord Injury. *Intern J Neurosci*. 2007;117:1731-1746.

Herrera JJ, Haywood-Watson RJ. 2nd, Grill RJ. Acute and chronic deficits in the urinary bladder following spinal contusion injury in the adult rat. *J Neurotrauma*. 2010;27(2):423-431.

Hodgson JÁ, Roy RR, De Leon RD, Dobkin B, Edgerton VR. Can the mammalian lumbar spinal cord learn a motor task? *Med Sci Sports Exerc*. 1994;26(12):1491-1497.

Hoover JE, Strick PL. The Organization of Cerebellar and Basal Ganglia Outputs to Primary Motor Cortex as Revealed by Retrograde Transneuronal Transport of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Neurosci*. 1999;19(4):1446-1463.

Hoschouer EL, Basso MD, Jakeman LB. Aberrant sensory responses are dependent on lesion severity after spinal cord contusion injury in mice. *Pain*. 2010;148(2):328-342.

Hoshi E, Tremblay L, Féger J, Carras PL, Strick PL. The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat Neurosci*. 2005;8:1491–1493.

Houle JD, Tessler A. Repair of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2003;182:247-260.

Huang MX, Theilmann RJ, Robb A, Angeles A, Nichols S, Drake A, D'Andrea J, Levy M, Holland M, Song T, Ge S, Hwang E, Yoo K, Cui L, Baker DG, Trauner D, Coimbra R, Lee RR. Integrated imaging approach with MEG and DTI to detect mild traumatic brain injury in military and civilian patients. *J Neurotrauma*. 2009;26(8):1213-1226.

Hulsebosch CE. Recent Advances in Pathophysiology and Treatment of Spinal Cord Injury. *Adv Physiol Educ*. 2002;26:238-255.

Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):202-213.

Hussain S, Xie SQ, Liu G. Robot assisted treadmill training: Mechanisms and training strategies. *Med Eng Phys.* 2011;33(5):527-533.

Hutchinson KJ, Pinilla FG, Crowe MJ, Ying Z, Basso M. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain*. 2004;127(6):1403-1414.

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

Ibrahim E, Brackett NL, Aballa TC, Lynne CM. Safety of a novel treatment to improve sperm motility in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1411-1413.

Inase M, Tokuno H, Nambu A, Akazawa T, Takada M. Origin of thalamocortical projections to the presupplementary motor area (pre-SMA) in the macaque monkey. *Neurosci Res*. 1996;25:217-227.

Jain N, Kenneth CC, Kaas JH. Deactivation and reactivation of somatossensory cortex after dorsal spinal cord injury. *Nature*. 1997;386:495-498.

Jain N, Florence SL, Kaas JH. Reorganization of Somatosensory Cortex After Nerve and Spinal Cord Injury. *News Physiol Sci*. 1998;13:143-149.

Jakeman LB, Wei P, Guan Z, Stokes BT. Brain-Derived Neurotrophic Factor Stimulates Hindlimb Stepping and Sprouting of Cholinergic Fibers after Spinal Cord Injury. *Exp Neurol*. 1998;154:170-184.

Jayaraman A, Shah P, Gregory C, Bowden M, Stevens J, Bishop M, Walter G, Behrman A, Vandenborne K. Locomotor Training and Muscle Function After Incomplete Spinal Cord Injury: Case Series. *J Spinal Cord Med*. 2008;31:185-193.

Jones TA, Chu CJ, Grande LA, Gregory AD. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats*. J Neurosci*. 1999;19(22):10153-10163.

Kaas JH, Qi HX, Burish MJ, Gharbawie OA, Onifer SM, Massey JM. Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord. *Exp Neurol*. 2008;209:407-416.

Kaegi S, Schwab ME, Dietz V, Fouad, K. Electromyographic activity associated with spontaneous functional recovery after spinal cord injury in rats. *Eur J Neurosci*. 2001;16:249-258.

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

Kerr BJ, David S. Pain behaviors after spinal cord contusion injury in two commonly used mouse strains. *Exp Neurol*. 2007;206:240-247.

Keinrath C, Wriessnegger S, Müller-Putz GR, Pfurtscheller G. Post-movement beta synchronization after kinesthetic illusion, active and passive movements. *Intern J Psychophysiol.* 2006;62:321-327.

Kim BG, Dai HN, Mcatee M, Vicini S, Bregman BS. Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2006;198:401-415.

Kjaerulff O, Kiehn O. Crossed Rhythmic Synaptic Input to Motoneurons during Selective Activation of the Contralateral Spinal Locomotor Network. *J Neurosci*. 1997;17(24):9433-9447.

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

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

Kleim JA, Barbay S, Nudo RJ. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning*. J Neurophysiol*. 1998;80(6):3321-3325.

Kleim JA, Hogg TM, VandenBerg PM, Cooper NR, Bruneau R, Remple M. Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning*. J Neurosci*. 2004;24(3):628-633.

Kloos AD, Fisher LC, Detloff MR, Hassemzahl DL, Basso MD. Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Exp Neurology*. 2005;191:251-265.

Kokotilo KJ, Eng JJ, Curt A. Reorganization and preservation of motor control of the brain in spinal cord injury: a systematic review. *J Neurotrauma*. 2009;26(11):2113-2126.

Kozlowski DA, James DC, Schallert T. Use dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J Neurosci*. 1996;16:4776-4786.

Krajacic A, Weishaupt N, Girgis J, Tetzlaff W, Fouad K. Training-induced plasticity in rats with cervical spinal cord injury: Effects and side effects. *Behav Brain Res*. 2010;214:323-331.

Kristeva R, Patino L, Omlor W. Beta-range cortical motor spectral power and corticomuscular coherence as a mechanism for effective corticospinal interaction during steady-state motor output. *Neuroimage*. 2007;36(3):785-792.

Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*. 2010;16(11):1258-1266.

Kunkel-Bagden E, Daí HN, Bregman BS. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats*. Exp Neurol*. 1993;119(2):153-64.

Kuo TBJ, Li JY, Hsieh SSY, Chen JJ, Tsai CY, Yang CCH. Effect of aging on treadmill exercise induced theta power in the rat. *Age (Dordr)*. 2010;32(3):297-308.

Lalo E, Gilbertson T, Doyle L, Di Lazzaro V, Cioni B, Brown P. Phasic increases in cortical beta activity are associated with alterations in sensory processing in the human. *Exp Brain Res*. 2007;177(1):137-145.

Lankhorst AJ, ter Laak MP, van Laar TJ, van Meeteren NL, de Groot JC, Schrama LH, Hamers FP, Gispen WH. Effects of Enriched Housing on Functional Recovery After Spinal Cord Contusive Injury in the Adult Rat. *J Neurotrauma*. 2001;18(2):203-215.

Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Pain*. 2009;10(9):895-926.

Lee C, Won D, Cantoria MJ, Hamlin M, De Leon RD. Robotic assistance that encourages the generation of stepping rather than fully assisting movements is best for learning to step in spinally contused rats. *J Neurophysiol.* 2011; [Epub ahead of print].

Lemon RN, Baker SN, Davis JA, Kirkwood PA, Maier MA, Yang HS. The importance of the cortico-motoneuronal system for control of grasp. *Novartis Found Symp*. 1998;218:202-215.

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

Lemon RN, Griffiths J. Comparing the Function of the Corticospinal System in Different Species: Organizational Differences for Motor Specialization? *Muscle Nerve*. 2005;32:261-279.

Leung PY, Wrathall JR. Local and distal responses to injury in the rapid functional recovery from spinal cord contusion in rat pups. *Exp Neurol.* 2006;202:225–237.

Liang FY, Moret V, Wiesendanger M, Rouiller EM. Corticomotoneuronal connections in the rat: evidence from double-labeling of motoneurons and corticospinal axon arborizations. *J Comp Neurol*. 1991;311(3):356-366.

Liebermann DG, Buchman AS, Franks IM. Enhancement of motor rehabilitation through the use of information technologies. *Clin Biomech*. 2006;21:8-20.

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

Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *Neurosci*. 1997;17(14):5395-5406.

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

Loy DN, Magnuson DSK, Zhang YP, Onifer SM, Mills MD, Cao Q, Darnall JB, Fajardo LC, Burke DA, Whittermore SR. Functional Redundancy of Ventral Spinal Locomotor Pathways. *J Neurosci*. 2002;22(1):315-323.

Lu XC, Hartings JA, Si Y, Balbir A, Cao Y, Tortella FC. Electrocortical Pathology in a Rat Model of Penetrating Ballistic-Like Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2011;28:71-83.

Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2005;191:344-360.

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

Luppino G, Rizzolatti G. The Organization of the Frontal Motor Cortex. *News Physiol Sci*. 2000;15:219-224.

Lukashevich IP, Shklovskii VM, Kurkova KS, Machinskaya RI, Serova GG, Akopova NV. The Effects of Lesions to Subcortical Conducting Pathways on the Electrical Activity of the Human Cerebral Cortex. *Neurosci Behav Physiol.* 1999; 29(3):283-287.

Lyalka VF, Zelenin PV, Karayannidou A, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG. Impairment and Recovery of Postural Control in Rabbits With Spinal Cord Lesions. *J Neurophysiol*. 2005;94:3677-3690.

Ma M, Basso MD, Walters P, Stokes BT, Jakeman LB. Behavioral and Histological Outcomes Following Graded Spinal Cord Contusion Injury in the C57Bl/6 Mouse. *Exp Neurol*. 2001;169:239-254.

Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Ltda.; 1983.

Machado S, Portella CE, Silva JG, Velasques B, Terra P, Vorkapic CF, Silva VF, Miana L, Basile L, Cagy M, Piedade R, Ribeiro P. Changes in Quantitative EEG Absolute Power During the Task of Catching an Object in Free Fall. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007;65(3-A):633-636.

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

Maeda Y, Ikeuchi M, Wacnik P, Sluka KA. Increased c-fos immunoreactivity in the spinal cord and brain following spinal cord stimulation is frequency-dependent. *Brain Res*. 2009;1259:40-50.

Magnuson DS, Lovett R, Coffee C, Gray R, Han Y, Zhang YP, Burke DA. Functional Consequences of Lumbar Spinal Cord Contusion Injuries in the Adult Rat. *J Neurotrauma.* 2005;22(5):529-543.

Magnuson DS, Smith RR, Brown EH, Enzmann G, Angeli C, Quesada PM, Burke D. Swimming as a model of task-specific locomotor retraining after spinal cord injury in the rat. *Neurorehabil Neural Repair*. 2009;23(6):535-545.

Maier IC, Ichiyama RM, Courtine G, Schnell L, Lavrov I, Edgerton RV, Schwab ME. Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury. *Brain*. 2009;132:1426-1440.

Maier MA, Olivier E, Baker SN, Kirkwood PA, Morris T, Lemon RN. Direct and Indirect Corticospinal Control of Arm and Hand Motoneurons in the Squirrel Monkey (Saimiri sciureus). *J Neurophysiol*. 1997;78:721-733.

Maier MA, Schwab ME. Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361:1611-1634.

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

Marieb EN. *Human Anatomy & Physiology*. EUA:Benjamin Cummings/ Addison Wesley Longman, Inc.; 2001.

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

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

Meeteren ML, Eggers R, Lankhorst AJ, Gispen WH, Hamers FPT. Locomotor Recovery after Spinal Cord Contusion Injury in Rats Is Improved by Spontaneous Exercise. *J Neurotrauma*. 2003;20(10):1029-1037.

Metz GA, Whishaw IQ. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. *J Visualiz Exp*. 2009;12(28):1-4.

Miranda TAB, Cristante AF, Valle AC, Sameshima K, Morya E. Treadmill training improves motor function and mechanical pain of spinal cord injured Wistar rats. Program#/Poster#: 684.17/XX3. *2010 Neuroscience Meeting Planner*. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010.

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

Molina-Luna K, Hertler B, Buitrago MM, Luft AR. Motor learning transiently changes cortical somatotopy. *Neuroimage*. 2008;40(4):1748-1754.

Mullen RJ, Buck CR, Smith M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992;116(1):201-211.

Murakami Y, Furukawa S, Nitta A, Furukawa Y. Accumulation of nerve growth factor protein at both rostral and caudal stumps in the transected rat spinal cord. *J Neurol Sci*. 2002;198:63-69.

Nacimiento W, Noth J. What, if anything, is spinal shock? *Arch Neurol*. 1999;56(8):1033-1035.

National Spinal Cord Injury Database. Facts and Figures at a Glance. National Spinal Cord Injury Statistical Center, Birmingham, Alabama, jun., 2010. Disponível em: <http://images.main.uab.edu/spinalcord/pdffiles/Facts06.pdf> Acesso em: 14 ago. 2010.

Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR. The Organization of the Rt Motor Rat Cortex: A Microstimulation Mapping Study. *Brain Res Rev*. 1986;11:77-96.

Neuper C, Pfurtscheller G. Event-related dynamics of cortical rhythms: frequency-specific features and functional correlates. *Int J Psychophysiol*. 2001;43(1):41-58.

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

Nicolelis MA, Lin C-S, Woodward DJ, Chapin JK. Distributed processing of somatic information by networks of thalamic cells induces time-dependent shifts of their receptive fields. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:2212-2216.

Nicolelis MA, Baccala LA, Lin RC, Chapin JK. Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system. *Science*. 1995;268(5215):1353-1358.

Nicolelis MA, Ghazanfar AA, Faggin BM, Votaw S, Oliveira LM. Reconstructing the engram: simultaneous, multisite, many single neuron recordings. *Neuron*. 1997;18(4):529-537(a).

Nicolelis MA, Lin RCS, Chapin JK. Neonatal whisker removal reduces the discrimination of tactile stimuli by thalamic ensembles in adult rats. *J Neurophysiol*. 1997;78(3):1691-1706(b).

Nicolelis MA, Dimitrov DF, Carmena JM, Crist RE, Lehew G, Kralik JD, Wise SP. Chronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(19):11041-11046.

Nielsen JB, Perez MA, Oudega M, Enriquez-Denton M, Aimonetti JM. Evaluation of transcranial magnetic stimulation for investigating transmission in descending motor tracts in the rat. *Eur J Neurosci*. 2007;25;805-814.

Nishikawa K, Maciver MB. Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *J Neurosci*. 2000;20(16):5915-5923.

Nooijen CF, Hoeve NT, Field-Fote EC. Gait quality is improved by locomotor training in individuals with SCI regardless of training approach. *J Neuroeng Rehab*. 2009;6:36-46.

Norrie BA, Nevett-Duchcherer JM, Gorassini MA. Reduced Functional Recovery by Delaying Motor Training After Spinal Cord Injury. *J Neurophysiol*. 2005;94:255-264.

Parkes LM, Bastiaansen MCM, Norris DG. Combining EEG and fMRI to investigate the post-movement beta rebound. *Neuroimage*. 2006;29:685-696.

Pavlides C, Miyashita E, Asanuma H. Projection from the sensory to the motor cortex is important in learning motor skills in the monkey. *J Neurophysiol*. 1993;70(2):733-741.

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

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

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

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

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

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

Popovich P, McTigue D. Beware the immune system in spinal cord injury. *Nat Med*. 2009;15(7):736-737.

Qi HX, Jaina N, Collins CE, Lyon DC, Kaas JH. Functional organization of motor cortex of adult macaque monkeys is altered by sensory loss in infancy. *PNAS*. 2010;107(7):3192-3197.

Qin DX, Zou XL, Luo W, Zhang W, Zhang HT, Li XL, Zhang H,Wang XY, Wang TH. Expression of some neurotrophins in the spinal motoneurons after cord hemisection in adult rats. *Neurosci Lett*. 2006;410:222-227.

Ramsey JB, Ramer LM, Inskip JA, Alan N, Ramer MS, Krassioukov AV. Care of rats with complete high-thoracic spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2010;27(9):1709-1722.

Rathelot JA, Strick PL. Muscle representation in the macaque motor cortex: An anatomical perspective. *PNAS*. 2006;103(21): 8257–8262.

Reier PJ, Stokes BT, Thompson FJ, Anderson DK. Fetal cell grafts into resection and contusion/ compression injuries of the rat and cat spinal cord. *Exp Neurol*. 1992;115(1):177-188.

Riegger T, Conrad S, Liu K, Schluesener HJ, Adibzahdeh M, Schwab JM. Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS). *Eur J Neurosci*. 2007;25(6):1743-1747.

Riegger T, Conrad S, Schluesener HJ, Kaps HP, Badke A, Baron C, Gerstein J, Dietz K, Abdizahdeh M, Schwab JM. Immune Depression Syndrome Following Human Spinal Cord Injury (SCI): a pilot study. *Neuroscience*. 2009;158(3):1194-1199.

Rizzolatti G, Luppino G. The Cortical Motor System. *Neuron*. 2001;31(6):889-901.

Rossignol S. Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/or peripheral lesions in the adult mammals. *Phil Trans R Soc*. 2006;361:1647-1671.

Saberi H, Moshayedi P, Aghayana H-R, Arjmanda B, Hosseini S-K, Emami-Razavi S-H, Rahimi-Movaghara V, Razad M, Firouzib M. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: An interim report on safety considerations and possible outcomes. *Neurosci Lett*. 2008;443:46-50.

Sakai ST, Istepniewska I, Qi HX, Kaas JH. Pallidal and Cerebellar Afferents to Pre- Supplementary Motor Area Thalamocortical Neurons in the Owl Monkey: A Multiple Labeling Study. *J Comp Neurol*. 2000;417:164-180.

Salenius S, Hari R. Synchronous cortical oscillatory activity during motor action. *Curr Opin Neurobiol*. 2003;13:678-684.

Sanes JN, Schieber MH. Orderly somatotopy in primary motor cortex: does it exist? *Neuroimage*. 2001;13(6 Pt 1):968-974.

Sanes JN, Suner S, Lando JF, Donoghue JP. Rapid Reorganization of Adult Rat Motor Cortex Somatic Representation Patterns after Motor Nerve Injury. *Proc Nail Acad Sci*. 1988;85:2003-2007.

Sarikcioglu L, Ozsoy U. Bror Rexed (1914–2002). *J Neurol*. 2008;255:1988-1989.

Sarnthein J, Stern J, Aufenberg C, Rousson V, Jeanmonod D. Increased EEG power and slowed dominant frequency in patients with neurogenic pain. *Brain*. 2006;129(Pt 1):55-64.

Sauseng P, Klimesch W. What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? *Neurosci Biobehavl Rev*. 2008;32(5):1001-1013.

Scanziani M, Häusser M. Electrophysiology in the age of light. *Nature.* 2009;461:930-939.

Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A Statistical Method for Analyzing Rating Scale Data: The BBB Locomotor Score. *J Neurotrauma*. 2002;19(10):1251-1260.

Schwab ME. Repairing the Injured Spinal Cord. *Science*. 2002;295:1029-1031.

Schwab ME. Repair of injured fiber tracts in the mammalian central nervous system. *Intern Congress Series*. 2007;1302:131-140.

Šedý JI, Urdzíková L, Jendelová P, Syková E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32:550-580.

Shackman AJ, McMenamin BW, Maxwell JS, Greischar LL, Davidson RJ. Identifying robust and sensitive frequency bands for interrogating neural oscillations. *Neuroimage*. 2010;51(4):1319-1333.

Shin HC, Chapin JK. Movement induced modulation of afferent transmission to single neurons in the ventroposterior thalamus and somatosensory cortex in rat. *Exp Brain Res*. 1990;81(3):515-22.

Siegenthaler MM, Berchtold NC, Cotman CW, Keirstead HS. Voluntary running attenuates age-related deficits following SCI. *Exp Neurol.* 2008;210(1):207-216.

Siemionow M, Mendiola A. Methods of Assessment of Cortical Plasticity in Patients Following Amputation, Replantation, and Composite Tissue Allograft Transplantation. *Ann Plast Surg*. 2010;65(3): 344-348.

Singh A, Balasubramanian S, Murray M, Lemay MA, Houle JD. Role of Spared Pathways in Locomotor Recovery after Body Weight Supported Treadmill Training in Contused Rats. *J Neurotrauma.* 2011; [Epub ahead of print].

Smeal WL, Yezierski RP, Wrigley PJ, Siddall PJ, Jensen MP, Ehde DM. Spinal cord injury. *J Pain*. 2006;7(12):871-877.

Smith RR, Shum-Siu A, Baltzley R, Bunger M, Baldini A, Burke DA, Magnuson DSK. Effects of Swimming on Functional Recovery after Incomplete Spinal Cord Injury in Rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(6):908-919.

Smith RR, Brown EH, Shum-Siu A, Whelan A, Burke DA, Benton RL, Magnuson DSK. Swim Training Initiated Acutely after Spinal Cord Injury Is Ineffective and Induces Extravasation In and Around the Epicenter. *J Neurotrauma*. 2009;26:1017-1027.

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

Spinal Cord Injury Statistics. Foundation for Spinal Cord Injury Prevention, Care & Cure. 2009. <http://www.fscip.org/facts.htm>. Acesso em 14 setembro 2010.

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

Steriade M. *Cellular Substrates of Brain Rhythms* in Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields. EUA:Lippincott Williams & Wilkins;2005.

Stoffers D, Bosboom JLW, Deijen JB, Wolters EC, Berendse HW, Stam CJ. Slowing of oscillatory brain activity is a stable characteristic of Parkinson's disease without dementia. *Brain*. 2007;130(7):1847-1860.

Sydekum E, Baltes C, Ghosh A, Mueggler T, Schwab ME, Rudin M. Functional reorganization in rat somatosensory cortex assessed by fMRI: Elastic image registration based on structural landmarks in fMRI images and application to spinal cord injured rats. *Neuroimage*. 2009;44:1345-1354.

Takami T, Oudega M, Bethea JR, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone and Interleukin-10 Reduce Gray Matter Damage in the Contused Fischer Rat Thoracic Spinal Cord but Do Not Improve Functional Outcome. *J Neurotrauma*. 2002;19(5):653-666.

Takasaki I, Andoh T, Nojima H, Shiraki K, Kuraishi Y. Gabapentin Antinociception in Mice with Acute Herpetic Pain Induced by Herpes Simplex Virus Infection. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296:270-275.

Todman D. Wilder Penfield (1891–1976). *J Neurol*. 2008;255:1104-1105.

Touch Test™ Sensory Evaluators, Semmes Weinstein Von Frey Aesthesiometers, Operation Manual, 2001.

Tran Y, Boord P, Middleton J, Craig A. Levels of brain wave activity (8–13 Hz) in persons with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2004;42:73-79.

Triola, M. *Correlação e Regressão* em Introdução à Estatística. Rio de Janeiro:Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.; 1999.

Turak B, Louvel J, Buser P, Lamarche M.Parieto-temporal rhythms in the 6-9 Hz band recorded in epileptic patients with depth electrodes in a self-paced movement protocol. *Clin Neurophysiol.* 2001;112(11):2069-74.

Velliste M, Velliste M, Perel S, Spalding MC, Whitford AS, Schwartz AB. Cortical control of a prosthetic arm for self-feeding. *Nature*. 2008;453(7198):1098-1101.

Verma P, Garcia-Alias G, Fawcett JW. Spinal Cord Repair: Bridging the Divide. *Neurorehabil Neural Repair*. 2008;22(5):429-437.

Vialle LRG, Fisher S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Torres LFB. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop*. 1999;34(2):85-89.

Vialle E, Vialle LRG, Rasera E, Cechinel C, Leonel I, Seyboth C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental. *Rev Bras Ortop*. 2002;37(3):83-88.

Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, Heise C. *Atlas of the Rat Spinal Cord* in The Spinal Cord: A Cristopher and Danna Reve Foundation Text and Atlas. EUA:Academic Press; 2009.

Wewetzer K, Radtke C, Kocsis J, Baumgärtner W. Species-specific control of cellular proliferation and the impact of large animal models for the use of olfactory ensheathing cells and Schwann cells in spinal cord repair. *Exp Neurol*. 2011; 229(1):80-87.

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

Winchester P, McColl R, Querry R, Foreman N, Mosby J, Tansey K, Williamson J. Changes in supraspinal activation patterns following robotic locomotor therapy in motor-incomplete spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair*. 2005;19(4):313-324.

Wise SP, Pellegrino GD, Boussaoud D. The premotor cortex and nonstandard sensorimotor mapping. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74:469-482.

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

Welch, PD. The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms. *IEEE Transactions on Audio Electroacoustics*. 1967;15:70-73.

Wolpert DM, Ghahramani Z, Flanagan JR. Perspectives and problems in motor learning. *Trends Cogn Sci*. 2001;5(11):487-494.

Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152(3 Suppl):S2-S15.

Yang HW, Lemon RN. An electron microscopic examination of the corticospinal projection to the cervical spinal cord in the rat: lack of evidence for cortico-motoneuronal synapses. *Exp Brain Res*. 2003;149(4):458-469.

Yague JG, Foffani G, Aguilar J. Cortical hyperexcitability in response to preserved spinothalamic inputs immediately after spinal cord hemisection. *Exp Neurol.* 2011;277:252-263.

Yezierski RP. Spinal Cord Injury: A Model of Central Neuropathic Pain. *Neurosignals*. 2005;14:182-193.

Zacksenhouse M, Lebedev MA, Carmena JM, O'Doherty JE, Henriquez C, Nicolelis MA. Cortical modulations increase in early sessions with brain-machine interface. *PLoS One*. 2007;2(7):e619.

Zai LJ, Wrathall JR. Cell Proliferation and Replacement Following Contusive Spinal Cord Injury. *Glia*. 2005;50:247-257.

Zhang H, Xie W, Xie Y. Spinal cord injury triggers sensitization of wide dynamic range dorsal horn neurons in segments rostral to the injury. *Brain Res*. 2005;1055(1-2):103-110.

Zhou L, Shine HD. Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 2003;74(2):221-226.

Zilles K, Amunts K. Centenary of Brodmann's map - conception and fate. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11:139-145.

Apêndice A - Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais IEP/HSL

Hospital Sírio Libanês
INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 17 de Outubro de 2008.

Ilma. Ft. Taisa Amoroso Miranda
Pesquisadora Principal

Prezada Pesquisadora,

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Hospital Sírio Libanês analisou e **APROVOU,** o Treinamento de novas técnicas ou tecnologias CEUA2008/21 titulado: *"Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora"* em **17 de outubro de 2008.**

Dr. Luciano César Pontes de Azevedo
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Hospital Sírio-Libanês

R. Cel. Nicolau dos Santos, 69 Bela Vista São Paulo SP CEP 01308-060 Tel 11 3155-1145 / 3155-1146 Fax 11 3155-0494 icp@hsl.org.br www.icphsl.org.br

Apêndice B - Aprovação Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa FMUSP/HC

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ao
Departamento de Patologia

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 16.12.08, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº **1079/08**, intitulado: **"Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora".**

No que tange sua parte empírica será desenvolvido na **Hospital Sírio Libanês** , tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 17.10.08.

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Ângela Cristina do Valle**
Pesquisador Executante: **Taisa Amoroso Bortolato Miranda**

CAPPesq, 16 de dezembro de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
tms

Apêndice C - Centro de Bioterismo da FMUSP

C:\Users\FMUSP\Documentos\Trabalho\ADMIRAÇÃO\TROF ao Assessor Financeiro FMUSP solicitando ordens de compra de rações para agosto setembro2009.doc

MEDICINA
USP

Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DTAEP/145/FM/040809

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Eduardo Massad
Responsável pelo LIM 01 - Lab.de Bioengenharia

Senhor(a) Professor(a),

Encaminhamos a V.Sa. o no. DTAEP, datas de liberação, vencimento e previsão total relativos ao projeto de pesquisa:

No. DTAEP: 044/091

TITULO: Extrategia terapeutica apos contusao da medula espinh

RESPONSAVEIS: Miranda,T.A.B.;Sameshima,K.; Valle,A.C.; Morya,

LIBERAÇÃO: 04/08/2009 VENCIMENTO: 31/07/2010

PREVISÃO: 2/qui PREVISÃO TOTAL: 21

Esclarecemos que o fornecimento será conforme a disponibilidade do setor.

(A não utilização dos animais por 3 meses acarretará o cancelamento do projeto.)

Atenciosamente,

Alex Hatsukawa Griman
Seção Adm. nº USP 2463290
Centro de Bioterismo DTAPEP/FMUSP

Observações: Liberado 2 ratos Wistar, machos, de 250 a 300g, por quinzena.

2ª 6ª Feira
8ª 10h30

FACULDADE DE MEDICINA USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César
01246-903 - São Paulo – SP - ☎ PABX 3061 7000

DTAPEP/CENTRO DE BIOTERISMO
☎/Fax 3082.6777
☎-KS 3061-7344, -7412, -7196, -7197