JULIANA MENDES YULE VICENTE

Análise dos eventos tônicos e fásicos do sono dessincronizado em
ratos Wistar com lesão medular contusa

São Paulo

2009

JULLIANA MENDES YULE VICENTE	Análise dos eventos tônicos e fásicos do sono dessincronizado em ratos Wistar com lesão medular contusa	DOUTORADO FMUSP 2009
---------------------------------------	---	----------------------------

JULIANA MENDES YULE VICENTE

Análise dos eventos tônicos e fásicos do sono dessincronizado em
ratos Wistar com lesão medular contusa

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

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Dra. Angela Cristina do Valle

v.1

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vicente, Juliana Mendes Yule

Análise dos eventos tônicos e fásicos do sono dessincronizado em ratos Wistar com lesão medular contusa / Juliana Mendes Yule Vicente. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Ângela Cristina do Valle.

Descritores: 1.Sono REM/fisiologia 2.Traumatismos da medula espinal
3.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-268/09

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Mendes Yule Vicente

Análise dos eventos tônicos e fásicos do sono dessincronizado em ratos Wistar com lesão medular contusa

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Esta tese, que é a síntese de um trabalho científico pessoal de alguns anos
visando à obtenção do grau de doutor, é dedicada com grande afeto e
muitíssimo respeito:

Aos pais, Guilherme e Isley

Ao marido, Sérgio

Ao filho, João

Ao mestre, César Timo-laria (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Considero o processo de elaboração de uma dissertação de doutorado, ser fruto de um esforço coletivo, embora de seu desenho até a finalização de sua redação, inúmeras responsabilidades e *stress* sejam predominantemente individuais. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse neste ponto. A todas elas manifesto minha imensa gratidão.

Aos pais, Guilherme e Isley, pelo exemplo a ser seguido e pela doação de educação e instrução que sem dúvida é a origem deste processo de amadurecimento profissional e pessoal.

Ao marido, Sérgio, pelo incentivo incansável, sem o qual várias das minhas conquistas não aconteceriam como aconteceram.

Ao filho, João, pela razão do meu viver.

Às tias: Claudete, pela crença interminável e pelo brilho nos olhos ao me incentivar e apoiar a cada tombo e derrapagem. Eliza, pela alegria de me ensinar a ver as coisas como elas podem vir a ser. Cleusa, que mesmo como tia postiça e agregada manifestou seu orgulho e me incentivou a nunca desistir.

À amiga Gabiroba, pelo tombo, pelo afago, pela coragem, pela determinação, pela técnica e muito, muito mais.

Ao Prof. Dr. MaVi, pelo puxão de orelha e pelas aulas da escola da vida.

À Prof. Dra. Cinthia Itiki, pela recepção calorosa e acolhedora.

Ao Prof. Dr. Tarcísio Eloi Barros Filho. e Dr. Rafael Marcon, pela autorização e apoio na utilização do NYU Impactor no LETRAN.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, pela autorização de uso de material e processamento histológico no LIM-51.

Às técnicas, Fátima e Sueli, pelo processamento do material histológico no LIM-51.

À Prof^a Dra. Elia Tamasso Espin Garcia Caldini, pelo incentivo e orientação.

Aos iniciantes científicos, Taisa, Vivian e Victor, pela opção escolhida.

À secretária da Fisiopatologia Experimental, Tânia e Sônia.

À CAPES, pela contemplação da bolsa institucional.

À orientadora, Dra. Angela Valle, pela oportunidade.

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”

(Confúcio)

RESUMO

Após a lesão medular (LM) ocorre reorganização estrutural local e em múltiplos níveis do sistema nervoso central (SNC). Comprometimento das funções sensorio-motoras bem como alterações significativas de outras funções neurais são normalmente relatadas após um trauma seguido de LM. Os ritmos circadianos, em especial, o ciclo vigília-sono são frequentemente afetados após um trauma ou intervenção no SNC, no entanto, poucos estudos tem relacionado a influência da lesão medular sobre a fisiologia do sono. Estudos fisiopatológicos são atualmente baseados em modelos experimentais os quais tem possibilitado o esclarecimento dos mecanismos subjacentes a vários fenômenos biológicos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo apresentar, primeiramente, uma análise sistemática do ciclo vigília-sono em um modelo animal de LM contusa moderada e, em segundo lugar, por ser o sono dessincronizado uma fase importante pela ocorrência de movimentos espontâneos, estudar detalhadamente a influencia da LM sobre os eventos tônicos e fásicos desta fase. Para tal, foram realizados registros eletroscilográficos das áreas corticais sensorio-motora (A7) e hipocampais (CA1) de ambos os hemisférios e, registros eletromiográficos dos trapézios, elevadores da asa do nariz, gastrocnêmios e epicantos oculares. Os resultados mostraram significativo aumento na quantidade total das fases sono sincronizado ($p < 0,002$, Dunn) e SD ($p < 0,03$, Dunn), bem como, presença dos eventos fásicos inerentes ao SD após a lesão medular. A arquitetura dos ciclos sofreu forte influencia da LM manifestada pela desorganização das fases ($p < 0.05$). Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que o trauma medular provoca alterações qualitativas e quantitativas nos ciclos vigília-sono dos ratos portadores LM contusa moderada.

Descritores: Sono REM/ fisiologia; Traumatismo da medula espinal; Ratos Wistar

ABSTRACT

After a spinal cord injury (SCI), structural reorganization occurs locally and at multiple levels of the central nervous system (CNS). Compromising of sensory motor functions and significant alterations of other neural functions are normally related after a SCI. The circadian rhythms, specially the sleep-wake cycle are frequently affected after a trauma or intervention in CNS. Few studies have approached contusive SCI in sleep physiology. Nowadays, physiopathological studies are based on experimental models which offer several possibilities to obtain new signs related to mechanisms to several biological phenomena. Thus, the present research aimed to present a systematic analysis of the sleep-wake cycle in a SCI animal model to detail the influence of SCI over tonic and phasic events during desynchronized sleep (DS), since this sleep phase is important for the occurrence of spontaneous movements. In order to do that, electroencephalogram (EEG) records of the sensory motor cortex (A7) and dorsal hippocampus (CA1) of both hemispheres were carried out, and electromyography (EMG) records of the trapezium, rostrum, gastrocnemius and eyes. The results showed significant increase of total time of synchronized sleep ($p < 0.002$) and DS ($p < 0.03$) and evidence of phasic events inherent to DS after SCI. The cycle architecture suffered high influence of SCI manifested by disarrangement of phases ($p < 0.05$). The results presented in this study showed that SCI provokes qualitative and quantitative alterations of sleep-wake cycle in contusive moderate SCI rats.

Descriptors: REM sleep/ physiology; Spinal cord trauma; Wistar rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Foto de soquete e elétrodos.....	27
Figura 2	Representação gráfica cartesiana das áreas cito-arquitetônicas	28
Figura 3	Representação gráfica do córtex frontal do encéfalo de rato.....	29
Figura 4	Representação esquemática dos músculos utilizados para implante.....	30
Figura 5	Representação por fotos das etapas do procedimento cirúrgico de implantação de elétrodos encefálicos.....	32
Figura 6	Foto de ventilador criado para secagem de acrílico.....	33
Figura 7	Foto do aparato NYU Impactor para procedimento de lesão medular.....	34
Figura 8	Apresentação de traçado de 20 segundos de vigília atenta pré-lesão medular	49
Figura 9	Apresentação de traçado de 20 segundos de vigília relaxada pré-lesão medular	50
Figura 10	Apresentação de traçado de 20 segundos de sono sincronizado pré-lesão medular.....	50
Figura 11	Apresentação de traçado de 20 segundos da transição do sono sincronizado para sono pré-paradoxal pré-lesão medular	51
Figura 12	Apresentação de traçado de 20 segundos de sono dessincronizado pré-lesão medular	52
Figura 13	Apresentação de traçado de 20 segundos de vigília atenta pós-lesão medular.....	52
Figura 14	Apresentação de traçado de 20 segundos da transição de vigília relaxada para sono sincronizado pós-lesão medular.....	53
Figura 15	Apresentação de traçado de 20 segundos da transição de sono sincronizado para sono pré-paradoxal pós-lesão medular.....	53

Figura 16	Apresentação de traçado de 20 segundos de sono dessincronizado pós-lesão medular.....	54
Figura 17	Representação gráfica do tempo total e número de fases do ciclo vigília-sono da análise longitudinal pré e pós lesão medular	57
Figura 18	Representação gráfica dos ciclos completos e incompletos da vigília-sono da análise longitudinal pré e pós lesão medular	58
Figura 19	Representação gráfica dos eventos fásicos do sono dessincronizado da análise longitudinal pré e pós lesão medular.....	65
Figura 20	Apresentação gráfica dos trechos de dois segundos utilizados para análise espectral e a representação das três bandas de frequência utilizada na análise longitudinal pré e pós lesão medular e entre grupos com e sem eventos fásicos durante o sono dessincronizado.....	67
Figura 21	Representação gráfica da frequência delta da análise longitudinal pré e pós lesão medular e entre grupos com e sem eventos fásicos durante o sono dessincronizado.....	69
Figura 22	Representação gráfica da frequência beta da análise longitudinal pré e pós lesão medular e entre grupos com e sem eventos fásicos durante o sono dessincronizado.....	72
Figura 23	Representação gráfica das frequências sigma e beta da análise longitudinal pré e pós lesão medular e entre grupos com e sem eventos fásicos durante o sono dessincronizado.....	74
Figura 24	Representação gráfica da evolução da escala BBB pós lesão medular.....	79
Figura 25	Foto da histologia por Cresil Violeta do posicionamento dos elétrodos hipocampais.....	80
Figura 26	Representação gráfica por <i>Blox Plot</i> da descrição histológica de caracterização da lesão medular.....	81

Figura 27 Foto da histologia por Hematoxilina Eosina da caracterização da lesão medular e imuno-histoquímica por GFAP para caracterização de comportamento glial após lesão medular..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tempo e ocorrência de número de fases, em cada fase do ciclo vigília-sono.....	56
Tabela 2	Quantidade de ciclos de vigília-sono: total, completos e incompletos.....	58
Tabela 3	Quantidade de transições de sono para as demais fases do ciclo vigília-sono.....	61
Tabela 4	Quantidade dos diversos tipos de eventos fásicos durante o sono dessincronizado.....	64
Tabela 5	Frequência de registros EEGs, banda δ , em cada região e lado mensurado.....	68
Tabela 6	Frequência de registros EEGs, banda θ , em cada região e lado mensurado.....	71
Tabela 7	Frequência de registros EEGs, banda σ/β , em cada região e lado mensurado.....	73
Tabela 8	Potência dos registros EEGs, banda δ , em cada região e lado mensurado.....	76
Tabela 9	Potência dos registros EEGs, banda θ , em cada região e lado mensurado.....	77
Tabela 10	Potência dos registros EEGs, banda σ/β , em cada região e lado mensurado.....	78
Tabela 11	Intensidade dos achados na medula espinhal após lesão da medula espinhal.....	81

LISTA DE SIGLAS

VA	Vigília atenta
VR	Vigília relaxada
SS	Sono sincronizado
PP	Sono pré-paradoxal
SD	Sono dessincronizado
LM	Lesão medular
EEG	Eletroencefalograma
EOsG	Eletroscilograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
CVS	Ciclo vigília-sono
SNC	Sistema nervoso Central
SPI	Síndrome das pernas inquietas
RF	Formação Reticular
LCa	Locus Cerúleo
PGO	Ponto genículo occipitais
SLD	Núcleo pontino sub-laterodorsal
NGC	Núcleos gigantocelular
RPC	Núcleo caudal da rafe
RPO	Núcleo oral da ponte
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
A7	Córtex associativo sensório motor
CA1	Hipocampo dorsal
C	Músculo trapézio
R	<i>Rostrum</i>

O	Olhos
PPe	Pata posterior esquerda
PPd	Pata Posterior direita
CROPP	Eventos fásicos dos grupos musculares Cabeça, <i>Rostrum</i> , Olhos e Patas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ciclo Vigília-Sono Sono.....	5
1.2 Lesão Medular	15
2. OBJETIVO.....	25
3. MÉTODO	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Implante de Eléttodos.....	26
3.2.1 Eléttodos.....	27
3.2.2 Coordenadas Estereotáxicas.....	28
3.2.3 Implante Musculares.....	29
3.2.4 Anestesia	30
3. 2.5 Assepsia	31
3.2.6 Procedimento Cirúrgico.....	31
3.2.7 Profilaxia.....	33
3.2.8 Manutenção dos animais	34
3.3 Lesão Medular.....	34
3.3.1 Anestesia.....	35
3.3.2 Laminectomia.....	35
3.3.3 Assepsia.....	36
3.3.4. Nível de lesão	36
3.3.5 Profilaxia.....	37
3.3.6 Manutenção dos animais.....	37
3. 4 Registros eletroscilográficos.....	37
3.4.1 Habituação	37
3.4.2 Registros eletroscilográficos.....	38

3.5 Análise comportamental.....	39
3.5.1 Etologia.....	39
3.5.2 Escala BBB.....	40
3.6 Análise espectral	41
3.7 Histopatologia.....	42
3.7.1 Coloração por violeta cresil.....	43
3.7.2 Coloração HE	43
3.7.2 Dosagem de GFAP.....	44
3.8 Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1 Ciclo vigília-sono.....	47
4.1.1 Características eletrofisiológicas.....	47
4.1.2 Tempo total.....	54
4.2 Número de fases do ciclo vigília sono	55
4.3 Ciclos completos e incompletos.....	55
4.4 Transição entre fases.....	59
4.4.1 Alternância da vigília para as demais fases do ciclo vigília-sono.....	59
4.4.2 Alternância de sono para as demais fases do ciclo vigília-sono.....	60
4.5 Eventos fásicos.....	63
4.6 Análise espectral do SD.....	66
4.6.1 Frequências.....	66
4.6.1.1 Banda delta δ (0.5 – 4.0 Hz).....	66
4.6.1.2 Banda teta θ (5,0 – 11,0 Hz).....	70
4.6.1.3 Banda sigma e beta.....	70
4.6.2 Potências.....	75
4.6.2.1 Banda delta.....	75

4.6.2.2 Banda teta.....	75
4.6.2.3 Banda sigma e beta.....	75
4.7 Escala BBB.....	79
4.7 Histopatologia.....	80
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1 Ciclo vigília-sono.....	83
5.2 Análise Espectral.....	89
5.3 Escala BBB.....	92
5.4 Histopatologia.....	93
6. CONCLUSÃO.....	94
7. ANEXOS.....	95
8. REFERÊNCIAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

O sono de indivíduos portadores de lesão medular (LM) ou qualquer limitação motora tem recebido maior atenção por parte de especialistas. As alterações no sono influenciam diretamente a qualidade de vida dos portadores de LM. São vários os fatores que influenciam o sono; estresse, ansiedade, que surgem por modificação do estilo de vida. As alterações no padrão do sono relacionam-se com o comprometimento da capacidade de locomoção independente e com o prejuízo na interação social

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2001, o número de pacientes com LM que apresenta algum tipo de transtorno do sono é alto, representando um elevado custo para a área da saúde (70 bilhões anuais nos EUA) (Smith e Haythornthwaite, 2004). Indivíduos portadores de LM apresentam uma queixa comum referentes à dificuldade de dormir. Estes indivíduos apresentam frequentemente síndrome das pernas inquietas, queixam-se de espasmos, dificuldade de iniciar e manter o sono, roncos, freqüentes, despertares nas horas iniciais da manhã e como consequência incapacidade de retornar ao sono, e durante o dia estes sentem-se cansados e sonolentos (De Mello e cols., 1996; Bara-Jimenez e cols., 2000; Clemens e cols., 2006; Bampi e cols, 2008;).

Podemos assim elencar alguns fatores negativos exibidos em portadores de LM para a qualidade do sono como a posição de dormir supina, tendência à obesidade e uso de sedativos. Em tetraplégicos, apnéia obstrutiva do sono e desaturação de oxigênio arterial contribuem para a interrupção do

sono e pode ser responsável por diversos sintomas diurnos de desconforto. (Biering-Sørensen e Biering-Sørensen, 2001). Todos estes aspectos dificultam a reintrodução destes indivíduos na sociedade e geram um grande desafio para a economia no sentido de que suas capacidades produtivas estão diminuídas, assim como, os custos se mantêm aumentados e em ascensão para os cuidados aos quais são necessários para a sua manutenção.

Ressalta-se o fato de que a LM a qual, normalmente, causa um acentuado comprometimento das funções sensório-motoras promove, também, alterações significativas de outras funções neurais, nas quais se inclui os ritmos circadianos, em especial, o ciclo vigília-sono (CVS). Estas funções estão frequentemente afetadas após lesões ou qualquer tipo de intervenção no sistema nervoso central (SNC) (Scheer e cols., 2006; Kim e cols., 2006; Herbert e cols. 2007; Esteves e cols., 2007).

Algumas evidências sugerem a existência de uma estreita correlação entre as alterações do sono e LM, contudo, não se sabe, ainda, como o sono e seus componentes são influenciados, tampouco como eles podem influenciar outras funções e o comportamento após a LM (Biering-Sørensen e Biering-Sørensen, 2001; De Mello e cols., 2002; Scheer e cols., 2006; Esteves e cols., 2007).

Um importante fato observado em indivíduos com LM consiste no aumento da movimentação das pernas durante o sono dessincronizado, também chamado de sono paradoxal ou sono REM – *Rapid Eyes Movements*, sobretudo, após reabilitação e atividade física.

Essa movimentação das pernas durante o sono é conhecida como Síndrome das pernas inquietas (SPI). A SPI pode ser um distúrbio tanto primário como secundário. A forma primária da SPI é frequentemente hereditária enquanto que a secundária esta principalmente associada com uremia, deficiência de ferro, gravidez, além de ultimante ter sido associada com LM (De Mello, 2007, Scheer e cols., 2002). A maioria dos pacientes com SPI apresentam também uma movimentação periódica das pernas durante o sono. A patogênese de ambos os eventos de movimentação de pernas prévia e durante o sono continua especulativa. (Hartmann e cols., 1999). Existe a possibilidade de a SPI ser apenas um achado coincidente em pacientes com LM.

Entretanto, existem associações temporais estreitas entre o início da movimentação das pernas com paraparesias. Após a realização de cirurgia para a remoção das massas lesionais das paraparesias ocorre o desaparecimento completo da SPI ou mudanças severas de acordo com a evolução clínica da mielopatia posterior ao procedimento cirúrgico o que reafirma uma suposta relação de causa e efeito entre LM e SPI. (Lee e cols., 1996)

Pesquisas revelam que a atividade física e exercícios podem ser importantes para uma redução do risco nas condições de comorbidades da SPI (Silva e cols., 1995). Entretanto, os efeitos de tais exercícios na severidade da SPI ainda são desconhecidos. Além disto, o tratamento atual da SPI é primeiramente de natureza farmacológica. Recentemente pesquisas têm mostrado que programas de exercícios mostram-se eficaz na melhora dos

sintomas da SPI. (De Melo e cols., 1999; Esteves e cols., 2004; Aukerman e cols., 2006).

Os estudos clínicos têm apresentado informações relevantes, porém limitadas, que não permitem uma interpretação adequada ou completa da fisiopatologia comum ao sono e à LM. Dessa forma, torna-se imprescindível a busca por modelos experimentais que mimetizem os diversos aspectos desses fenômenos e possibilitem o estudo aprofundado dos mecanismos subjacentes às relações entre eles.

Na atual prática de pesquisa, são os modelos experimentais um instrumental valioso para a busca de ferramentas capazes de sugerir indícios de respostas conclusivas para diversas perguntas. Estes modelos podem ser definidos como a materialização de uma parte da realidade, por meio da representação simples de uma ocorrência recente ou antiga.

O desenvolvimento de modelos experimentais torna-se importante na medida em que estes auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais. Na ciência médica permitem o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas. Sua maior importância está relacionada ao respeito à barreira ética de não intervenção primária experimental em *anima nobile*. Nesse sentido, o modelo experimental deve ser funcionalmente, o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar (Ferreira e cols., 2005).

Existem diversos modelos experimentais utilizados em pesquisas clínico-cirúrgicas, tais como, culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*), animais de laboratório (pesquisa *in vivo*) e estudos anatômicos, geralmente em cadáveres de seres humanos (Hochamann e cols., 2004).

1.1. Ciclo Vigília-Sono

O estado de vigília se manifesta subjetivamente pela consciência do que ocorre no meio externo ou no próprio corpo. O alerta, não se caracteriza por componentes motores e necessariamente não envolve manifestações motoras, são os estímulos externos (seja sensorial ou de atenção) ao organismos que definem o comportamento motor ou não. O alerta inespecífico permite a programação de um comportamento seqüencial e exploratório (Morgane e Ster, 1972).

Já durante o sono, a principal característica a grosso olhar é a imobilidade. Ao contrário do se imagina nesta fase o sistema nervoso é sede de intensa atividade, Para manutenção deste comportamento de quietude, o sistema nervoso processa inibição de várias funções e ativação de outras. Alternando-se ritmicamente com o estado de vigília, o sono se desenrola em diversas fases consecutivas que se repetem ciclicamente (Hodes e Suzuki, 1965).

A gênese do sono é uma questão que vem ocupando pesquisadores há muitos anos. Tanto que na antiguidade era considerada a possibilidade de que o sono fosse causado pela saída da alma do corpo material. Desde aquela época são várias as hipóteses para a explicação do sono. Aristóteles acreditava que o sono ocorria por evaporação de matéria nutritiva, para aliviar o coração que para ele era sede da mente (Timo-laria, 1992).

No século XVIII Willis e Morgagni aventaram a hipótese de que o sono ocorresse por congestão cerebral, isto é, por acúmulo de sangue no sistema

nervoso central (SNC). Já no século XIX, Howel acreditava que o sono resultasse do contrário, isto é, de anemia do SNC (Timo-laria, 1992).

Com a descoberta da sinapse por Cajal, acreditava-se que o sono resultava da retração dos botões terminais, desligando os neurônios essenciais ao estado de vigília. Um pouco mais tarde, Pavlov aventou a hipótese de inibição cortical. Já nos fins do século XIX, Mauthner propôs a hipótese de que o sono resultava do bloqueio ativo das informações sensoriais ao córtex cerebral. A criação da eletrencefalografia, nos anos de 1920 e 1930, por Hans Berger, favoreceu o estudo dos mecanismos do sono e suas manifestações. Só então a proposta de Mauthner foi abordada na década de 30 por Bremer, que reafirmou, por meio experimental, que na transecção mesencefálica ocorria visualização eletroscilográfica de sono no córtex cerebral, o *“cérebro isolado”* (Valle, 1992, Valle, 1995).

Uma vez postulada a hipótese de coexistência de sono e lesão da região mesodiencefálica, Mauthner e Von Economo admitiam que existia nessa região neurônios capazes de produzirem sono. Essa hipótese sugere que o hipotálamo anterior é quem contém um centro gerador ou pelo menos facilitador de sono, enquanto que o hipotálamo posterior abriga um centro alertante (Timo-laria, 1992).

Em meados dos anos 50, Monnier e Pappenheimer verificaram a produção de peptídeos que causam sono no líquido céfalo-raquidiano e espaços ventriculares. Em seguida, são décadas de pesquisas descrevendo cada uma das novas descobertas com relação à função do tronco encefálico na geração do sono (Timo-laria, 1992).

A estimulação elétrica em diversas áreas como o núcleo lateral do tálamo e tegmento mesencefálico (Parmeggiani e Zanicco, 1963), área pré-óptica, núcleo caudado, núcleos anteriores da rafe (Morgane e Stern, 1972), interfeririam diretamente no sono, com indução ou com abolição do mesmo.

Concomitante à descoberta dos centros geradores ou abolidores de sono também se descreve o sono dessincronizado (SD), e se inicia uma grande produção científica em diversas áreas de conhecimento, como a neurofisiologia, neuroanatomia e neurofarmacologia.

Loomis, Harvey e Hobart (1930), fisiologistas americanos, realizaram o primeiro estudo sistemático dos padrões eletrencefalográficos durante o sono humano, e descreveram as fases do que denominamos sono sincronizado ou sono de ondas lentas (Valle, 1992, Valle, 1995).

Outrossim, na França, em 1950, Passouant descreveu, pela primeira vez, o sono dessincronizado; fato detalhado, três anos depois (em 1953), por Kleitman e Aserinsk. O sono dessincronizado, em humanos, foi chamado de sono REM e definido por movimentos oculares rápidos. O resto do sono foi chamado de sono não-REM, sem movimento ocular rápido (Jankel e Niedermeyer, 1985).

Muitas pesquisas consideravam que o sono REM representa o sono mais profundo, primariamente pelos achados que para a ocorrência do despertar seria necessário um estímulo muito intenso durante o sono REM do que durante o sono sincronizado (sono de ondas lentas) (Aserinsky e Kleitman, 1953). Posteriormente, foi confirmado que o estímulo para exibição de

movimentos cortico-espinhais é baixo em animais acordados, aumenta no animal sonolento e ainda maior no animal dormindo (Hodes e Suzuki, 1965).

Jouvet demonstrou interesse pelo estudo do sono REM, chamado de paradoxal em gatos, pelo fato de este apresentar a característica da dessincronização, tal como na vigília (Jouvet, 1967).

A dessincronização cortical consiste em aumento da frequência dos potenciais e redução de sua voltagem o que indica uma evidente ativação neuronal; a sincronização, ao contrário, caracteriza-se pela presença de ondas de baixa frequência, mas de alta voltagem, o que, em geral, significa redução da ativação neuronal (Roldan e Weiss, 1962; Timo-laria e cols., 1970; Valle e cols., 1992).

Um dos primeiros estudos do ciclo vigília-sono em ratos data de 1962, quando Roldan e Weiss, produziram um relato preliminar. Eles descreveram 3 diferentes fases do ciclo por meio de eletroencefalograma (EEG): 1) baixa frequência e alta voltagem no neocórtex, hipocampo e formação reticular. 2) dessincronização cortical e ritmo teta no hipocampo e formação reticular durante o sono. 3) vigília combinada com dessincronização neo-cortical e também ritmo teta durante comportamento ativo ou dessincronização no hipocampo.

Uma vez identificado padrões eletroscilográficos no rato, a utilização deste animal como modelo tornou-se de extensa produção científica. Desde então, a estrutura do ciclo vigília-sono em roedores tem sido amplamente estudada nas últimas quatro décadas (Jouvet, 1963, 1967; Timo-laria e cols., 1970; Clancy e cols., 1978; Timo-laria e cols., 1990; Valle e cols., 1992;

Gottesman, 1992; Valle, 1992 e 1995; Giuditta e cols., 1995; Esteves e cols., 2004; Esteves e cols., 2007; Lesku e cols., 2009).

A classificação do sono, em fases bem definidas, (sono de ondas lentas e sono REM), reflete a predominância estatística dos respectivos padrões eletroscilográficos¹, visto haver evidente oscilação desses padrões ao longo do tempo.

O rato adulto é um animal de hábitos noturnos com maior prevalência de vigília, principalmente vigília atenta (VA) durante os comportamentos exploratórios e sono diurno (Rosemberg e cols., 1976; Coenen e cols., 1983; Andersen e Tufik, 2003). Assim, por meio de métodos de implantes crônicos de elétrodos bipolares em múltiplos pontos do encéfalo e minuciosa análise eletroscilográfica, foi possível realizar a caracterização do ciclo vigília-sono de ratos (Timo-laria, 1970). Tal caracterização possibilitou descrever as fases e os estados, classificando-os em: vigília atenta (VA) e relaxada (VR); sono sincronizado (SS), de acordo com a prevalência de fusos (S), fusos e ondas delta (SW) e ondas delta (W); sono pré-paradoxal (PP) e sono dessincronizado (SD) (Timo-laria e cols., 1970, Valle 1992, Valle e cols., 1992, 1995, Santos e cols., 2008).

De acordo com esses estudos, os ratos apresentam ciclos completos e incompletos; os primeiros ciclos de uma seqüência de registros eletroscilograficos apresentam alta variabilidade quanto à duração dos ciclos

¹ Em nosso laboratório, criou-se a expressão eletroscilogramas (EOsGs), para denominar as oscilações de potenciais de populações neuronais de qualquer região do sistema nervoso, incluindo o eletrocardiograma, eletroencefalograma, eletroespinograma, etc. **Eletroscilograma** substitui com grandes vantagens a expressão “atividade elétrica cerebral”, imprópria, pois restringe a atividade ao cérebro e exclui as demais regiões encefálicas e medula espinhal.

de sono e a sequência de estágios, quando, então, os ciclos são geralmente incompletos e o sono dessincronizado frequentemente irregular e breve. Quando eles se tornam completos, a variabilidade da duração diminui e a sequência de fases tende a ser mais regular. Durante o dia, a vigília atinge 20% da duração do ciclo; o sono sincronizado 60%; o sono pré-paradoxal 7% e o sono dessincronizado 14% (Roldan e Weiss, 1962; Parmeggiani e Zanicco, 1963; Timofeiev e cols., 1970; Clancy e cols., 1978).

Os estudos sobre esse tema progrediram em conjunto com o imenso salto tecnológico que teve como marco inicial a segunda metade do século XX, permitindo o aprofundamento dos conhecimentos sobre os processos da vigília e do sono, o que favoreceu uma descrição detalhada do SD, que se caracteriza por uma constelação de eventos os quais incluem: (1) um padrão de dessincronização da atividade eletroencefalográfica cortical; (2) um ritmo teta no hipocampo; (3) acentuada atonia nos músculos posturais; (4) potenciais de campo na ponte, núcleo geniculado lateral e córtex occipital – espícula ponto-geniculado-occipital (PGO); (5) movimentos rápidos dos olhos; (6) espasmos mioclônicos, mas aparentes na face e musculatura de membros distais; e (7) oscilações cardiorespiratórias acentuadas (Roldan e Weiss, 1962; Vertes, 1981, 1984 e 1988, Giuditta e cols., 1995).

Conforme relatos, no sono dessincronizado de ratos, o córtex pré-frontal está, sobretudo, dessincronizado, enquanto as ondas teta aparecem sobre outras áreas corticais e hipocámpais. Uma das principais características do sono dessincronizado é a dessincronização cortical equivalente à da vigília e ritmo teta hipocámpal (Parmeggiani e Zanicco, 1963; Timofeiev e cols., 1970, Clancy e cols., 1978).

Achados têm sido revisados e discutidos em detalhes, apontando que: (1) a dessincronização cortical do sono dessincronizado é controlada pela região mesencefálica da formação reticular (RF); (2) o ritmo teta hipocampal é controlado pelos núcleos oral pontinos da formação reticular (RF); (3) a tonia muscular é controlada pela área peri-alpha do locus cerúleo (LCa); (4) as ondas PGO são, primariamente, controladas pela área 10 (A10); os movimentos oculares rápidos são controlados pelo núcleo peri-abducem da formação reticular (RF); abalos musculares pelo núcleo gigantocelular e caudal do núcleo caudal da ponte; e (7) respostas cardiorespiratórias encontram-se sob o controle do complexo parabraquial (Vertes, 1981 e 1984, Velayos e cols., 2007).

A completa atonia muscular e a ocorrência de movimentação espontânea de vários segmentos do corpo constituem-se características muito importantes do sono dessincronizado. Tais alterações, na atividade tônica espontânea, são similares às mudanças nos reflexos espinhais proprioceptivos. É importante esclarecer que reflexos monossináptico e polissináptico são tonicamente deprimidos durante o sono dessincronizado. Esses efeitos ocorrem devido ao aumento da inibição exercida por estruturas supraespinhais no arco reflexo espinhal, manifestando, conseqüentemente, a atonia no sono dessincronizado (Gassel e cols., 1964; Gassel e cols., 1965).

Durante o sono dessincronizado, paradoxalmente, os abalos mioclônicos da musculatura somática apresentam ativação muscular pelo aumento da atividade fásica em diferentes estruturas, que se projetam para a medula espinhal, ativando motoneurônios- α , tais como: os do trato piramidal, do núcleo rubro, da formação reticular e os núcleos vestibular lateral e medial (Gassel e

cols., 1964). A ativação muscular fásica de tal via é descrita, por diversos autores, como uma manifestação onírica durante o sono dessincronizado (Timo-laria e cols., 1990; Slegel e cols., 1990; Valle, 1992; Valle 1995; Simões e cols., 1996; Timo-laria, 1997; Coenen, 2002).

Ressalta-se que estudos voltados à descrição dos mecanismos do sono dessincronizado em ratos demonstraram que o núcleo pontino sub-laterodorsal (SLD) (que é equivalente ao cerúleo e sub-cerúleo em gatos) é a principal estrutura responsável pela atonia observada durante o sono (Boeve e cols., 2007). Neurônios glutamatérgicos do SLD projetam-se para interneurônios na medula oblonga e medula espinhal, recaem para os motoneurônios do corno ventral, produzindo hiperpolarização, o que resulta na atonia durante o sono dessincronizado (Taepavarapruk e cols., 2003, 2008).

A maioria das espécies estudadas (humanos – Slegel e cols., 1991; Koyama e cols., 1994; gatos – Shouse e Siegel, 1992; Márquez-Ruiz e Escudero, 2008; ratos – Simões e cols., 1996; Koyama 2001) apresentam abalos e atividade motora localizada (eventos fásicos) durante o sono dessincronizado, geralmente relacionado à atividade onírica, embora a intensa inibição promovida por centros pontinos e bulboespinais resulte em completa atonia.

Verificou-se, nos estudos em ratos em nosso laboratório, que os movimentos do focinho, durante o sono dessincronizado, caracterizam a atividade onírica e predominam acentuadamente sobre a dos olhos, a relação é de 3:1, o que sugere que o rato, como animal macrosmático, tem muito mais sonhos olfativos e tácteis do que visuais (Timo-laria, 1990).

Em outra pesquisa, conduzida em nosso laboratório, avaliou-se a prevalência de movimentação de várias partes do corpo do rato durante o sono dessincronizado, o que se deu na seguinte ordem: focinho (62%), olhos (26%), patas anteriores (6%), orelhas (3.8%), cabeça (1,2%) e patas posteriores (1%) (Timo-laria, 1995).

O ritmo teta hipocampal constitui-se uma das características eletroscilográficas do sono dessincronizado. Ele apresenta um padrão sinusoidal da atividade elétrica com frequências que abrangem dos 5 aos 10Hz. Aparentemente, o ritmo teta está presente no sono dessincronizado e durante condições de vigília, em todos os mamíferos. O teta da vigília, por exemplo, parece estar associado com movimentos voluntários no rato e no cachorro; com processos atencionais no gato e com o despertar no coelho (Vertes 1984 e 1995; Velayos e cols., 2007).

A descoberta do núcleo oral da ponte, como principal foco de geração deste ritmo, advém de um trabalho em que foram estimulados os núcleos gigantocelular (NGC), caudal (RPC) e oral da ponte (RPO). O POR, quando estimulado, aumentou, tanto a voltagem como a frequência do ritmo teta, de 6 para 9Hz (Vertes, 1981).

Além desses fatos, existe uma relação estreita entre movimentos fásicos durante o sono dessincronizado e ritmo teta hipocampal. Por ocasião da movimentação fásica, ocorre um evidente aumento na voltagem e frequência do ritmo teta hipocampal (Sano e cols., 1973; Sei e Morita, 1996). Em ratos, acredita-se que esse ritmo influencie na modulação plástica e eficácia sináptica. Além disso, pesquisas sugerem que a frequência e a amplitude do

ritmo teta hipocampal sejam controladas por diferentes núcleos envolvidos, diferentemente, no processo de aprendizado e memória. Presume-se, portanto, a existência de um gerador comum de eventos fásicos durante o sono dessincronizado (Timo-laria e cols., 1997; Karashima e cols., 2004; Montgomery e cols., 2008).

Nesse sentido, surge, então, uma hipótese sobre um gerador de eventos fásicos que altera a dinâmica do ritmo teta hipocampal. De fato, existe uma região na formação reticular, o núcleo tegmento-pedúnculo-pontino, que poderia afetar a dinâmica dos eventos fásicos, como, também, o ritmo teta hipocampal (Datta, 2000).

Percebe-se que essas características fásicas do sono dessincronizado parecem preservadas em animais que sofreram trauma, independente do segmento medular, apesar de a LM significar a interrupção do fluxo de informações sensorial e motora.

Para resumir o tópico, o sono é um estado periódico de quiescência, na qual há um processamento mínimo de informação sensorial e nenhuma interação com o ambiente ou outrém. Ainda que o sono tenha uma marca registrada como a suspensão de atividade do estado de vigília, ele é mais do que a ausência de estar acordado – ele é um processo regulado. Mantendo-se o estado de vigília há o aumento à propensão (também conhecida como pressão de sono), como exemplo: necessidade ou prontidão para dormir, apesar de que o excesso de sono tenha um efeito contrário. Considerando o tempo gasto no sono, em humanos aproximadamente um terço da vida, este processo deve ser importante.

Todavia, o propósito e função do sono estão entre o mais obscuros dos problemas da neurociência e biologia. Nos últimos 50 anos, muito tem se descoberto sobre a estrutura do sono, muitos candidatos para indução química endógena do sono tem sido propostos e interações circadianas e homeostáticas influenciam a regulação do sono já foi esclarecida. Entre as explições do propósito do sono, duas principais, porém não exclusivas e mutuamente, é a hipótese que domina a literatura: que o sono é restaurador para o metabolismo cerebral e que ele serve como consolidador de memória. Muitas peças destes quebra-cabeças são conhecidas, mas nem todas revelam a figura final.

1.2. Lesão Medular

A lesão medular (LM) é considerada um assunto de abrangência nos contextos social, econômico e psicológico. Seus efeitos são devastadores para o indivíduo portador, para a sociedade e para o Estado. O custo econômico e social para o atendimento de pessoas portadoras de LM é assombroso, pois soma o atendimento médico-hospitalar de urgência ao período de reabilitação.

Nos Estados Unidos, existe desde 1937 o *National Spinal Cord Injury Database*, que registra informações oriundas de 21 centros federais de atendimento a pacientes com LM. Por seus dados, estima-se que a incidência anual de LM está entre 30 e 40 casos novos por milhão de habitantes. Para uma população em torno de 158.000.000 habitantes, poderíamos imaginar cerca de 6.000 casos anuais no Brasil. A prevalência é estimada em torno de

700 casos por milhão de habitantes, o que daria uma população de 100.000 pessoas convivendo com esse problema em nosso país (Vialle e cols., 1999).

As lesões medulares são cada vez mais freqüentes devido principalmente ao aumento da violência urbana. Dentre as causas, o acidente de trânsito e a agressão por arma de fogo são as mais comuns. Os pacientes acometidos, em sua maioria, são jovens, do sexo masculino, solteiros e residentes em áreas urbanas. Tais lesões causam perda parcial ou total da motricidade, sensibilidade e funções autonômicas (vasomotora, intestinal, vesical e sexual). Além de sua gravidade e irreversibilidade, exigem um programa de reabilitação longo e oneroso, que na maioria das vezes não leva à cura, mas à adaptação do indivíduo à sua nova condição (Greve, 1999; Bampi e cols., 2008).

A história nos mostra que por ocasião da I Guerra Mundial, soldados com LM completa não sobreviviam. Após 3 anos de lesão, 80% dos soldados britânicos com paraplegia traumática morreram. Os sobreviventes eram doentes crônicos e extremamente dependentes e, por suas perspectivas serem tão lúgubres, não foram desenvolvidos programas de reabilitação intensos. Mesmo nos anos iniciais da II Guerra Mundial, a maioria dos soldados e civis com LM morriam de sepsia entre 2 e 3 anos, devido a infecções na bexiga e rins e úlceras de decúbito, consequências, essas, inevitáveis nas lesões medulares naquela época (Guttmann, 1976 apud Houle e Tessler, 2003).

Tendo em vista que 94% dos pacientes com LM sobrevivem ao primeiro ano após a lesão, e dos que sobrevivem ao período de hospitalização em unidades especiais, 93% são suficientemente independentes e apresentam condições de retornar à sociedade (DeVivo, 2002).

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), qualidade de vida é “a percepção do indivíduo de sua posição na vida, no contexto da cultura e sistema de valores nos quais ele vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações” (Andrade, 2001).

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos relacionando qualidade de vida e lesão medular. No entanto avaliar a qualidade de vida é de grande importância para essas pessoas. Uma das principais ferramentas utilizadas mundialmente para a avaliação de qualidade de vida é o questionário SF-36. (Ciconelli, 1999). Porém, este questionário não avalia a qualidade e eficácia do sono nestes indivíduos, a qual é uma importantíssima medida de qualidade de vida.

Posteriormente, elaborou-se o instrumento *World Health Organization Quality of Life – 100* (WHOQOL–100) e sua versão abreviada o *WHOQOL-bref* de 1998. No estudo inédito no Brasil, Bampi e cols., pesquisaram em nossa população de lesados medulares por meio deste questionário e desta vez, quantificaram a medida sono. E para a surpresa o resultado manifestou uma boa qualidade de sono naquela população, o qual os autores descrevem como “sono preservado” (Bampi e cols., 2008).

Mesmo com este início no seguimento de pesquisas que relacionam sono e LM ainda são raros os estudos que observem a fisiologia do sono. Sabe-se, entretanto, que alterações fisiológicas e psicológicas causadas pela LM podem levar a mudanças no padrão do sono. Brito realizou um levantamento que mostra que 43% dos indivíduos com LM apresentam distúrbio de sono.

Desse modo, as estratégias de reabilitação motora devem ser otimizadas visando melhorar a qualidade de vida e favorecer condições para execução das tarefas do dia-a-dia e, por consequência, para que ocorra o retorno ativo no papel sócio-econômico (Rossignol e cols., 2007).

Para Hulsebosch (2002), a LM é uma ocorrência devastadora e pode apresentar uma variedade de efeitos fisiopatológicos dependendo da gravidade e o nível espinhal da lesão. As consequências da LM causam debilitamento físico, dependência e, conseqüentemente, perda de auto-estima

As disfunções motoras e sensoriais distais, abaixo do nível da LM, são o resultado final de um processo fisiopatológico complexo e se distingue em três fases: aguda, secundária e crônica.

A fase aguda abrange o momento da lesão e se estende por alguns dias, ocasião em que se inicia uma imensa variedade de processos fisiopatológicos. Essa fase começa imediatamente após lesão mecânica a qual afeta, tanto o tecido neuronal (neurônios e glias) assim como o endotélio celular e vascular. Como resultado do insulto mecânico e isquêmico ocorre morte celular por necrose e, conseqüentemente, na lesão contusa, parece estar mais evidente na substância cinzenta do que na substância branca, uma vez que, normalmente a substância cinza danificada é visualizada envolta por um anel de substância branca preservada no sítio da contusão (Hulsebosch, 2002; Smith e cols., 2006).

Nos minutos que se seguem após a lesão inicial, o potencial de ação das células neuronais sofre uma interrupção induzida pela lesão. Essa característica de barreira elétrica ocorre devido à substituição eletrolítica,

envolvendo, especialmente, cátions monovalentes de Na^+ (a concentração intracelular aumenta), K^+ (a concentração extracelular aumenta) e Ca^{2+} (a concentração intracelular aumenta a níveis tóxicos), contribuindo com a falha na função neuronal, o que leva ao choque medular. Esse choque dura até 24 (vinte e quatro) horas e representa falha generalizada da circuitaria neuro-espinhal (Anderson e Hall, 1993; Hulsebosch, 2002; Hubscher e Johnson, 2006).

Ainda na fase aguda da LM, ocorre hemorragia com edema localizado, perda da microcirculação por trombose, vasoespasmos e lesão mecânica, além da perda da auto-regulação vascular. Todos esses eventos exacerbam a lesão neuronal (Hulsebosch, 2002; Smith e cols, 2006).

Na fase secundária (que ocorre ao longo de minutos a semanas), as características fisiopatológicas são a morte celular isquêmica, substituição eletrolítica e o edema contínuo da fase aguda. Após 15 minutos de lesão, ocasionadas pela destruição celular, as concentrações extracelulares glutamatérgicas e outros aminoácidos excitatórios atingem concentrações tóxicas que são de seis a oito vezes maiores que o nível basal. Além disso, as vias mediadas por glutamato, peroxidação lipídica e produção de radicais livres também ocorrem como resultado da ativação dos receptores glutamatérgicos, subsequentemente (Anderson e Hall, 1993; Hulsebosch, 2002; Becker e cols., 2003).

Outra característica da fase secundária é a apoptose que ocorre e envolve gliose reativa que inclui o aumento da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e proliferação astrocitária. Somado a isso, os neutrófilos

secretam mieloperoxidase que invadem o parênquima espinhal em 24 horas, seguidos por linfócitos (os quais secretam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento) que invadem e atingem picos máximos em 48 horas. Essa invasão de células inflamatórias aumenta a concentração local de citocinas (cito = célula; cina = pequena proteína) e quimiocinas (citocinas quimiotáticas). Além disso, fatores inibitórios e/ou barreiras à regeneração são expressas no sítio peri-lesional. A lesão cresce em tamanho a partir da região central, onde ocorreram as mortes celulares das células em risco ou em apoptose na região peri-lesional, criando-se uma região mais ampla de provável morte celular (Anderson e Hall, 1993; Hulsebosch, 2002).

Finalmente, na fase crônica, que se caracteriza ao longo de dias a anos, continuam os processos de apoptose em ambas as direções, anterógradas e retrógradas, incluindo regiões encefálicas; a variedade de receptores e canais iônicos alterados em seus níveis expressos e estados ativos, favorece a formação cicatrizes e barreiras físicas na medula; a desmielinização resulta em uma condição debilitante; formam-se cistos em regiões adjacentes à lesão (20%); a recuperação axonal ocorre e se estende por apenas 1mm; circuitos neuronais mantêm-se alterados devido a mudanças na informação aferente e eferente, tanto inibitória quanto excitatória; e, em muitos outros tipos de células, desenvolve-se hiper-excitabilidade permanente, resultando em dor crônica na maioria dos pacientes com LM (Anderson e Hall, 1993; Christensen e cols., 1996 e 1997).

Classicamente, neurônios do sistema nervoso central foram considerados incapazes de processos de regeneração. Hipóteses indicavam que projeções centrais de fibras de aferência primária poderiam se ramificar na

medula espinhal. Ou seja, após todas as fases descritas acima, ou concomitante a elas, há uma tentativa intrínseca de recuperação do sistema nervoso central (Anderson e Hall, 1993; Hulsebosch, 2002).

A habilidade intrínseca de neurônios do sistema nervoso central está embasada, essencialmente, na presença de proteínas envolvidas nos processo de alongamentos de neurites (proteína associada ao crescimento - GAP-43, expressão imediata por genes recentes, e a proto-oncogene - Bcl-2) para demonstrar a regeneração axonal (Hulsebosch, 2002). Em algumas populações neuronais, sobretudo naquelas sem mielina, pode ocorrer a regeneração em ramificação na medula espinhal (Christensen e cols., 1996 e 1997).

Há indícios que esta habilidade seja mediada pela reorganização estrutural do espraio no sistema motor, na recuperação espontânea da função motora. Essa remodelação compensatória ocorre em múltiplos níveis do sistema nervoso central (Raineteau e Schwab, 2001).

Tais habilidades espontâneas foram observadas no córtex sensoriomotor de adultos, em resposta a alterações nas aferências sensoriais periféricas ou manipulação comportamental. Muitas linhas de pesquisa sugerem que a conectividade sináptica no córtex sensoriomotor pode estar modificada após LM. Observou-se, nos estudos experimentais de lesões espinhais utilizando gatos e primatas, a redistribuição do mapa cortical de representação sensorial (Zai e cols., 2005). Exames de imagem funcional e estimulação magnética transcraniana demonstram significantes alterações na

conectividade entre o córtex motor e a medula espinhal em humanos, assim como, nas lesões medulares (Kim e cols., 2008).

O substrato celular e/ou anatômico sobrevivente ao processo de LM e a possível indução de plasticidade cortical ainda não foram totalmente esclarecidos. O desmascaramento e a potencialização de conexões existentes podem contribuir para a plasticidade em curto período de tempo. Além disso, alterações na conectividade cortical, por meses a anos, podem envolver crescimento de novos axônios e processos dendríticos (Florence e cols., 1998).

De acordo com estudos de Kim e cols. (2006 e 2008) as mudanças dinâmicas na densidade e morfologia dos espinhos dendríticos participam na reorganização da conectividade sináptica do córtex motor após LM. Vias neurais neocorticais sofrem um desarranjo dinâmico em resposta a lesões ao sistema nervoso; esse desarranjo, entretanto, pode promover alterações na função cortical, incluindo a reorganização sensorial e motora após a LM.

Informações aferentes sensoriais para o encéfalo ficam alteradas e reduzidas, após LM, como resultado de um trauma aos neurônios na medula espinhal. Essa deaferentação está associada com a reorganização das estruturas espinhais para ajustar as mudanças nas funções sensório-motoras do encéfalo (Christensen e Hulsebosch, 1997). Vale esclarecer que a perda da informação aferente pode resultar em tentativas de reorganização que permite, a ela mesma, ser responsável pela plasticidade neuronal, levando a processos patológicos (Herbert e cols., 2007). Para exemplificar, alguns autores revelaram a relação entre a plasticidade neuronal do córtex somatossensorial e o desenvolvimento de síndromes de dor crônica pela exibição de aumento na

plasticidade em ambos os domínios, motor e somatossensorial, em amputados com dor fantasma no membro amputado (Lendvai e cols., 2000; Endo e cols., 2007; Kim e cols., 2008;).

Outros estudos indicam a existência de alterações na atividade elétrica de regiões encefálicas após LM e têm-se demonstrado que pessoas com LM apresentam alterações na atividade neuronal talâmica, incluindo regiões do tálamo que perderam a aferência devido à LM comparada com indivíduos não-lesados, (Lenz e cols. 2000; Endo e cols., 2007).

Também, estudos em modelos animais demonstraram mudanças na atividade talâmica e cortical no processamento de informações somato-sensoriais após LM (Weng e cols., 2000; Gerke e cols., 2003).

Tais pesquisas, tanto em humanos como em modelos animais, revelam que a LM encontra-se associada à alteração dos ritmos nos circuitos tálamo-corticais.

Ressalta-se, que a eletroencefalografia (eletrocorticogramas) apresenta-se como um importante e poderoso instrumento nos estudos de plasticidade cortical, além de permitir a identificação de processos patológicos.

Entretanto, apesar de algumas informações que sugiram a partir de estudos eletrofisiológicos em pacientes portadores de traumas existem lacunas importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos processos de LM. Poucos estudos correlacionam as variações nos registros eletroencefalográficos humanos basais após LM. Em um estudo bastante elegante os autores encontraram uma redução na atividade do ritmo

alfa (8-13Hz) e em sua magnitude total de banda, em pessoas com LM (Tran e cols., 2003).

Herbert e cols. (2007) observaram uma diminuição significativa na banda alfa e aumento na banda beta, na tentativa de avaliar todas as bandas de frequências do eletroencefalograma humano, após LM. Os mesmos autores sugerem que, após LM, não ocorrem alterações significativas nas bandas de baixas frequências (delta e teta).

Admite-se que o melhor animal para essas experiências seja o rato e que a única forma de comparar resultados é a partir de lesões padronizadas e em grande volume de espécimes (Vialle e cols., 2002; Tebet e cols., 2003;

Diante da relevância de se conhecer os mecanismos subjacentes a esse fenômeno e, assim, propiciar subsídios para melhor compreensão da interação de sono e LM, propomo-nos, primeiramente, apresentar uma análise sistemática do ciclo vigília-sono de ratos portadores de LM contusa moderada e, na sequência, estudar detalhadamente a influência da LM sobre os eventos tônicos e fásicos do sono dessincronizado (SD), visto essa fase do sono ser importante pela ocorrência de movimentos espontâneos.

2. OBJETIVO

Poucos estudos relacionam a influência da lesão medular contusa incompleta na fisiologia do sono.

Diante da relevância de se conhecer os mecanismos subjacentes a esse fenômeno e dessa forma propiciar subsídios para melhor compreensão da interação de sono e lesão medular, propomo-nos:

- ✓ primeiramente, apresentar uma análise longitudinal do ciclo vigília-sono de ratos portadores lesão medular contusa moderada;
- ✓ em segundo lugar, por ser o sono dessincronizado a fase do sono em que observa-se a ocorrência de movimentos espontâneos, estudar detalhadamente a influência da lesão medular sobre os eventos tônicos e fásicos do sono dessincronizado.

3. MÉTODO

3.1. Animais

Para o presente estudo foram utilizados dez (10) ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) adultos jovens, machos com peso entre 250 a 280gr no início do protocolo, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os ratos eram mantidos em caixas individuais e em condições controladas de temperatura (24°C) e ciclo de 12 horas claro-escuro (7:00 às 19:00), alimentação e água eram oferecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob nº 827/05.

3.2. Implante de Elétrodos

A fim de se registrar os eletroscilogramas de algumas regiões do sistema nervoso central concomitantemente com os movimentos expressos durante os comportamentos exploratórios e durante o sono dessincronizado

dos animais, foi realizada cirurgia estereotáxica para implante crônico de eletrodos e posterior monitoramento eletrofisiológico.

3.2.1. Eletrodos

Os eletrodos, bipolares de derivação curta eram confeccionados com fio de níquel-cromo 150 μ m de diâmetro e totalmente isolados com teflon montados em pares solidários paralelos. Nos eletrodos corticais as pontas eram dobradas em T e nos terminais, o isolamento era removido em cerca de 0,5 mm de extensão. Os eletrodos sub-corticais eram mantidos paralelos ate as extremidades distais, que eram cortadas de modo que as duas pontas, sem isolamento, distassem 0,5 mm uma da outra. As extremidades proximais dos eletrodos eram soldadas aos pinos de um soquete fêmea de 32 pinos, cortado para abrigar as 20 conexões (10 pares de eletrodos) do presente protocolo (Figura 1).

Figura 1: A: Soquete preparado com eletrodos corticais e musculares; B: Eletrodos sub-corticais; C e D: Escala para eletrodo corticais e sub-corticais.

3.2.2. Coordenadas Estereotáticas

Os elétrodos foram implantados no córtex associativo sensório-motor (A7) e hipocampo dorsal (CA1) de ambos os hemisférios.

Para implantação no encéfalo era feito, com broca de 1/8", orifícios com cerca de três milímetros de diâmetro nas posições previamente determinadas segundo coordenadas do mapa cortical (A7: AP=-3,5mm; L=±4,0mm) ou do mapa estereotático para os eletrodos sub-corticais (CA1, AP=-3,8mm; L=±2,0mm; H=3,0mm) (Figuras 2 e 3).

Figura 2: Gráfico cartesiano com a representação esquemática das regiões corticais do rato de acordo com as áreas cito-arquitetônicas segundo Krieg, 1946 (lado direito) e áreas funcionais segundo Zilles, 1990 (lado esquerdo). Escalas a direita e acima em milímetros, em relação aos zeros estereotáticos anteroposterior (AP) e médiolateral (L), respectivamente. Local de implante cortical - Área somato-sensorial (A7) destacada em amarelo na figura.

Figura 3: Esquema de corte frontal do encéfalo de rato em que aparece a região hipocampal dorsal (CA1). O posicionamento para implante dos eletrodos sub-corticais esta destacada em amarelo na figura.

3.2.3. Implantes Musculares

Os registros musculares foram obtidos por meio de elétrodos de 70µm implantados nos músculos trapézios, elevadores da asa do nariz, epicantos oculares e gastrocnêmios (Valle e cols., 1992; Valle, 1995; Andersen e cols., 2001) (Figura 4).

Os eletrodos destinados ao registro dos movimentos oculares eram suturados subcutaneamente nos cantos externos dos olhos e os do *rostrum* eram conduzidos por agulha de injeção ate a musculatura elevadora da asa do nariz. Os eletrodos para registro da movimentação da cabeça eram suturados nos músculos trapézios de cada lado e dos membros eram suturados nos gastrocnêmios, levados por uma agulha 9x100, no interior da qual eram conduzidos sob a pele desde o soquete (onde eram soldados) ate os músculos.

Figura 4: Desenho esquemático dos grupos musculares do rato nos quais eram implantados os eletrodos para monitoramento dos movimentos. A: Trapézio; B: *Rostrum*; C: Olhos; D: Gastrocnêmios.

3.2.4. Anestesia

O implante de eletrodos era realizado durante cirurgia estereotáxica sob anestesia de *Ketamina*® (0,2,g/100gr, ip) precedida de *Diazepam*® (0,1mg/100gr, ip) e anestesia local (*Xilestesin*® 0,5ml 2% com vasoconstritor) aplicada subcutaneamente na região da incisão. O efeito anestésico iniciava-se em aproximadamente cinco minutos e tinha duração de cerca de duas horas; em seguida eram feitas suplementações com 10% da dose anestésica inicial de ketamina a fim de se manter o grau anestésico adequado durante todos os procedimentos cirúrgicos. O plano anestésico profundo era confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda.

3.2.5. Assepsia

Era realizado tricotomia na região da cabeça, pescoço e patas posteriores dos ratos, seguida por assepsia local com digluconato de clorexidina 2% (*Hioex*®).

3.2.6. Procedimento cirúrgico

Após fixação do animal no estereotáxico (David KopfTM), era realizada uma incisão longitudinal mediana desde a região nasofrontal até a lambdóide, em seguida a pele era rebatida, a facia removida para exposição das suturas da calota craniana e do bregma. Os pontos a serem trepanados eram marcados na calota de acordo com as coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (1997). Para as trepanações utilizou-se furadeira Dremel e broca de 1/8” com cuidado para não lesar a dura-máter. Uma vez implantados, os elétrodos eram soldados a um conector fêmea que posteriormente era fixado no crânio dos ratos com meta-acrilato de polimerização rápida (Figura 5).

Figura 5: A. Esquema do crânio do rato fixado no aparelho estereotático pelas barras auriculares, introduzidas no conduto auditivo externo para impedir a mobilização da cabeça para os lados, para frente e para trás, e pela presilha nasal, que impede a movimentação para baixo e para cima. B. Incisão da pele, a fim de expor a superfície óssea do crânio (a) barra auricular introduzida na orelha direita e a presilha (p) que imobiliza cabeça, impedindo movimentos para cima e para baixo, o maxilar superior é mantido imóvel pelo pinçamento entre a presilha (p) e a barra inferior (b). C. Exposição do crânio, com os pontos selecionados para a perfuração e introdução de elétrodos. A sutura bregmática (b) é um marco que permite calcular a posição dos implantes. D. Perfuração de um dos pontos de implantação, (br) broca na castanha do motor, já penetrando no osso parietal. E. Posicionamento do elétrodo hipocampal com fixação por acrílico. F. Posicionamento e fixação dos elétrodos corticais. G. Implantação dos elétrodos para registro dos movimentos oculares; a agulha é introduzida no ponto de implante e levada até a região subcutânea. H. Aspecto final dos procedimentos de implante dos elétrodos. I. Preparo do rato para registro.

O procedimento cirúrgico era realizado sob rigoroso controle de tempo e suplementações anestésicas (Anexo 1 – Ficha Cirúrgica). O tempo total do procedimento cirúrgico inicialmente era de aproximadamente dez horas. Neste tempo eram necessárias de seis a oito suplementações com *Ketamina*®

(0,2,g/100gr, ip). A fim de se acelerar as etapas finais dos procedimentos cirúrgicos e com isso prevenir problemas respiratórios nos ratos devido hipersecreção produzida pelo anestésico, foi desenvolvido um aparato para auxiliar na secagem do meta-acrilato. O aparato consistia em um conjunto de ventiladores montados em serie e soldados a uma haste a qual era fixada nas torres do estereotáxico (Figura 6). Tal recurso reduzia em até três horas a cirurgia de implante de eletrodos.

Figura 6: A: Vista diagonal do aparato para aceleração de secagem do meta-acrilato durante o procedimento cirúrgico para implante de elétrodos. B. Idem, vista lateral.

3.2.7. Profilaxia

Como conduta profilática administrava-se, via intramuscular 25mg/kg de Cefaloxina 1g (Keflin Neutro® - Ely Lilly), imediatamente após cirurgia de implante de elétrodos e durante cinco dias subseqüentes.

Após a cirurgia de implantes os animais eram mantidos aquecidos até completa recuperação anestésica.

3.2.8. Manutenção dos animais

Os animais eram mantidos em gaiolas plásticas individuais de 60X40cm, sob condições adequadas de higiene com água e ração a vontade (Anexo 2 – Etiqueta de Identificação).

3.3. Lesão Medular

O procedimento de LM era realizado no 11º. dia após a cirurgia de implante de elétrodos e um (1) dia após o registro eletroscilografico basal. Para este estudo, adotou-se o modelo experimental de LM do “Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study” (MASCIS) padronizado para ratos Wistar por meio de equipamento New York University (NYU) Impactor™ (Rodrigues, 1999) (Figura 7).

Figura7: A. Vista latero-diagonal do aparato NYU Impactor para realização do procedimento de LM contusa controlada e padronizada. B. Posicionamento do rato no NYU Impactor.

3.3.1. Anestesia

O animal era anestesiado com *Ketamina*® (0,2,g/100gr, ip) precedido de *Diazepam*® (0,1mg/100gr, ip), e, localmente, lidocaína (*Xilestesin*® 0,5ml 2% com vasoconstritor). O efeito anestésico iniciava-se em aproximadamente cinco minutos e tinha duração de aproximadamente duas horas; tempo suficiente para realização do procedimento cirúrgico para LM. O plano anestésico profundo era confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda.

3.3.2. Laminectomia

A exposição da medula para contusão era realizada com auxílio de microscópio cirúrgico. Após a tricotomia, realizava-se uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral, da 8ª vértebra torácica (T8) à 12ª vértebra torácica (T12). Os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas da 9ª vértebra torácica (T9) à 11ª vértebra torácica (T11) eram divulsionados e desinseridos. Os processos articulares destas vértebras eram expostos. A homeostasia, quando necessária, era realizada com um coagulador bipolar (*Xilestesin*® 0,5ml 2% com vasoconstritor). Em seguida eram removidos, com micro saca-bicados, o processo espinhoso e a lâmina da 10ª vértebra torácica (T10) e a metade do processo espinhoso de T9 até expor a medula e permitir o posicionamento da

ponta da haste do NYU-Impactor e um peso de 10g era liberado de 25mm de altura sobre a medula espinhal exposta a fim de se reproduzir uma lesão contusa moderada (NYU Spinal Cord Contusion System, 1993) (Basso e cols., 1996). Após o procedimento a pele era suturada e os animais eram mantidos aquecidos até completa recuperação anestésica e choque medular.

3.3.3. Assepsia

A laminectomia no nível torácico T9-T10 foi precedida por tricotomia e assepsia do local com digluconato de clorexidina 2% (*Hioex*®).

3.3.4. Nível de lesão

As lesões medulares realizadas nesta pesquisa, foram lesões moderadas por meio de equipamento especializado para o impacto por queda de peso NYU-Impactor. O modelo de impacto consiste na queda de haste de peso de 10g de peso de altura pré-estabelecida de 25mm entre a ponta da haste e a superfície da medula espinhal, por meio de um tubo guia, de maneira a reduzir os fatores de imprecisão.

O aparelho foi construído de modo a produzir um impacto de direto de alto rendimento, reduzir atritos e a resistência do ar, permitindo uma contusão reproduzível (Rodrigues, 1999).

3.3.5. Profilaxia

Antibióticoterapia era administrada via intramuscular 0,1/100g de Cefaloxina 1g (Cefazolin®) imediatamente após a cirurgia e uma vez ao dia por sete dias. O esvaziamento vesical manual era realizado duas vezes ao dia por duas semanas.

3.3.6. Manutenção dos animais

Os animais eram mantidos em gaiolas plásticas individuais de 60X40cm, sob condições adequadas de higiene, alimentação e hidratação. A manutenção dos animais em gaiola individuais durante todo o experimento possibilitou uma melhor adaptação e redução da agressividade e das auto-mutilações (autofagias).

3.4. Registros eletroscilográficos

3.4.1. Habituação

Para se obter registros eletroscilográficos que reproduzissem da melhor forma possível todos os padrões comportamentais da vigília e sono, os ratos

eram submetidos a sessões de habituação por dois dias antes do registro basal. Durante a habituação os animais eram levados à sala de registros onde eram mantidos por 2hs dentro de uma gaiola de Faraday de alumínio (40X40X40cm) em cujo teto se encontrava o conector por meio do qual o animal era acoplado ao cabo de registro do aparelho eletroencefalógrafo. A parede anterior da câmara era livre e permitia a observação visual do rato

3.4.2. Registros eletroscilográficos

Os registros com duração de 6hs eram realizados entre 9h e 15h, período de maior incidência de sono no rato. Os eletroscilogramas eram obtidos por meio de um aparelho eletroencefalógrafo (EEG) Nihon-Kohden de 21 canais modelo NK 4400 acoplado a um sistema computacional com placa de conversão analógico-digital CAD12/32 de 12 bits e programa de aquisição de sinais biológicos AqDados da Lynx Tecnologia Eletrônica (São Paulo).

As bandas de corte para os registros corticais e sub-corticais eram entre 35Hz e 0,1Hz, filtros passa baixa (HF) e constante de tempo (TC), respectivamente. Para os registros musculares utilizava-se HF de 70Hz e TC 0,003Hz. A frequência de amostragem era de 256 Hz e, após o termino dos registros, os dados eram armazenados em formato de arquivos binários com extensão *.TEM. Foram utilizadas as rotinas lynxeng.m e lyninfo.m desenvolvidos anteriormente em nosso laboratório para leitura dos arquivos em ambiente MatLab, no qual foi realizado a análise matemática.

Os eletroscilogramas basais eram realizados no 10º dia pós-implante de elétrodos e os demais eletroscilogramas eram realizados nos 1º, 3º, 5º, 7º e 14º dias pós-LM.

Concomitantemente a aquisição dos registros, os ratos eram cuidadosamente monitorados e todos os comportamentos emitidos por eles eram anotados a fim de se estabelecer uma correlação com os registros. A identificação e quantificação do ciclo vigília-sono eram realizadas por meio de análise visual sendo que a varredura manual incluía a identificação e contabilização de eventos de até 0,07s (1mm).

3.5. Análise comportamental

3.5.1. Etologia

O acoplamento da análise comportamental com a análise eletroscilográfica é fundamental para que se possa descobrir as analogias e compreender parte do que sucede no sistema nervoso central durante determinada fase do ciclo.

Para tal, os ratos foram monitorados visualmente e por meio de um sistema de vídeo-câmera durante os registros. A maioria dos comportamentos vigis e durante o sono foram marcados para posterior análise de correlação.

3.5.2. Escala BBB

Para avaliar a função motora em ratos com LM foi utilizada a escala BBB. A escala BBB é uma medida para graduação locomotora na qual dois avaliadores observam as posições das patas e a deambulação de um animal em campo aberto por um período de 4 minutos. A utilização deste método é amplamente aceita e reconhecida pela comunidade científica como o padrão ouro para este tipo de estudo. Esta escala é uma modificação do teste em campo aberto, a qual foi elaborada para graduar a locomoção de patas posteriores de zero (nenhum atividade locomotora espontânea) até vinte e um (movimentação normal e coordenação de marcha com posicionamento paralelo de membros).

A avaliação funcional pela escala BBB (Anexo 3 – Ficha da Escala BBB) considera os movimentos da articulação do quadril, do joelho, do tornozelo, e a posição do tronco, do rabo e das patas traseiras. Cada avaliador atribui pontos de zero a 21 (Basso e cols., 2002; Vialle e cols., 2002; Zai e Wrathall, 2005, Sedy e cols. 2008).

✓ Atribui-se uma pontuação seqüencial e acumulativa de acordo com a observação de um movimento definido pela escala BBB e com a frequência de sua ocorrência nenhuma (0-5%), ocasionais (<50%), freqüente (51-94%) e consistente (95-100%).

✓ O teste é composto de observações quanto a presença de movimentos individuais nas articulações das patas posteriores, arrasto sem suporte de peso, passada dorsal com suporte de peso, posicionamento plantar

com ou sem suporte de peso, coordenação de patas dianteiras com posteriores, rotação interna e externa e, paralelismo de patas na predominância do contato inicial e quando a pata é elevada, liberação de dedos, elevação de calda durante a locomoção e estabilidade do tronco.

A avaliação foi realizada utilizando-se uma caixa de vidro transparente (80X80X30cm) com fundo forrado com material em cor azul marinho para proporcionar alto contraste com a cor branca dos ratos. Os ratos eram avaliados por dois pesquisadores todos os dias em que foram coletados os registros (1°, 3°, 5°, 7° e 14 ° POs de LM).

A utilização desta medida comportamental propiciou uma classificação do comprometimento da função motora nas fases de vigília e posterior correlação com os eventos fásicos do SD.

3.6. Análise Espectral

Foram selecionados trechos de 2 segundos de duração de sono dessincronizado com presença (N=4.775) e ausência (N=2.831) de movimentos dos vários segmentos do corpo do animal. A densidade espectral de potência desses trechos foi estimada pelo periodograma, que é proporcional ao quadrado do módulo da transformada discreta de Fourier.

Os picos de maior potência foram selecionados em três bandas de frequência: delta (0,5Hz – 4,0Hz), teta (4Hz – 11Hz) e sigma/beta (11Hz – 35Hz).

Para cada animal, foi salvo um arquivo texto (em formato ASCII, com extensão.TXT), contendo os valores dos maiores picos de potência ($\mu V^2/Hz$) e das correspondentes frequências (Hz) em cada uma das três bandas. Além disso, foram salvos os valores das potências acumuladas em cada banda (μV^2) e das frequências medianas (Hz), ou seja, das frequências que dividem a densidade espectral de potência em duas partes de mesma área (cada uma com 50% da potência).

3.7. Histopatologia

Para avaliação da posição dos elétrodos foi utilizada a coloração por Cresil Violeta e para a caracterização da LM, foi utilizada a coloração com hematoxilina-eosina (HE) em cortes transversais e longitudinais, respectivamente. A reação imuno-histoquímica de expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) foi utilizada para averiguação do comportamento das células gliais mediante o insulto ao sistema nervoso central no segmento medular.

A perfusão transcardíaca foi realizada com solução fisiológica seguida por solução de formol a 10% em tampão fosfato de Sorensen (pH neutro). Os ratos foram profundamente anestesiados com éter etílico P.A. e perfundidos por aproximadamente 15 a 20 minutos ou até serem perfundidos 250 mL de solução. Após perfusão, o encefálico e a medula espinhal foram removidos e imersos em solução fixadora de formol a 10% em tampão fosfato de Sorensen

(pH neutro). As amostras permaneceram em solução fixadora por, no mínimo, 72 horas para desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

3.7.1. Coloração por Violeta Cresil.

Na análise dos hipocampus após a montagem dos cortes nas lâminas silanizadas, foi aguardado 20 minutos, aproximadamente, para secagem. Posteriormente as lâminas foram imersas para hidratação na seqüência a seguir por dois minutos cada uma: Xilol I; Xilol II; Álcool 100 II; Álcool 100 I; Álcool 95 II; Álcool 95 I; Álcool 70; Álcool 50; H₂O destilada. Para a coloração as lâminas foram submetidas à imersão de corante cresil violeta de dois a sete minutos e posteriormente lavadas em água destilada. Iniciou-se a etapa de desidratação com imersão das lâminas por 5 mergulhadas rápidas na seqüência a seguir: Álcool 50; Álcool 70; Diferenciador (1ml de ácido acético em 100ml de álcool); Para conclusão da desidratação as lâminas foram imersas por um minuto em álcool 70, álcool 96 I, álcool 96 II, álcool 100 I, álcool 100 II, xilol I e xilol II. Para a finalização do processo, as lâminas foram fechadas com bálsamo do Canadá Permount Entelan

3.7.2. Coloração HE

As lâminas de medula foram submetidas ao procedimento padrão de hidratação e imersas em hematoxilina de Harris por seis minutos para iniciar a coloração. Em seguida, foi realizada a lavagem em água corrente, aplicação de

diferenciador, e novamente lavagem em água corrente. Água amoniacal foi utilizada como mordente. Lavagens com água corrente e álcool 95% foram feitas mais uma vez para preparar as lâminas para imersão em eosina, onde foram mantidas por 30 a 40 segundos. Depois foram realizados dois banhos de álcool absoluto e três banhos de xilol. Para finalizar foi realizada montagem com lamínulas com Entellan® (Merck 1.07961).

Para caracterização e determinar da extensão da LM foi utilizada a pontuação de avaliação qualitativa de necrose, hemorragia, neovascularização, degeneração da substância micsóide e infiltrado celular na escala de (1) ausente, (2) 5 a 25% discreto, (3) 26 a 50% moderado e (4) 51 a 100% intenso (Narazaki e cols., 2003).

3.7.3. Dosagem de GFAP

Cortes longitudinais histológicos dos ratos (medula e hipocampo) foram colhidos em lâminas silanizadas e, posteriormente, os cortes foram desparafinados. O método de desmascaramento antigênico realizado para os anticorpos anti-GFAP foi por meio de microondas; A peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se as lâminas por 30 minutos em metanol contendo 30% de peróxido de hidrogênio PA. Para a marcação imuno-histoquímica do GFAP, o método utilizado foi o da strepto-avidina-biotina-peroxidase, sendo cada etapa intercalada por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato. Os cortes foram incubados, em câmara úmida, a 44°C, por 16 horas, com o anticorpo primário anti-GFAP (Camundongo anti-GFAP clone, código

número M0761, Dako), padronizado na diluição 1:1000. Posteriormente, foi realizada a incubação dos cortes por 30 minutos com anticorpo secundário biotinilado na diluição de 1:100 e, após, a aplicação por 30 minutos do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase (Novostain Super ABC Kit, Novocastra - EP-ABCU), diluído em solução salina tamponada com fosfato. Foi aplicada solução substrato de peroxidase (3,3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride – DAB, Sigma – O5637) por 5 minutos a 37°C. Finalmente, os cortes foram lavados, contra corados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética (Sanchez e cols., 2006). Para contagem da marcação celular, utilizou-se a contagem em três campos de grande aumento (40x), considerando as áreas de maior concentração celular para determinação da média populacional.

3.8. Análise estatística

Para a avaliação das variáveis do ciclo vigília-sono entre as condições pré-lesão e os 1º; 3º; 5º; 7º e 14º. dias pós-lesão foi utilizado teste não-paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn. O tempo total e o número de ocorrência de cada uma das fases do ciclo vigília-sono; os eventos fásicos do sono dessincronizado; a transição de sono para as demais fases do ciclo vigília-sono; transição de vigília para as demais fases do ciclo vigília-sono e número total de ciclos completos e incompletos foram comparados entre as condições pré e pós-LM.

A comparação entre as condições pré e pós-lesão das bandas de frequências dos eletroscilogramas (δ , θ e σ/β) do córtex associativo sensorio-motor e do hipocampo dorsal foi realizada por meio do teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunn*. A comparação entre os grupos (Grupo 1: com e Grupo 2: sem eventos fásicos) foi realizada por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*. A comparação dos dados resultantes da pontuação na Escala BBB foi realizada por meio do teste de *Friedman*, seguido pelo pós-teste de *Dunn*. Os resultados das variáveis avaliadas foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando diferenças e correlações significativas quando o valor de “p” foi menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Ciclo vigília-sono

4.1.1. Características eletrofisiológicas

Com o propósito de se intentar adquirir uma compreensão plena a respeito dos padrões comportamentais durante os ciclos vigília-sono de ratos portadores de LM, foi realizada uma minuciosa análise qualitativa e quantitativa dos registros eletroscilográficos. O acoplamento da análise da atividade motora com a análise eletroscilográfica de algumas regiões encefálicas é fundamental para que se possa descobrir as analogias e compreender pelo menos parte do que sucede no sistema nervoso central durante as fases de vigília e do sono de indivíduos portadores de LM.

O conjunto total (sessenta horas) de registros eletroscilográficos obtidos dos dez animais estudados foram submetidos à análise; todas as fases dos ciclos vigília-sono identificados foram mensuradas.

No estado de vigília o rato movimenta-se para explorar o ambiente, alimentar-se e auto-limpeza. O registro eletrofisiológico de alguns grupos musculares simultaneamente com dos eletroscilogramas de regiões corticais e subcorticais possibilita evidenciar gradações de vigilância, desde o alerta tônico, relaxado, até graus extremos de alerta atento.

A figura 8 mostra um episódio de vigília atenta e comportamento exploratório na condição pré-lesão.

O comportamento exploratório se caracteriza, na figura, por intensa atividade dos músculos trapézios (movimentação da cabeça), dos músculos elevadores da asa do nariz (movimentação do *rostrum*) e dos músculos gastrocnêmios (movimentos das patas posteriores), bem como, movimentação dos olhos. O *rostrum* e os olhos oscilam concomitantemente com a movimentação da cabeça durante a exploração do ambiente. A movimentação do focinho e dos olhos segue dois padrões eletrofisiológicos distintos, o primeiro constituído por potenciais de alta frequência e baixa voltagem, caracteriza uma exploração visual frontal minuciosa, o outro constituído por potenciais de menor frequência e alta voltagem caracteriza uma varredura visual mais extensa do ambiente.

No exemplo da figura 8 a cabeça (C) se mantém moderadamente estendida e ocorrem alguns movimentos do *rostrum* (R), olhos (O) e patas posteriores (PP). Os eletroscilogramas neocorticais das áreas sensório-motora (A7) de ambos os hemisférios mostram dessincronização conspícua expressa por atividade eletrofisiológica de alta frequência e baixa voltagem. Eventualmente, a dessincronização neo-cortical é descontinuada pela intrusão de potenciais de baixa voltagem, entremeados ou alternados com os potenciais de alta frequência. Os eletroscilogramas dos campos CA1 do hipocampo apresentam ritmo teta de modulação complexa de 7.44 Hz e voltagem média próxima de 734 μ V característico dessa fase do ciclo.

A vigília relaxada era caracterizada por atividade eletroscilográfica composta por frequências mistas com ligeira prevalência de atividade sincronizada entremeada com curtos períodos de dessincronização e ondas lentas nas regiões corticais e hipocámpais concomitante com atenuação da

atividade eletromiográfica. A figura 9 mostra um episódio de vigília relaxada no qual se observa dessincronização intercalada com atividade sincronizada nas áreas A7 e CA1 de ambos os hemisférios concomitante com a atenuação da atividade muscular dos trapézios, *rostrum*, gastrocnêmios e, pouca movimentação ocular, condizente com a condição de relaxamento. Neste exemplo (figura 9), a vigília relaxada é seguida por um episódio de vigília atenta com intenso comportamento exploratório. Os eletroscilogramas das regiões neocorticais eram substituídos por atividade dessincronizada enquanto o ritmo teta reaparecia nos campos hipocampais concomitantemente com intensa movimentação dos vários seguimentos do corpo do animal.

Figura 8: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos no qual se observa dessincronização neo-cortical (A7) em ambos os hemisférios e ritmo teta irregular nos campos hipocampais (CA1) concomitantemente com a movimentação dos vários seguimentos do corpo do animal, característicos de comportamento exploratório durante vigília atenta. A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

O sono sincronizado era caracterizado por uma acentuada redução do tônus muscular e aparecimento de ondas sincronizadas regulares na forma de

fusos com frequência entre 15 e 18 Hz entremeadas com ondas delta com frequência menores que 4 Hz nas áreas corticais e no hipocampo (Figura 10).

Figura 9: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando a transição de vigília relaxada (VR) para vigília atenta (VA) com evidente alteração no padrão da atividade eletroscilográfica neo-cortical e hipocampal. A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

Figura 10: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando um episódio de sono sincronizado (SS) com presença de fusos e ondas delta nas áreas neo-corticais (A7) e hipocampais (CA1). A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

O sono sincronizado era normalmente, seguido pela fase de sono intermediário ou sono pré-paradoxal caracterizado pela ocorrência surtos de

fusos de alta frequência entremeados com algumas poucas ondas delta no córtex concomitantemente com ritmo teta no hipocampo (Figura 11).

Figura 11: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando a transição entre a fase de sono sincronizado (SS) e sono pré-paradoxal (PP). Note em vermelho, ritmo teta hipocampal e fusos corticais características eletrofisiológicas do sono pré-paradoxal. A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μV/s.

A fase de sono dessincronizado era caracterizada pelo desaparecimento dos fusos neo-corticais os quais eram substituídos por dessincronização cortical equivalente a da vigília atenta e conspícuo ritmo teta hipocampal. Nesta fase foram identificados curtos episódios de movimentação espontânea de todos os seguimentos do corpo concomitante com intensa modulação da frequência e da voltagem do ritmo teta hipocampal característicos de atividade onírica no rato (Figura 12).

Os ratos portadores de LM contusa apresentaram todas as características eletrofisiológicas descritas na fase anterior à LM. Todas as fases do ciclo vigília-sono assim como os eventos tônicos e fásicos característicos de cada uma das fases foram preservadas após a lesão. (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Figura 12: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando sono dessincronizado (SD). Note que o ritmo teta hipocampal sofre continua modulação de sua frequência e voltagem durante a movimentação dos vários segmentos do corpo (eventos fásicos da CROPP) A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

Figura 13: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando vigília atenta (VA) no 5º dia pós operatório de lesão medular. Note as mesmas características de dessincronização neo-cortical (A7) em ambos os hemisférios e ritmo teta irregular nos campos hipocampais (CA1) concomitantemente com a movimentação dos vários seguimentos do corpo do animal. A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

Figura 14: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando um episódio de transição entre vigília relaxada (VR) e sono sincronizado (SS). A VR no 5º dia pós operatório de lesão medular se caracteriza por atividade de frequências mistas e ligeira dessincronização. O SS mantém a característica de fusos e ondas delta nas áreas neo-corticais (A7) e hipocampais (CA1). A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

Figura 15: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando a transição entre a fase de sono sincronizado (SS) e sono pré-paradoxal (PP). Note em vermelho, manutenção das características do ritmo teta hipocampal e fusos corticais características eletrofisiológicas do sono pré-paradoxal no 5º dia pós-operatório de lesão medular. A7e: área neo-cortical sensório-motora hemisfério esquerdo; A7d: idem, hemisfério direito; CA1e: campo hipocampal dorsal, hemisfério esquerdo; CA1d: idem, hemisfério direito; C: cabeça; R: *rostrum*; O: olhos; PPe: pata posterior esquerda; PPd: idem, direita. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

O sono sincronizado era caracterizado por uma acentuada redução do tônus muscular e aparecimento de ondas sincronizadas regulares na forma de fusos com frequência entre 15 e 18 Hz entremeadas com ondas delta com frequência menores que 4 Hz nas áreas corticais e no hipocampo (Figura 16).

Figura 16: Trecho de eletroscilograma de 20 segundos mostrando a preservação e intensificação das principais características do SD após 14 dias após a lesão medular. Note a intensa modulação do ritmo teta durante um episódio de sonho (entre as barras paralelas) no SD. Tempo em segs. Calibração: 50 μ V/s.

A caracterização dos ciclos vigília-sono de ratos submetidos à LM foi realizada considerando-se a integridade (completos e incompletos), duração total e o número total de cada uma das fases, transição entre fases dos ciclos e eventos fásicos do SD ao longo dos 14 dias pós-lesão por meio de teste estatístico não-paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn.

4.1.2. Tempo Total

O ciclo vigília-sono de ratos submetidos à LM apresentou patentes alterações na avaliação longitudinal (Registro Pré LM, 1º, 3º, 5º 7º e 14º pós-LM) quanto à duração total (Figura 17).

A análise longitudinal das variáveis do ciclo vigília-sono após a LM mostrou um aumento estatisticamente significativo no tempo total das fases de

SS ($p < 0,002$) e SD ($p < 0,03$), e diminuição no tempo total da fase de VA ($p < 0,002$) (Tabela 1).

4.2. Número de fases do ciclo vigília-sono

Em relação ao número de ocorrência de cada uma das fases, foram encontrados valores estatisticamente significativos aumentados para o número de episódios de PP ($p < 0,01$) e diminuídos para VA ($p < 0,002$), VR ($p < 0,008$), SS ($p < 0,006$) e SD ($p < 0,03$) para a análise longitudinal das variáveis do ciclo vigília-sono após a LM. (Tabela 1).

4.3. Ciclos completos e incompletos

Na avaliação longitudinal após a LM referente à quantidade dos ciclos de vigília-sono compostos por todas as fases e de ciclos incompletos sofreu uma evidente modificação em função da LM ao longo do tempo. A análise estatística mostrou diminuição significativa no número de ciclos incompletos ($p < 0,001$) e aumento significativo no número de ciclos completos ($p < 0,001$) (Tabela 2, Figura 18).

Tabela 1: Tempo e ocorrência de número de fases, em cada fase do ciclo vigília-sono.

CICLO VIGÍLIA-SONO							
Tempo total (segundos)							
Fase do sono	PRE	1ºPO	3ºPO	5ºPO	7ºPO	14ºPO	Valor de p (entre momentos)
VA	855,49 ±69,30	827,66 ±20,58	680,72 ±9,86	642,53 ±88,68	526,80 ±34,66	714,00 ±34,88	0,002
VR	379,66 ±40,00	425,22 ±59,34	405,86 ±24,83	403,33 ±30,08	376,24 ±26,29	380,29 ±16,23	0,687
SS	1713,11 ±82,52	1356,52 ±75,06	1777,19 ±36,85	1744,73 ±26,72	1850,72 ±22,47	1727,85 ±23,43	0,002
PP	74,38 ±7,31	102,60 ±16,74	124,56 ±20,84	118,27 ±23,50	120,70 ±21,42	83,04 ±8,51	0,441
SD	577,37 ±56,50	518,51 ±15,23	611,75 ±25,31	691,16 ±75,45	725,54 ±39,92	694,81 ±30,30	0,037
Ocorrência de número de fases (n)							
Fase do sono	PRE	1ºPO	3ºPO	5ºPO	7ºPO	14ºPO	Valor de p (entre momentos)
VA	35,93 ±5,43	45,26 ±4,42	44,52 ±5,13	41,26 ±8,57	35,52 ±5,98	22,48 ±0,54	0,002
VR	47,21 ±7,28	59,86 ±2,74	54,43 ±4,95	53,19 ±9,63	51,48 ±5,84	29,40 ±1,60	0,008
SS	36,40 ±4,58	45,19 ±2,14	40,26 ±1,04	36,33 ±4,04	39,12 ±1,07	25,71 ±1,33	0,006
PP	7,57 ±1,51	9,33 ±1,47	8,31 ±1,38	10,71 ±1,94	9,31 ±0,97	8,74 ±0,48	0,012
SD	10,67 ±1,07	11,00 ±1,03	13,52 ±1,59	10,69 ±1,80	11,00 ±0,30	10,17 ±0,28	0,032

Os dados estão apresentados em média ±erro padrão da média e valores de “p”.

Figura 17: Gráfico ilustrando o tempo total (eixos Y à esquerda) e a ocorrência de número de fases (eixos Y à direita) durante o ciclo vigília-sono (VA, VR, SS, PP e SD), nos diversos momentos avaliados neste estudo. Cada símbolo representa o valor médio e a barra o erro padrão da média.

Tabela 2: Quantidade de ciclos de vigília-sono: total, completos e incompletos.

NÚMEROS DE CICLOS: TOTAL, COMPLETOS E INCOMPLETOS							Valor de p (entre momentos)
Ciclos	PRE	1ºPO	3ºPO	5ºPO	7ºPO	14ºPO	
Total	27,90 ±3,40	36,52 ±1,59	34,95 ±0,76	32,02 ±3,80	34,81 ±2,08	22,95 ±0,81	0,004
Completos	8,24 ±0,60	6,33 ±0,61	8,83 ±0,43	9,19 ±0,51	10,81 ±0,69	9,31 ±0,11	0,001
Incompletos	19,67 ±2,84	30,19 ±1,00	26,12 ±0,34	22,83 ±3,30	24,00 ±1,40	13,64 ±0,77	0,001

Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média e valores de “p”.

Figura 18: Gráfico ilustrando a quantidade de ciclos completos (eixo Y à esquerda) e de ciclos incompletos (eixo Y à direita) de sono, nos diversos momentos avaliados neste estudo. Cada símbolo representa o valor médio e a barra o erro padrão da média.

4.4. Transição entre fases

A análise das transições entre as fases dos ciclos foi realizada a fim de propiciar uma averiguação mais apurada da fragmentação de sono. Essa análise consistiu-se na identificação do número de vezes que uma fase passava para outra mais profunda ou mais superficial, o que poderia refletir o grau de dificuldade do animal começar a dormir ou manter o sono. Para tal, todas as alternâncias das fases de vigília para as fases do sono, assim como o inverso, do sono para a vigília, além de vigília atenta para relaxada e de sono (sincronizado, pré-paradoxal e dessincronizado) para sono (sincronizado, pré-paradoxal e dessincronizado).

4.4.1. Alternância da vigília para as demais fases do ciclo vigília-sono

Na análise da alternância da vigília para o sono, verificamos diferentes padrões de ocorrência ao longo dos dias avaliados.

1º Padrão: aumento do número destas transições no 1º PO seguido de diminuição até o 5º PO, com discreto aumento no 7º PO e nova queda no 14ºPO com valores inferiores ao EOsG basal. (VA→VR – $p<0,03$, VR→VA – $p<0,001$ e VR→SS – $0,001$).

2º Padrão: diminuição do número destas transições no 1º PO com aumento no 3º PO e 7º PO e queda no 14º PO com valores inferiores ao EOsG basal (VA→SS com valores de $p<0,001$).

4.4.2. Alternância de sono para as demais fases do ciclo vigília-sono

Como na análise anterior observamos dois padrões diferentes de ocorrência:

1º Padrão: aumento no número destas transições no 1º e 3º POs, seguida de diminuição no 5º PO aumento no 7º PO e queda no 14º PO com valores inferiores ao EOsG basal (SS→VR – $p<0,006$ e SD→PP - $p<0,001$).

2º Padrão: aumento no número destas transições ao longo dos 14 dias avaliados com valores no 14º PO superiores ao EOsG basal (SS→PP – $p<0,001$ e SD→VR – $p<0,03$).

Tabela 3: Quantidade de transições de sono para as demais fases do ciclo vigília-sono.

TRANSIÇÃO DE VIGÍLIA PARA AS DEMAIS FASES DO CICLO VIGÍLIA-SONO							
Transição	PRE	1ºPO	3ºPO	5ºPO	7ºPO	14ºPO	Valor de p (entre momentos)
VA→VR	22,38 ±3,73	32,60 ±1,18	28,43 ±4,47	25,12 ±4,20	27,00 ±6,23	18,50 ±0,34	0,034
VA→SS	4,33 ±0,45	4,07 ±0,80	9,33 ±1,04	5,19 ±0,67	7,19 ±0,22	3,36 ±0,20	0,001
VA→PP	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,00
VA→SD	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,00
VR→VA	15,76 ±2,71	24,62 ±0,78	21,57 ±3,36	20,71 ±4,80	23,05 ±4,79	10,21 ±0,55	0,001
VR→SS	23,17 ±3,67	30,07 ±3,07	28,62 ±4,12	20,62 ±2,78	25,64 ±1,73	20,19 ±0,79	0,001
VR→PP	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,00
VR→SD	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,00
TRANSIÇÃO DE SONO PARA AS DEMAIS FASES DO CICLO VIGÍLIA-SONO							
SS→VA	6,81 ±1,64	12,48 ±1,21	9,95 ±0,59	7,02 ±1,04	6,33 ±1,42	5,40 ±0,39	0,001
SS→VR	15,43 ±2,44	17,79 ±1,57	19,57 ±2,83	13,26 ±2,06	17,90 ±0,95	9,14 ±0,90	0,006
SS→PP	4,67 ±0,51	5,12 ±0,76	5,69 ±0,73	6,26 ±0,95	7,81 ±0,61	7,14 ±0,16	0,001
SS→SD	4,62 ±0,81	4,36 ±0,27	5,88 ±0,37	4,76 ±0,66	4,14 ±0,69	3,79 ±0,48	0,085
PP→VA	0,52 ±0,02	0,81 ±0,17	1,19 ±0,27	0,55 ±0,21	0,69 ±0,28	0,19 ±0,11	0,063
PP→VR	0,71 ±0,06	0,26 ±0,14	0,33 ±0,21	0,38 ±0,19	0,55 ±0,06	0,57 ±0,05	0,096
PP→SS	0,33 ±0,13	1,14 ±0,23	0,67 ±0,26	1,50 ±0,56	0,86 ±0,12	0,52 ±0,08	0,001
PP→SD	4,02 ±0,17	4,64 ±0,21	5,67 ±0,71	5,93 ±0,73	6,17 ±0,68	2,19 ±1,21	0,002
SD→VA	2,98 ±0,55	1,43 ±0,15	3,33 ±0,16	4,31 ±0,08	3,31 ±0,32	5,29 ±0,34	0,001
SD→VR	1,79 ±0,29	2,10 ±0,45	2,90 ±0,85	2,00 ±0,40	3,14 ±0,54	4,50 ±0,52	0,030
SD→SS	3,14 ±0,23	3,67 ±0,48	3,43 ±0,66	2,52 ±0,54	2,98 ±0,72	2,00 ±0,17	0,070
SD→PP	0,64 ±0,13	1,90 ±0,14	2,10 ±0,35	0,98 ±0,26	1,05 ±0,35	0,57 ±0,13	0,001

Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média e valores de “p”.

Padrões isolados de transição entre fases do ciclo vigília-sono:

- Aumento no 1º e 5º PO e diminuição no 3º e 14º POs com valores no 14º PO superiores ao do EOsG basal (PP→SS com valores de $p<0,001$).
- Aumento do 1º ao 7º PO.e diminuição no 14ºPO com valores inferiores ao EOsG basal (PP→SD com valores de $p<0,002$).
- Aumento no 1º PO com diminuição até o 14º PO com valores inferiores ao EOsG basal (SS→VA com valores $p<0,001$).
- Diminuição no 1º PO com aumento até o 14º PO com valores superiores ao EOsG basal (SD→VA com valores de $p<0,001$).
- Diminuição no 1º PO com aumento até o 14º PO com valores inferiores ao EOsG basal (PP→VR com valores de $p<0,007$).
-

Não foram observados valores estatisticamente significativos nas transições entre SS→SD, PP→VA, PP→VR e SD→SS.

4.5. Eventos fásicos

Abalos musculares dos vários segmentos do corpo (eventos fásicos) foram identificados durante o SD antes e após a LM. Os eventos fásicos foram avaliados quanto sua ocorrência isolada ou, combinada com movimentação dos demais segmentos do corpo, dessa forma, os movimentos da cabeça (aumento do tônus nos músculos trapézios), movimentos de vibriças, dos olhos e das patas foram quantificados quanto a sua duração em segundos (Figura 19).

Observou-se diminuição estatisticamente significativa na duração da movimentação da cabeça (C) ao longo do período após a LM ($p < 0,006$)

Na análise da movimentação de olhos (O) e pata posterior esquerda (PPE), observamos aumento ao longo do período avaliado com valores no 14º PO superiores ao EOsG basal com leve tendência estatística para movimentação dos olhos ($p < 0,07$).

E na análise dos movimentos de *rostrum* (R) e pata posterior direita (PPD), não observamos valores estatisticamente significativos, porém notamos uma diminuição no 1º PO e posterior aumento do 3º ao 7º PO para R e 3º ao 5º PO para PPD com diminuição no 14º PO com valores inferiores ao do EOsG basal (R $p < 0,65$ / PPD $p < 0,08$) (Tabela 4 e Figura 19).

Tabela 4: Quantidade dos diversos tipos de eventos fásicos durante o sono dessincronizado

EVENTOS FÁSICOS DO SONO DESSINCRONIZADO EM RELAÇÃO AO MOMENTO DA LESÃO MEDULAR							
Evento	PRE	1ºPO	3ºPO	5ºPO	7ºPO	14ºPO	Valor de p (entre momentos)
C	4,95 ±0,99	2,60 ±1,01	2,44 ±0,84	2,68 ±0,97	1,61 ±0,64	1,32 ±0,52	0,006
R	70,02 ±10,92	64,14 ±4,17	82,81 ±14,83	85,43 ±16,29	82,76 ±15,70	55,50 ±14,83	0,650
O	20,66 ±6,48	26,30 ±6,60	32,68 ±8,35	43,34 ±12,12	34,17 ±7,80	24,26 ±6,02	0,077
PPE	1,21 ±0,22	2,33 ±1,33	3,27 ±1,72	1,26 ±0,53	1,89 ±0,42	1,93 ±0,51	0,287
PPD	5,63 ±1,79	2,78 ±0,85	11,10 ±4,80	8,28 ±5,36	3,10 ±0,85	2,37 ±0,83	0,087

Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média e valores de “p”.

Figura 19: Gráfico ilustrando a quantidade dos diferentes tipos de eventos fásicos (C, R, O, PPE e PPD) durante o sono dessincronizado, nos diversos momentos avaliados neste estudo. Cada símbolo representa o valor médio $\pm$ erro padrão da média.

4.6. Análise espectral do SD

A fim de se averiguar, se a LM resultava em algum tipo de alteração neurofisiológica foi realizada análise instrumental e longitudinal dos eletroscilogramas neo-corticais e hipocampais por meio de teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunn*. A comparação entre os grupos (Grupo 1: com e Grupo 2: sem eventos fásicos) foi realizada por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Para evidenciar as freqüências de maior prevalência nos episódios de SD foi realizada análise espectral do córtex associativo (A7) e hipocampo (CA1) considerando-se as principais bandas de freqüência que caracterizam os ciclos vigília-sono (0.5 – 4.0, 4.0 – 11.0 e 11.0 – 35 Hz) no rato (Figura 20).

4.6.1. Freqüências

4.6.1.1. Banda *delta* δ (0.5 – 4.0 Hz)

Na tabela 5 e figura 21 apresentamos os resultados dos achados no córtex associativo sensório-motor (A7) e hipocampo (CA1) de ambos os hemisférios (lado esquerdo e direito) da análise longitudinal após a LM e a comparação entre grupos (Grupo 1 – com eventos fásicos e Grupo 2 – sem eventos fásicos) para cada região registrada (A7 e CA1).

Figura 20: Apresentação de trecho de análise espectral. A e B: Trechos de 2 segundos de SD. A: SD sem eventos fásicos. Note na figura A que o registro do músculo trapézio (C) exibição característica de padrão eletrofisiológico de frequência cardíaca (FC). B: SD com eventos fásicos em patas posteriores (PPe e PPd). Note na figura B que o registro ocular exibe FC. C e D: Processamento espectral com destaque para as três bandas de frequência estudadas (δ , θ , σ e β).

Tabela 5: Frequência de registros EOsGs, banda δ , em cada região e lado mensurado.

FRECUENCIA (Hz) – BANDA δ (0,5 – 5,0Hz)									
	Lado	Grupo	PRE (n=478)	1ºPO (n=571)	3ºPO (n=713)	5ºPO (n=835)	7ºPO (n=844)	14ºPO (n=638)	Valor de p (entre momentos)
Córtex asociativo sensorio-motor (A7)	E	G1	2,79 $\pm 0,07$	2,74 $\pm 0,07$	3,10 $\pm 0,05$	2,93 $\pm 0,05$	3,07 $\pm 0,05$	2,70 $\pm 0,06$	0,0001
		G2	3,18 $\pm 0,08$	2,98 $\pm 0,07$	3,27 $\pm 0,06$	3,25 $\pm 0,07$	3,42 $\pm 0,06$	3,19 $\pm 0,09$	0,059
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,020	0,020	0,002	0,960	0,001	
	D	G1	2,70 $\pm 0,07$	2,78 $\pm 0,06$	2,66 $\pm 0,05$	2,26 $\pm 0,05$	3,14 $\pm 0,05$	2,99 $\pm 0,05$	0,0001
		G2	2,91 $\pm 0,08$	2,98 $\pm 0,07$	2,54 $\pm 0,06$	2,53 $\pm 0,08$	3,25 $\pm 0,06$	3,28 $\pm 0,08$	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,012	0,909	0,029	0,343	0,001	
Hipocampo dorsal (Ca1)	E	G1	2,97 $\pm 0,07$	3,30 $\pm 0,06$	3,47 $\pm 0,05$	3,32 $\pm 0,05$	3,52 $\pm 0,04$	3,12 $\pm 0,05$	0,0001
		G2	3,36 $\pm 0,07$	3,50 $\pm 0,06$	3,51 $\pm 0,05$	3,63 $\pm 0,06$	3,70 $\pm 0,06$	3,60 $\pm 0,07$	0,301
		Valor de p (entre grupos)	0,527	0,351	0,076	0,035	0,150	0,001	
	D	G1	2,90 $\pm 0,07$	2,45 $\pm 0,07$	3,71 $\pm 0,04$	3,43 $\pm 0,05$	3,38 $\pm 0,05$	2,89 $\pm 0,06$	0,0001
		G2	3,24 $\pm 0,08$	2,67 $\pm 0,08$	3,67 $\pm 0,05$	3,52 $\pm 0,07$	3,68 $\pm 0,06$	3,53 $\pm 0,08$	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,370	0,123	0,223	0,001	

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média e valores de “p” na coluna direita para análise longitudinal e nas linhas destacadas (lilás) para análise entre grupos.

Figura 21: Gráfico ilustrando a frequência (Hz) dos registros EOsGs, banda δ , no córtex associativo sensório-motor (A7) e no hipocampo dorsal (Ca1), à direita e à esquerda, nos diversos momentos avaliados neste estudo. Cada símbolo representa o valor médio e a barra o erro padrão da média.

4.6.1.2. Banda *teta* θ (5,0 – 11,0 Hz)

Na tabela 6 e figura 22 apresentamos os resultados das análises estatísticas para os achados no córtex associativo sensório-motor (A7) e hipocampo (CA1) de ambos os hemisférios (lado esquerdo e direito) ao longo dos dias avaliados e a comparação entre grupos (Grupo 1 – com eventos fásicos e Grupo 2 – sem eventos fásicos) para cada região registrada (A7 e CA1).

4.6.1.3. Banda *sigma* e *beta*

Na tabela7 e figura 23 apresentamos os resultados das análises estatísticas para os achados no córtex associativo sensório-motor (A7) e hipocampo (CA1) de ambos os hemisférios (lado esquerdo e direito) ao longo dos dias avaliados e a comparação entre grupos (Grupo 1 – com eventos fásicos e Grupo 2 – sem eventos fásicos) para cada região registrada (A7 e CA1).

Tabela 6: Frequência de registros EOsGs, banda θ , em cada região e lado mensurado.

FREQUENCIA (Hz) – BANDA θ (5,0 – 11,0Hz)									
	Lado	Grupo	PRE (n=478)	1ºPO (n=571)	3ºPO (n=713)	5ºPO (n=835)	7ºPO (n=844)	14ºPO (n=638)	Valor de p (entre momentos)
Córtex associativo sensório- motor (A7)	E	G1	7,44 ±0,05	7,50 ±0,04	7,49 ±0,05	7,48 ±0,03	7,46 ±0,04	7,43 ±0,04	0,0001
		G2	6,84 ±0,06	6,88 ±0,04	7,34 ±0,07	6,99 ±0,06	7,27 ±0,07	6,80 ±0,06	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,096	0,013	0,005	0,001	
	D	G1	7,46 ±0,05	7,56 ±0,05	7,44 ±0,04	7,31 ±0,03	7,44 ±0,03	7,38 ±0,03	0,0001
		G2	6,91 ±0,06	6,97 ±0,05	6,73 ±0,04	6,86 ±0,06	6,82 ±0,05	6,82 ±0,06	0,019
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	
Hipocampo dorsal (Ca1)	E	G1	7,45 ±0,04	7,46 ±0,05	7,50 ±0,03	7,42 ±0,03	7,42 ±0,03	7,41 ±0,03	0,005
		G2	6,85 ±0,05	6,65 ±0,04	6,60 ±0,03	6,68 ±0,05	6,75 ±0,04	6,63 ±0,04	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	
	D	G1	7,50 ±0,04	7,61 ±0,04	7,59 ±0,03	7,41 ±0,03	7,43 ±0,03	7,39 ±0,03	0,0001
		G2	6,67 ±0,04	6,93 ±0,04	6,73 ±0,04	6,66 ±0,03	6,74 ±0,04	6,65 ±0,04	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média e valores de “p” na coluna direita para análise longitudinal e nas linhas destacadas (lilás) para análise entre grupos.

Figura 22: Gráfico ilustrando a frequência (Hz) dos registros EOsgs, banda θ , no córtex associativo sensório-motor (A7) e no hipocampo dorsal (Ca1), à direita e à esquerda, nos diversos momentos avaliados neste estudo. Cada símbolo representa o valor médio e a barra o erro padrão da média.

Tabela 7: Frequência de registros EOsGs, banda σ/β , em cada região e lado mensurado.

FRECUENCIA (Hz) – BANDA σ/β (11,0 – 35,0Hz)									
	Lado	Grupo	PRE (n=478)	1ºPO (n=571)	3ºPO (n=713)	5ºPO (n=835)	7ºPO (n=844)	14ºPO (n=638)	Valor de p (entre momentos)
Córtex associativo sensório- motor (A7)	E	G1	15,50 ±0,16	15,92 ±0,15	17,13 ±0,19	16,48 ±0,14	16,83 ±0,15	15,77 ±0,15	0,0001
		G2	15,49 ±0,20	15,31 ±0,18	16,62 ±0,20	16,51 ±0,24	17,28 ±0,24	15,20 ±0,22	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,014	0,001	0,001	0,020	0,073	0,001	
	D	G1	15,54 ±0,17	15,54 ±0,14	16,15 ±0,15	15,50 ±0,13	15,69 ±0,13	15,63 ±0,14	0,022
		G2	14,95 ±0,20	15,38 ±0,16	14,94 ±0,15	15,98 ±0,22	15,92 0,21	15,79 ±0,25	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,050	0,023	0,001	0,001	0,040	0,420	
Hipocampo dorsal (Ca1)	E	G1	16,50 ±0,22	15,89 ±0,18	15,61 ±0,12	15,75 ±0,13	14,74 ±0,07	14,78 ±0,07	0,0001
		G2	17,08 ±0,29	16,19 ±0,25	14,95 ±0,18	15,50 ±0,22	14,76 ±0,14	14,04 ±0,14	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,091	0,149	0,089	0,001	
	D	G1	15,47 ±0,15	15,41 ±0,11	15,14 ±0,08	14,94 ±0,08	14,88 ±0,07	14,81 ±0,09	0,0001
		G2	14,97 ±0,20	14,86 ±0,15	13,56 ±0,09	14,26 ±0,15	14,26 ±0,13	14,40 ±0,14	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,820	0,005	0,001	0,045	0,001	0,159	

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média e valores de “p” na coluna direita para análise longitudinal e nas linhas destacadas (lilás) para análise entre grupos.

Figura 23: Gráfico ilustrando a frequência (Hz) dos registros EOGs, banda σ/β , no córtex associativo sensório-motor (A7) e no hipocampo dorsal (Ca1), à direita e à esquerda, nos diversos momentos avaliados neste estudo. Cada símbolo representa o valor médio e a barra o erro padrão da média.

4.6.2. Potências

4.6.2.1. Banda *delta*

Na tabela 8 apresentamos os resultados das análises estatísticas para os achados no córtex associativo sensório-motor (A7) e hipocampo (CA1) de ambos os hemisférios (lado esquerdo e direito) ao longo dos dias avaliados e a comparação entre grupos (Grupo 1 – com eventos fásicos e Grupo 2 – sem eventos fásicos) para cada região registrada (A7 e CA1).

4.6.2.2. Banda *teta*

Na tabela 9 apresentamos os resultados das análises estatísticas para os achados no córtex associativo sensório-motor (A7) e hipocampo (CA1) de ambos os hemisférios (lado esquerdo e direito) ao longo dos dias avaliados e a comparação entre grupos (Grupo 1 – com eventos fásicos e Grupo 2 – sem eventos fásicos) para cada região registrada (A7 e CA1).

4.6.2.3. Banda *sigma e beta*

Na tabela 10 apresentamos os resultados das análises estatísticas para os achados no córtex associativo sensório-motor (A7) e hipocampo (CA1) de ambos os hemisférios (lado esquerdo e direito) ao longo dos dias avaliados e a comparação entre grupos (Grupo 1 – com eventos fásicos e Grupo 2 – sem eventos fásicos) para cada região registrada (A7 e CA1).

Tabela 8: Potência dos registros EOsGs, banda δ , em cada região e lado mensurado.

POTÊNCIA (μV²) – BANDA δ (0,5 – 5,0Hz)									
	Lado	Grupo	PRE (n=478)	1ºPO (n=571)	3ºPO (n=713)	5ºPO (n=835)	7ºPO (n=844)	14ºPO (n=638)	Valor de p (entre momentos)
Córtex associativo sensório- motor (A7)	E	G1	73,13 ±6,16	60,91 ±12,39	106,27 ±29,13	116,76 ±10,93	61,31 ±4,41	163,87 ±22,02	0,0001
		G2	51,22 ±7,35	34,48 ±3,65	46,00 ±4,69	169,12 ±21,94	58,31 ±8,67	196,65 ±18,27	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,716	0,001	0,002	0,044	0,001	
	D	G1	126,18 ±14,59	94,62 ±6,40	239,15 ±27,58	181,18 ±12,38	43,46 ±2,32	62,52 ±2,64	0,0001
		G2	112,69 ±19,89	111,20 ±17,08	1257,75 ±116,52	214,84 ±31,63	28,57 ±2,74	72,73 ±5,46	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,231	0,001	0,001	0,001	0,773	
Hipocampo dorsal (Ca1)	E	G1	168,06 ±17,26	15,51 ±1,31	713,50 ±87,31	1592,55 ±121,20	930,98 ±89,06	1013,72 ±254,54	0,0001
		G2	5,86 ±0,42	8,62 ±1,11	6353,95 ±520,47	1750,16 ±252,37	3260,45 ±343,09	2788,22 ±716,20	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,001	0,934	0,001	0,002	
	D	G1	878,45 ±92,20	160,14 ±33,94	224,72 ±23,95	658,27 ±69,30	435,34 ±31,08	816,91 ±123,67	0,0001
		G2	74,11 ±15,78	46,02 ±11,08	1818,35 ±132,03	1006,70 ±140,65	1139,37 ±122,12	1982,07 ±381,03	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,001	0,159	0,005	0,228	

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média e valores de “p” na coluna direita para análise longitudinal e nas linhas destacadas (lilás) para análise entre grupos.

Tabela 9: Potência dos registros EOGs, banda θ , em cada região e lado mensurado.

POTÊNCIA (μV²) – BANDA θ (5,0 – 11,0Hz)									
	Lado	Grupo	PRE (n=478)	1ºPO (n=571)	3ºPO (n=713)	5ºPO (n=835)	7ºPO (n=844)	14ºPO (n=638)	Valor de p (entre momentos)
Córtex associativo sensório- motor (A7)	E	G1	734,86 ±92,67	434,14 ±60,72	417,99 ±61,89	1758,04 ±111,84	1247,65 ±123,03	1345,92 ±134,62	0,0001
		G2	637,71 ±78,34	620,28 ±70,62	536,60 ±101,64	851,94 ±95,89	1099,63 ±159,45	2642,72 ±232,82	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,784	0,001	0,001	0,001	0,001	
	D	G1	463,72 ±29,13	434,54 ±31,39	239,15 ±27,58	351,75 ±23,14	295,78 ±13,70	378,41 ±22,49	0,0001
		G2	371,75 ±27,82	439,85 ±31,15	402,60 ±25,85	192,15 ±16,37	197,82 ±19,53	554,47 ±43,93	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,056	0,001	0,001	0,001	0,148	
Hipocampo dorsal (Ca1)	E	G1	2375,12 ±213,19	103,17 ±5,71	3836,21 ±452,36	13093,00 ±807,44	11059,16 ±847,10	15215,84 ±1795,79	0,0001
		G2	34,64 ±2,91	25,06 ±2,32	19943,37 ±1213,65	6302,81 ±751,34	13534,40 ±1230,76	18188,63 ±3274,16	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,001	0,212	0,227	0,001	
	D	G1	5361,13 ±451,37	563,08 ±37,91	3127,52 ±362,98	12356,17 ±621,94	8928,97 ±626,53	5458,70 ±339,18	0,0001
		G2	390,69 ±30,22	313,48 ±25,07	10996,11 ±609,89	5213,05 ±478,27	8271,86 ±662,26	7778,92 ±1284,62	0,0001
		Valor de p (entre grupos)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,040	0,001	

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média e valores de “p” na coluna direita para análise longitudinal e nas linhas destacadas (lilás) para análise entre grupos.

Tabela 10: Potência dos registros EOGs, banda σ/β , em cada região e lado mensurado.

POTÊNCIA (μV²) – BANDA σ/β (11,0 – 35,0Hz)									
	Lado	Grupo	PRE (n=478)	1ºPO (n=571)	3ºPO (n=713)	5ºPO (n=835)	7ºPO (n=844)	14ºPO (n=638)	Valor de p (entre momentos)
Córtex associativo sensório- motor (A7)	E	G1	81,33 ±10,28	44,28 ±6,34	45,39 ±5,85	125,92 ±8,71	82,09 ±7,85	105,34 ±9,97	<0,0001 5 > Pré, 1, 3, 7 e 14 14 > Pré, 1, 3 e 7 Pré e 7 > 1 e 3
		G2	81,42 ±10,29	64,61 ±6,92	57,61 ±7,08	68,36 ±8,11	72,44 ±9,60	225,20 ±21,56	<0,0001 14 > Pré, 1, 3, 5 e 7 5 > Pré, 1 e 7 3 > Pré e 7 1 > Pré
	Valor de p (entre grupos)		0,335	<0,001	<0,001	<0,001	0,013	<0,001	
	D	G1	33,39 ±1,83	21,83 ±1,51	26,99 ±1,73	24,73 ±0,94	25,93 ±0,90	30,28 ±1,25	<0,0001 14 > 1, 3, 5 e 7 Pré, 5 e 7 > 1 e 3
		G2	27,11 ±1,77	31,53 ±1,95	60,74 ±3,06	16,78 ±1,02	21,00 ±1,20	31,07 ±1,91	<0,0001 3 > Pré, 1, 5, 7, e 14 14 > Pré, 5 e 7 Pré e 1 > 5 e 7
	Valor de p (entre grupos)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,539	
Hipocampo dorsal (Ca1)	E	G1	256,05 ±24,66	20,14 ±1,29	386,53 ±45,70	897,42 ±58,88	1322,83 ±116,36	1204,22 ±170,89	<0,0001 14 e 7 > Pré, 1, 3, e 5 5 > Pré, 1 e 3 Pré e 3 > 1
		G2	11,85 ±0,45	8,76 ±0,35	1824,54 ±99,96	543,96 ±66,23	1849,24 ±163,35	1323,55 ±228,42	<0,0001 7 > Pré, 1, 3, 5 e 14 3 > Pré, 1, 5 e 14 5 e 14 > Pré e 1 Pré > 1
	Valor de p (entre grupos)		0,003	0,087	<0,001	<0,001	0,540	<0,001	
	D	G1	668,80 ±56,36	49,37 ±3,24	224,38 ±20,12	729,85 ±37,91	524,96 ±35,52	511,66 ±57,75	<0,0001 5, 7 e 14 > Pré, 1 e 3 Pré > 1 e 3 3 > 1
		G2	45,43 ±2,71	45,54 ±3,06	781,92 ±42,71	376,71 ±36,62	534,99 ±39,25	1249,60 ±215,59	<0,0001 3, 7 e 14 > Pré, 1 e 5 5 > Pré e 1
	Valor de p (entre grupos)		<0,001	0,244	<0,001	<0,001	0,618	0,478	

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média e valores de “p” na coluna direita para análise longitudinal e nas linhas destacadas (lilás) para análise entre grupos.

4.7. Escala BBB

A pontuação na Escala BBB nas condições pré- lesão e 1, 3, 5, 7 e 14 dias pós-lesão foi, respectivamente, $21,00 \pm 0,00$, $0,14 \pm 0,14$, $0,21 \pm 0,57$, $0,86 \pm 2,06$, $1,57 \pm 1,89$ e $1,71 \pm 1,91$ pontos (média $\pm$ erro padrão da média). Na comparação da pontuação BBB entre as condições pré e pós-lesão, houve diferença estatística significativa entre eles (teste de Friedman, $p < 0,0001$), sendo que a pontuação nos momentos após a LM (1, 3, 5, 7 e 14 dias) foi significativamente menor do que aquela observada no momento pré-lesão (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$). Além disso, nos momentos 7 e 14, a pontuação foi maior do que o daquela observada nos dias 1, 3 e 5 após a lesão (Figura 24).

Figura 24: Gráfico ilustrando a pontuação na Escala BBB nos dias em relação à LM. Cada símbolo representa o valor médio e a barra o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação aos dias -1, 7 e 14; ** Diferença significativa em relação aos dias -1, 1, 3 e 5; (teste de Friedman, seguido pelo pós-teste de Dunn).

4.8. Histopatologia

Verificou-se por meio de Cresil Violeta que a posição dos elétrodos hipocampais estava de acordo com as coordenadas escolhidas para o presente protocolo segundo o atlas estereotático para ratos de Paxinos e Watson (Figura 25).

A LM contusa produziu um núcleo central de lesão nas substâncias cinzenta e branca da medula com um espraio de tecido da borda para a periferia em T10 que se caracterizaram por necrose, degeneração de substância micsóide e infiltrado celular moderado a intenso, presença de hemorragia discreta e neovascularização intensa (Tabela 11 e Figura 26 e 27). Observou-se as mesmas características no segmento caudal T9 menos intensas.

Figura 25: A. Aproximação de 20X com visualização de posicionamento de elétrodos na região CA1 hipocampal B. Esquema de corte frontal do encéfalo de rato em que aparece a região hipocampal dorsal (CA1). O posicionamento para implante dos eletrodos sub-corticais esta destacada em amarelo na figura.

Tabela 11: Intensidade dos achados na medula espinhal após lesão da medula espinhal.

Intensidade do achado					
Achado	Mediana	Mínimo	Máximo	Quartil 25%	Quartil 75%
Necrose	4	2	4	3	4
Hemorragia	1	1	3	1	1
Neovascularização	4	3	4	4	4
Degeneração	3	2	4	3	4
Infiltrado	3	2	4	3	4

Figura 26: Gráfico Box Plot ilustrando a intensidade do achado histológico de acordo com a alteração histológica avaliada na coloração de HE.

A marcação por GFAP caracterizou-se por reação glial intensa no hipocampo, foco da LM e segmento distal à LM. O número médio de células gliais marcadas com GFAP foi de $26,81 \pm 3,66$ células.

Figura 27: Apresentação das lâminas histológicas de 2 exemplos de ratos com LM de 14 dias de evolução. A e D: Apresentação da característica do fragmento de medula espinhal em corte longitudinal (lupa) por coloração de hematoxilina eosina (HE) com definição da extensão da área de LM. B e E: Aumento de 10X para apresentação das características de necrose, degeneração de substância micsóide e infiltrado celular moderado a intenso, presença de hemorragia discreta e neovascularização intensa. C e F: Aumento de 40X para apresentação das características de morfologia celular. A' e D': Apresentação da característica do fragmento de medula espinhal em corte longitudinal (lupa) por imuno-histoquímica por proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para caracterização da extensão cicatriz glial. B' e E': Aumento de 10X para apresentação das características migração de células gliais para o foco lesional. C' e F': Aumento de 40X para apresentação das características de comportamento das células gliais com marcante aglomeração ao redor de neurônios remanescentes.

5 Discussão

5.1. Ciclo vigília-sono

O estudo experimental do sono data de longa época, mas somente após a invenção da eletrencefalografia na década de 1930 que foi possível observarmos avanços na elucidação de alguns de seus mecanismos. O gato foi um animal amplamente estudado na década de 1960 com os clássicos estudos do Instituto di Fisiologia dell'Università di Pisa (Gassel MM., Marchiafava PL e Pompeiano O, 1964 e 1965), em seguida o rato, começou a ser estudado e tornou-se o animal de escolha para o estudo do sono, foi introduzido como modelo experimental nas décadas de 1960 e 1970 com os pioneiros estudos de Roldan e Weiss, 1962, Timo-laria e cols., 1970. Atualmente é o modelo experimental mais utilizado nos protocolos das investigações sobre a fisiopatologia do sono (Vertes 1984, Steriade 1992; Valle e cols., 1992; Valle, 1995; Andersen e Tufik, 2000). Entretanto, apesar de importante e uma necessidade clínica veemente, poucos estudos correlacionam os fenômenos comuns ao sono e a LM (Esteves e cols., 2004 e 2007). Avaliar as consequências da LM no sono é importante para conduzirmos terapias futuras.

Normalmente, como resposta a um trauma medular, diversos sistemas são mobilizados para o início de uma intensa e duradoura reorganização estrutural e funcional. Embora a LM resulte primariamente no comprometimento das vias sensório-motoras e, conseqüente perda das funções motoras, é comum observar alterações em outros segmentos do

organismo (Gerke e cols., 2003, Ondrejcek T. e cols., 2005). Os ritmos circadianos, especialmente, o ciclo vigília-sono são freqüentemente afetados após um trauma (Esteves e cols., 2007).

Não obstante a necessidade inerente de uma melhor elucidação do conjunto de eventos decorrentes de um trauma medular sobre as varias funções de um organismo afetado, poucos estudos tem sido dedicados, particularmente, ao esclarecimento das relações entre LM e sono.

A eletrofisiologia é a ferramenta de escolha em nosso laboratório para a análise dos padrões comportamentais do ciclo vigília-sono. Tal ferramenta, neste estudo longitudinal, se mostrou eficaz em apontar as alterações comportamentais ao longo dos 14 dias avaliados após a LM contusa.

A escolha do modelo experimental de LM contusa se deu pelo fato de que tal protocolo mimetiza a condição humana na qual a lesão não é completa e mantém íntegros alguns tratos medulares e função motora residual.

Apartir de tais seleções de ferramentas experimentais obtivemos em nossa pesquisa resultados que demonstram que o ciclo vigília-sono sofre alterações após a LM. O animal no período claro aumentou a tempo total das fases de sono sincronizado e dessincronizado. Tais resultados divergem da literatura atual. Esteves e cols. 2007 apontam em seus resultados diminuição do sono sincronizado e dessincronizado. O método de estagimento implementado pelo grupo citado, segue os critérios descritos em 1968 de Rechtschaffen e Kales.

Em nosso estudo, utilizamos a leitura de traçados analógicos, sendo consideradas pequenas frações das características eletrofisiológicas das fases

do ciclo vigília-sono de até 1 segundo. Esta metodologia se mostrou mais sensível e proporcionou detectarmos um aumento da fragmentação do sono e contabilizarmos um maior tempo de sono nestes animais. Os resultados demonstram que a LM provoca alterações significativas na arquitetura, especialmente, na microestrutura do ciclo vigília-sono do rato tanto no período agudo como no crônico.

Pela metodologia implementada foi possível realizarmos uma distribuição e ordenação dos dados extraídos, o que favoreceu identificarmos alterações significativas na composição e na organização dos ciclos. Também significativas foram as alterações na duração de cada uma das várias fases dos ciclos, bem como, as freqüentes alternâncias, intrusão de ondas lentas nas fases caracterizadas por dessincronização e distribuição espectral de padrões eletroscilográficos diferenciada ao longo do período de 14 dias decorrentes da LM.

A fragmentação do sono é uma medida importante que possibilita a avaliação da eficiência do sono. Portanto indivíduos com fragmentação aumentada possuem uma baixa eficiência do sono e, conseqüente déficit em diversas outras funções, principalmente, cognitivas.

A maioria das alterações na microestrutura dos ciclos (aumento da duração das fases SS e SD e diminuição das fases VA, VR e PP) ocorreu no período agudo refletindo uma profunda desorganização dos sistemas sincronizadores. O aumento do período de sono em detrimento à vigília poderia ser um reflexo do choque decorrente do trauma, o qual, sabidamente exerce profundos efeitos deletérios sobre os organismos. Vale à pena ressaltar,

entretanto, que todos os animais apresentaram comportamento equivalente ao de um rato não lesado algumas horas após despertarem dos efeitos anestésicos e, exceto pela ausência completa de movimento nas patas posteriores, eles eram capazes de executar praticamente todos os comportamentos, tais como, deambular (apenas com as patas anteriores arrastando o trem posterior); alimentar-se; farejar e explorar visualmente o ambiente.

O fato de o animal apresentar maior fragmentação concomitante com alterações na duração das fases de SS e SD poderia representar, ainda que indiretamente, uma adequação dessas funções no rato portador de LM no período agudo. Entretanto, somente com avaliações e testes específicos essa hipótese poderá ser confirmada.

A avaliação do número de fases do ciclo e o número de ciclos completos e incompletos demonstraram evidente fragmentação na fase aguda (1º PO), com restabelecimento destas medidas a partir do 5º PO. A fragmentação observada na primeira semana pós-lesão pode ser decorrente dos efeitos deletérios que essa nova condição impõe sobre os sistemas sincronizadores (Steriade, 1994).

Essas alterações iniciais são substituídas por uma maior organização a partir do 5º. PO, sugerindo a recuperação do comportamento, porém, sem o completo restabelecimento até o 14ºPO, pois todas as medidas de sono se mantêm aumentadas, sugerindo um “rebote de sono” aumentado nos animais lesados

A maior fragmentação decorrente da LM no período agudo e, recuperação após uma semana poderia ser explicada por uma recuperação funcional dos centros hipnogênicos e dos sistemas de vigília. De fato, em fase de publicação do nosso laboratório demonstraram que ratos submetidos à lesão eletrolítica e neurotóxica de porções da formação reticular mesencefálica (FRM) recuperaram os padrões eletroscilográficos (dessincronização) e comportamentais de vigília e do sono dessincronizado após uma semana. Guardada as proporções dos dois tipos de lesão (LM e lesão da FRM), parece que as funções de vigília e de sono são de importância inquestionável visto que após um insulto grave no sistema nervoso central, ambas as funções se recuperam no prazo de uma semana

Após esta extensa análise dos vários aspectos que compõem o ciclo vigília-sono, se fez necessário o aprofundamento dos achados do sono dessincronizado, por ser esta uma fase do sono importante pela ocorrência de movimentos espontâneos relacionados à atividade onírica.

O SD caracterizou-se pela composição de eventos tônicos e fásicos. A dessincronização cortical manifesta e estável é o eventoônico mais patente dessa fase do sono. Os eventos fásicos são representados pelos movimentos rápidos de olhos (REMs), abalos musculares, flutuação do padrão respiratório, aumento da frequência cardíaca e ondas ponto-genículo-ocipitais (PGOs), os quais freqüentemente ocorrem simultâneos.

Além da dessincronização cortical e atonia muscular característicos do SD na maioria das espécies e em roedores é possível registrar atividade teta notável nas regiões hipocampais. O ritmo teta hipocampal é uma oscilação

regular lenta registrada durante comportamento específico no SD de ratos e gatos (Karashima e cols., 2004).

As análises do sono dessincronizado e a influência da LM sobre os eventos tônicos e fásicos desta fase, também foram favorecidas pela metodologia eleita. De acordo com a classificação de Kohyama e cols., 1994, eventos fásicos com duração inferior a 0,5 segundo são chamados de abalos musculares e os superiores de movimentos localizados. Foram os movimentos localizados que compreenderam a maioria dos eventos fásicos contabilizados em nossa pesquisa. Confirmamos os achados de Esteves e cols. 2004 e 2007, porém evidenciamos um aumento de movimentos oculares e de patas posteriores esquerdas.

A atividade muscular dos elevadores da asa do nariz difere de outras pesquisas de nosso laboratório (Timo-laria, 1990; Valle e cols., 1992 e 1995), o que nos leva crer que a LM apresenta padrões diferentes de outras lesões no sistema nervoso central.

Por outro lado, a metodologia implementada em nossa pesquisa apresenta a característica de “pesquisador dependente”. Para a acurácia dos pequenos eventos eletrofisiológicos avaliados, seria ideal a implementação de estagiamento do sono automatizado com recursos matemáticos por redes neurais (Berthomier, 2007).

5.2. Análise Espectral

O presente estudo investigou a presença de atividade motora denominada de eventos fásicos (abalos musculares e movimentos localizados) durante o SD de ratos com LM contusa. Como o SD possui variados mecanismos de atonia e a LM interrompe a conectividade sensorial e motora, a análise da presença de tais movimentos em ratos com LM é no mínimo intrigante e uma possível ferramenta instrumental para discutirmos mecanismos de liberação destes movimentos.

Na tentativa de descrever os achados descritos nos dirigimos a análises matemáticas consagradas (Sie e Morita, 1996). A análise espectral foi utilizada para observarmos uma possível reorganização cortical após LM (Basso e cols., 2002 e Kim e cols., 2006). Isto nos conduziu a realização de uma avaliação mais pormenorizada da atividade eletrofisiológica do SD após a constatação de que a LM resulta em alterações na expressão dos eventos fásicos motores. Pouco se sabe sobre o efeito da LM e o resultado dela na redução de **input** sensorial sobre a atividade neuronal de estruturas supraespinhais.

Os resultados deste estudo demonstram, primeiramente, a presença de movimentos no trem posteriores após a LM durante o sono REM de ratos ao longo de 14 dias.

Segundo, foi observada no córtex sensório-motor e hipocampo uma evidente diferença entre as frequências e potências do ritmo teta do REM nos períodos com e sem movimentação.

Além disso, observamos a intrusão de frequências delta no hipocampo (2,50Hz) características de disfunção por injúria ao sistema nervoso central em mamíferos (Herbert e cols., 2007). Os resultados mostram que as bandas delta e teta prevalecem e apresentam aumento significativo de frequência e potência no SD, o que corrobora com a literatura

É sabido que a frequência e potência do ritmo teta do sono REM em animais intactos é diferente entre os momentos com e sem eventos fásicos (Karashima e cols., 2004 e 2005, Simões e cols., 1996, Valle e cols., 1992, Fonoff e cols., 1999, Montgomery e cols., 2008, Benington, 1994 e 2006). Nossos resultados evidenciam o aumento de frequência e potência durante os eventos fásicos do REM tanto no animal sem LM como no com LM.

Podemos formular várias hipóteses para tais achados: durante o sono REM a liberação de acetilcolina está intensificada. Esta liberação está positivamente relacionada com o aumento de frequência e potencia do ritmo teta (Keita e cols., 2000).

Liberações dopaminérgicas na via espino-talâmica para modulação da dor, desencadeiam respostas autonômica e motora tais como os eventos fásicos do sono REM (Lindvall e cols., 1983).

Nos estudos com LM existe um conceito bem estabelecido de que o SNC sofre como um todo após a LM. O córtex sensório-motor projeta-se para vários alvos sub-corticais, tais como núcleos pontinos, núcleos da rafe, formação reticular, núcleo trigeminal e núcleos da coluna dorsal. Todos estes núcleos estão envolvidos no processo de sono (Vertes 2004), e os mesmos sofrem com a LM (Raineteau e Schwab, 2001, Basso e cols., 2002, Kim e cols.,

2006), sendo assim, a identificação do aumento de frequência e potência após a LM poderia sugerir uma possível reorganização cortical.

O hipocampo é centro de atenções quando nos reportamos à consolidação de memória (Valle 1992, Walker e cols, 2004, Santos e cols., 2008). Podemos sugerir que a LM oferece um estímulo proprioceptivo na informação corporal que exigiria um maior reconhecimento e aprendizado, com isso a necessidade de consolidar a memória desta nova condição e definiria novos padrões comportamentais.

Nossos dados mostram diminuição de potência para ambas as situações, com e sem eventos fásicos durante o SD no 14º PO, essa diminuição de potência inexplicada também foi identificada por Valle e cols., 1992 e Simões e cols., 1999. Na atividade dessincronizada o padrão é diminuição de potência com aumento de frequência (Clancy, 1978), porém tais características eletrofisiológicas não são parâmetro para a modulação do ritmo teta durante a presença dos eventos fásicos do sono REM.

Ainda com a sugestão de alteração proprioceptiva advinda da LM é possível que tal diminuição de potência seja uma influência do córtex sensório-motor sobre o córtex motor (Serman, 1977). Estas alterações de frequência e potencia refletem o modo de transferência e processamento de informação sensório-motora através das estruturas corticais e talâmicas (Babiloni e cols., 2008).

O estudo do espectro de frequências em pesquisas clínicas (Tran e cols., 2004) descreveu resultados sobre a diminuição de frequência e potencia

(8-13Hz) em indivíduos tetraplégicos quando comparados com paraplégicos e com normais e pode estar associada a deafferentação provocada pela LM.

5.3. Escala BBB

Depois de tais informações, fica mais fácil apresentarmos os achados da avaliação comportamental da escala BBB e compreendermos sua importância em nossa pesquisa. Nesta avaliação ficou evidenciado a recuperação residual funcional a partir do 5º PO e uma melhora até o 14ºPO avaliado. Achados de recuperação funcional descrevem recuperação até a 7ª semana após a LM (Basso, 2004; Smith, 2006).

Nos estudos com LM existe um conceito bem estabelecido de que o SNC sofre como um todo após a LM. A densa rede estrutural que interconecta as diferentes sub-regiões do córtex primário oferece um provável substrato para a rápida reorganização ocorrida. O córtex sensório-motor projeta-se para vários alvos sub-corticais, tais como núcleos pontinos, núcleos da rafe, formação reticular, núcleo trigeminal e núcleos da coluna dorsal. Todos estes núcleos estão envolvidos no processo de sono assim como sofrem com a LM e promovem reorganização sub-cortical (Raineteau e Schwab, 2001, Basso e cols., 2002, Kim e cols., 2006).

5.4. Histopatologia

O recurso histopatológico serviu de ferramenta para avaliar a posição dos elétrodos nas coordenadas das áreas escolhidas e para caracterizar a extensão da LM.

Uma vez confirmada à correta posição dos elétrodos foi possível declarar que nossos achados estão de acordo com o que afirmamos na discussão acima, desde que observamos alterações comportamentais significativas não apenas como um todo, mas também expressões eletrofisiológicas correspondentes. Isto indicou que em ambos estados tanto de vigília quanto de sono estão afetados e são alvos de mudanças significativas com conseqüente ajuste a nova condição devido à LM nestes ratos.

Acreditamos que esta ferramenta possa ser amplamente explorada. Observar o comportamento das células encefálicas após a LM pode trazer novas e importantes informações. Sugerimos um estudo para avaliar a morte neuronal e o comportamento glial de regiões corticais como a motora e sensório-motora, e, sub-corticais como o hipocampo e o tálamo após a LM.

6. CONCLUSÃO

A alteração sensório-motora causada pela LM é responsável por alterações dopaminérgicas caracterizadas por desativação do **drive** dopaminérgico hipotalâmico pela nova condição sensório-motora, sendo o provável gatilho para a liberação dos eventos fásicos durante o SD (Hochman 2008) a influência deste mesmo sistema dopaminérgico na modulação da dor (Christensen e Hulsebosch, 1997) e suas conseqüências como disfunções autonômicas, motoras (De Mello e cols. 2002), distúrbios de movimento (Garcia-Garcia e cols. 2005).

Embora não seja o escopo deste trabalho e nenhum tipo específico de avaliação cognitiva tenha sido aplicada aos animais, vale a pena citar que trabalhos de nosso laboratório em que a atividade onírica foi extensamente estudada, era expressa com aumento da voltagem e da freqüência do ritmo teta durante o sono dessincronizado, a maioria das vezes, com aumento concomitante da freqüência cardíaca, refletindo maior grau de atenção. Esse tipo de modulação era freqüente na vigília atenta (Valle, 1992; Valle et. al, 1992; Valle, 1995, Santos e cols., 2008).

Nossos dados estão de acordo com a citação acima uma vez que observamos alterações significativas não somente nos comportamentos como um todo, mas também nas expressões eletrofisiológicas a que correspondem indicando que tanto a vigília como o sono são afetados e alvos de profundas mudanças com conseqüente adaptação a uma nova situação nos indivíduos portadores de LM.

7. ANEXOS

Anexo 1: Ficha de Registro de Cirurgia de Implante de Eléttodos

Folha de Registro de Cirurgia de Implante de Eléttodos																																																																											
<u>Geral</u>					<u>Preparação RLM</u>																																																																						
Animal: _____ Peso: _____ g Data: _____ / _____ / _____ Início: _____ : _____ Término: _____ : _____ Responsável: _____					<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="3" style="text-align: left; padding: 2px;">Esquerda</th> <th colspan="3" style="text-align: left; padding: 2px;">Direita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">T</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">0</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">T</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">Terra</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">V</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">2</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">V</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">Vibriças</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">O</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">3</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">4</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">O</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">Olhos</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A7</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">5</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">6</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A7</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">Córtex Associativo</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">7</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">8</td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">CA1</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">9</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">10</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">CA1</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">Hipocampo</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">11</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">12</td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">C</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">13</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">14</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">C</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">Cervical</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">pp</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">15</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">16</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">pp</td> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 2px;">Patas Posteriores</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">17</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">18</td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> </tbody> </table>					Esquerda			Direita			T	0		T	Terra		V	1	2	V	Vibriças		O	3	4	O	Olhos		A7	5	6	A7	Córtex Associativo			7	8				CA1	9	10	CA1	Hipocampo			11	12				C	13	14	C	Cervical		pp	15	16	pp	Patas Posteriores			17	18			
Esquerda			Direita																																																																								
T	0		T	Terra																																																																							
V	1	2	V	Vibriças																																																																							
O	3	4	O	Olhos																																																																							
A7	5	6	A7	Córtex Associativo																																																																							
	7	8																																																																									
CA1	9	10	CA1	Hipocampo																																																																							
	11	12																																																																									
C	13	14	C	Cervical																																																																							
pp	15	16	pp	Patas Posteriores																																																																							
	17	18																																																																									
<u>Anestesia</u> Diazepam 0,1ml/100gr Dose (_____ ml) _____ : _____ Ketamina 0,2ml/100gr Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____ Dose (_____ ml) _____ : _____					<u>Coordenadas (mm):</u> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center; padding: 2px;">AP BREGMA</th> <th style="text-align: center; padding: 2px;">ML SAGITAL</th> <th style="text-align: center; padding: 2px;">DV OSSO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Estereot</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A7</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-3,5</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">±4,0</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Ca1</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-3,8</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">±2,0</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">4,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Soma</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>						AP BREGMA	ML SAGITAL	DV OSSO	Estereot				A7	-3,5	±4,0	-	Ca1	-3,8	±2,0	4,0	Soma																																																	
	AP BREGMA	ML SAGITAL	DV OSSO																																																																								
Estereot																																																																											
A7	-3,5	±4,0	-																																																																								
Ca1	-3,8	±2,0	4,0																																																																								
Soma																																																																											

Anexo 2: Etiqueta de Identificação do rato

Responsável:	
Rato:	
Implante:	
LM:	
Observações:	

Anexo 3: Escala BBB

[illegible]

8. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN ML. E TUFIK S., **Altered sleep and behavioral patterns of arthritic rats.** Sleep Research, 2000; 3(4): 161-167.
- ANDERSEN ML. E TUFIK S., **Sleep patterns over 21-day period in rats with chronic constriction of sciatic nerve.** Brain Research Volume 984, Issues 1-2, 12 September 2003, Pages 84-92
- ANDERSEN ML., VALLE AC., TIMO-IARIA C., TUFIK S. **Implantação de elétrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato.** Ed. 01. São Paulo: Ed. UNIFESP, 2001. pp.20-34.
- ANDERSON DK., HALL ED. **Pathophysiology of spinal cord trauma.** Annals of emergency medicine, 1993; 22 (6): 987-992.
- ANDRADE A C C FILHO. **Dor: diagnóstico e tratamento.** São Paulo: Roca, 2001.
- BABILONI C., DEL PERCIO C., IACOBONI M., INFARINATO F., LIZIO R., MARZANO N., CRESPI G., DASS `U F., PIRRITANO M., GALLAMINI M, EUSEBI F. **Golf putt outcomes are predicted by sensorimotor cerebral EEG rhythms.** Journal of Physiology, 2008; 586 (1): 131–139.
- BAMPI LNS., GUILHEM D., LIMA DD. **Quality of live in people with traumatic spinal cord injury: a study with WHOQOL-bref.** Rev. Bras. Epidemiol., 2008; 11 (1): 67-77.
- BARA-JIMENEZ W., AKSU M, GRAHAM B., SATO S., HALLETT M. **Periodic limb movements in sleep State-dependent excitability of the spinal flexor reflex.** Neurology, 2000; 54:1609-1616.
- BASSO DM., BEATTIE MS., BRESNAHAN JC. **Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transaction.** Experimental Neurology, 1996; 139: 244-256.
- BASSO DM., BEATTIE MS., BRESNAHAN JC. **Descending system contributing to locomotor recovery after mild or moderate spinal cord injury in rats: experimental evidence and a review of literature.** Restorative Neurology and Neuroscience, 2002; 20: 189-218.
- BASSO DM. **Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies.** Journal of Neurotrauma, 2004; 21(4):395-404.
- BENINGTON JH., KODALI SK., HELLER HC. **Scoring transitions to REM sleep in rats based on the EEG phenomena of pre-REM sleep: an improved analysis of sleep structure.** Sleep 1994; 17(1): 28-36.

- BERTHOMIER C, DROUOT X, HERMAN-STOICA M, BERTHOMIER P, PRADO J, BOKAR-THIRE D, BENOIT O, MATTOU J, D'ORTHO MP. **Automatic analysis of single-channel sleep EEG: validation in healthy individuals.** Sleep, 2007; 30(11): 1587-95.
- BOEVE BF., SILBER MH., SAPER CB., FERMAN TJ., DICKSON DW., PARISI JE., BENARROCH EE., AHLSSKOG JE., SMITH GE., CASELLI RC., TOPPIMAN-PEIKERT M., OLSON EJ., LIN SC., YOUNG T., WSZOLEK Z., SCHENCK CH., MAHOWALD MW., CATILLO PR., DEL TREDICI K. **Pathophysiology of REM sleep behavior disorder and relevance to neurodegenerative disease.** Brain, 2007; 130: 2770-2788.
- BOISSARD R., GERVASONI D., SCHIMIDT MH., BARBAGLI B., FORT P. **The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study.** Eur J Neuroscience, 2002; 16: 1959-1973.
- BOISSARD R., FORT P., GERVASSONI D., BARBAGLI B., LUPPI PH. **Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset.** Eur J Neuroscience, 2003; 18: 1627-1639.
- BRITO, MAGM., **Diagnóstico de enfermagem da NANDA identificados em pessoas com LM mediante abordagem baseada na teoria do déficit de auto-cuidado.** [Dissertação] Universidade Federal do Goiás, 2007.
- BROOKS PL., PEEVER JH. **Glycinergic and GABA(A)-mediated inhibition of somatic motoneurons does not mediate rapid eye movement sleep motor atonia.** J Neurosci, 2008; 28(14):3535-45.
- CHRISTENSEN MD., EVERHART AW., PICKELMAN JT., HULSEBOSCH CE. **Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury.** Pain, 1996;68(1):97-107.
- CHRISTENSEN MD., HULSEBOSCH CE. **Chronic central pain after spinal cord injury.** J Neurotrauma, 1997; 14(8): 517-37.
- CICONELLI RM. **Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36).** Rev Bras Reumatol 1999;39:144-150.
- CLANCY JJ., CALDWELL DF., VILLENEUVE MJ., SANGIAH S. **Daytime sleep-wake cycle in the rat.** Physiology & Behavior, 1978; 21 (3): 457-459.
- CLEMENS S., RYE D., HOCHMAN S. **Restless legs syndrome Revisiting the dopamine hypothesis from the spinal cord perspective.** Neurology, 2006; 67:125-130.
- COENEN AM, VAN HULZEN ZJ, VAN LUIJTELAAR EL. **Paradoxical sleep in the dark period of the rat: a dissociation between**

- electrophysiological and behavioral characteristics.** Behav Neural Biol., 1983; 37(2):350-6.
- COENEN AML., DRINKENBURG WHIM. **Animal models for information processing during sleep.** International Journal of Psychophysiology, 2002; 46 (3): 163-175.
- DATTA S. **Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat. A mechanism for sleep-dependent plasticity.** Journal of Neuroscience, 2000; 20: 8607-8613.
- DE MELLO MT., LAURO FAA., SILVA AC., TUFIK S. **Incidence of periodic leg movements and of the restless legs syndrome during sleep following acute physical activity in spinal cord injury subjects.** Paraplegia, 1996; 34 (5): 294-296.
- DE MELLO MT., POYARES DL., TUFIK S. **Treatment of periodic leg movements with a dopaminergic agonist in subjects with total spinal cord.** Spinal Cord. 1999; 37(9):634-7.
- DE MELLO MT., SILVA AC., ESTEVES AM., TUFIK S. **Reduction of periodic leg movement in individuals with paraplegia following aerobic physical exercise.** Spinal cord, 2002; 40 (12): 646-9.
- DEVIVO MJ., GO BK., JACKSON AB. **Overview of the national spinal cord injury statistical center database.** The journal of spinal cord medicine, 2002; 25 (4): 335-8.
- DUMONT RJ., OKONKWO DO., VERMA S.; HURLBERT RJ., BOULOS PT., ELLEGALA DB., DUMONT AS. **Acute Spinal Cord Injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms** Clinical Neuropharmacology, 2001; 24 (5): 254-264.
- ERBEL F., BREHM KH., BRUGGENCATE G. **Recording of spinal reflexes evoked by dorsal root stimulation in unanesthetized free moving cats** Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1970. 316 (2): 208-212.
- ESTEVES AM., MELLO MT., SQUARCINI CFR., LANCELLOTTI CLP., TUFIK S. **Sleep patterns over 15-day period in rats with spinal cord injury.** Spinal Cord, 2007; 45: 360-366.
- ESTEVES AM., MELLO MT., LANCELLOTTI CLP., NATAL CL., TUFIK S. **Ocurrence of limb movement during sleep in rats with spinal cord injury.** Brain Reserch, 2004; 1017: 32-38.
- FERREIRA LM, HOCHMAN B, BARBOSA MVJ. **Modelos experimentais em pesquisa.** Acta Cir Bras., 2005; 20 Suppl. 2:28-34.

- FLOR H. **Cortical reorganization and chronic pain: implications for rehabilitation.** Journal of Rehabilitation Medicine, 2003; 35; (5), Supplement 41, 66–72.
- FLORENCE, S.L., TAUB, H.B., KAAS, J.H., 1998. **Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys.** Science 282, 1117–1121.
- FRANK MG AND BENINGTON JH. **The role of sleep in memory consolidation and brain plasticity: Dream or reality?** The Neuroscientist, 2006; 12: 477-488.
- FONOFF ET., SILVA CPC., BALLESTER G., TIMO-IARIA C. **Electro-oscillographic correlation between dorsal raphe nucleus, neocortex and hippocampus during wakefulness before and after serotonergic inactivation.** Brazilian Journal of Medical and Biological research, 1999; 32: 469-472.
- FOUAD K., PEDERSEN V., SCHWAB ME. BRÖSAMLE C. **Cervical sprouting of corticospinal fibers after thoracic spinal cord injury accompanies shifts in evoked motor responses.** Current Biology, 2001; 11 (22): 1766-1770.
- GARCIA-GARCIA F., PONCE S., BROWN R., CUSSEN V., KRUEGER JM. **Sleep disturbance in the rotenone animal model of Parkinson disease.** Brain Research, 2005; 1042:160-168.
- GASSEL MM., GHEKARDUCCI B., MARCHIAFAVA PL., POMPEIANO O. **Phasic changes in blood pressure and heart rate during the rapid eye movement episodes of desynchronized sleep in unrestrained cats.** Arch Ital. Biol., 1964; 102: 530-544.
- GASSEL MM., MARCHIAFAVA PL., POMPEIANO O. **An analysis of the supraspinal influences acting on motoneurons during sleep in the unrestrained cat.** Arch Ital. Biol., 1965; 103: 25-44.
- GERKE MB., DUGGAN AW., XU L., SIDDALL PJ. **Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury.** Neuroscience, 2003; 117 (3): 715-722.
- GIUDITTA A; AMBROSINI MV; MONTAGNESE P; MANDILE P; COTUGNO M; GRASSI ZUCCONI G; VESCIA S. **The sequential hypothesis of the function of sleep.** Behav Brain Res, 1995; 69 (1-2): 157-66.
- GOTTESMAN C. **Detection of seven sleep-waking stages in the rat.** Neurosci Biobehav Rev, 1992; 16: 31-38.
- GREVE JMD. **Reabilitação na lesão da medula espinhal.** Rev Med 1999; 78:276-286.

- GWAK Y., CROWN E., UNABIA G., HULSEBOSCH C. **Propentofylline attenuates allodynia, glial activation and modulates GABAergic tone after spinal cord injury in the rat.** *Pain*, 2008; 138 (2): 410-422.
- GWAK YS., HAINS BC., JOHNSON KM., HULSEBOSCH CE. **Effect of Age at Time of Spinal Cord Injury on Behavioral Outcomes in Rat.** *Journal of Neurotrauma*, 2004; 21 (8): 983-993
- HARTMANN M., PFISTER R., PFADENHAUER K.-**Restless legs syndrome associated with spinal cord lesions.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999; 66: 688a-689a.
- HERBERT D, TRAN Y., CRAIG A., BOORD P., MIDDLETON J., SIDDALL P. **Altered brain wave activity in persons with chronic spinal cord injury** *International Journal of Neuroscience*, 2007; 117 (12): 1731–1746.
- HOCHMAN B, FERREIRA LM, VILAS BÔAS FC, MARIANO M. **Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery.** *Acta Cir Bras.*, 2004; 29: 19.
- HOCHMAN S. **Depression of spinal sensory transmission during REM sleep: dopaminergic involvement and insights into restless legs syndrome. Focus on “state-dependent changes in glutamate, glycine, GABA, and dopamine levels in cat lumbar spinal cord”.** *J Neurophysiol*, 2008; 100: 519-550.
- HUBSCHER CH., JOHNSON RD. **Chronic spinal cord injury induced changes in the responses of thalamic neurons.** *Experimental Neurology*, 2006; 197 (1): 177-188.
- HOULE JD., TESSLER A. **Repair of chronic spinal cord injury.** *Experimental neurology*, 2003; 182 (2): 247-60.
- HULSEBOSCH CE. **Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury** *Advan. Physiol. Edu*, 2002; 26: 238-255.
- HULSEBOSCH CE. **Gliopathy ensures persistent inflammation and chronic pain after spinal cord injury.** *Experimental Neurology*, 2008; 214 (1): 6-9.
- IWASAKI N., KARASHIMA A., TAMAKAWA Y., KATAYAMA N., NAKAO M. **Sleep EEG dynamics in rat barrel cortex associated with sensory deprivation.** *Neuroreport*, 2005; 15 (17): 2681-4.
- JANKEL WR, NIEDERMAYER E. **Sleep spindles.** *J. Clin. Neurophysiol.*, 1985; 2: 1-36.

- JOUVET M. **A study of the neurophysiological mechanisms of dreaming.** Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 1963; 133 (24).
- JOUVET M. **The states of sleep.** Scientific American, 1967; 216 (2) : 62-68.
- KARASHIMA A., NAKAO M., HONDA K., IWASAKI N., KATAYAMA N., YAMAMOTO M. **Theta wave amplitude and frequency are differentially correlated with pontine waves and rapid eye movements during REM sleep in rats.** Neuroscience research, 2004; 50 (3): 283-9.
- KARASHIMA A., KATAYAMA N., NAKAO M. **Phase-locking of spontaneous and tone-elicited pontine waves to hippocampal theta waves during REM sleep in rats.** Brain research, 2007; 1182: 73-81.
- KEITA MS., FRANKEL-KOHN L., BERTRAND N., LECANU L., MONMAUR P. **Acetylcholine release in the hippocampus of the urethane anaesthetized rat positively correlates with both peak theta frequency and relative power in the theta band.** Brain, 2000; 887: 323-334.
- KIM BG., DAI H., MCATEE M., VICINI S., BREGMAN BS. **Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury.** Experimental Neurology, 2006; 198: 401-415.
- KIM BG., DAI HN., MCATEE M., BREGMAN BS. **Modulation of dendritic spine remodeling in the motor cortex following spinal cord injury: effects of environmental enrichment and combinatorial treatment with transplants and neurotrophin-3.** J Comp Neurol, 2008; 508 (3): 473-86.
- KOCSIS B., LI S., HAJOS M. **Behavior-Dependent modulation of hippocampal EEG activity by the selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine in rats.** Hippocampus 2007; 17: 627-633.
- KOHYAMA J., SHIMOHIRA M., IWAKAWA Y. **Brainstem control of phasic muscle activity during REM sleep: a review and hypothesis.** Brain & Development, 1994; 16: 81-91.
- KOHYAMA J. **REM sleep atonia: from basic background to clinical application.** J Med Dent Sci, 2001; 48 (2): 29-39.
- LEE MS., CHOI YC., LEE SH., LEE SB. **Sleep-related periodic leg movements associated with spinal cord lesions.** Movement Disorders, 2004; 11 (6): 719-722.
- LENDVAI B, STERN EA, CHEN B, SVOBODA K. 2000. **Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo.** Nature 404:876–881.
- LENZ FA., KWAN HC., MARTIN R., TASKER R., RICHARDSON RT., DOSTROVSKY JO. **Characteristics of somatotopic organization and**

spontaneous neuronal activity in the region of the thalamic principal sensory nucleus in patients with spinal cord transaction. Neurophysiol, 1994; 72: 1570-1587.

LENZ FA., LEE JI., GARONZIK IM., ROWLAND LH., DOUGHERTY PM., HUA SE. **Plasticity of pain-related neuronal activity in the human thalamus.** Prog Brain Res, 2000; 129: 259-73.

LINDIVALL O., BJORKLUND A., SKAGERBERG G. **Dopamine-containing neurons in the spinal cord: anatomy and some functional aspects.** Ann. Neurol, 1983; 14: 255-260.

LUIJTELAAR EL., MILLER CA., COENEN AM., DRINKENBURG WH., ELLENBROEK BA. **Differential effects of non-REM and REM sleep on sensory gating in rats.** Acta neurobiologiae experimentalis. 1998; 58 (4): 263-70.

MÁRQUEZ-RUIZ J.; ESCUDERO M. **Tonic and phasic phenomena underlying eye movements during sleep in the cat.** J Physiol.,2008;586:3461-3477.

MOLINA AI, CRISTANTE AF., BARROS FILHO TEP. **Análise comparativa da avaliação funcional realizada na lesão medular em animais.** Acta Ortop. Bras. 2004; 12 (1): 48-56.

MONTGOMERY SM., SIROTA A., BUZSÁKI G. **Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and REM sleep.** Journal of Neuroscience, 2008; 28: 6731–6741.

NARAZAKI DK., BARROS FILHO TEP., OLIVEIRA CRGCM., CRISTANTE AF. **Regeneração Medular: A Ação do Neurotrophin-3 sobre a Lesão Medular de Ratos.** Anais do IX Congresso da Sociedade Brasileira de Coluna, 2003; 65-65.

ONDREJCAK T., VANICKY I., GÁLIK J., SAGANOVÁ K. **Chronically implanted electrodes for repeated stimulation and recording of spinal cord potentials.** Journal of Neuroscience Methods, 2005; 141: 125-134.

PROFYRIS C, CHEEMA SS, ZANG D, AZARI MF, BOYLE K, PETRATOS S. **Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury.** Neurobiol Dis, 2004;15 (3):415-36.

SANCHEZ M.; BONDAN EF., LALLO MA., SINHORINI IL., DAGLI MLZ., MAIORKA PC., PEREIRA LAVD., GRAÇA DL. **Marcação imuno-histoquímica da resposta macrofágica e astrocitária no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do**

- brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida.** Arq. neuropsiquiatr, 2006; 64(3b): 787-793.
- SANTOS LM., DZIRASA K., KUBO R., SILVA MTA., RIBEIRO S., SAMESHIMA K., VALLE AC., TIMO-IARIA C. **Baseline hippocampal theta oscillation speeds correlate with rate of operant task acquisition.** Behavioural Brain Research, 2008; 190: 152–155.
- RAINETEAU O., FOUAD K., BAREYRE FM., SCHWAB ME. **Reorganization of descending motor tracts in the rat spinal cord.** European Journal of Neuroscience, 2002; 16 (9): 1761–1771.
- RECHTSCHAFFEN A., KALES A. **A manual of standardized terminology, techniques, and scoring system for sleep stages of human subjects.** Washington D.C.: Public Health Service, U.S. Government Printing Service (Eds.) (1968).
- RODRIGUES NR. **Padronização da lesão na medula espinhal em ratos Wistar** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 1999.
- ROSENBERG RS., BERGMANN BM., RECHTSCHAFFEN A. **Variations in slow wave activity during sleep in the rat.** Physiology & Behavior. 1976; 17 (6): 931-938
- ROSSIGNOL S., SCHWAB M., SCHWARTZ M., FEHLINGS MG. **Spinal Cord Injury: Time to Move?** The Journal of Neuroscience, 2007; 27 (44): 11782-11792.
- SANCHEZ M., BONDAN EF., LALLO MA, SINHORINI IL., DAGLI MLZ., MAIORKA PC., PEREIRA LAVD., GRAÇA DL. **Marcação imuno-histoquímica da resposta macrofágica e astrocitária no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida.** Arq Neuropsiquiatria 2006; 64 (3-B): 787-793.
- SCHEER FAJL., ZEITZER JM., AYAS NT., CZEISLER CA., SHEA SA. **Reduced sleep efficiency in cervical spinal cord injury; association with abolished night time melatonin secretion.** Spinal Cord, 2006; 44: 78-81.
- SCHEFF SW., SAUCIER DA., CAIN ME. **A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score.** J Neurotrauma, 2002; 19(10): 1251-60.
- ŠEDÝ J., URDZÍKOVÁ L., JENDELOVÁ P., SYKOVÁ E. **Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2008; 32 (3): 550-580.

- SEI H; MORITA Y. **Acceleration of EEG theta wave precedes the phasic surge of arterial pressure during REM sleep in the rat.** *Neuroreport*, 1996; 7 (18): 3059-62.
- SIMÕES CA.; VALLE.; TIMO-IARIA C. **Correlation between concomitant theta waves in nucleus reticularis pontis oralis and in hippocampus, thalamus and neocortex during dreaming rats.** *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, 1996; 29: 1645-1650.
- SMITH MT., HAYTHORNTHWAITE JA. **How do sleep disturbance and chronic pain inter-relate? Insights from the longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature.** *Sleep Medicine Review*, 2004; 8 (2): 119-32.
- SMITH PM., JEFFERY ND. **Spinal shock — comparative aspects and clinical relevance.** *Journal of Veterinary International Medicine*, 2005; 19: 788–793.
- STERIADE M. **Basic mechanism of sleep generation.** *Neurology*, 1992; 42 (7): 9-17.
- STERMAN, M.B. **Sensorimotor EEG operant conditioning and experimental and clinical effects.** *Journal of Biological Science*, 1977; 12(2), 65-92.
- TAEPAVARAPRUK N, TAEPAVARAPRUK P, JOHN J. **Statedependent release of glycine in Clarke's column of the upper lumbar spinal cord.** *Sleep*, 2003; 26: A11-A12.
- TEBET MA., BARROS FILHO TEP., MACHADO IR., CARVALHO MOP., HANAN FR., DACI K. **Effect of methylprednisolone in medullar injury in rats: a functional and histological analysis.** *Acta Ortop Bras.*, 2003; 11 (2): 80-87.
- THE WHOQOL GROUP. **The World Health Organization quality of life assessment (WHOQOL): development and general psychometric properties.** *Soc Sci Méd* 1998; 46 (12): 1569- 85.
- TIMO-IARIA C., NEGRÃO N., SCHMIDEK WR., HOSHINO K., DE MENEZES CEL., ROCHA TL. **Phases and states of sleep in the rat.** *Physiology and Behavior*, 1970; 5: 1057-1062.
- TIMO-IARIA, C. **Frequency and voltage of theta waves in the hippocampus.** In: *Reunião Anual FESBE*, 1985, Caxambu MG. *Resumos Fesbe*. São Paulo : FESBE, 1985.
- TIMO-IARIA, C. **Ajustes hemodinâmicos provocados pela estimulação algesiogenica em gatos.** In: *XX CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA*, 1985.
- TIMO-IARIA, C., SAMESHIMA, K. ; FRAGA, J. L. . **Stationarity and gaussianity in rat electrocorticogram during wakefulness and desynchronized sleep.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1990; 23: 1061-1064.

- TIMO-IARIA C., YAMASHITA, R.; HOSHINO, K.; MELO AS. **Rostrum movements in desynchronized sleep as a prevalent manifestation of dreaming activity in Wistar rats.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1990; 23: 617-620.
- TIMO-IARIA, C. **Evolução histórica da experimentação animal em Medicina.** In: Irary Novah Moraes; Joamel B. Mello; Pedro Nahas. (Org.). Residente de Cirurgia. 1 ed. São Paulo: Ateneu, 1992, 64-71.
- TIMO-IARIA, C. **Early research on dreaming.** World Federation of The Sleep Research Societies Bulletin, 1997, Estados Unidos, v. 5, p. 20-21, 1997.
- TIMO-IARIA, C., PELLARIN, L. ; VALLE, A. C. **Prevalência de diferentes padrões oníricos no rato.** In: Reunião Anual FESBE, 1997, Caxambu MG. Resumos FESBE. São Paulo : FESBE, 1997.
- 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.
- UNALAN H. **Quality of life of primary caregivers of spinal cord injury survivors living in the community: controlled study with short form-36 questionnaire.** Spinal Cord 2001;39:318-322.
- VALL J., BRAGA VAB., ALMEIDA PC. **Estudo da qualidade de vida em pessoas com lesão medular traumática.** Arq Neuropsiquiatr., 2006; 64(2-B):451-455.
- VALLE AC. **Estudo comparativo de algumas manifestações equivalentes do alerta e do sono dessincronizado no rato.** 1992. [Tese] Universidade Federal de São Paulo/EPM, São Paulo, 1992.
- VALLE AC. **Análise eletrofisiológica do hipocampo durante o sono dessincronizado do rato.** 1995. [Dissertação] Universidade Federal de São Paulo/EPM, São Paulo, 1995.
- VALLE AC., TIMO-IARIA, C.; SAMESHIMA, K.; YAMASHITA, R. **Theta waves and behavioral manifestation of alertness and dreaming activity in the rat.** Brazilian. Journal of Medical and Biological Research, 1992; 25: 745-750.
- VELAYOS JL., MOLERES FJ., IRUJO AM., PATERNAIN B. **Anatomical basis of sleep.** An. Sist. Navar 2007; 30 (Supl.1): 7-17.
- VERTES RP. **An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization.** Journal of Neurophysiology, 1981; 46: 1140-1159.
- VERTES RP. **Brainstem control of the events of REM sleep.** Progress in Neurobiology, 1984; 22: 241-288.

- VERTES RP. **A life-sustaining function for REM sleep: A theory.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1986; 10: 371-376.
- VERTES RP. **Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat.** Neuroscience, 1988; 24: 907-935.
- VERTES RP. **Memory consolidation in REM sleep: Dream on.** Sleep Research Society Bulletin, 1995; 1: 27-32.
- VIALLE LRG., FISCHER 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.** Revista Brasileira de Ortopedia, 2002; 37(3): 83-88.
- YOUNG W. **Spinal cord contusion models.** Progressive Brain Research, 2002; 137:231-55.
- WALKER MP., STICKGOLD R. **Sleep-dependent learning and memory consolidation.** Neuron, 2004; 44: 121-133.
- WARE JE JÚNIOR. **SF-36® health survey manual.** Boston, Massachusetts, 1993.
- WENG HR., LEE JI., LENZ FA., SCHWARTZ A., VIERCK C., ROWLAND L., DOUGHERTY PM. **Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord.** Neuroscience, 2000; 101 (2): 393-401.
- ZAI LJ., WRATHALL JR. **Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury.** Glia, 2005; 50: 247-257.