

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA**

**LEONIDAS GOMES ANGELIN**

**Estimulação elétrica medular para recuperação motora de ratos  
com lesão medular**

**São Paulo  
2023**

LEONIDAS GOMES ANGELIN

**Estimulação elétrica medular para recuperação motora de ratos  
com lesão medular**

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

Programa de Pós-graduação em  
Psiquiatria  
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Alves  
Lepski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original  
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Angelin, Leonidas Gomes  
Estimulação elétrica medular para recuperação  
motora de ratos com lesão medular / Leonidas Gomes  
Angelin. -- São Paulo, 2023.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Psiquiatria.  
Orientador: Guilherme Alves Lepski.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal  
2.Recuperação motora 3.Estimulação epidural  
4.Plasticidade neuronal

USP/FM/DBD-279/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, José M. B. Angelin (In  
memoriam) e Neusa G. R. Angelin, cujo apoio e  
incentivo inabaláveis estiveram presentes em todos  
os momentos da minha vida.  
Ao meu querido e amado irmão, Giovane G. Angelin,  
por ser minha fonte inesgotável de alegria e meu  
maior e mais fiel amigo.  
Eu amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

À minha querida e amada mãe, Neusa Angelin, mulher de opinião forte e determinação inabalável, sendo um verdadeiro exemplo em sua conduta.

Ao meu estimado irmão, Giovane Angelin, expresso minha sincera gratidão pela sua prontidão em oferecer ajuda e por ser uma constante fonte de ânimo durante os momentos mais delicados.

Ao meu querido amigo, orientador e mentor, Prof. Dr. Guilherme Lepski, um grande exemplo de sua classe médica. Sua inteligência notável e excepcional capacidade intelectual são fontes de inspiração constantes para mim, agradeço imensamente por ter sido meu guia durante esta importante fase da minha vida.

Agradeço imensamente à Dra. Chary Ely por compartilhar comigo preceitos de suma relevância envolvidos nesta obra, proporcionando-me um aprendizado valioso.

Minha profunda gratidão à professora Dra. Analía Arevalo, uma crítica científica brilhante e dedicada, por todo o suporte e os valiosos ensinamentos que me proporcionou sobre o campo das neurociências

Expresso minha sincera gratidão à Isabel Ataile por sua profissionalidade exemplar e enorme disponibilidade em ajudar-me com todas as dificuldades encontradas no âmbito normativo do programa de pós-graduação.

Profunda gratidão à Eliza Fukushima por toda a atenção e o cuidado dedicados a mim no âmbito institucional ao longo desta importante fase da minha vida.

À minha querida Zelinda Garcia, mulher verdadeiramente maravilhosa, capaz de iluminar um dia inteiro com sua alegria contagiante e risada encantadora, expresso minha profunda gratidão por sua presença incansável e pela confiança inabalável que depositou em meu sucesso profissional.

À minha estimada amiga, Junko Osaka, expresso minha profunda gratidão por todos os conselhos e pela ajuda inestimável. Sua orientação e seu apoio foram fundamentais para o meu progresso e sucesso acadêmico.

Ao meu querido amigo, Claudio Vidotti, expresso minha sincera gratidão por todas as risadas compartilhadas ao longo dos dias e pelas inúmeras conversas enriquecedoras.

Ao ilustre Prof. Dr. José Pinhata Otoch expresso minha profunda gratidão por ter aberto as portas da Técnica Cirúrgica (FMUSP) de forma irrestrita, além de me auxiliar nas dificuldades institucionais e experimentais com as quais me deparei ao longo desta jornada.

Ao distinto Prof. Dr. Marcelo Paez Carrenõ (Poli-USP) expresso minha profunda gratidão por ter aberto as portas do seu laboratório de forma irrestrita. Sua confiança em meu potencial e seu valioso auxílio acadêmico foram essenciais durante esta significativa fase da minha vida. Sua orientação e suporte foram fundamentais para o sucesso deste trabalho de pesquisa.

Ao excepcional engenheiro Alexandre Lopes (Poli-USP) minha sincera gratidão por seu auxílio em decisões de extrema importância relacionadas ao aprimoramento do dispositivo apresentado neste trabalho. Sua expertise e orientação foram fundamentais para garantir a qualidade e eficiência do projeto.

À senhora Renaide Gacek, muito obrigado por todo o suporte e pela prontidão em me ajudar, especialmente durante o desafiador ano de pandemia.

Ao Prof. Dr. Fabio Goulart de Andrade (Universidade Estadual de Londrina), amigo e primeiro mentor, por todo auxílio acadêmico que foram cruciais para meu sucesso, muito obrigado.

Ao ilustre Prof. Dr. Eduardo Rafael da Veiga Neto (Universidade Estadual de Londrina), um neuroanatomista notável, expresso minha sincera gratidão por despertar em mim uma paixão profunda pela neuroanatomia e áreas correlatas

Ao dedicado Prof. Dr. Luciano Tavares (Universidade Estadual de Londrina), neurofisiologista incrível, gostaria de expressar minha gratidão por todas nossas conversas, discussões científicas e não científicas.

Por fim, mas igualmente importante, expresso minha profunda gratidão a todos aqueles que estiveram presentes de alguma forma durante a elaboração desta obra. Sem dúvida alguma, vocês foram essenciais para o meu sucesso e sou imensamente grato por todo o apoio e pelas contribuições que ofereceram.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

*“POR QUE VOCÊ QUER TANTO ISSO? PORQUE ME  
DISSERAM QUE EU NÃO CONSEGUIRIA”*

HOMENS DE HONRA – GEORGE TILLMAN JR

## RESUMO

Angelin LG. Estimulação elétrica medular para recuperação motora de ratos com lesão medular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** A lesão medular traumática é uma das principais causas de incapacidade motora, e atualmente não existem tratamentos totalmente eficazes para essa condição. No entanto, estudos baseados em estimulação elétrica epidural medular têm apresentado avanços importantes para a reabilitação motora, mesmo na fase crônica da doença. **Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo principal a investigação da eficácia da estimulação elétrica epidural medular na recuperação da motricidade em ratos com lesão medular e, secundariamente, esclarecer os mecanismos por trás de possível melhora. **Métodos:** (1) Aprimoramos o modelo de lesão medular por impacto controlado no sentido de causar danos graves e permanentes ao longo de 2 meses. (2) Desenvolvemos e testamos um dispositivo implantável de estimulação medular epidural para ratos, incluindo eletrodo e gerador implantável. (3) Avaliamos a eficácia da estimulação elétrica epidural. Para isso, utilizamos 60 ratos Wistar, divididos nos seguintes grupos: i) lesão grave com estimulação elétrica epidural (n=15), ii) lesão grave isolada (n=15), iii) implante isolado sem bateria (sham, n=15), iv) controle, sem manipulação cirúrgica. Todos os animais foram submetidos a avaliações semanais através do índice BBB, teste de plano inclinado e teste de OpenField, iniciando-se uma semana antes da lesão e continuando por um período de oito semanas. Após esse período, os animais foram sacrificados, suas medulas espinhais foram explantadas e preparadas para análise histológica (hematoxilina-eosina) e imunohistoquímica para NeuN, beta-III-tubulina e sinaptofisina. Finalmente, núcleos neuronais NeuN+ foram quantificados por estereologia, e intensidade de fluorescência para beta-tubulina e sinaptofisina foi aferida em microscopia de epi-fluorescência. **Resultados:** O grupo estimulado apresentou melhora significativa no índice BBB em relação ao sham ( $5,2 \pm 1,9$ , vs.  $4 \pm 1,9$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). A análise estereológica demonstrou uma contagem média de células neurais significativamente maior no grupo stim em relação a sham ( $1783 \pm 2$  vs.  $897 \pm 3$ ,  $p < 0,001$ ). A análise de intensidade de fluorescência revelou sinal de sinaptofisina significativamente mais intenso no grupo stim em relação a sham ( $1294 \pm 46$ , U.a. unidade arbitraria vs.  $1198 \pm 23$ , U.a  $p < 0,01$ ). Nossos dados sugerem um potencial regenerativo e protetivo secundário da estimulação elétrica epidural em ratos submetidos ao modelo de lesão medular traumática por impacto.

**Palavras-chave:** Traumatismos da medula espinhal, recuperação motora, estimulação epidural, plasticidade neuronal.



## ABSTRACT

Angelin LG. Spinal cord electrical stimulation for motor recovery in rats with spinal cord injury [thesis]. São Paulo: "School of Medicine, University of São Paulo"; 2023.

**Introduction:** Traumatic spinal cord injury is a major cause of disability, and currently, there are no fully effective treatments for this condition. However, studies based on epidural electrical stimulation have shown significant advances in motor rehabilitation, even in chronic phases of the disease. **Objective:** The present study aims at investigating the effectiveness of epidural electric stimulation in the motor recovery of rats with spinal cord injury, and secondarily, aims at clarifying the mechanisms beyond a possible recovery. **Methods:** (1) We improved the impact spinal cord injury model in order to cause severe and permanent motor deficits lasting 2 months. (2) We developed and tested an implantable epidural spinal cord stimulator device for rats, which included electrode and implantable generator. (3) We evaluated the efficacy of epidural electrical stimulation on motor recovery after spinal cord injury in Wistar rats. To this end, 60 animals were divided into the following groups: i) severe injury with epidural electrical stimulation (n=15), ii) severe injury without stimulation (n=15), iii) sham implantation without battery (n=15), iv) control group, without surgical intervention. All animals underwent weekly evaluations using the BBB index, inclined plane and OpenField test, starting one week before lesion, and continuing for eight weeks. After this period, the animals were sacrificed, their spinal cords were explanted and prepared for histological analysis (hematoxylin-eosin), and immunohistochemistry for NeuN, beta-III-tubulin and synaptophysin. Finally, NeuN-positive neuronal nuclei were quantified through stereology, and fluorescence signal intensity for beta-tubulin and synaptophysin was measured in epifluorescence microscope. **Results:** the stimulated group showed significant improvement in the BBB index in relation to the sham group (5.2 ± 1.9 vs. 4 ± 1.9, p<0.05, respectively). Stereological analysis showed a significantly higher average count of neural cells in the stim group in relation to sham (1783 ± 2 vs. 897 ± 3, p<0.001). Additionally, fluorescence signal intensity for synaptophysin was significantly higher in the stim group in relation to sham (1294 ± 46. A.u, arbitrary unit vs. 1198 ± 23, A.u, p<0,01). Our data suggest a potential regenerative and protective effect of epidural electrical stimulation in rats subjected to impact-induced traumatic spinal cord injury.

**Keywords:** Spinal cord injury, motor recovery, epidural electric stimulation, neuroplasticity

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Índice BBB.....	47
Figura 2 - Peso corpóreo .....	49
Figura 3 - Função vesical.....	50
Figura 4 - Plano inclinado .....	51
Figura 5 - Distância percorrida.....	52
Figura 6 - Apoio bípede .....	53
Figura 7 - Processamento histológico.....	54
Figura 8 - Processamento Histológico .....	55
Figura 9 - Esquema básico do circuito.....	56
Figura 10 - Teste bancada.....	58
Figura 11 - Dimensões dos componentes.....	59
Figura 12 - Fotolitografia da placa principal .....	60
Figura 13 - Confeção da placa principal.....	61
Figura 14 - Evolução de Peso.....	62
Figura 15 - Índice BBB.....	63
Figura 16 - Procedimento de implante .....	64
Figura 17 - Distância percorrida.....	65
Figura 18 - Velocidade máxima .....	66
Figura 19 - Circuito elétrico integrado .....	67
Figura 20 – Diagrama de blocos do microcontrolador.....	68
Figura 21 - Comparação de versões do estimulador .....	68
Figura 22 – Representação da tensão de funcionamento do chip .....	69
Figura 23 - Tabela de registradores e modos de economia de energia .....	70
Figura 24 - Relação consumo de energia, frequência e modos de economia .....	70
Figura 25 - Otimização de isolamento elétrico .....	71
Figura 26 – Avaliação de recuperação motora BBB .....	72
Figura 27 - Evolução de peso corpóreo .....	73
Figura 28 - Avaliação de plano inclinado .....	74
Figura 29 - Distância percorrida.....	75
Figura 30 - Velocidade média de deslocamento .....	76
Figura 31 - Análise morfológica neural .....	77

Figura 32 - Quantificação estereológica .....	78
Figura 33 - Intensidade de imunofluorescência - Sinaptofisina.....	79
Figura 34 - Intensidade de imunofluorescência - $\beta$ -tubulina.....	80
Figura 35 - Intensidade de imunofluorescência - Sinaptofisina.....	80
Figura 36 - Intensidade de imunofluorescência - $\beta$ -tubulina.....	81

## Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Estimulação epidural medular.....	22
2 OBJETIVOS .....	26
2.1 Gerais .....	26
2.2 Específicos .....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Caracterização do modelo de lesão medular.....	27
3.1.1 Impactor .....	27
3.1.2 Animais e grupos experimentais.....	27
3.1.3 Procedimento de lesão medular .....	28
3.1.4 Avaliações pré e pós cirúrgicos .....	28
3.1.5 Sacrifício.....	29
3.1.6 Imuno-histoquímica .....	29
3.1.7 Análise estatística .....	30
3.2 Desenvolvimento do estimulador implantável.....	32
3.2.1 Determinação dos parâmetros de estimulação .....	32
3.2.2 Determinação do microcontrolador.....	32
3.2.3 Determinação dos componentes eletrônicos.....	32
3.2.4 Desenvolvimento do código-fonte .....	33
3.2.5 Simulação virtual de viabilidade do circuito .....	34
3.2.6 Simulação do <i>layout</i> do circuito e implante.....	34
3.2.7 Determinação dos materiais da placa base.....	35
3.2.8 Construção do protótipo .....	35
3.2.9 Teste de funcionabilidade do protótipo .....	37
3.2.10 Teste de viabilidade do sistema de alimentação do circuito .....	37

3.2.11	Determinação dos materiais de isolamento elétrico .....	38
3.2.12	Teste de isolamento elétrico <i>in vitro</i> .....	38
3.2.13	Teste de viabilidade biológica do sistema <i>in Vivo</i> .....	39
3.2.14	Avaliações pré e pós cirúrgicos .....	40
3.2.15	Metodologia de sacrifício .....	40
3.2.16	Avaliações Post-Mortem .....	40
3.2.17	Determinação estatística .....	41
3.3	Avaliação de eficácia da eletroestimulação epidural medular .....	42
3.3.1	Determinação dos grupos de animais .....	42
3.3.2	Procedimento de lesão medular .....	42
3.3.3	Avaliação funcional .....	43
3.3.4	Implante do estimulador medular .....	43
3.3.5	Avaliações pré e pós cirúrgicos .....	44
3.3.6	Metodologia de sacrifício .....	44
3.3.7	Avaliações Post-mortem .....	45
3.3.8	Análise estereológica .....	45
3.3.9	Análise de intensidade de imunofluorescência .....	46
3.3.10	Determinação estatística .....	46
4	RESULTADOS .....	47
4.1	Estudo de padronização da lesão .....	47
4.1.1	Resultados comportamentais .....	47
4.1.2	Resultados histológicos .....	54
4.2	Desenvolvimento do estimulador implantável .....	57
4.2.1	Desenvolvimento do estimulador em ambiente virtual .....	57
4.2.2	Desenvolvimento do estimulador em bancada .....	58
4.2.3	Testes de segurança <i>In Vivo</i> .....	63
4.2.4	Análise comportamental .....	64

4.2.5 Melhorias implementadas.....	67
4.3 Teste de eficiência da eletroestimulação epidural no modelo de lesão medular.....	73
4.3.1 Análises comportamentais .....	73
4.3.2 Análise morfológica e estereológica por imunohistoquímica de fluorescência .....	77
4.3.3 Análise de intensidade de imunofluorescência.....	79
5 DISCUSSÃO .....	83
5.1 Sobre o modelo animal.....	83
5.2 Sobre o dispositivo de estimulação implantável.....	88
5.3 Sobre a estimulação epidural na lesão medular .....	89
5.4 Estimulação medular para recuperação motora em humanos.....	94
6 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
7 ANEXO .....	113

## INTRODUÇÃO

A lesão medular é um problema de saúde global que não faz distinção entre gênero, aspectos sociais ou poder aquisitivo, sendo uma condição devastadora para o ambiente familiar e social. Estima-se que, a cada ano, ocorram cerca de 13 novos casos de lesão medular a cada cem mil pessoas em todo o mundo, resultando em uma prevalência aproximada de 368 casos por 100.000 habitantes (Furlan et al., 2013; Singh et al., 2014; Injury and Spinal Cord Injury 2019; Jazayeri et al., 2023). No Brasil, registram-se cerca de 9 novos casos de lesão medular por 100.000 habitantes por ano, o que resulta em uma prevalência de 235 casos a cada 100.000 habitantes, correspondendo a 507 mil pacientes sobreviventes do TRM no Brasil e 27 milhões no mundo (Furlan, Sakakibara et al., 2013; Singh, Tetreault et al., 2014; Injury and Spinal Cord Injury 2019; Jazayeri, Maroufi et al., 2023). Em termos etiológicos, no nosso meio destacam-se acidentes automobilísticos (40%), quedas (27%), e violência urbana por arma de fogo (20%) (Faleiros et al., 2023).

Somados a isso, dados da literatura demonstram que 78% das lesões medulares são classificadas como parciais ou incompletas (Faleiros, Marcossi et al., 2023), ou seja, quando há preservação ao menos parcial de função motora, sensitiva ou vegetativa abaixo da lesão. Lesões medulares traumáticas são também classificadas clinicamente em função de sua gravidade, conforme a classificação de Frankel, o ASIA (*American Spinal Injury Association*), sendo essa a escala de avaliação mais amplamente empregada, dividida em cinco níveis básicos (Frankel et al., 1969):

- **ASIA A** - Lesão completa da medula espinhal devido à ausência total das funções sensoriais e/ou motoras nos segmentos da medula sacral (S4-S5).
- **ASIA B** – Lesão incompleta, com função motora ausente, mas com função sensorial preservada abaixo do nível de lesão.
- **ASIA C** - Lesão incompleta, com função motora abaixo do nível de lesão preservada, com maioria da musculatura apresentando certa força muscular, embora essa força seja incapaz de vencer a gravidade.
- **ASIA D** – Lesão incompleta, com função motora preservada abaixo do nível neurológico, com força muscular em mais da metade dos músculos, sendo suficiente para vencer a gravidade
- **ASIA E** – Todas funções motoras e sensitivas normais

Além disso, em termos de mecanismos fisiopatológicos, as lesões medulares traumáticas podem ser classificadas em deslocação, distração e contusão.

A lesão medular por deslocação é observada quando um mecanismo físico externo e com grande força atinge uma das vértebras da coluna vertebral, fazendo com que essa deslize para frente ou para trás em referência à vértebra superior ou inferior, fazendo com que o espaço intervertebral seja reduzido e, conseqüentemente, ocorra uma compressão do tecido medular encontrado no interior do canal medular. Nesse tipo de lesão não é comum observar danos à continuidade do tecido medular macroscópico. Contudo, os resultados dessa ação geralmente são perda da atividade motora, sensitiva e/ou autônoma, abaixo do nível lesado.

A distração é um evento geralmente observado como resultado do efeito chicote do pescoço e se caracteriza pelo estiramento radial da medula espinhal, o qual, promove o afastamento das vértebras da coluna, causando um estresse na medula espinhal e lesionando seus componentes internos. Geralmente esse tipo de evento apresenta a característica de rompimento da continuidade do órgão, causando déficits motor, sensitivo e/ou autônoma, a depender da magnitude da lesão (Ditunno et al., 2004; Norenberg et al., 2004).

Por sua vez, a contusão é uma lesão que se caracteriza pelo impacto direto na medula, seja pela ação direta do agente agressor ou devido à lesão óssea causada pelo mesmo, levando a uma compressão perpendicular à medula. Geralmente esse tipo de evento não causa descontinuidade no aspecto geral do órgão (Chen et al., 2016). Já do ponto de vista cronológico, as lesões medulares traumáticas são subdivididas em duas fases: primária e secundária (tissular), sendo esta última subdividida em aguda, intermediária e crônica.

A fase primária é o período imediatamente após a lesão, caracterizado pela perda de controle motor voluntário, pela paralisia flácida e pela ausência de reflexos espinhais, juntamente com hipotensão e vasodilatação periférica, resultando no estado de choque medular. Nesse estágio, ocorre a instalação do estado hemorrágico e inflamatório, regulados por citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL- $\beta$ , que culminam em isquemia no local da lesão. Esse processo resulta em acentuada morte celular, causada pela falta de suprimento de oxigênio e de nutrientes básicos, além do traumatismo direto (Norenberg et al., 2004).



Estudos indicam que após a lesão medular, ocorre uma cascata de eventos pró-inflamatórios e infiltração celular no local lesado, criando um ambiente hostil para a reparação espontânea das células lesadas (Bazley et al., 2014; Wang et al., 2014). No entanto, esses eventos não se limitam apenas ao epicentro da lesão, mas podem se estender a outros níveis da medula espinhal, contribuindo para o surgimento de lesões secundárias (Yip and Malaspina 2012).

As lesões secundárias são caracterizadas pela instalação do microambiente hostil no sítio da lesão com conseqüente piora das funções neurológicas. A deterioração do microambiente, no que lhe concerne, é devida a processos de desmielinização, produção de radicais livres, excitotoxicidade, desregulação iônica intracelular e extracelular, morte celular, hipertrofia celular e gliose reacional (Courtine et al., 2009; Zhang et al., 2019).

Uma vez que a fase secundária é aquela na qual ocorrem os processos biológicos mais relevantes e abordáveis do ponto de vista terapêutico, grande parte dos tratamentos visa evitar a instalação desse cenário ou ao menos diminuir sua intensidade, garantindo assim as condições mínimas para que a medula se recupere dentro de suas potencialidades de regeneração (Streijger et al., 2017; Zhang et al., 2019).

A fase aguda da lesão secundária (de 2 a 48 horas após a lesão) é marcada pela continuidade da morte e desmielinização celular, liberação de espécies reativas de oxigênio, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, mediada em parte pela IL-1 $\beta$ , além de processos fagocitários. Os principais eventos dessa fase são a hipertrofia celular e a cicatrização glial, os quais são em parte responsáveis pela formação de uma barreira física que, por sua vez, dificulta a revascularização e reinervação do local lesado (Gerardo-Nava et al., 2013).

As duas últimas fases: intermediária ou subaguda (de 48 horas a 6 meses de lesão) e crônica (após 6 meses da lesão inicial), podem ser resumidas basicamente como a maturação da cicatriz glial e estabilização na evolução da lesão medular, respectivamente (Bartholdi and Schwab 1995; Witiw and Fehlings 2015). De acordo com isso, Rosenzweig et al. (2010), demonstram que, após a lesão medular, vias neurais intactas emitem prolongamentos colaterais, tentando reestabelecer a inervação lesada. Mas, devido a fatores como microambiente hostil e extensão da lesão medular, essa recuperação é limitada. De fato, diversas proteínas liberadas por

oligodendrócitos impedem o brotamento axonal e a neo-sinaptogenese, cuja primeira reportada foi denominada de proteína Nogo-A, nos de estudos de Chen et al. (2000) em modelo animal de ratos. Como fator complicador, a medula não é cede de neurogênese na fase adulta de mamíferos e os fenômenos de reorganização sináptica (plasticidade) são, até então, tidos como limitados (Meletis et al., 2008; Rodriguez et al., 2021).

Visando a proteção neural dos agentes citotóxicos observados principalmente na fase secundária do trauma, a metilprednisolona, glicocorticoide sintético, foi extensamente estudada com a finalidade de diminuir as ações da fase secundária da lesão, devido à sua atuação sobre a inibição da peroxidação lipídica, além de características anti-inflamatórias (Fehlings et al., 2014; Hurlbert 2014). No entanto, estudos prospectivos, cegos, randomizados e controlados demonstraram que os efeitos neuroprotetores do medicamento são mínimos (Bracken et al., 1984; Bracken et al., 1990; Bracken et al., 1992; Bracken et al., 1997; Pointillart et al., 2000).

Contudo, outros agentes farmacológicos têm-se mostrado promissores no que tange à diminuição dos efeitos da fase secundária da lesão como, por exemplo, a minociclina. A minociclina é um antibiótico semissintético do grupo das tetraciclina, com propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, que tem demonstrado bons resultados quanto à diminuição de fatores inflamatórios, radicais livres e de metaloproteinases no ambiente de lesão e, conseqüentemente, melhora dos aspectos clinico-neurológicos relacionados à segunda fase da lesão (Zhu et al., 2002; Plane et al., 2010; Casha et al., 2012; Chen et al., 2015):

Outras evidências apontam para o magnésio como possível agente neuroprotetor, devido à sua ação de bloqueio de receptores NMDA, reduzindo, assim, a excitotoxicidade (Berger and Soder 2015). Tator et al. (2012) demonstraram em animais com lesão medular expostos a tratamentos com magnésio maior preservação celular com diminuição da quantidade de apoptose, e, além disso, uma melhora na perfusão tecidual. Contudo, outros estudos com lesão cerebral demonstraram efeitos mínimos do magnésio (Temkin et al., 2007).

Mais recentemente, conforme estudo de Nagoshi et al. (2015), foi demonstrada neuroproteção em relação ao Riluzol<sup>®</sup>, bloqueador de glutamato usado no tratamento de esclerose lateral amiotrófica. O fármaco diminui o influxo de cálcio associado à excitotoxicidade mediada por glutamato e por esse mecanismo diminui a lesão

nervosa associada. Corroborando tais observações, outros autores observaram neuroproteção funcional, histológica e molecular em ratos com lesão medular expostos ao Riluzol<sup>®</sup> quando comparados com o grupo controle (Wu et al., 2013; Nagoshi et al., 2015; Kjell and Olson 2016).

Outra estratégia regenerativa se baseia no transplante de células-tronco com o potencial de repovoamento celular neural, por via direta (neuro-diferenciação) ou indireta (neurogênese endógena) (Webber et al., 2007; Nishimura et al., 2013). Assim, o transplante de células-tronco pode ser realizado através de 3 tipos celulares principais, células-tronco embrionárias (derivadas da camada interna do blastocisto), células-tronco neurais (fetais, ou adultas), células-tronco adultas não modificadas (mesenquimais, adiposas) ou modificadas (*IPS-induced pluripotent stem cells*) (Batista et al., 2014; Mariano et al., 2014; Mariano et al., 2015; Ruzicka et al., 2017). Uma revisão extensa com foco específico em regeneração pós-traumatismo medular foi publicada previamente por nosso grupo, na qual os autores descrevem as potencialidades desse tipo de intervenção, tais como repovoamento de células perdidas, regulação do microambiente celular, diminuição de fatores agressivos à regeneração celular. Além disso, também os tipos celulares mais promissores para esse tipo de tratamento, assim como algumas limitações envolvendo potencial distinto de regeneração celular, reparação axonal, diferenciação neuronal e bio-segurança envolvidos com cada tipo de fonte celular (Li and Lepski 2013).

Ainda com foco neuro-restaurador, Nori et al. (2011) realizaram o transplante de células-tronco humanas pluripotentes induzidas (IPS) em modelo de ratos com lesão medular e observaram que 50% das células foram diferenciadas em neurônios, o que refletiu em uma melhora motora de aproximadamente 40% nos animais tratados em relação ao controle. Com base nesses estudos, uma revisão que aborda o transplante de células pluripotentes induzidas (iPSCs) para lesões medulares, elaborada por Nagoshi and Okano 2018, enumerou uma série de investigações realizadas em modelos animais e humanos que demonstraram resultados promissores no uso do transplante de iPSCs como terapia para lesões medulares. Em se tratando de iPSCs, a preocupação central é com a biossegurança do método, haja vista que envolve transformações genéticas das células a serem transplantadas.

Com o objetivo de avaliar a influência da remielinização na recuperação funcional em um modelo de lesão medular em camundongos, Yasuda et al. (2011)

realizaram um estudo utilizando células progenitoras neurais de duas origens distintas: uma proveniente de animais normais e outra obtida de animais *knockout* com deficiência na produção de mielina. Os autores verificaram uma melhora funcional de aproximadamente 30%, após um período de 50 dias de estudo, nos animais que receberam o tratamento com as células sem a deficiência na produção de mielina, em comparação àqueles que foram transplantados com células dos animais *knockout*. Além disso, por meio de técnicas de imunofluorescência, foi observado que as células de origem neural dos animais normais foram capazes de migrar para a área da lesão, sendo diferenciadas em oligodendrócitos e auxiliaram na remielinização das fibras neurais danificadas.

Em um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia e influência da mielinização por meio de células neurais pluripotentes induzidas (iPS), em comparação com células tronco da linhagem Shiverer, realizado por Salewski et al. (2015), os resultados indicaram que os animais transplantados com células iPS apresentaram uma melhora funcional motora significativamente maior do que aqueles que receberam transplante com células tronco não induzidas. Análises histológicas sugerem que essa melhoria funcional pode ser atribuída à remielinização das fibras nervosas restantes pelas células tronco induzidas.

Resultados similares também foram relatados por Salewski et al. (2015), nos quais os autores por meio do transplante de células-tronco embrionárias foram transplantados em modelos animais de ratos submetidos a lesão medular torácica via *clip* compressivo. Após 8 semanas, os autores observaram uma melhora na recuperação motora, devido à diferenciação das células-tronco em células gliais, a partir da 5ª semana de estudo nos animais transplantados. Além disso, os autores discutem que somada aos ganhos motores, houve também uma preservação na morfologia do órgão. Mais recentemente, Batista et al. (2019), demonstraram melhora da dor neuropática, mas não da motricidade, em animais com lesão medular implantados com precursores GABAérgicos.

Goganau et al. (2018) discutem em seu trabalho que para uma recuperação das funções perdidas não são isoladamente suficientes a geração de novas células neurais, brotamentos axo-dentritico ou novas sinapses, sendo muito mais importante a reorganização plástica de redes neurais funcionais. Todavia, segue incerto no mundo científico que fator ou fatores poderiam “direcionar” esse processo de

reorganização plástica: recrutamento neural durante tarefas específicas? (Gerasimenko et al., 2015) Eletroestimulação exógena? Algum fármaco indutor de plasticidade (como valproato de sódio)? (Hao et al., 2013; Rao et al., 2014). Dentre os processos mencionados, a eletroestimulação, seja não invasiva ou invasiva, é a que vem sendo mais amplamente investigada.

Quando se trata de estimulação não invasiva é encontrado na literatura uma vasta gama de técnicas que visam a estimulação seja de elementos neurais ou musculares em pessoas com lesão medular, seja para a reabilitação motora ou alívio da dor causada pela lesão. Uma estratégia mais recente e ainda pouco explorada é a estimulação medular magnética, que induz um campo magnético capaz de gerar a despolarização superficial da medula espinal, visando melhora motora (Ahmed and Wieraszko 2008; Zhivolupov et al., 2012; Korzhova et al., 2018).

Dentro das metodologias de eletroestimulação não invasiva para lesão medular uma das principais abordagens é a eletroestimulação funcional (FES), que foi desenvolvida nas décadas de 60-70. O objetivo dessa técnica é amplificar periféricamente o estímulo neural à contração muscular, através da aplicação de uma corrente elétrica em eletrodos colocados na superfície da pele, visando melhorar a força muscular e a mobilidade em indivíduos com lesão medular.

Griffin et al. (2009) investigaram o impacto da FES em 18 pacientes com lesão medular, divididos em dois grupos: tratamento e controle. Os autores avaliaram a composição corporal e a análise metabólica. Após 10 semanas de estudo, os pacientes que receberam a eletroestimulação alcançaram melhores resultados, incluindo aumento da massa corporal magra, melhoria na mobilidade e maior sensibilidade à insulina em comparação ao grupo controle.

No entanto, a aplicação da eletroestimulação funcional favorece a fadiga muscular, o que impacta diretamente na eficácia do tratamento. Nesse âmbito, pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando os melhores parâmetros, a fim de postergar a instalação do quadro de fadiga. Estudos sugerem que uma possível abordagem é a aplicação de corrente elétrica de baixa frequência, multipolar e com períodos de disparos assíncronos (Downey et al., 2015; Bekhet et al., 2019).

Outra metodologia de estimulação não-invasiva aplicada sobre a superfície do corpo é a TENS (estimulação elétrica trans-cutânea). Essa técnica envolve o emprego de corrente elétrica para estimulação de fibras nervosas sensitivas que

favorecem o sistema central inibidor de dor, tornando-a, assim, uma boa escolha para aplicação em pacientes com lesão medular acometidos por dores crônicas de caráter neuropático (Gibson et al., 2017).

Outra metodologia utilizada é a estimulação medular transcutânea (tSCS- *Transcutaneous Electrical Spinal Cord Stimulation*), sendo uma técnica não invasiva que utiliza eletrodos na superfície da pele, mas é direcionada para a ativação de elementos da medula espinhal, visando produzir efeitos terapêuticos, como melhoria da função autonômica e muscular. Diferentemente das técnicas mencionadas anteriormente, a estimulação medular transcutânea utiliza eletrodos colocados nas regiões perivertebrais da coluna lombar para a estimulação elétrica. Essa técnica pode ser útil para o tratamento de várias condições neuromusculares, incluindo dor crônica, espasticidade e fraqueza muscular em pacientes com lesão medular. Tharu et al. (2022) conduziram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da tSCS sobre o controle de tronco em pessoas com lesão medular cervical. Cinco indivíduos foram submetidos a esse tratamento por um período de 12 semanas. Após o período de estudo, os autores observaram melhorias significativas no controle de tronco em posição sentada, na eletromiografia e na amplitude de movimentos desses indivíduos. Outra vertente encontrada na literatura é a combinação de técnicas não- invasivas e invasivas de estimulação. Neste âmbito, Calvert et al. (2021) fizeram a combinação de estimulação transcutânea medula e epidural para resposta motoravoluntária em 9 indivíduos com lesão medular. Nessa pesquisa os autores observaram que a combinação dessas técnicas leva a um aumento da atividade de interneurônios, o que pode ser benéfico para a reabilitação motora.

### 1.1 Estimulação epidural medular

Em 1969, foi introduzida por Shealy et al. (1967). a técnica de estimulação epidural medular para o tratamento da dor neuropática. Tais efeitos clínicos benéficos, descobertos empiricamente, foram na mesma época melhor esclarecidos por ocasião da divulgação da teoria da comporta de dor, por Melzack and Wall (1965). Essa teoria explica a inibição da transmissão dolorosa dentro da medula espinhal por meio de interneurônios inibitórios ativados através de fibras grossas relacionadas ao tato e, em última análise, às fibras diretamente estimuladas por meio de eletrodos epidurais

espinhais. Embora tenha também sido aplicada contra a espasticidade (Siegfried et al., 1978; Gybels and van Roost 1987; Barolat 1993) foi contra a dor neuropática que a eletroestimulação invasiva se consagrou mais eficaz (Morgalla et al., 2016; Morgalla et al., 2017; Morgalla et al., 2018). Embora a teoria de Melzack e Wall tenha dado uma ótima primeira explicação para a eficácia da estimulação epidural em dor, diversas vias e mecanismos têm sido mais recentemente implicado (Meyerson and Linderoth 2000).

Do ponto de vista pré-clínico, Aoyagi et al. (2004), conduziram um estudo com gatos descerebrados para comparar os efeitos da estimulação elétrica em diferentes pontos de aplicação. Os pesquisadores analisaram a resposta da estimulação nos músculos, nervos, raízes nervosas da medula e da medula epidural. Os resultados do estudo indicaram que a estimulação epidural foi capaz de reduzir a fadiga muscular e apresentou uma menor carga elétrica efetiva. Além disso, permitiu uma melhor ativação dos músculos agonistas e antagonistas, o que sugere que a estimulação epidural é mais eficaz para a ativação adequada e para a prevenção da fadiga muscular.

Com foco na reabilitação motora, Lavrov et al. (2006), realizaram um estudo em ratos com lesão medular na altura de T8 e que foram submetidos à estimulação elétrica epidural na medula lombar. Com isso, na primeira semana, após o início da aplicação da estimulação, os autores relatam a ocorrência de ativação muscular simples e que, com o passar das semanas, esse efeito tornou-se mais coordenado e complexo, coincidindo com padrões fisiológicos de marchar, observados após 6 semanas de estudo.

Lavrov et al. (2008), investigaram o papel da entrada sensorial na recuperação da atividade rítmica coordenada de ratos com lesão medular. Eles usaram a estimulação epidural medular para facilitar a marcha e testaram se as fibras aferentes do lado não desaferentado poderiam compensar a perda de entrada aferente contralateral, que foi realizada por meio de rizotomia. Os resultados mostraram que a facilitação da marcha com a estimulação está relacionada à sensibilidade ipsilateral, ou seja, o lado não rizotomizado pode auxiliar de forma limitada na restauração dos movimentos do lado submetido à desaferentação, demonstrando que a sensibilidade é uma informação essencial para a aplicação da eletroestimulação epidural na reabilitação motora.

Ademais, Sato et al. (2013), observaram que animais com lesão medular submetidos à estimulação elétrica medular tiveram uma melhora na função motora, alodinia e da hiperalgesia por ativação de receptores opioides. Bamford et al. (2017), valendo-se de um eletrodo adaptado para estimulação elétrica medular, constataram que a aplicação de estimulação elétrica medular em ratos submetidos à lesão medular pode auxiliar na melhora motora, devido à ativação das redes neurais medulares remanescentes.

Similarmente, Gad et al. (2013) desenvolveram um tipo de eletrodo epidural implantável para estimulação elétrica medular em ratos com gerador externo e relatam que os animais tratados com estímulos de 40Hz obtiveram dados de eletromiografia mais coordenados com contrações defasadas durante o período de marcha, além de tempos de resposta melhores com relação aos demais grupos não tratados.

Corroborando esses achados, Moraud et al. (2016), por meio de um extenso trabalho, envolvendo tanto simulações computacionais quanto experimentos em animais, demonstraram que a aplicação de estimulação elétrica medular pode ativar os circuitos medulares responsáveis pela execução da marcha, possivelmente devido a um mecanismo de ativação é através da ativação primária de neurônios sensitivos presentes na coluna dorsal.

Já baseando-se em humanos, Dimitrijevic et al. (1998) conduziram um estudo com seis indivíduos com lesão medular em que a aplicação de estimulação elétrica medular resultou em melhorias significativas na atividade motora, incluindo a indução das fases rítmicas e de melhor balanço, durante a marcha com suporte de peso.

Herman et al. (2002), por sua vez, também baseando-se em eletroestimulação epidural medular em pacientes com lesão medular em fase crônica, demonstraram melhorias significativas imediatamente após o início do tratamento, incluindo um maior controle motor voluntário, uma redução na percepção de esforço e na espasticidade.

Resultados convergentes foram relatados por Carhart et al. (2004), dado que foi observada uma melhora na realização da marcha em esteira em pacientes com lesão medular e submetidos à estimulação epidural e suporte de peso.

Huang et al. (2006) também encontraram resultados semelhantes ao utilizar estimulação epidural em dois indivíduos com lesão medular, incluindo uma facilitação



no processo de marcha e uma melhoria na atividade eletromiográfica, com uma sensação reduzida de esforço para realizar o movimento.

Visando a recuperação motora, Angeli et al. (2014), em um estudo com humanos acometidos com lesão medular crônica, observaram uma progressiva recuperação via eletromiografia motora, após o implante e a aplicação de eletroestimulação epidural na medula, demonstrando a potencialidade que essa abordagem pode apresentar.

Recentemente, maior experiência clínica foi agregada na área, após o grupo de Lauzane divulgar resultados promissores em doentes crônicos medulares implantados com um gerador cíclico, capaz de estimular pools de motoneurônios em tempos específicos durante a marcha (Wagner et al., 2018).

Apesar desses avanços, ainda permanece obscuro os mecanismos pelos quais a eletroestimulação medular contribue no sentido de recuperação motora. A resposta a essa pergunta científica só é possível através da experimentação animal, por meio da qual o explante e a análise histopatológica das medulas estimuladas tornam-se possíveis.

## OBJETIVOS

### 1.2 Gerais

Este projeto tem como objetivo avaliar a recuperação motora de ratos com lesão medular submetidos à estimulação elétrica epidural intermitente.

### 1.3 Específicos

- a) Aprimorar o modelo de lesão medular no sentido de causar lesão grave com pouca recuperação espontânea.
- b) Desenvolver um sistema de estimulação elétrica medular implantável para ratos.
- c) Avaliar a estabilidade, a segurança e os efeitos adversos do sistema estimulação elétrica medular em ratos normais
- d) Estudar a eficácia da estimulação elétrica epidural na recuperação motora após lesão medular em ratos.
- e) Esclarecer as mudanças estruturais medulares induzidas pela eletroestimulação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.4 Caracterização do modelo de lesão medular

Para a realização do estudo foi necessário a caracterização do modelo de lesão por meio da escolha dos melhores parâmetros, a fim de se buscar uma lesão grave o suficiente a ponto de não se incorrer em recuperação espontânea significativa durante a fase de observação do projeto previsto para 2 meses.

#### 1.4.1 Impactor

Foi utilizado como equipamento de lesão o *Benchmark Stereotaxic Impactor-Impact One®* (Leica Biosystems Richmond inc®, Estados Unidos da America - EUA) acoplado ao estereotáxico *Leica Angle Two®* (Leica Biosystems Richmond inc®, Estados Unidos da America - EUA) e pontas de impactos nas dimensões de 1,5 e 2 milímetros de diâmetro. Para a estabilidade vertebral no momento da lesão foi utilizado o sistema de fixação vertebral *Clamping System* (NewYork University, Estados Unidos da América).

#### 1.4.2 Animais e grupos experimentais

Ratos Wistar, machos, pesando entre 250 e 300 gramas foram divididos em 4 grupos e submetidos a específicos protocolos de lesão medular:

- Grupo controle (n=2): submetidos apenas a laminectomia a nível de T9;
- Grupo lesão leve (n=6): submetidos a laminectomia a nível de T9 e aos parâmetros de lesão: ponta de impacto 2mm de diâmetro; velocidade de impacto 4 m/s; profundidade de lesão a partir da superfície da medula 1,5 mm e tempo de permanência da ponta de impacto no local da lesão 0,1 ms.
- Grupo lesão moderada (n=6): submetidos a laminectomia a nível de T9 e aos parâmetros de lesão: ponta de impacto 1,5mm de diâmetro; velocidade de

impacto 1,5 m/s; profundidade de lesão a partir da superfície da medula 1,7 mm e tempo de permanência da ponta de impacto no local da lesão 0,1 ms.

- Grupo lesão grave (n=6): submetidos a laminectomia a nível de T9 e aos parâmetros de lesão: ponta de impacto 2mm de diâmetro; velocidade de impacto 5 m/s; profundidade de lesão a partir da superfície da medula 2 mm e tempo de permanência da ponta de impacto no local da lesão 0,1 ms.

#### 1.4.3 Procedimento de lesão medular

Os animais foram anestesiados via injeção intraperitoneal com cetamina(100mg/kg, Ketamin NP-Cristália®) e xilazina (10 mg/kg, Xilazin-Syntec do Brasil®). Em seguida foram acomodados sobre uma plataforma aquecida a temperatura aproximada de 38 °C (*Insight- EFF421- Insight®*, São Paulo, Brasil). Após a acomodação, foi realizada a assepsia da região dorsal, via aplicação de gaze embebida de solução de iodopovidona na concentração de 10%, seguida de uma incisão longitudinal mediana da pele na topografia de T7 a T12, afastando cuidadosamente a musculatura paravertebral das lâminas vertebrais, seguindo-se a laminectomia em T9, expondo-se a dura-máter intacta. Em seguida os animais foram acondicionados no aparelho estereotáxico, fixados pelas vértebras superior e inferior em relação à laminectomia (T8 e T10). O dispositivo de lesão *Bechmark® Stereotaxic Impactor* foi configurado para aplicar as características lesões descritas para cada grupo de animais. No pós-operatório, foi feita analgesia via Tramadol intramuscular 20 mg/kg, de 12/12 horas, por no mínimo de 7 dias. O esvaziamento vesical foi realizado duas vezes ao dia até o retorno da função, se necessário.

#### 1.4.4 Avaliações pré e pós cirúrgicas

Inicialmente foram realizados testes pré-lesão que consistiram na avaliação motora pela escala de BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) cujo objetivo é quantificar a evolução do déficit motor decorrente da lesão medular (Basso et al., 1996), além de mensuração de peso, avaliação de campo aberto (Open Field).

Já as avaliações pós-cirúrgicas consistiram na avaliação pela escala BBB, avaliação de peso corporal e retorno da função vesical da bexiga, realizados 3 vezes por semana, durante 8 semanas.

Ao final da última semana, repetiram-se os testes já descritos.

- i) Testes de campo aberto, *Open-Field (Insight- 06250- Insight®*, São Paulo, Brasil) dispositivo destinado à monitorização atividade motora dos animais no tocante ao deslocamento nos eixos X, Y e Z (Basso, Beattie et al., 1996) ;
- ii) Testes de plano inclinado (*Insight®*, São Paulo, Brasil) cujo objetivo é avaliar a força e resistência muscular dos membros através do aumento do ângulo de inclinação máximo de sustentação do animal (Rivlin and Tator 1977)

#### 1.4.5 Sacrifício

Após as oito semanas de estudo, os animais foram anestesiados com cetamina (300 mg/kg, Ketamin NP-Cristália®) e xilazina (30 mg/kg, *Xilazin-Syntec do Brasil®*) por via intraperitoneal até cessação dos batimentos cardíacos. Imediatamente após o sacrifício, os animais foram abertos por toracotomia, canulados no ventrículo esquerdo e, após abertura do átrio direito e clampeamento da aorta descendente, foram perfundidos continuamente com 300ml de solução salina (PBS) resfriada.

Em seguida, os animais foram perfundidos com 300ml de solução fixadora que consistia em 4% de paraformaldeído diluído em solução tampão fosfato resfriada (0,1M; pH 7,4), preparada no dia anterior. Após esses procedimentos, as medulas foram removidas e cortadas 1,0 cm acima e 1,0 cm abaixo do ponto da lesão, por extensão da laminectomia prévia. Assim, os seguimentos das medulas extraplantadas foram congelados por submersão em solução de congelamento (*Tissue Freezing Medium- Leica®*, Wetzlar, Alemanha) e guardadas em freezer a -80°C. Antes da marcação imuno-histoquímica, as medulas foram cortadas em 3 séries, em cortes de 60 µm de espessura, em criostato (Leica, CM3050, Leica®, Wetzlar, Alemanha).

#### 1.4.6 Imuno-histoquímica

Para tanto, foi escolhido o anticorpo primário NeuN-monoclonal (1: 1.000; Millipore®-MAB377, *host Specie*: Mouse, Burlington, Massachusetts, EUA) para a

marcação de núcleos de neurônios. Como marcador secundário foi utilizado o Alexa 488-policlonal (Molecular Probes®, *host Specie: Goat*, Estados Unidos).

#### 1.4.6.1 Hematoxilina e eosina

Previamente à realização dos cortes do material, foi realizada a gelatinização das lâminas, a fim de evitar que o material cortado se deslocasse pela extensão desta. Tendo finalizado o processo de gelatinização, os materiais foram submetidos a cortes de 15 µm de espessura em criostato (Leica, CM3050, Leica®, Wetzlar, Alemanha), seguido de um desbaste de 60 µm, sendo pego sempre o primeiro corte de após o desbaste, e, assim, até o fim do material.

Seguindo esses procedimentos, os cortes de foram submetidos à desidratação por meios de banhos sucessivos de álcool etílico nas concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%, seguidos por dois banhos de xilol, durando 5 minutos cada etapa, como preparação do tecido para a aplicação dos corantes. As lâminas foram observadas em microscópio óptico de luz comum.

#### 1.4.6.2 Imunofluorescência

Outro conjunto de cortes foi lavado em solução tampão (PBS) e incubado durante uma hora em solução de bloqueio (4% soro de cabra) e PBS +0,1% de Triton X-100.

A seguir foi aplicado o anticorpo primário anti-NeuN por um período de 24 horas a uma temperatura de 8°C em *shaker*. A seguir, os cortes foram lavados por 5 vezes em PBS por 10 min cada lavagem e foi aplicado o anticorpo secundário Alexa Flour 488 respectivamente, seguido de incubação de 24 horas a 8 graus em *shaker*. Por fim, as lamínulas foram montadas sobre as lâminas contendo *flourescent mounting médium* (Dako), fotografadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) e analisadas via software (Zen blue, Carl Zeiss, Alemanha).

#### 1.4.7 Análise estatística

Para análise estatística utilizamos o *software* JMP14.0 (SAS Institute, California, EUA) e para a configuração dos gráficos utilizamos o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Holdings®, Califórnia, EUA).

Com relação aos testes utilizamos o de Anderson-Darling para avaliação de normalidade da distribuição dos dados. Dessa forma, analisamos os dados paramétricos por meio de ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados não-paramétricos foram comparados pelos testes de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, nos quais foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultaram em um  $p$  menor ou igual a 0,05.

## 1.5 Desenvolvimento do estimulador implantável

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Microeletrônica do Departamento de Engenharia Elétrica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, sob supervisão e chefia do Prof. Dr. Marcelo Nelson Páez Carreño.

### 1.5.1 Determinação dos parâmetros de estimulação

Para o cumprimento do presente projeto, surgiu a necessidade de desenvolvimento de um estimulador elétrico totalmente implantável, apto a liberar correntes fisiológicas de maneira estável e biologicamente seguro, ou seja, com revestimento adequado da bateria para evitar intoxicação metálica, segundo parâmetros pré-definidos na literatura (Gerasimenko et al., 2006; Gerasimenko et al., 2007; Lavrov, Courtine et al., 2008; Lavrov et al., 2008; Harkema et al., 2011; Shah and Lavrov 2017; Gill et al., 2020). Em termos de características elétricas do estímulo, foi preconizado para o presente trabalho a intensidade de estímulo de aproximadamente 100mV, frequência de 30 a 40 Hz, formato de onda monofásica retangular e largura de pulso de 500 $\mu$ s.

### 1.5.2 Determinação do microcontrolador

Para a escolha do chip utilizado, foi estabelecido que este deveria atender alguns requisitos tais como: baixo custo, possibilidade de programação, apresentar pequenas dimensões, necessidade mínima de componentes externos, baixo consumo de energia, tensão de funcionamento baixa, apresentar sistemas de gerenciamento de *clock*, apresentar sistemas de gerenciamento de energia e modos de suspensão e ter sistemas de segurança contra perda de programação.

Considerando esses pré-requisitos, a arquitetura foi baseada no microcontrolador da família MegaAVR (Atmel®), dado que esta família de microcontroladores atende a todos os requisitos exigidos pelo trabalho.



### 1.5.3 Determinação dos componentes eletrônicos

Embora o microcontrolador escolhido atenda aos requisitos do projeto, em um primeiro momento, existiu a necessidade de alguns componentes externos para o pleno funcionamento do circuito. Desta forma, além do microchip, houve a necessidade da adição de capacitores, os quais foram responsáveis por realizar o desacoplamento da energia de rádio frequência do sistema, resistores tanto para divisão de tensão de saída como para realizar o *pull up* e cristal oscilador para determinar o ciclo de *clock*.

#### 1.5.3.1 Otimização do circuito eletrônico

Devido ao tempo de avaliação dos animais e como se optou por utilizar apenas uma bateria do modelo 2032 para alimentar o sistema, foi necessária a reconfiguração do circuito eletrônico, a fim deste consumir uma menor quantidade de energia.

Dessa forma, buscando atingir tal meta, efetuaram-se aprimoramentos no hardware do dispositivo, resultando na eliminação dos capacitores de desacoplamento, do cristal oscilador externo e na reconfiguração dos fusos. Essas alterações possibilitaram ao sistema operar plenamente com uma quantidade mínima de tensão, viabilizando a administração da estimulação elétrica ao longo do período de estudo.

### 1.5.4 Desenvolvimento do código-fonte

O desenvolvimento do código-fonte foi baseado inteiramente em linguagem de programação C++, sendo que em um primeiro momento o código se deu por meio da utilização de bibliotecas específicas suportadas pelo microcontrolador. No processo de elaboração do código de programação foram estabelecidas as tensões de trabalho, frequência de estímulos, formatos de onda, modos de suspensão e ativação, tempo de trabalho e ativação e/ou desativação de portas digitais e analógicas.

#### 1.5.4.1 Otimização do software

Esse objetivo foi alcançado através da implementação de lógicas de programação e da alteração de fusos como: *deepsleep*, *watchdog timer*, desativação de portas lógicas, alteração do *clock* do sistema, tudo através do programa Progisp (versão 1.72) e da interface de comunicação ISP (AVR USBASP).

#### 1.5.5 Simulação virtual de viabilidade do circuito

Após a elaboração do código-fonte e com o intuito de testar a viabilidade do circuito desenvolvido e da segurança do código-fonte, foi criado um ambiente de simulação virtual, por meio do programa de simulação de circuitos elétricos, *Proteus Design Suite*, versão 8.6 (*Labcenter Electronics Ltd®*). Neste *software* foi simulado todo o circuito eletrônico, considerando todos os componentes já descritos.

#### 1.5.6 Simulação do *layout* do circuito e implante

Para a efetividade do desenvolvimento do sistema implantável e principalmente devido às pequenas dimensões do animal, foi necessária a elaboração de um *layout* compatível tanto com circuito eletrônico quanto com as dimensões do animal. Para isso, foi realizado um estudo e simulações sobre o melhor modo para a interligação dos componentes eletrônicos da placa e do eletrodo de implante propriamente dito.

Para essa interligação elétrica foi utilizado o *Proteus Design Suite*, versão 8.6 (*Labcenter Electronics Ltd®*), o qual dispõe de diversos mecanismos de roteamento de trilhas de cobre. Após isso, foi desenvolvido o formato do implante, o qual teve como objetivo a acomodação de toda a parte eletrônica, assim como o sistema de alimentação do circuito. Assim sendo, ficou definido que o sistema completo seria composto por três módulos interdependentes, em que o primeiro compreendia o circuito propriamente dito, o segundo o sistema de alimentação e por último o eletrodo de estimulação. Todos esses módulos foram projetados para serem interligados via cabos subcutâneos.

O desenvolvimento do eletrodo de estimulação foi baseado no trabalho de Gad, Choe et al. (2013), sendo desenvolvido por meio do *software Inventor versão 2019*

(AutoDesk®). Após todos esses procedimentos e testes de viabilidade em ambiente virtual, deu-se início aos trabalhos de construção e aos testes em bancada.

#### 1.5.7 Determinação dos materiais da placa base

Para construção do estimulador os materiais teriam que apresentar baixo custo, fácil aquisição, disponibilidade no mercado nacional, boa flexibilidade, espessura adequada, biocompatibilidade, condução elétrica adequada, capacidade de suportar temperaturas de até 400°C (necessárias para a solda dos componentes eletrônicos) e permitir a utilização de isolante elétrico-biológico ao final da construção.

A partir desses pré-requisitos e após diversas tentativas e testes, foi escolhido como material para a construção, um composto formado por polímero de Poli-imida recoberto com uma fina camada de cobre cuja espessura total foi menor que 100 µm e atendia todos os requisitos necessários para o início dos testes de bancada.

#### 1.5.8 Construção do protótipo

##### 1.5.8.1 Integração dos projetos físico e elétrico

O primeiro passo da construção do protótipo foi a integração dos projetos de roteamentos de trilhas com o formato físico do implante. Esses passos foram unidos por meio do *Proteus Design Suite*, versão 8.6 (*Labcenter Electronics Ltd*®). Após a integração do projeto e a acomodação das trilhas de cobre no espaço do dispositivo, esses arquivos foram exportados sob a forma de negativos e submetidos à impressão fotolitográfica de alta resolução em papel acetato.

##### 1.5.8.2 Aplicação da película fotossensível

Em paralelo, a folha de Poli-imida cobreada foi submetida a uma limpeza utilizando-se água e sabão para remoção de impurezas sobre as faces. Seguindo, o substrato cobreado foi submetido a limpeza com álcool etílico 70%, 80%, 90% e 100%, respectivamente, e, por último, com álcool metílico, a fim de remover qualquer tipo de impurezas orgânicas e inorgânicas, preparando, assim, a folha para a aplicação da película fotossensível.

O *dry film* ou película fotossensível é um composto azulado que se enrijece quando exposto à radiação ultravioleta. Todo o processo de aplicação do *dry film* foi realizado em sala limpa, livre de radiação ultravioleta e submerso em água. Assim, a aplicação do filme fotossensível se deu em uma cuba plástica contendo água ultrapura onde foi submersa a folha de Poli-imida cobreada, seguida da aplicação do filme fotossensível na camada que continha o metal. Todas as bolhas foram retiradas, garantindo assim a adesão adequada entre o *dry film* e a camada de cobre. Após esse procedimento, o novo composto formado foi submetido a uma prensa de rolo aquecida, a fim de retirar a umidade e garantir melhor adesão.

#### 1.5.8.3 Transferência do circuito para a camada de cobre

Após aplicado o filme fotossensível sobre o cobre, iniciou-se a transferência do circuito elétrico contendo o *layout* das trilhas e pontos de solda dos componentes. Para isso a folha de cobre foi posicionada em uma superfície plana e acima do conjunto cobre-*dry Film* foi colocado o papel de fotolitografia contendo o negativo do circuito. Para garantir o posicionamento desses elementos foi colocada uma placa de vidro transparente, pressionando tudo contra a superfície plana.

Após isso, foi utilizada uma lâmpada de radiação ultravioleta de 40 watts de potência a uma distância de 15 cm da superfície superior do vidro. Em seguida, a lâmpada foi ligada e expôs o *dry film* a radiação UV por um período de 40 segundos. Após esse período a lâmpada foi desligada, o vidro e o fotolito foram retirados, restando apenas o composto de cobre com a tinta sensibilizada nos pontos de interesse.

#### 1.5.8.4 Revelação e corrosão da Poli-imida cobreada

Para remoção da porção não sensibilizada do filme fotossensível, a folha obtida na etapa anterior foi submersa em solução composta de 100ml de água destilada e 10g de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), até que toda a parte não curada do filme tivesse sido removida, restando apenas as regiões de interesse.

Terminada essa etapa, o produto resultante foi submetido a uma solução de 40% de percloroeto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ), cuja função foi remover todo o cobre exposto, permanecendo apenas aquele de interesse, ou seja, que o filme fotossensível curado estava protegendo.

Após a remoção do cobre, o produto dessa etapa foi novamente submetido à solução de água e carbonato de sódio. No entanto, na proporção de 50% e sobre atrito manual, até que todo o *dry film* fosse removido, restando como produto final o *layout* das trilhas e os pontos de solda do circuito final no cobre.

#### 1.5.8.5 Limpeza e solda dos componentes eletrônicos

Tendo finalizado a transferência do circuito, este foi novamente submetido à limpeza com álcoois 70%, 80%, 90%, 100% e álcool metílico, a fim de remover quaisquer resíduos das etapas posteriores.

Assim foi iniciada a soldagem dos componentes do dispositivo. Todo o processo foi realizado de forma manual, utilizando a estação de solda e retrabalho Yaxun (Yaxun 886d+, Yaxun, China), solda de estanho sem chumbo, pasta de solda, pinças oftalmológicas, fita Kapton e componentes eletrônicos SMD.

#### 1.5.9 Teste de funcionabilidade do protótipo

Para os testes de bancada, o protótipo construído foi alimentado com uma tensão de 3 volts, fornecido por uma fonte de bancada. Também foi utilizado osciloscópio HM407-2 (HAMEG®), a fim de conferir: formato de onda, tensões pico-a-pico, tensões médias, frequência de estimulação e artefatos indesejáveis. Além disso, um multímetro Fluke 115 (Fluke®) foi utilizado para verificar as características dos componentes elétricos e o consumo de energia e integridade das trilhas de cobre.

#### 1.5.10 Teste de viabilidade do sistema de alimentação do circuito

O teste de viabilidade do sistema de alimentação consistiu na simulação utilizando o ambiente virtual do *software Proteus Design Suite*. Assim, foi simulado um circuito cujas características elétricas eram similares às observadas no ambiente biológico ao qual o protótipo se destinava. Com isso, foi verificado que uma fonte contendo no mínimo 3 volts de tensão era necessária para o pleno funcionamento de todo o sistema e que um circuito com resistência de 50 k $\Omega$  conseguia simular o

ambiente de implante.

Na sequência, partiu-se para o teste físico do sistema de alimentação por meio da utilização de uma bateria do tipo moeda (2032- Sony). Assim todo o circuito foi avaliado e validado quanto ao seu funcionamento.

#### 1.5.11 Determinação dos materiais de isolamento elétrico

Devido ao ambiente úmido do organismo animal e como o sistema seria totalmente implantável, foi necessário o desenvolvimento de uma solução capaz de isolar totalmente os circuitos eletrônicos e de alimentação do organismo animal. Dessa forma foi possível evitar eventuais curtos-circuitos ou extravazamentos de materiais metálicos que poderiam levar à morte dos animais.

Para sanar esse problema foi aplicado, inicialmente sobre toda a superfície do dispositivo uma camada de polivinilsiloxano. Esse material tem como características principais a formação de uma barreira impermeável, sólida, flexível e com capacidade de isolamento elétrico, além de apresentar biocompatibilidade. Ao final dos testes biológicos, optamos por utilizar como isolante elétrico o silicone elastômero dimetil polissiloxano, devido a vantagens em modo de aplicação, tempo de cura, versatilidade e biocompatibilidade.

#### 1.5.12 Teste de isolamento elétrico *in vitro*

Tendo aplicado tal composto sobre o circuito, este foi submetido a uma imersão em um ambiente aquoso, com pH neutro, temperatura de 50°C por um período de 24 horas, seguido de outra imersão similar, em ambiente ácido, pelo mesmo período. Estes testes buscavam avaliar a capacidade de isolamento elétrico e de impermeabilidade do polímero de isolamento sobre situações de normalidade e ataque do sistema imunológico do animal frente ao implante.

Passado o período de imersão, o dispositivo foi retirado deste ambiente. Todo o seu isolamento foi removido e submetido a avaliações de possíveis infiltrações no circuito elétrico, de integridade no funcionamento deste. Tendo finalizado essa etapa, os dispositivos seguiram para os testes *In Vivo*.

### 1.5.13 Teste de viabilidade biológica do sistema *in Vivo*

A fim de avaliar a integridade, versatilidade do dispositivo e possíveis intercorrências no procedimento cirúrgico, foram produzidos 3 dispositivos para o implante em 3 ratos Wistar, machos, pesando cerca de 270 gramas, sem lesão medular, observados por um período de 30 dias e submetidos aos testes comportamentais, a fim de se verificar a adaptabilidade e conforto do animal com o sistema implantado, bem como possíveis reações inflamatórias nos tecidos peri-implante após o sacrifício. Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram acomodados sobre uma plataforma aquecida (*Insight- EFF421- Insight®*, São Paulo, Brasil). Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal mediana da pele na topografia de T8 a T12, afastando cuidadosamente a musculatura paravertebral das lâminas vertebrais, seguindo-se a laminectomia T10, expondo-se a dura-máter intacta. Em seguida foi realizado o implante do eletrodo de estimulação, o qual foi posicionado manualmente sobre a camada epidural, na região medial da medula espinal com polos de estimulação, catodo e anodo, de forma rostral e caudal, respectivamente. O circuito principal do estimulador e sua bateria foram alocados paralelamente na região dorsal da coluna vertebral. No pós-operatório foi feita analgesia via Tramadol intramuscular 20 mg/kg, de 12/12 horas, por no mínimo de 7 dias. O esvaziamento vesical foi realizado duas vezes ao dia até o retorno da função, se necessário.

### 1.5.14 Avaliações pré e pós cirúrgicas

Para a avaliação comportamental, foram realizados os seguintes testes, sempre um 1 dia antes, 1 uma semana depois da cirurgia e semanalmente até o sacrifício:

- Índice BBB: a fim de estimar a avaliação locomotora dos ratos.
- Plano inclinado: cujo objetivo é investigar alterações de força e resistência muscular.
- *Open Field*: cuja função é avaliar a atividade motora, no tocante ao deslocamento, nos eixos X, Y e Z.

### 1.5.15 Metodologia de sacrifício

Após o período de estudo, os animais foram anestesiados com cetamina (300 mg/kg, Ketamin NP-Cristália®) e xilazina (30 mg/kg, *Xilazin-Syntec do Brasil®*) por via intraperitoneal até cessação dos batimentos cardíacos. Imediatamente após o sacrifício, os animais foram abertos por toracotomia, canulados no ventrículo esquerdo e, após abertura do átrio direito e clampeamento da aorta descendente, foram perfundidos continuamente com 300ml de PBS resfriado, seguido por 300ml de paraformaldeído a 4% fresco e resfriado.

A medula espinal foi removida e cortada 1,5 cm acima e 1,5 cm abaixo, por extensão da laminectomia prévia. Por fim, a avaliação histológica foi feita por meio de hematoxilina/eosina. A imunofluorescência da medula espinal foi realizada por meio do anticorpo primário anti- NeuN monoclonal (1: 1.000; Millipore®-MAB377, *host Specie: Goat*, Burlington, Massachusetts, EUA) e 488 (Molecular Probes®).

#### 1.5.16 Avaliações Post-Mortem

##### 1.5.16.1 Teste de integridade do circuito

Após o sacrifício dos animais, os dispositivos eletrônicos foram retirados, lavados, seu isolamento externo retirado e, assim, foi realizada a avaliação por meio observacional, buscando pontos de infiltração de material biológico, quanto possíveis oxidações. Além disso, esses dispositivos foram submetidos a testes de bancada, a fim de avaliar a funcionalidade do sistema e estabilidade de funcionamento.

##### 1.5.16.2 Avaliações biológicas

A avaliação biológica foi por imunofluorescência da medula espinal realizada com o seguinte marcador: NeuN (Millipore®); 488 (Molecular Probes®) e por imunohistoquímica por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina. Ambas as técnicas tinham como objetivo avaliar as alterações celulares, assim como a extensão e as características da lesão.

Adicionalmente, o tecido celular subcutâneo, muscular e osteo-vertebral ao redor dos materiais implantados foram visualmente inspecionados, a fim de se notar possíveis sinais de inflamação ou infecção.

#### 1.5.17 Determinação estatística

Para análise estatística utilizamos o *software* JMP14.0 (SAS Institute, California, EUA) e para configuração dos gráficos utilizamos o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Holdings®, California, EUA).

Com relação aos testes utilizamos o teste de Anderson-Darling para avaliação de normalidade da distribuição dos dados e, assim, analisamos os dados paramétricos por meio de ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni e os dados não paramétricos com Kruskal-Wallis, seguido dos pós-teste de Dunns, tendo sido aceitas como



variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultassem em um  $p$  menor ou igual a 0,05.

Todas as etapas descritas nesse projeto, desde o planejamento, execução, testes virtuais e de bancada, testes *in vivo* até a análise de dados, sem exceção, foram feitas por mim, doutorando Leonidas Gomes Angelin, sem ajuda direta.

## 1.6 Avaliação de eficácia da eletroestimulação epidural medular

### 1.6.1 Determinação dos grupos de animais

Os animais selecionados para a fase 3, todos machos Wistar de 300 a 340 gramas, foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo controle (n=15): animais não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento cirúrgico.
- Grupo Sham (n=15): animais submetidos ao procedimento de laminectomia a nível de T9 e implante do dispositivo de estimulação elétrica.
- Grupo Lesão (n=15): animais submetidos aos procedimentos de laminectomia a nível de T9 e lesão medular.
- Grupo Lesão e estimulação (n=15): animais submetidos a laminectomia a nível de T9, lesão medular, e a estimulação elétrica epidural medular.

### 1.6.2 Procedimento de lesão medular

Os animais (n=45) foram anestesiados via injeção intraperitoneal com cetamina (100 mg/kg, Ketamin NP-Cristália®) e xilazina (10 mg/kg, Xilazin-Syntec do Brasil®). Em seguida foram acomodados sobre uma plataforma aquecida a temperatura aproximada de 38C° (*Insight- EFF421- Insight®*, São Paulo, Brasil). Após a acomodação, foi realizada a assepsia da região dorsal via aplicação de gaze embebida de solução de iodopovidona na concentração de 10%, seguida de uma incisão longitudinal mediana da pele na topografia de T8 a T12, afastando cuidadosamente a musculatura paravertebral das lâminas vertebrais, seguindo-se a laminectomia em T9 e expondo-se a dura-máter intacta.

Em seguida, os animais foram acondicionados no aparelho estereotáxico, fixados pelas vértebras superior e inferior em relação à laminectomia. O dispositivo de lesão *Benchmark Stereotaxic Impactor- Impact One®* (Leica Biosystems Richmond inc®, Estados Unidos da América - EUA) foi configurado para aplicar a seguinte lesão

nos grupos lesão e lesão com estimulação: ponta de impacto 2mm de diâmetro; velocidade de impacto 5 m/s; profundidade de lesão a partir da superfície da medula 2 mm e tempo de permanência da ponta de impacto no local da lesão 0,1 ms, conforme modelo de lesão grave estabelecido na fase anterior. No pós-operatório foi feita analgesia via Tramadol intramuscular 20 mg/kg, de 12/12 horas, por no mínimo 7 dias. O esvaziamento vesical foi realizado duas vezes ao dia até o retorno da função, se necessário.

### 1.6.3 Avaliação funcional

Após os procedimentos cirúrgicos, deu-se início ao processo de avaliação motora e comportamental, o qual teve uma duração de 8 semanas cuja contagem foi iniciada no dia seguinte ao da realização dos procedimentos cirúrgicos.

### 1.6.4 Implante do estimulador medular

30 Ratos Wistar machos, pesando entre 300 e 340g, referente ao grupo lesão e estimulação, foram anestesiados via injeção intraperitoneal com cetamina (100 mg/kg, Ketamin NP-Cristália®) e xilazina (10 mg/kg, *Xilazin-Syntec* do Brasil®). Os animais foram acomodados sobre uma plataforma aquecida (*Insight- EFF421-Insight*®, São Paulo, Brasil).

Passados sete dias da lesão, estes animais foram novamente submetidos à anestesia via injeção intraperitoneal com cetamina (100 mg/kg, Ketamin NP-Cristália®) e xilazina (10 mg/kg, *Xilazin-Syntec* do Brasil®). A incisão longitudinal mediana da pele na topografia de T8 a T12 foi reaberta e realizou-se o implante do dispositivo no espaço epidural. O implante foi realizado no sentido crânio-caudal, começando na vértebra T10 e avançando até o nível de T13. Após o posicionamento preciso do eletrodo de estimulação, a haste de fixação foi cuidadosamente afixada na fáscia das bordas laterais das vértebras com o objetivo de evitar qualquer deslocamento crânio-caudal indesejado. Para garantir ainda mais segurança, todo o aparato do gerador, incluindo a bateria, foi alocado e fixado no tecido subcutâneo da região dorsal do tórax do animal, e fixado nas fáscias adjacentes, evitando qualquer deslocamento supero-inferior ou latero-lateral, o que poderia comprometer o procedimento. Essa fixação cuidadosa é importante para garantir que a estimulação seja aplicada de forma consistente e precisa no local desejado, sem causar danos ao animal ou aos tecidos circundantes. Também é importante que o gerador e a bateria

não se movam para outras áreas do corpo do animal, o que poderia afetar a eficácia da estimulação ou causar desconforto.

Após a conclusão dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram cuidadosamente colocados em suas caixas individuais e mantidos aquecidos até que a anestesia fosse totalmente dissipada. Posteriormente, foram submetidos a uma limpeza diária da área cirúrgica, utilizando uma solução de soro fisiológico e iodopovidona, a fim de garantir uma recuperação saudável e segura. Este processo de higienização foi realizado regularmente até a completa cicatrização do tecido cutâneo, assegurando assim a impossibilidade de infecções. Quanto à analgesia, foi feita via Tramadol intramuscular 20 mg/kg, de 12/12 horas, por um mínimo de 7 dias.

#### 1.6.5 Avaliações pré e pós cirúrgicas

No dia anterior ao do procedimento cirúrgico de lesão, todos os animais passaram por uma série de avaliações, incluindo *OpenField*, Plano Inclinado, BBB e aferição de peso.

Após o procedimento cirúrgico de implante e durante as 8 semanas, todos os animais foram avaliados 3 vezes por semana através do índice BBB e medida de peso corpóreo.

No dia anterior ao do sacrifício, ou seja, ao final das 8 semanas de estudo, os testes de *OpenField*, Plano Inclinado, BBB e aferição de peso foram repetidos, a fim de avaliar a evolução dos animais desde o início do estudo até o momento do sacrifício.

#### 1.6.6 Metodologia de sacrifício

Após o período de estudo, os animais foram anestesiados com cetamina (300 mg/kg, Ketamin NP-Cristália®) e xilazina (30 mg/kg, *Xilazin-Syntec* do Brasil®) por via intraperitoneal até cessação dos batimentos cardíacos. Imediatamente após o sacrifício, os animais foram abertos por toracotomia, canulados no ventrículo esquerdo e, após abertura do átrio direito e clampeamento da aorta descendente, foram perfundidos continuamente com 300ml de PBS resfriado, seguido por 300ml de paraformaldeído a 4% fresco e resfriado. A medula espinal foi removida e cortada 1,5 cm acima e 1,5 cm abaixo, por extensão da laminectomia prévia. A seguir, em criostato, foram feitos cortes de 60µm micrometros por toda extensão do órgão.

## 1.6.7 Avaliações Post-mortem

### 1.6.7.1 Teste de integridade do circuito

Após o sacrifício dos animais, os dispositivos eletrônicos foram retirados, lavados e seu isolamento externo retirado. Assim, foi realizada a avaliação por meio observacional, buscando pontos de infiltração de material biológico, quanto possíveis oxidações. Além disso, esses dispositivos foram submetidos a testes de bancada, objetivando avaliar a funcionalidade do sistema.

### 1.6.7.2 Imunofluorescência

A marcação por imunofluorescência da medula espinal foi realizada com os seguintes anticorpos primários: NeuN (Millipore®); sinaptofisina (Millipore®), revelados com Alexa Flour 595 – Monoclonal (1:200, Molecular Probes®, *Host Specie: Rat*) e 488-policlonal (1: 200, Molecular Probes®, *host Specie: Goat*, Estados Unidos).

## 1.6.8 Análise estereológica

Para quantificação das células positivas para determinado marcador foram desenhadas as áreas de interesse, envolvendo os dois cornos anteriores medulares e a região central da medula. As áreas foram, automaticamente, escaneadas no microscópio de Zeiss Axio Imager A2 e as células positivas em cada campo visual foram determinadas de maneira semiautomática, usando-se para tanto uma série de 15 cortes de 15 animais de cada grupo, calculando-se as células positivas totais por animal de acordo com a fórmula de Abercrombie, cuja equação é apresentada abaixo:

$$P = M/(D + M) A. N$$

Onde P representa o total de células, M= espessura do corte, D= diâmetro médio de células positivas, A= número de contagem de células e N= número de series.

### 1.6.9 Análise de intensidade de imunofluorescência

Para a análise da intensidade do sinal fluorescente foram selecionadas 300 imagens de microscopia de epifluorescência por grupo. Em cada imagem a intensidade luminosa por pixel foi calculada. Foram definidas duas Regiões de Interesse (ROI) para cada imagem: a primeira ROI, representando a imagem completa (ROIT, ROI total), e a segunda ROI, englobando uma área correspondente a 10% do menor sinal (ROIB, ROI de *background*). Assim, o ROI final em cada caso foi obtido subtraindo-se o valor da ROI de fundo (ROIB) do valor da ROI total, conforme demonstrado na seguinte equação:

$$ROI_f = ROI_t - ROI_b \quad (2)$$

### 1.6.10 Determinação estatística

Para análise estatística utilizamos o *software* JMP14.0 (SAS Institute, California, EUA) e para configuração dos gráficos, utilizamos o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Holdings®, California, EUA).

Com relação aos testes utilizamos o teste de Anderson-Darling para avaliação de normalidade da distribuição dos dados. De acordo com essa análise, analisamos os dados paramétricos por meio de ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados não paramétricos com Kruskal-Wallis, seguido dos pós teste de Dunns, permitiram aceitar como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultassem em um  $p$  menor ou igual a 0,05.

## RESULTADOS

### 1.7 Estudo de padronização da lesão

Todos os animais submetidos a um dos três protocolos de lesão apresentaram os aspectos típicos daqueles observados em pacientes com lesão medular, ou seja, inicialmente uma paralisia flácida com ausências dos reflexos espinhais e dos reflexos vesicais, além de inexistência da atividade motora voluntária. Após cerca de 7 dias, esses achados foram dando lugar a algum tipo de recuperação motora e retorno das funções vesicais em níveis diferentes, devido aos protocolos distintos, progredindo de cranial para caudal, de maneira descendente. De forma contrária, os animais submetidos apenas à laminectomia não apresentaram quaisquer prejuízos funcionais, queira quanto à motricidade ou quanto à sensibilidade, funções vegetativas ou reflexas.

#### 1.7.1 Resultados comportamentais

##### 1.7.1.1 Índice BBB

Através da escala de evolução de recuperação motora, índice BBB, foi observado que os animais do grupo controle não apresentaram prejuízo quanto à atividade motora. Durante todo o estudo, esses animais obtiveram um score máximo de 21, o que reflete a ausência de lesão medular consistente. No entanto, todos os grupos de animais submetidos à lesão medular (leve, moderada e grave) apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, imediatamente após o procedimento de lesão (Fig.1).

A análise da evolução da recuperação espontânea dos grupos de animais submetidos à lesão medular mostrou que um dia após o procedimento todos os animais obtiveram um *score* de BBB de 0. As análises semanais subsequentes mostraram que, ao final da primeira semana, os animais do grupo de lesão moderada e grave alcançaram um score máximo de BBB de 1, enquanto o grupo de lesão leve obteve um *score* de aproximadamente 2. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre esses grupos (Fig.1).

Ao final da segunda semana, os resultados mostraram que os grupos de lesão leve e moderada apresentaram uma evolução mais evidente e pronunciada, o que lhes conferiu um índice BBB de aproximadamente 6. Esses grupos continuaram sua recuperação de forma semelhante e sem diferenças estatísticas até o final do estudo, alcançando um score máximo de BBB de 9 para o grupo de lesão leve e de 11 para o grupo de lesão moderada (Fig.1 -traçados preto e azul).

Por outro lado, os animais do grupo de lesão grave apresentaram uma evolução menos pronunciada que os demais grupos lesionados, refletindo em um score BBB de aproximadamente 2 no final da primeira semana. Continuando as análises, observou-se que os animais deste grupo seguiram uma evolução pouco pronunciada e quase linear entre a segunda e a terceira semanas do estudo. A partir da quarta semana, foi observada uma diferença estatística significativa entre este grupo ( $2,8 \pm 1$ ,  $p = 0,0022$ ) e os grupos de lesão leve ( $6 \pm 6$ ) e moderada ( $8 \pm 2$ ) Fig.1.

Figura 1 - Índice BBB

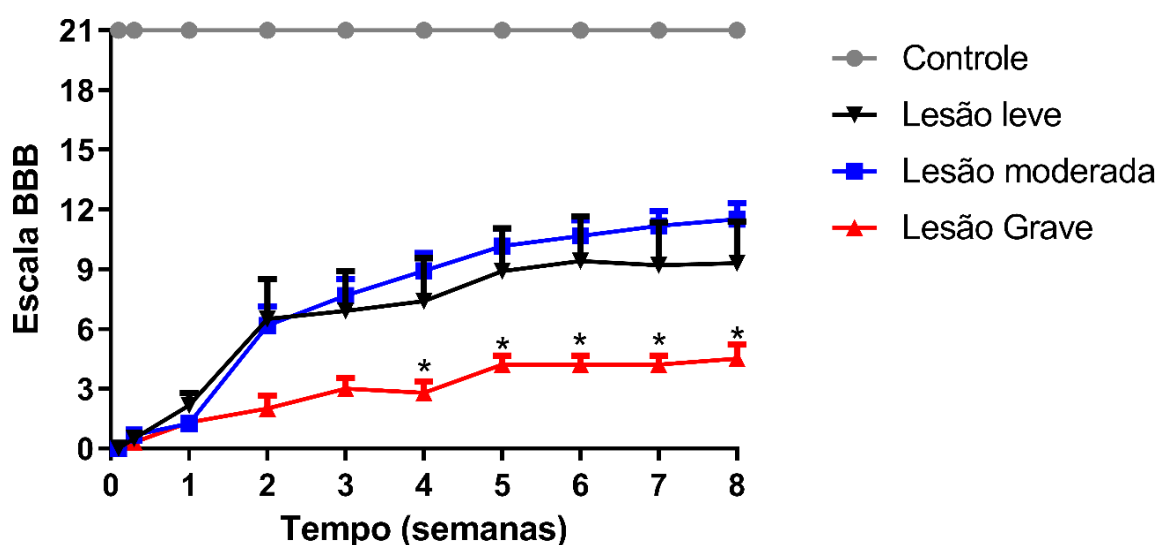


Figura 1 - Teste de gravidade da lesão medular. Evolução do índice BBB ao longo de 8 semanas de observação entre os grupos controle, lesão leve, moderada e grave, notando-se substancial evolução no grupo lesão moderada e leve a partir da 2ª semana, alcançando 9 e 11 pontos na escala BBB, respectivamente. O grupo lesão grave apresentou discreta evolução durante todo estudo, alcançando score máximo 5 no índice BBB. \* Diferença estatística entre os grupos submetidos a lesão  $P < 0,0022$ .

### 1.7.1.2 Peso corpóreo

Quanto à evolução do peso dos animais a partir da lesão medular, todos os grupos lesionados apresentaram evolução semelhante, sem diferença estatística entre eles e todos diferentes do grupo controle  $p= 0,001$  (média controle= 440 gramas ( $\pm 33$ ), média lesão leve =346 gramas ( $\pm 18$ ), média lesão moderada = 357 gramas ( $\pm 28$ ) e média lesão grave = 360 gramas ( $\pm 17$ ), entre a segunda e a quinta semanas de observação (Fig. 2), período esse em que os animais lesados tiveram perda ponderal, em relação aos seus valores de base.

Os resultados dos grupos lesados seguiram uma trajetória similar, partindo de 350 gramas e iniciando uma queda desde a primeira semana de estudo, alcançando seu menor valor na terceira semana (330 gramas). A partir de então foi observada uma recuperação do peso com uma taxa de crescimento consistente, as quais superaram seus valores iniciais por volta da sexta semana, seguindo uma evolução de forma constante até o final do estudo. Quando comparados os valores iniciais e finais, verificou-se que os animais ganharam peso, alcançando uma média máxima de 380 gramas ( $\pm 18$ ) (Fig. 2).

Já com relação aos animais do grupo controle, esses apresentaram durante todo o período de estudo um ganho de peso importante, principalmente a partir da terceira semana, quando foi observado o aumento na taxa de crescimento das medidas peso, sendo que ao final do período de estudo esse grupo alcançou uma média de 480 gramas (Fig.2- traçado cinza).



Figura 2 - Peso corpóreo

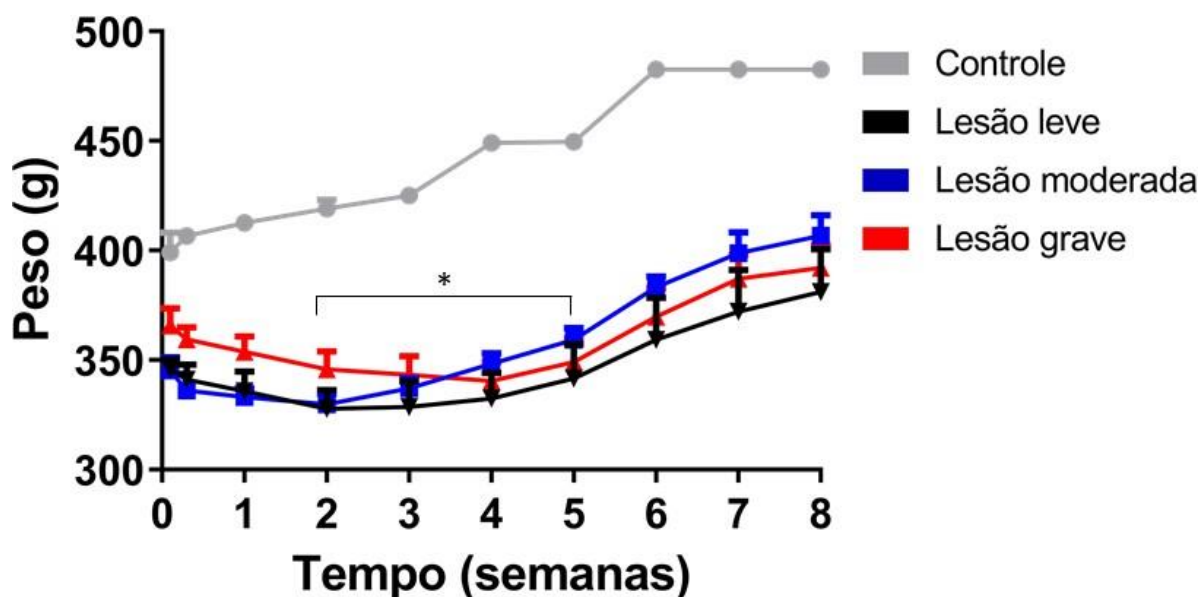


Figura 2 - Evolução de Peso ao longo de 8 semanas de duração, notando-se similaridade na perda de peso nos grupos lesão leve moderada e grave até a 3<sup>o</sup>, com ganho de peso idêntico a partir de então, até o fim do estudo. \* Diferença estatística entre os grupos submetidos a lesão  $P < 0,05$ .

#### 1.7.1.3 Função vesical

Os resultados do estudo indicaram que o grupo controle não apresentou disfunção urinária ao longo do período de observação, enquanto os grupos submetidos à lesão medular apresentaram prejuízos na liberação de urina no dia seguinte à lesão, persistindo de 3 a 5 semanas até a completa recuperação da função vesical (Fig. 3). Observou-se uma evolução semelhante no retorno da atividade vesical nos grupos de lesão leve e moderada, iniciando-se desde a primeira semana e progredindo ao longo do tempo.

Todos os animais do grupo lesão moderada recuperaram a plena função vesical no início da terceira semana, enquanto os do grupo lesão leve tiveram essa recuperação no início da quarta semana (Fig. 3). Já os animais do grupo de lesão grave apresentaram uma recuperação mais lenta, com ausência de melhora na liberação espontânea de urina na primeira semana, seguida de melhora consistente a partir da segunda semana, culminando na recuperação total da capacidade de liberação da urina na quinta semana, conforme demonstrado na Fig. 3.

Figura 3 - Função vesical

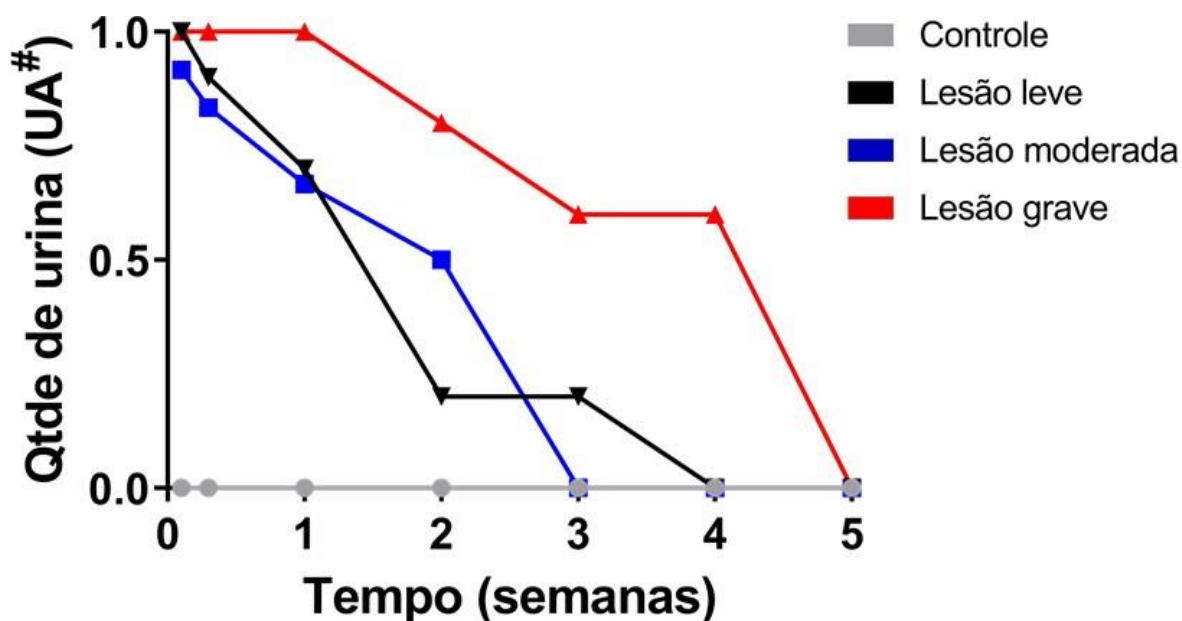


Figura 3 - Evolução da função vesical entre os grupos controle e lesados até a recuperação completa da função urinária; eixo Y: quantidade de retenção urinária (UA); bexiga vazia (e.g.,0,0); bexiga moderadamente cheia (e.g.,0,5); bexiga completamente cheia (e.g., 1,0) Nota-se plena recuperação do grupo lesão moderada na 3ª semana, do grupo lesão leve na 4ª semana, e na 5ª semana para o grupo lesão grave. # unidade arbitrária.

#### 1.7.1.4 Plano Inclinado

Durante a realização de testes de plano inclinado foi possível observar que o ângulo de inclinação médio obtido pelo grupo controle foi de  $80^\circ (\pm 3)$ , enquanto os grupos com lesões moderadas e leves apresentaram ângulos médios de  $66^\circ (\pm 3)$  e  $64^\circ (\pm 5)$ , respectivamente. A partir desses resultados, foi possível identificar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos lesão leve (média =  $64 \pm 5$ ,  $p = 0,020$ ) e moderada (média =  $66 \pm 3$ ,  $p = 0,031$ ) quando comparados ao grupo controle (média =  $80 \pm 3$ ). No entanto, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos lesionados.

Ao se comparar os grupos controle e lesão grave foi possível identificar uma diferença estatisticamente significativa, com uma média de  $80^\circ (\pm 3)$  de ângulo de inclinação para o grupo controle e de  $54^\circ (\pm 3)$  para o grupo de lesão grave, o que demonstra uma diferença mais expressiva quando comparada aos resultados dos demais grupos ( $p=0,0003$ ). Assim os animais do grupo grave obtiveram pior resultado entre os três grupos lesionados (Fig. 4).

Figura 4 - Plano inclinado

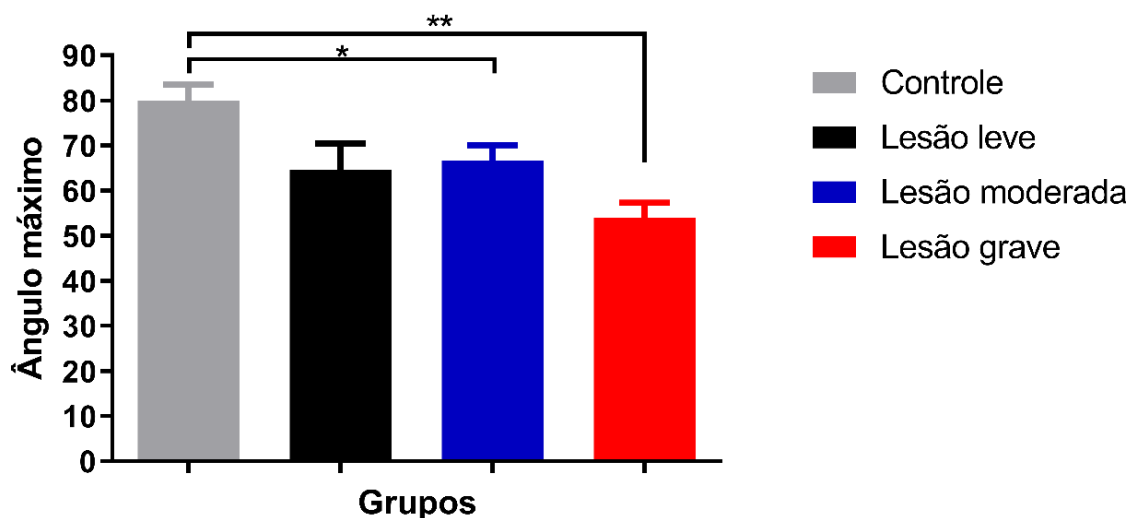


Figura 4 - Teste de plano inclinado. Avaliação de resistência muscular por meio do teste de plano inclinado após 8 semanas de estudo. Nota-se diferença estatística entre grupo controle e lesão leve e moderada e grupo lesão grave. \* Diferença estatística com relação aos grupos controle  $p < 0,02$ . \*\* Diferença estatística com relação aos grupos controle  $p < 0,0003$ . Barra: erro padrão.

#### 1.7.1.5 *Open field*

Os resultados do teste de *open field* indicaram que os animais pertencentes ao grupo de lesão leve ( $n=6$ ) apresentaram diferença significativa ( $5988 \pm 486$ , centímetros) em relação ao grupo controle ( $3946 \pm 458$  centímetros) na avaliação da distância percorrida ( $p=0,003$ ), conforme evidenciado na Figura 5.

Por outro lado, os demais grupos estudados não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Os animais do grupo de lesão moderada ( $n=5$ ) apresentaram uma distância percorrida de aproximadamente 4900 centímetros ( $\pm 461$ ), enquanto os animais do grupo de lesão grave ( $n=5$ ) apresentaram uma distância de 4100 centímetros ( $\pm 203$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre esses grupos e o grupo controle.

Figura 5 - Distância percorrida

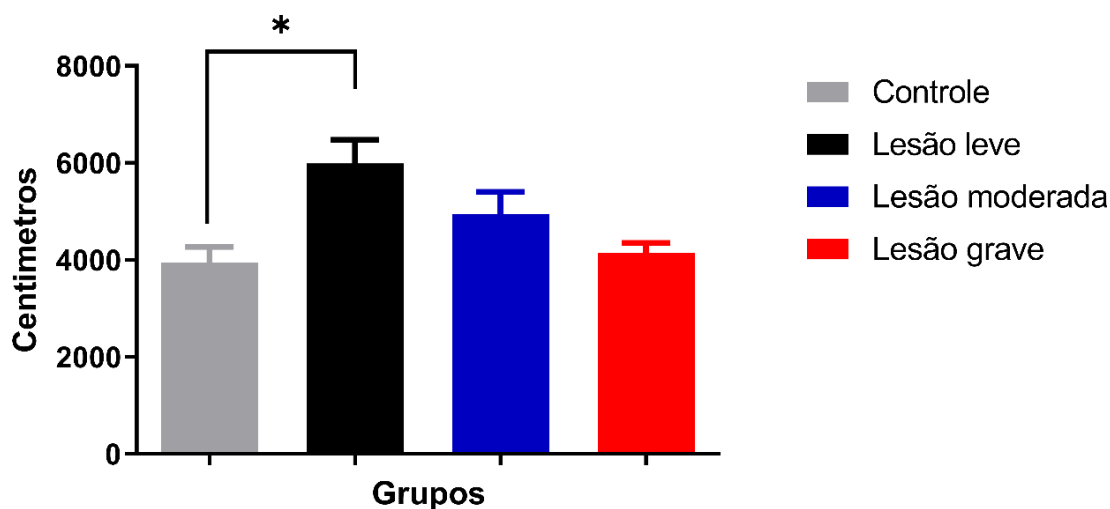


Figura 5 - Teste distância total via *OpenField*. Avaliação da distância máxima alcançada após 8 semanas de estudo entre os grupos controle, lesão leve, moderada e grave. Nota-se diferença estatística entre os grupos grupo lesão leve e lesão controle. \* Diferença estatística entre os grupos submetidos a lesão com relação ao grupo controle  $P < 0,003$ .

#### 1.7.1.6 Apoio bípede

A análise comportamental do teste de apoio bípede revelou que os animais submetidos aos protocolos de lesão medular apresentaram um desempenho significativamente inferior em comparação ao grupo controle. O grupo controle apresentou uma média de 25 ( $\pm 1$ ) apoios bípedes, contra uma média de 6 ( $\pm 3$ ,  $p = 0,03$ ) apoios bípedes do grupo lesão leve, 6 ( $\pm 3$ ,  $p = 0,02$ ) do grupo lesão moderada e, por fim, com os piores desempenhos os animais do grupo lesão grave os quais não realizaram nenhum evento ( $p = 0,0001$ ) apoio. Assim, todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle conforme evidenciado na Fig. 6.

Figura 6 - Apoio bípede

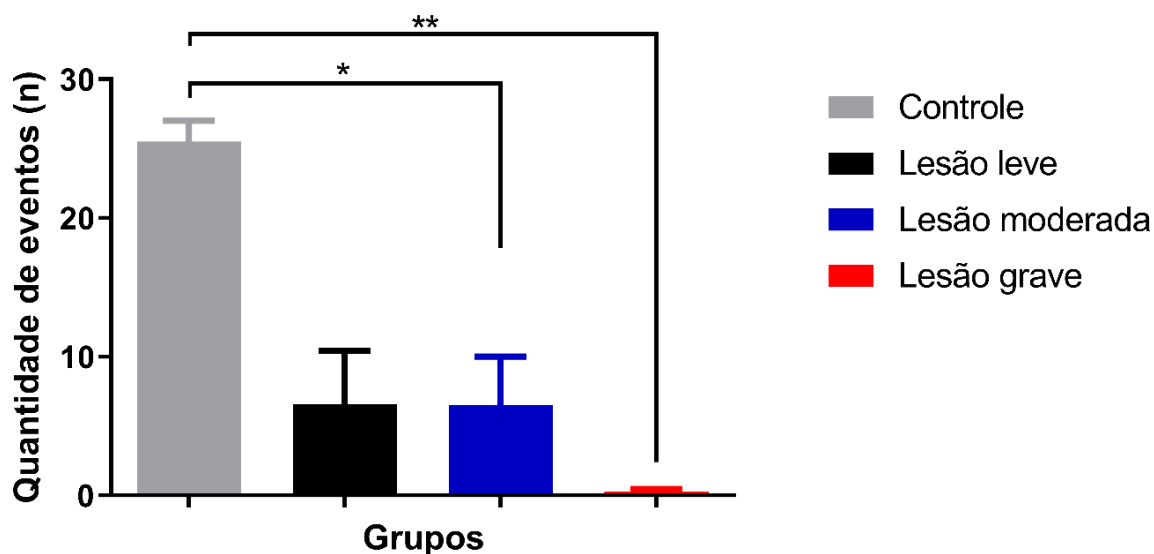


Figura 6 - Contagem de apoio bípede após 8 semanas de observações. Nota-se diferença estatística significativa entre os grupos lesão leve, moderada e grave contra o grupo controle. \* Diferença estatística com relação ao grupo controle  $p < 0,05$ . \*\* Diferença estatística com relação aos grupos controle  $p < 0,0001$ .

## 1.7.2 Resultados histológicos

### 1.7.2.1 Caracterização da lesão

A análise histológica permitiu a observação dos danos teciduais, causados em cada um dos parâmetros de lesão, tanto acima, no epicentro, quanto abaixo e acima do ponto de impacto. Inicialmente, utilizando a coloração com hematoxilina e eosina, foram observadas alterações teciduais gerais. Ao analisar os cortes histológicos no sentido cranial-caudal, foi possível notar que todos os animais lesados apresentaram alterações nos diâmetros do canal endocéfálico (asteriscos), localizados logo acima do epicentro da lesão. A partir daí, houve progressiva perda morfológica do órgão, somada a outras alterações teciduais (Fig.7).

No epicentro da lesão, os animais dos grupos lesão leve e moderada apresentaram perda parcial da citoarquitetura medular, morfologia e células, com focos de infiltrado celular (setas). De forma mais pronunciada e como esperado, os animais do grupo lesão grave apresentaram danos mais graves com perda total da citoarquitetura e morfologia medular, somados a uma expressiva perda celular em toda

a área afetada pela lesão. De forma contrária, não foram observados danos teciduais nos animais do grupo controle (Fig.7).

Figura 7 - Processamento histológico

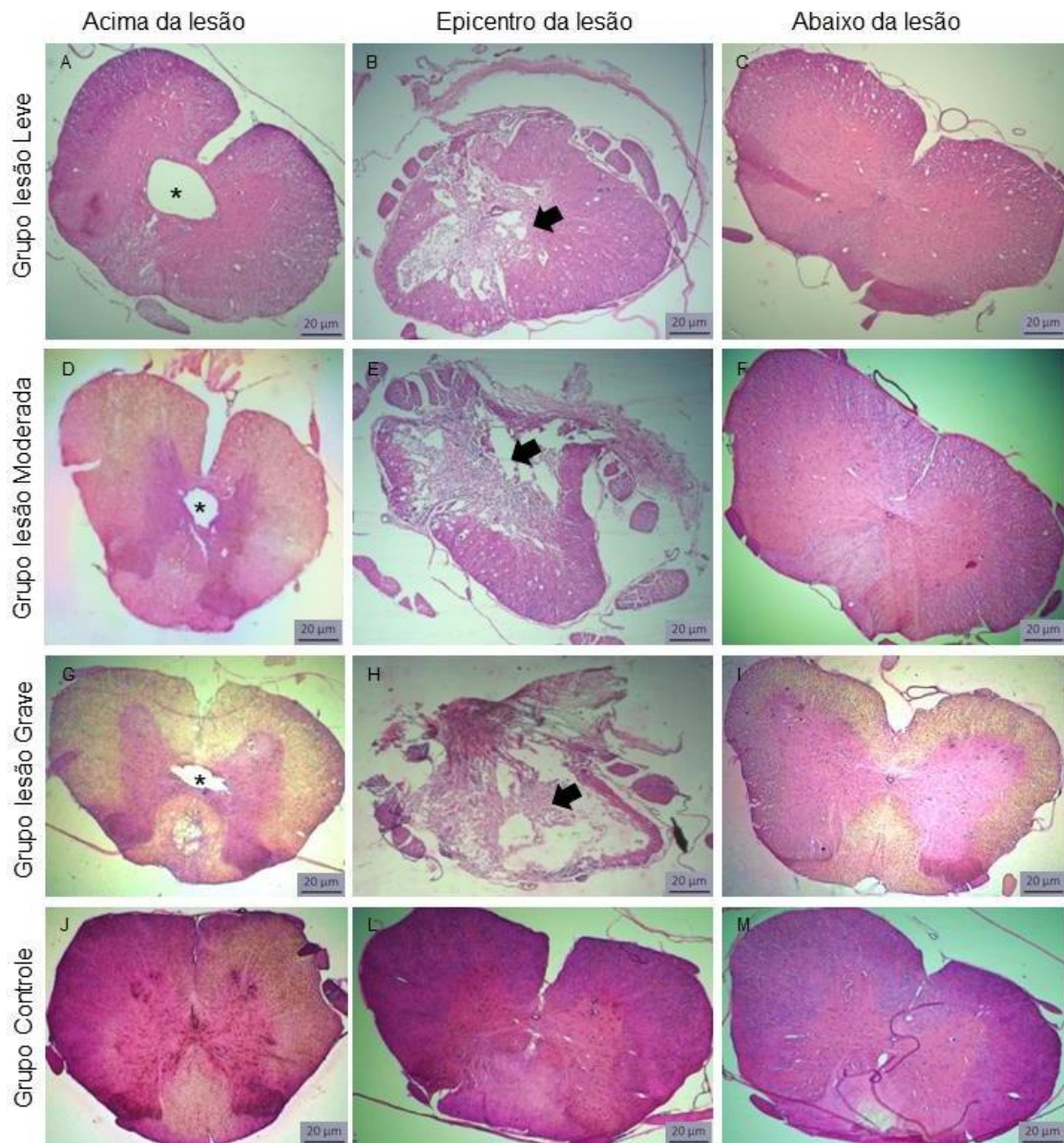


Figura 7 - Processamento histológico da medula espinhal. Coloração Hematoxilina e Heosina. Em A, B e C é observado o processamento histológico da medula de um animal do grupo Lesão leve, nos pontos acima da lesão, no epicentro da lesão e abaixo da lesão, respectivamente. Nota-se em A alteração no canal endimário (asterisco), em B um infiltrado celular com perda parcial da citoarquitetura do órgão (seta) e em C poucas alterações do tecido. Em D, E e F é observado o processamento histológico da medula de um animal do grupo lesão moderada, nos pontos acima da lesão, no epicentro da lesão e abaixo da lesão, respectivamente. Em G, H e I é observado o processamento histológico da medula de um animal do grupo lesão grave, nos pontos acima da lesão, no epicentro da lesão e abaixo da lesão, respectivamente. Nota-se em G, alteração no diâmetro do canal endimário (asterisco), em H completa destruição da secção transversal do órgão indicado grande severidade (seta) e em I poucas alterações celulares. Em J, L e M é observado o processamento da medula de um animal do grupo controle. Não são evidenciados quaisquer tipos de alterações. Barra de escala: 20µm.

### 1.7.2.2 Imunofluorescência

A análise morfológica não-quantitativa das lâminas coradas com anticorpos anti-NeuN permitiu revelar danos teciduais envolvendo todos os grupos de animais lesados. Todos os grupos submetidos à lesão medular apresentaram evidências de alterações morfológicas caracterizadas por aumento do tamanho do corpo celular, deslocamento periférico do núcleo e formação de vacúolo na região perinuclear, cujas características sugerem o processo de degeneração walleriana, indicativos de denervação, ou seja, interrupção de vias de projeção neuronal. Contudo, não foram observados quaisquer tipos de alterações morfológicas nos animais do grupo controle. (Fig.8).

Figura 8 - Processamento Histológico

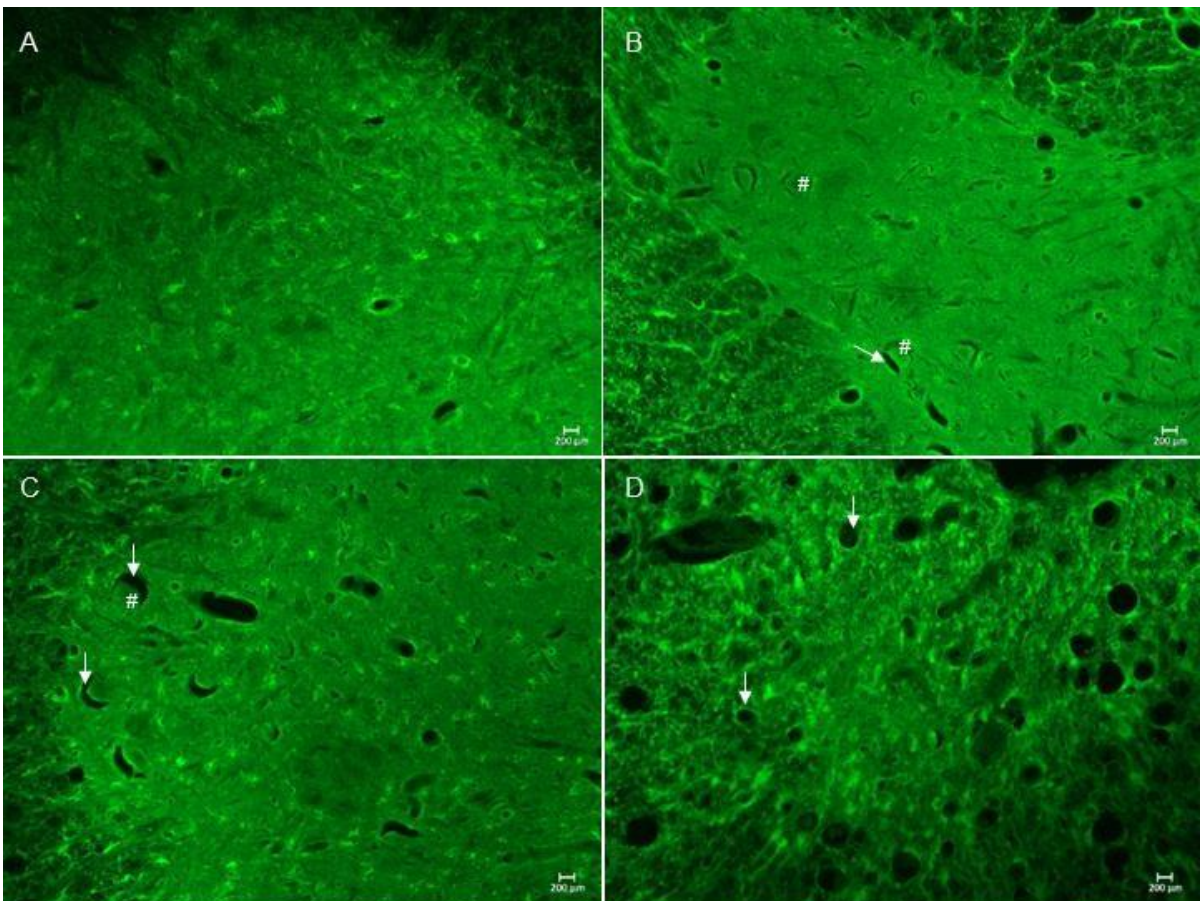


Figura 8 – Análise morfológica de neurônios NeuN positivos da região anterior do corno medular. A- Grupo controle. Nota-se núcleo bem delimitado e central ao citoplasma, ausência de focos de lesão e B- Grupo lesão leve. C- Grupo lesão moderada e D- Grupo lesão grave. Nota-se núcleo em com tendência na região periférica (#). Presença de vácuo células, refletindo a presença de focos de lesão da degeneração Walleriana (setas). Barra de escala 200µm.

## 1.8 Desenvolvimento do estimulador implantável

O desenvolvimento do estimulador contou com três fases de desenvolvimento: a primeira realizada toda em ambiente virtual; a segunda com implementação em bancada e, por último, testes de segurança em animais.

### 1.8.1 Desenvolvimento do estimulador em ambiente virtual

Para o desenvolvimento do sistema de estimulação foram realizadas simulações em ambiente virtual via Proteus®, a fim de mensurar a viabilidade desse sistema para futuros testes *In Vivo*.

Após o desenvolvimento do esquema elétrico básico, o mesmo foi testado utilizando-se um algoritmo simples responsável por fazer piscar um led virtual (D1). Desta forma, confirmou-se que o sistema virtual criado conseguiu executar de forma funcional o programa com a possibilidade de simulação da execução de algoritmos (Fig. 9).

Figura 9 - Esquema básico do circuito

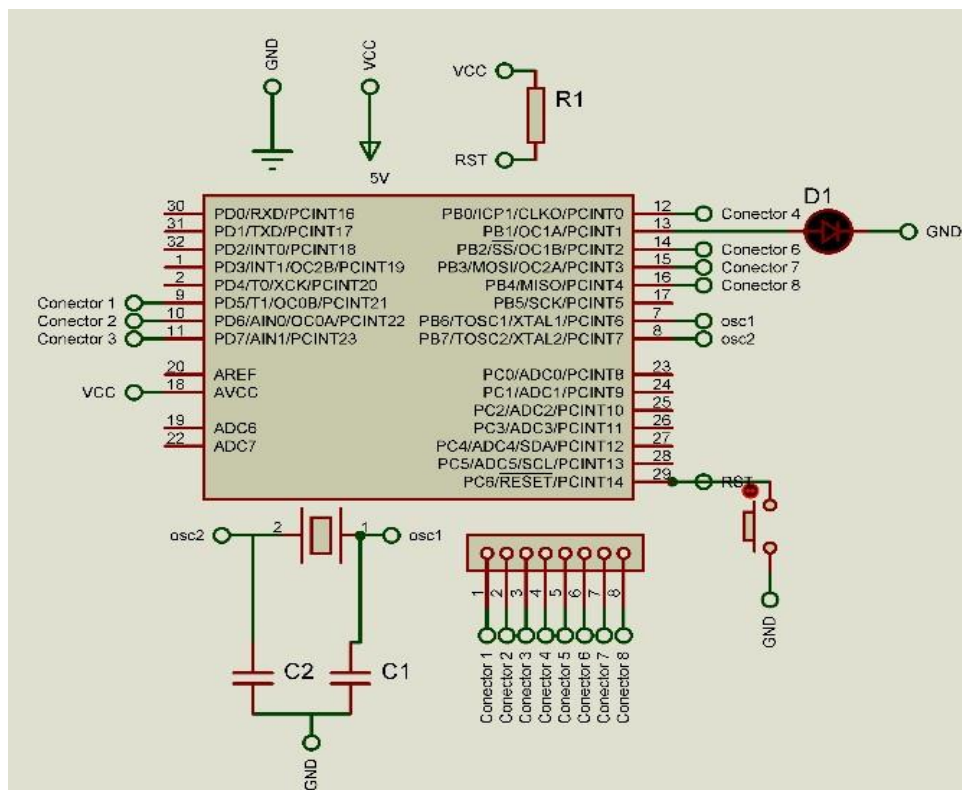




Figura 9 - Esquema básico do chip utilizado para os testes virtuais de viabilidade. Nota-se na porta lógica 13 a ligação de um LED virtual para visualizar a efetivação da estimulação elétrica. Osc 1 e 2, cristais osciladores para o clock do sistema ligados em conjuntos com capacitores de desacoplamento. RST botão de ativação do circuito, representando o *Red switch*.

### 1.8.2 Desenvolvimento do estimulador em bancada

Após a realização de experimentos em ambiente virtual, iniciou-se o desenvolvimento do algoritmo responsável pela ativação do circuito e entrega do estímulo elétrico aos animais. Com este propósito, um programa foi criado com o objetivo de modular a intensidade, a frequência e a largura de pulso da saída elétrica. Considerando-se que a porta do chip utilizado tem características digitais, que por padrão deve entregar apenas 0 volts (para nível lógico baixo) ou 5 volts (para nível lógico alto), o que é diferente dos 100 mV com onda quadrada necessários para uma estimulação adequada, foi necessário implementar a técnica de Modulação por Largura de Pulso (*PWM - Pulse Width Modulation*) em conjunto com um divisor resistivo. Estes componentes foram responsáveis por modular a tensão de saída da porta digital, garantindo também o formato de onda desejado por meio da manipulação da ativação e desativação do microcontrolador. A partir dessa metodologia, foi verificado que tanto o circuito quanto o algoritmo desenvolvido estavam adequados aos propósitos do projeto, confirmando sua viabilidade e sua estabilidade do ponto de vista elétrico, conforme mostrado na Figura 10.

Outro ponto avaliado foi a viabilidade do sistema de alimentação do circuito. Esse foi composto, em um primeiro momento, por duas baterias do tipo Sony® CR2032 de 3 Volts e 220mAh cada, ligadas em série e fornecendo 6 volts de tensão ao circuito. Para garantir a viabilidade da bateria, primeiro foi criado um circuito virtual composto por resistências elétricas da ordem de 50KΩ. Conforme a equação de Ohm ( $U = R \cdot I$ ), verificou-se que o sistema conseguiria fornecer energia por um período equivalente a 60 dias, respeitando o tempo de estimulação de 30 minutos por dia, até o fim do estudo. Com isso foi verificado que a abordagem adotada seria adequada ao propósito do trabalho.

Tendo confirmado as etapas anteriores, iniciou-se o desenvolvimento do *design* do estimulador, o qual foi composto por três módulos separados: o circuito eletrônico, contendo o microcontrolador e os componentes eletrônicos; o circuito contendo a bateria e, por fim, os *arrays* de estimulação.

Figura 10 - Teste bancada

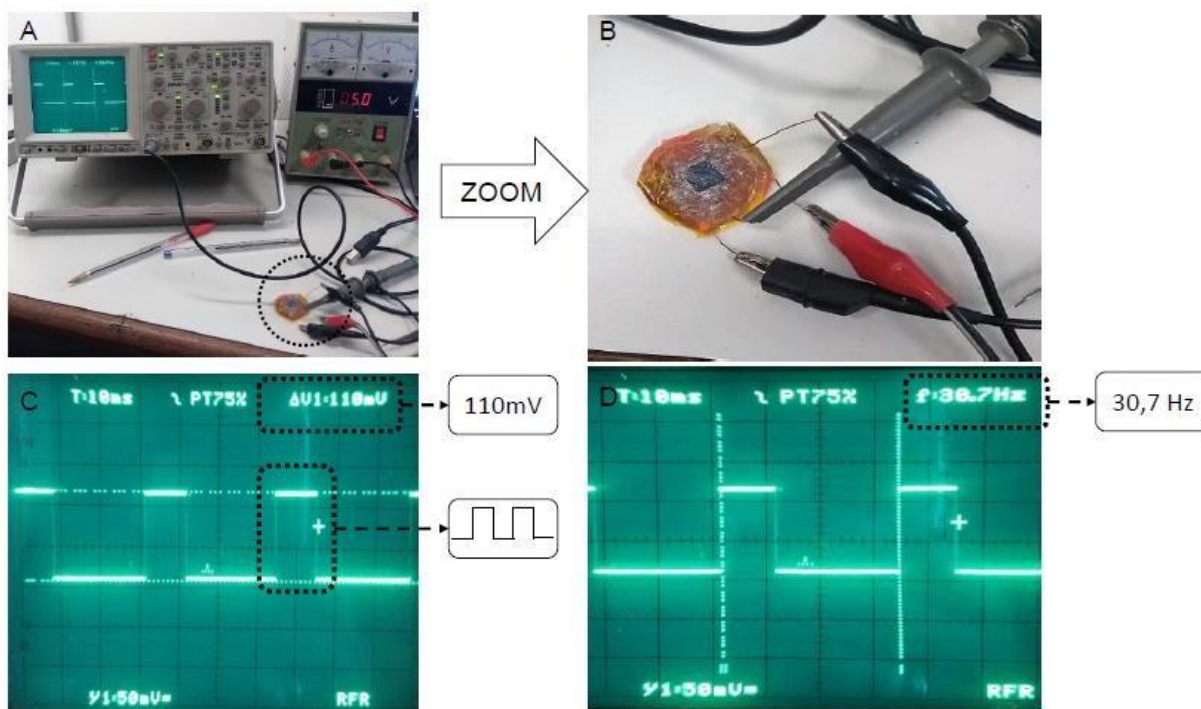


Figura 10 - A-Fotografia da bancada de testes. A- Bancada de testes. Nota-se a presença da fonte de alimentação configurada em 5v, alimentando o dispositivo de estimulação elétrica medular e o osciloscópio, registrando o sinal proveniente do dispositivo. B-Fotografia do dispositivo de estimulação. Nota-se a semelhança com o modelo de simulação em ambiente virtual. C-Formação de onda quadrada com tensão de pico de aproximadamente 100mV. Por análise do formato de onda, nota-se ausência de interferentes elétricos indesejáveis. D-Formação de onda quadrada com frequência de 30,7Hz, conforme proposto.

O circuito eletrônico e as baterias foram construídos com um formato circular, ambos com 20 mm de diâmetro total, 0,8 mm de altura para o circuito contendo o microcontrolador e 6 mm de altura no circuito contendo a bateria, (Fig. 11 e 13). O *array* estimulador foi concebido em um formato retangular, cuja extremidade distal tinha um formato de semicírculo, com pontos de estimulação circulares interligados às suas respectivas polaridades (Fig. 13-C).

Figura 11 - Dimensões dos componentes

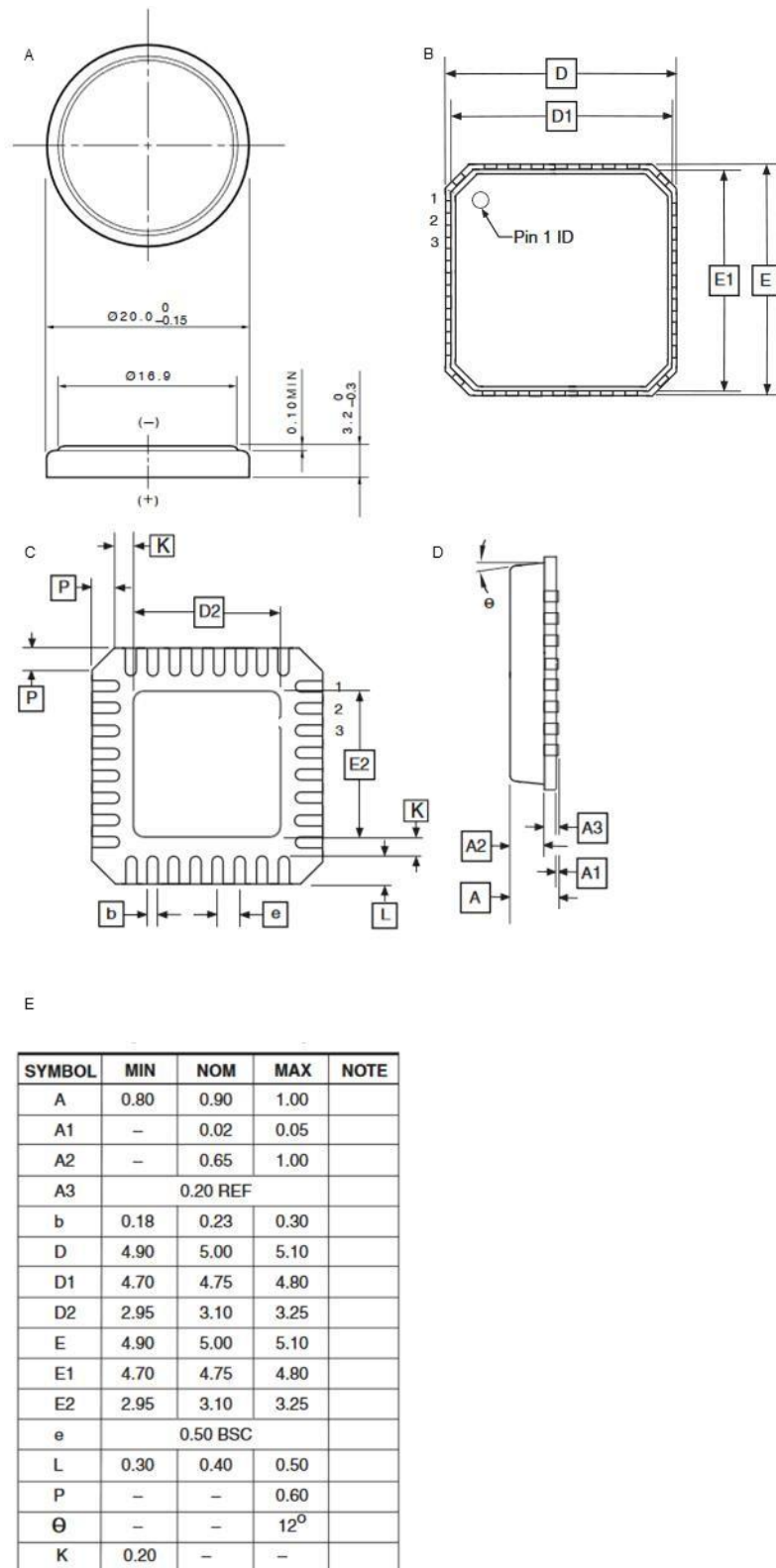


Figura 11 - Esquemático das dimensões dos componentes principais do estimulador. Em A observa-se a vista frontal/superior e lateral com as dimensões da bateria utilizada como fonte de energia do estimulador. Em B, C e D as vistas frontal/superior, frontal/inferior e lateral do chip principal. Em E, tabela referencial com as devidas dimensões de cada elemento do chip principal. Unidades em milímetros (mm).

A seguir, iniciou-se o processo de confecção da placa principal e do eletrodo de estimulação via técnica de fotolitografia, a partir do projeto nos ambientes AutoDesk® Inventor (versão 2020) e Proteus® (versão 8). Para tanto, foi utilizada como substrato uma folha de Poli-imida cobreada, cujas etapas são resumidas e mostradas na figura 12 e seu resultado na Fig.13.

Figura 12 - Fotolitografia da placa principal

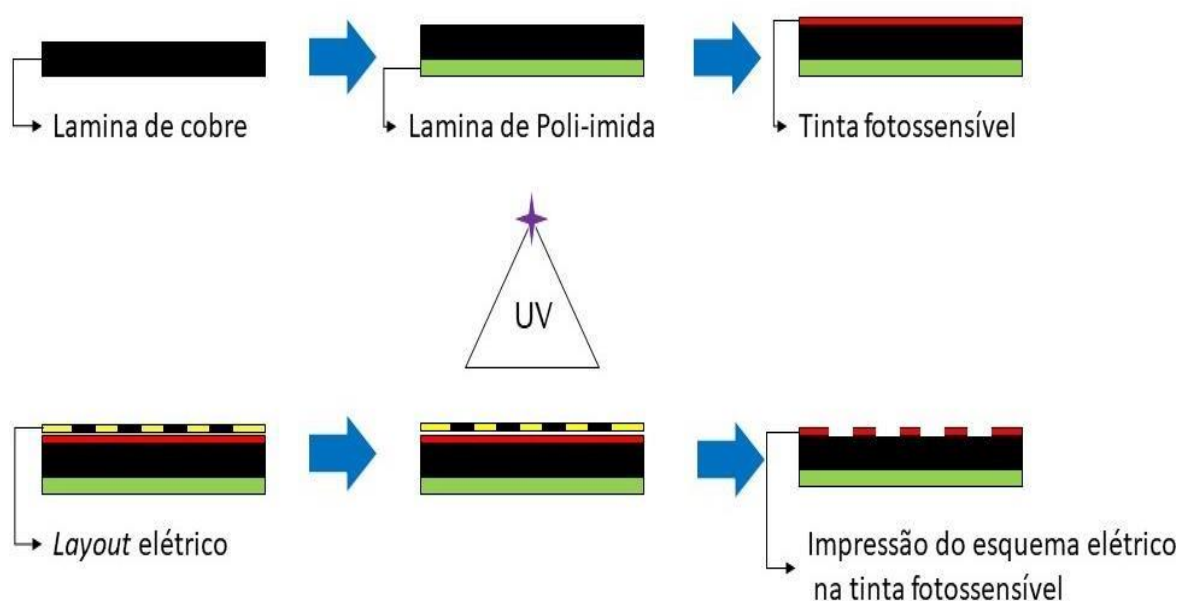


Figura 12 - Reprodução simplificada do processo de impressão do circuito eletrônico principal, circuito da bateria e do eletrodo de estimulação em folha de Poli-imida cobreada via técnica de fotolitografia. UV=Luz ultravioleta.

Com relação às dimensões do estimulador, essas foram adaptadas seguindo o modelo utilizado por Gad et al. (2013), sendo, então, confeccionadas com largura de 2,5mm, comprimento total de 1,5cm e 100 $\mu$ m de espessura com os pontos de estimulação sendo de formato circular com diâmetro de 0,5mm (Fig. 13-C).

Em seguida, os componentes eletrônicos foram devidamente soldados na placa principal e submetidos aos testes em bancada, cujo objetivo foi verificar se o funcionamento da parte elétrica e lógica atendiam aos requisitos projetados.

Figura 13 - Confeção da placa principal

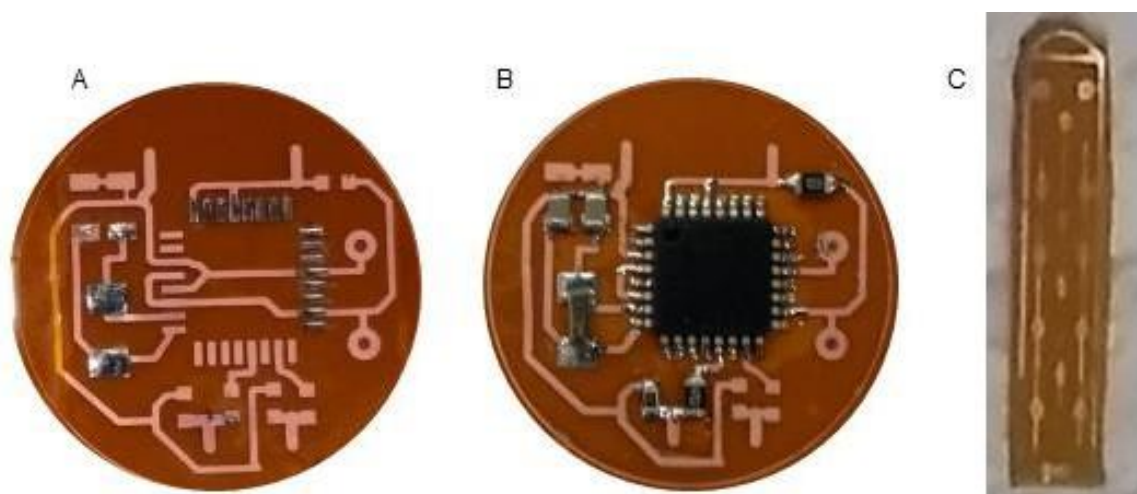


Figura 13 - Confeção da placa principal de estimulação e do eletrodo de implante. A-Resultado final do processo de fotolitografia da placa principal de estimulação. B-Acomodação dos principais componentes eletrônicos na placa principal. C-Eletrodo de implante epidural.

A análise gráfica em osciloscópio revelou ondas consistentes com o planejado, quase em forma quadrática (Fig.10-C e D) e sem a presença de artefatos, seja na rampa de subida, seja na rampa de descida. Além disso, a análise de *Ripple* demonstrou onda estável, oscilando de forma mínima próximo aos pontos máximo e mínimo de tensão.

Com relação à tensão pico a pico, o valor alcançado foi de aproximadamente 100mV para uma carga de 50k $\Omega$  de resistência (Fig. 10-C). Ainda na análise gráfica de tensão foi observado fornecimento adequado e estável de energia pelas baterias, não tendo sido observadas quedas abruptas de tensão durante o período de análise, demonstrando, assim, a eficácia do sistema eletrônico e do sistema de alimentação.

No que se refere à frequência de oscilação, foi viabilizada a modulação do cristal oscilador, cuja faixa de operação está situada na ordem dos mega-hertz, a fim de ajustá-lo para uma frequência desejada de 30 Hz (conforme indicado na Figura 10-D), de acordo com o planejamento projetado.

Assim sendo, os resultados obtidos em ambiente de bancada foram condizentes com aqueles observados em simulações virtuais, atestando a estabilidade e confiabilidade do sistema projetado.

### 1.8.3 Testes de segurança *In Vivo*

#### 1.8.3.1 Evolução de peso

A evolução do peso corpóreo apresentou diferença estatística ( $p= 0,001$ ) devido a um aumento progressivo de peso em um dos animais. Esse aumento de peso se deu desde o início do estudo (293 gramas), apresentando uma taxa de crescimento mais expressiva nos primeiros cinco dias após os procedimentos cirúrgicos, seguido de uma evolução menos pronunciada e voltando a um aumento mais evidente entre os cinco últimos dias, alcançando um peso máximo de 427 gramas.

Já os demais animais apresentaram uma estabilização do peso corpóreo nos primeiros 15 dias após os implantes, seguido de uma leve perda de peso no vigésimo dia de estudo, progredindo para um ganho de peso nos últimos 10 dias. A partir desses resultados, foi possível observar uma diferença estatística entre os animais 1 e 3 entre o 15º e 25º dia de estudo (média 1=  $371 \pm 13$ ; média 2=  $290 \pm 3$ , respectivamente), conforme observado na Fig. 14.

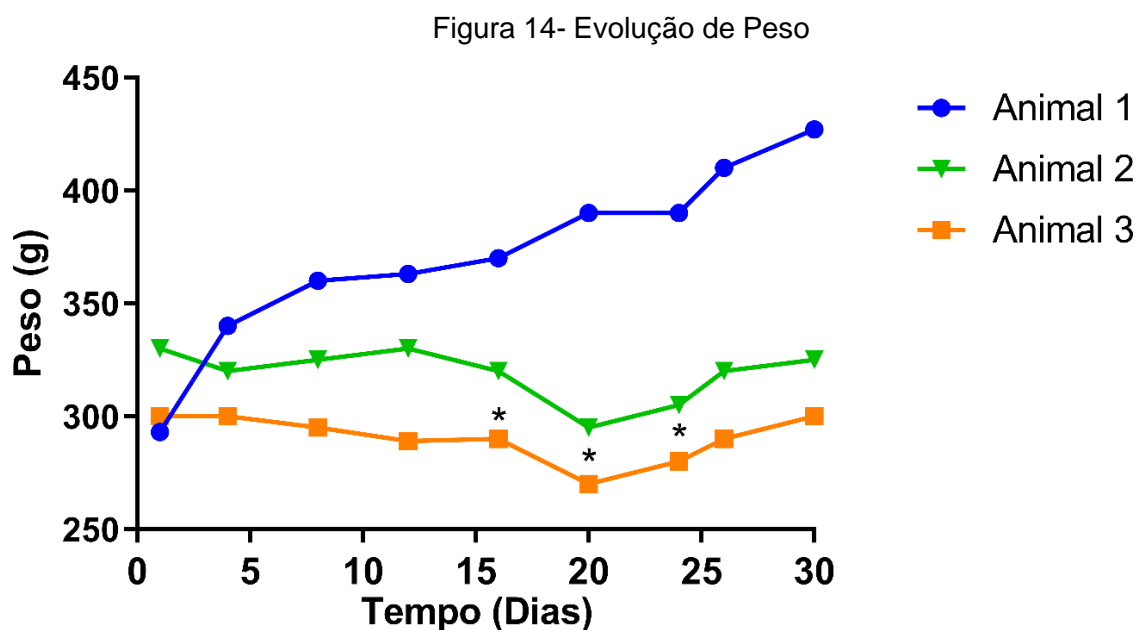


Figura 14 - Teste de segurança do dispositivo de implante. Evolução de Peso ao longo de 30 dias de observação entre os animais 1, 2 e 3. Nota-se diferença estatística entre os animais 1 e 3 entre o 15º e 25º dia de observação. Diferença estatística  $P < 0,0001$ .

## 1.8.4 Análise comportamental

### 1.8.4.1 Procedimento de implante e índice BBB

Os animais usados para os testes *in vivo* do sistema de estimulação foram seguidos por 30 dias, a fim de averiguar possíveis intolerâncias, reações inflamatórias, comportamento doloroso ou impedimento geral de mobilidade secundários ao implante do sistema em si e não à estimulação elétrica.

A evolução da escala BBB ao longo dos 30 dias de observação pós-implante revelou movimentação normal e inalterada dos animais implantados (Fig.16), sem qualquer prejuízo funcional (Fig.15). Ademais, não se observa qualquer comportamento doloroso consequente ao implante.

Figura 15 - Índice BBB

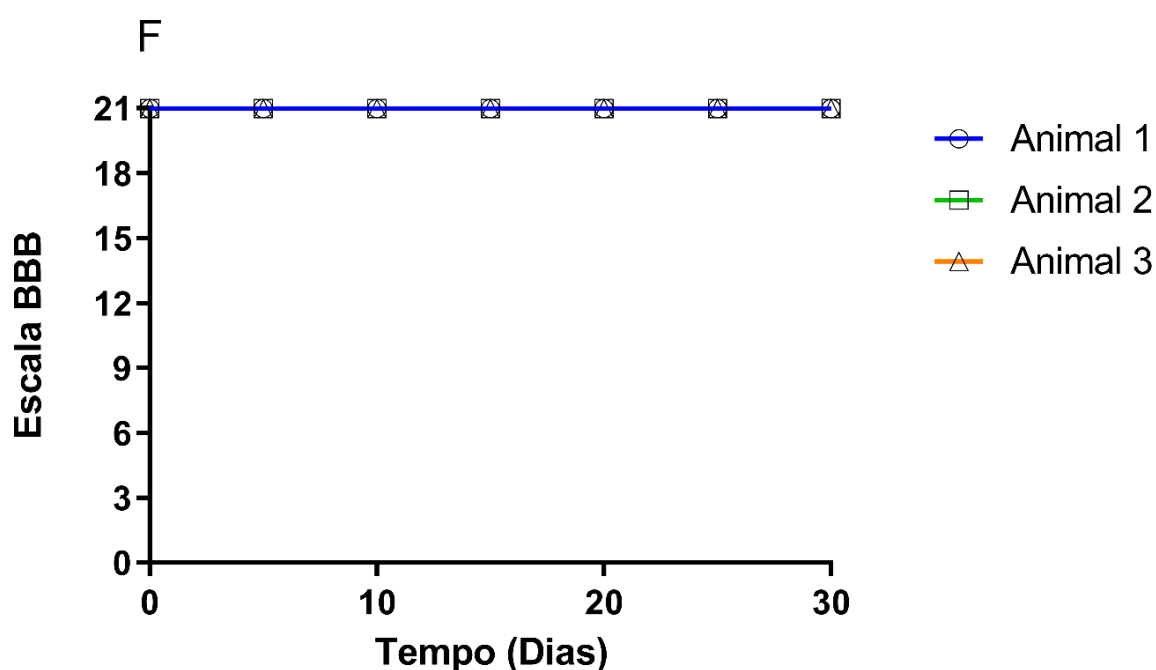


Figura 15 - Evolução do índice BBB ao longo de 30 dias de observação entre os animais 1, 2 e 3. Nota-se ausência de diferença estatística significativa - média =  $21 \pm 0$  (traçado azul).

Figura 16 - Procedimento de implante

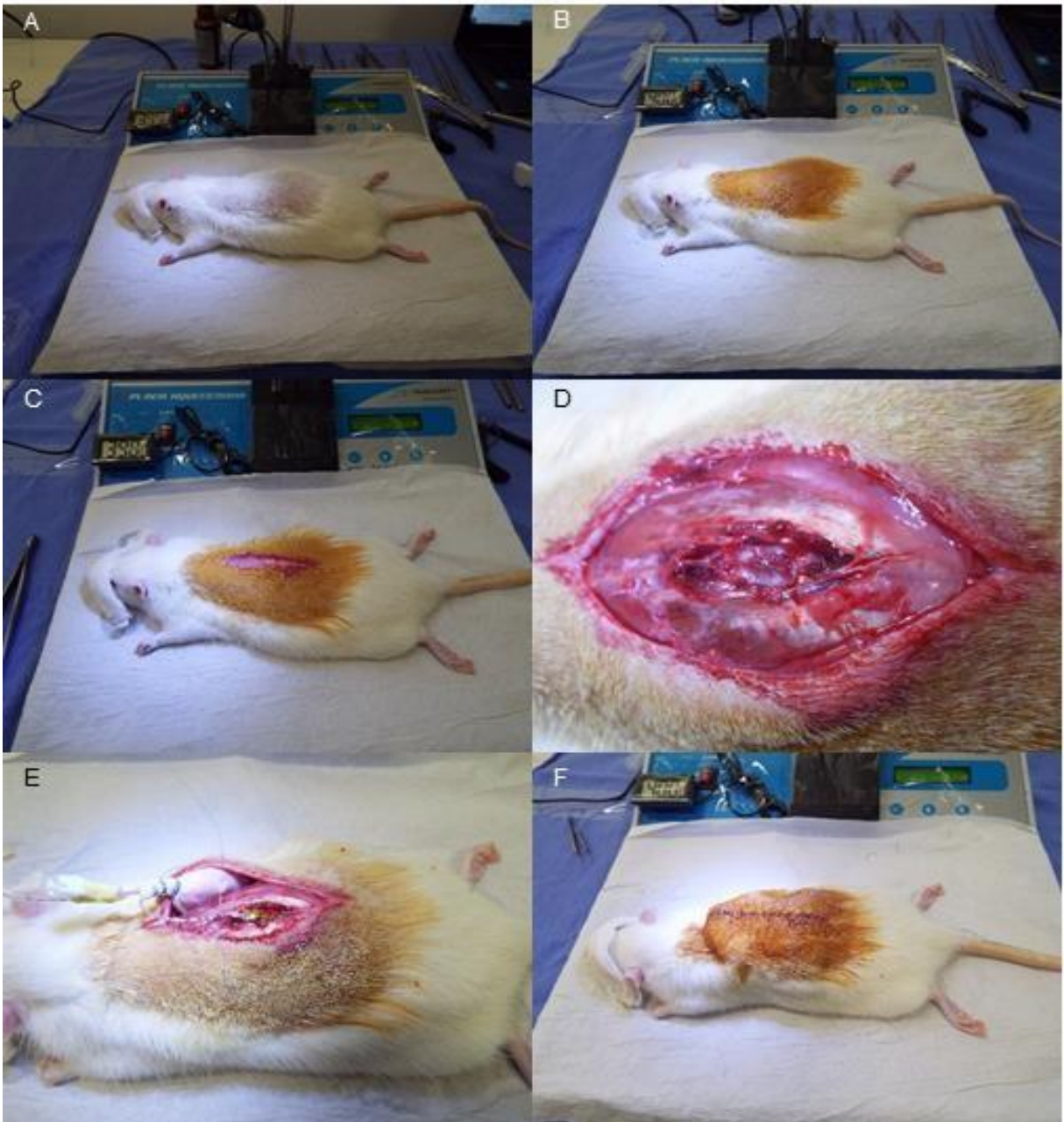


Figura 16 - Imagem demonstrando os passos principais do procedimento de implante do estimulador epidural. Em A acomodação do animal sobre a plataforma aquecida. Em B assepsia do local da incisão. Em C incisão longitudinal do tecido cutâneo. Em D exposição da lâmina da vertebra alvo para a realização do procedimento de laminectomia. Em E implante epidural e acomodação lateral dos componentes do estimulador. Em F sutura final e conclusão do procedimento de implante.



#### 1.8.4.2 Análise de distância percorrida

A análise via *OpenField* revelou distância máxima geral relativamente menor no período pós-implante ( $997\text{cm} \pm 163$ ), em relação às mensurações pré-implante ( $1352 \pm 161$ , centímetros), o que, todavia, não foi estatisticamente significativo ( $p=0,135$ ) Fig.17.

Figura 17 - Distância percorrida

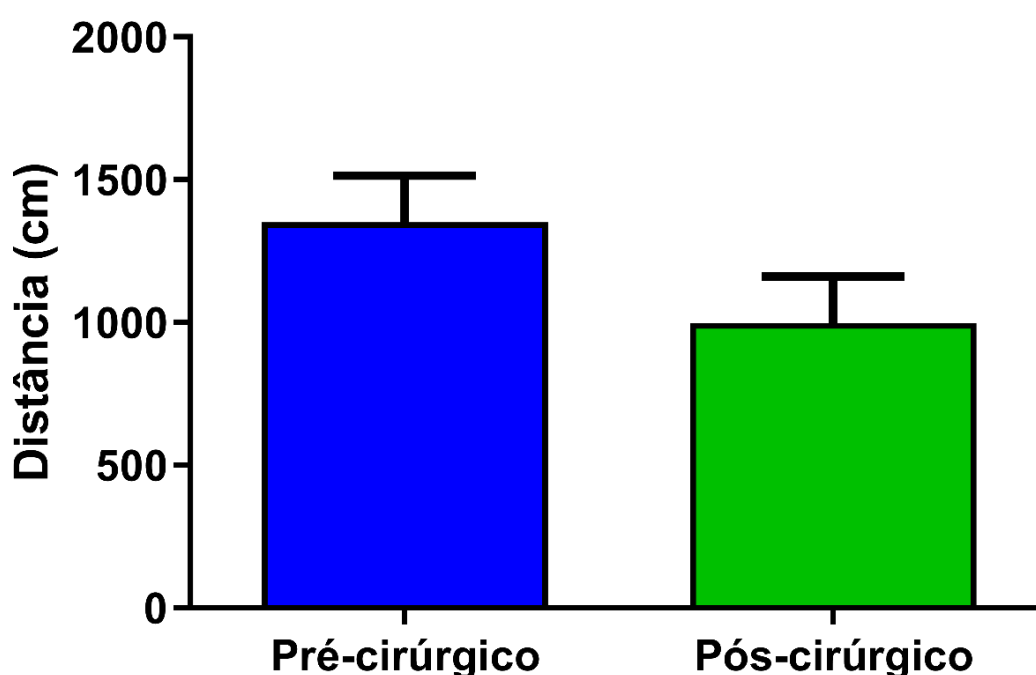


Figura 17 - Teste de segurança do dispositivo de implante. A – Deslocamento geral em centímetros por segundo dos animais 1, 2 e 3 antes e após o implante ao longo de 30 dias de observação. Nota-se ausência de diferença estatística.

#### 1.8.4.3 Análise de deslocamento geral

Quanto à velocidade média de deslocamento, essa foi discretamentemenor no período pós-implante, em relação ao pré-implante (média  $16 \pm 2$ , média  $22 \pm 2$  respectivamente), embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0873$ ) Fig. 18.

Figura 18 - Velocidade máxima

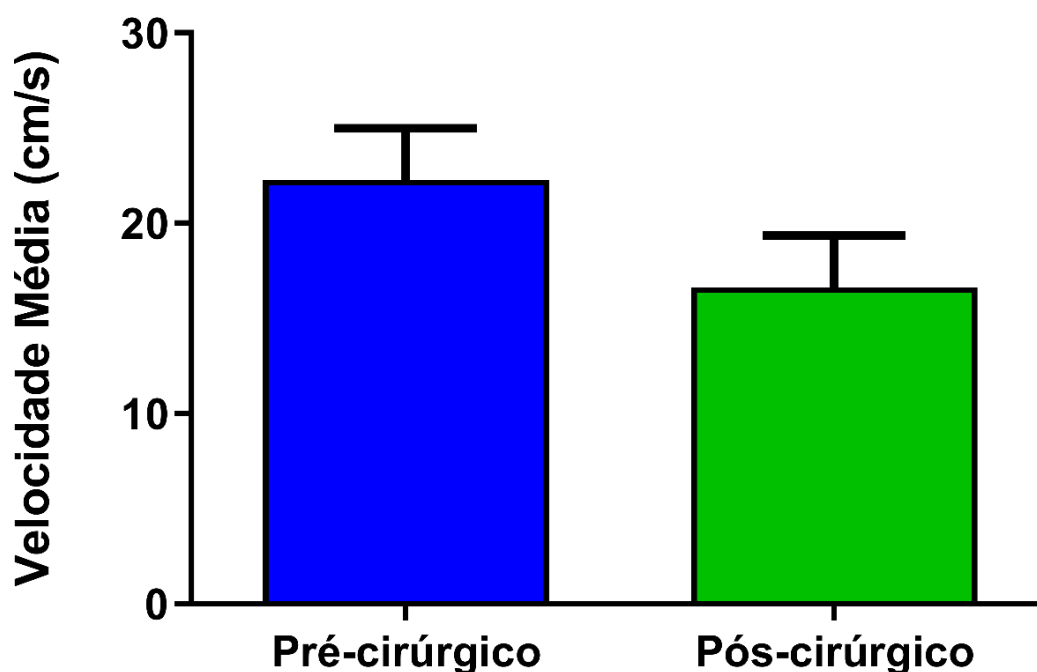


Figura 18 - Teste de segurança do dispositivo de implante. Velocidade geral de deslocamento em centímetros por segundo dos animais 1,2 e 3 antes e após o implante ao longo de 30 dias de observação. Nota-se ausência de diferença estatística.

### 1.8.5 Melhorias implementadas

Durante o processo de desenvolvimento e aplicação do primeiro protótipo do estimulador elétrico foram identificados possíveis pontos de aprimoramento em diversos aspectos. Isso, tanto no que se refere ao próprio dispositivo quanto às facilidades de implantação, configuração e de remoção de componentes eletrônicos cujo intuito foi melhorar a qualidade e efetividade do dispositivo, bem como, otimizar seus recursos, em especial aqueles ligados à economia de energia.

A primeira versão do dispositivo consistia em três módulos distintos: o circuito eletrônico, o sistema de alimentação e os eletrodos de estimulação. No entanto, foi observado que essa abordagem apresentava desafios consideráveis em termos de construção, isolamento elétrico e implante. Para superar esses obstáculos foi realizada uma revisão do *layout* do dispositivo, resultando na transição de um conjunto de módulos separados para um sistema completamente integrado, conforme ilustrado na Figura 19. Através dessa nova concepção, foram observadas melhorias significativas na fabricação do dispositivo, incluindo reduzidas chances de falhas ou de ruídos devido à ausência de pontos de conexão, bem como, maior praticidade no

processo de implantação.

Figura 19 - Circuito elétrico integrado

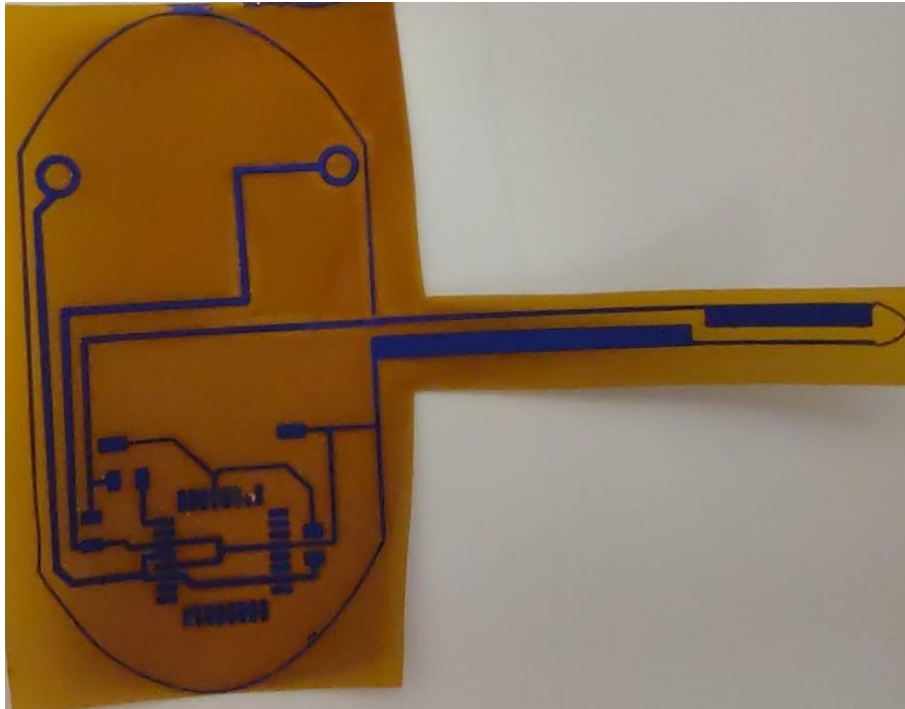


Figura 19 - Resultado da otimização e integração do Layout estimulador em apenas um módulo. Em marrom: substrato de Poliimida cobreada (cobre já corroído). Em azul: trilhas de cobre recobertas pelo *Dry Film* responsáveis pela interligação entre os pontos de solda dos componentes eletrônicos e entrega da estimulação elétrica.

Outro aspecto que demandou aprimoramento foi a utilização otimizada do sistema de alimentação, uma vez que na primeira versão do dispositivo este foi projetado para fornecer carga por cerca de 30 dias, a partir de duas baterias em série; enquanto a aplicação principal requeria um período de funcionamento de 60 dias. Assim, a partir da revisão dos componentes internos ao chip foi identificado que a sua arquitetura interna incluía diversos elementos eletrônicos básicos a seu funcionamento, tais como: cristal oscilador e resistores (conforme ilustrado na Figura 20), mas, que permaneciam inativos em sua forma original. Entretanto, através da manipulação direta de registradores foi possível a ativação desses componentes e, assim, a eliminação daqueles de origem externa que haviam sido utilizados na primeira versão do dispositivo. Essa redução de componentes externos conferiu ao sistema maior tempo de funcionamento, utilizando a mesma fonte de energia. A figura 21 traza comparação entre os componentes eletrônicos da primeira e da segunda versão.

Figura 20 – Diagrama de blocos do microcontrolador

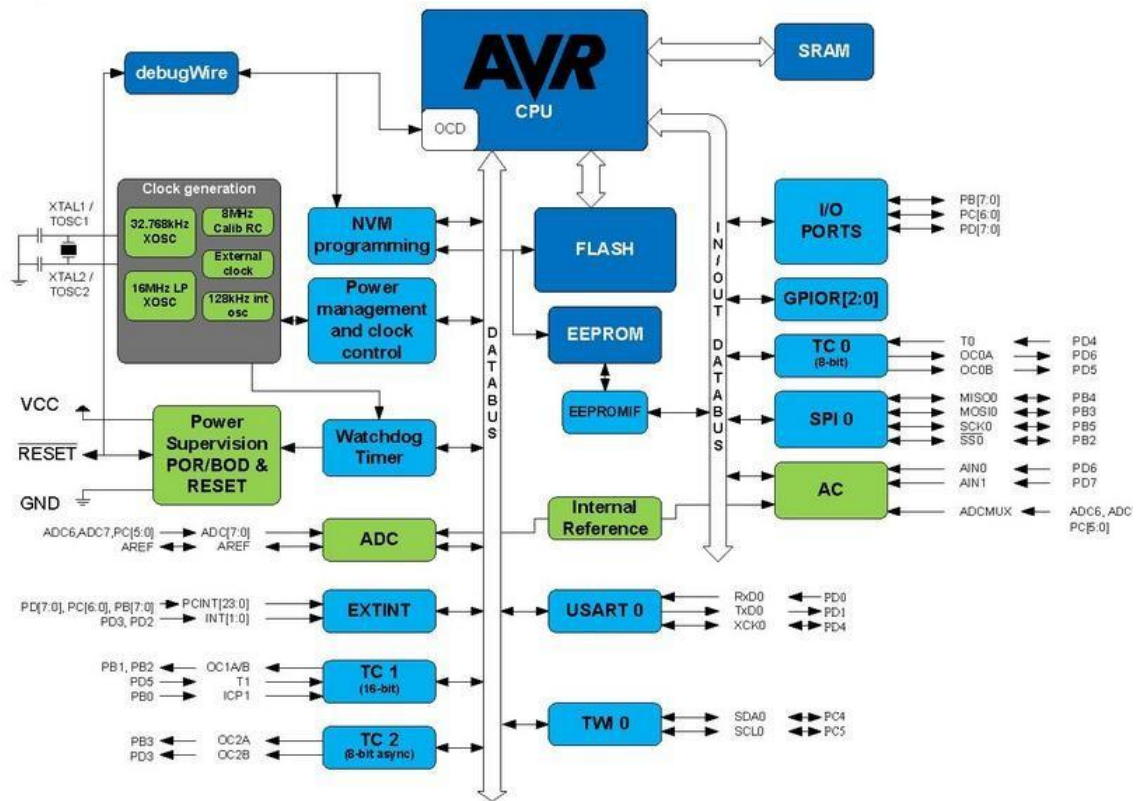


Figura 20 – Diagrama de blocos dos principais componentes internos do chip principal utilizado no desenvolvimento do estimulador. Nota-se a presença dos cristais osciladores responsáveis pelo sistema de *clock* do *chip*, assim como do sistema de gerenciamento de energia. Fonte: Atmel®.

Figura 21 - Comparação de versões do estimulador

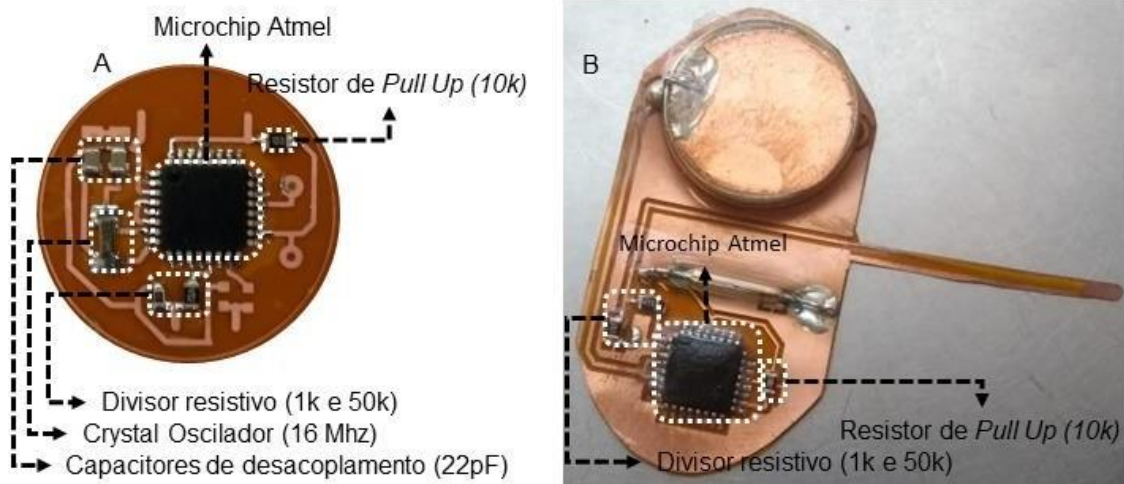


Figura 21 - Comparação das versões do estimulador implantável. A imagem A apresenta a primeira versão do estimulador elétrico com todos os componentes eletrônicos externos soldados. Na imagem B observa-se a segunda versão do estimulador elétrico, já com o layout integrado, notando-se a ausência dos capacitores de desacoplamento e do cristal oscilador.

Além disso, por meio da manipulação do hardware também foi possível alterar a frequência de funcionamento do cristal oscilador de 16 MHz para o valor mínimo necessário, resultando em uma frequência final de operação de 32 KHz. Essa redução na frequência de operação também contribuiu significativamente para a economia de energia do sistema.

Diante dessas mudanças, o sistema ainda apresentava sensibilidade a quedas de tensão, o que era interpretado pelo hardware como uma forma de reinicialização, devido ao sistema de garantia de carga padrão intrínseco ao chip. No entanto, por meio da manipulação dos componentes internos da CPU, incluindo a ativação do cristal oscilador interno e a redução da sua frequência de trabalho, foi possível manipular o sistema de garantia de carga sem prejudicar o processo de estimulação como ilustrado na Figura 22.

Figura 22 – representação da tensão de funcionamento do chip

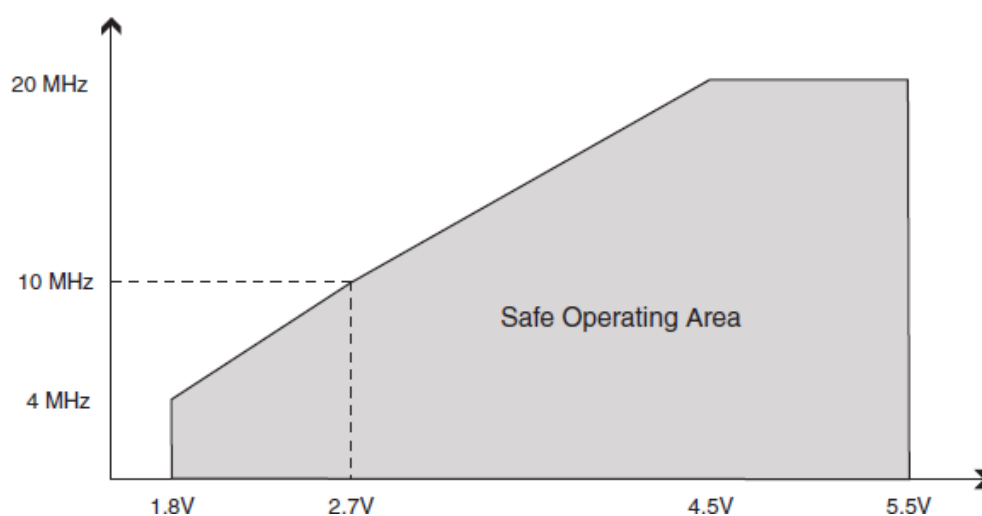


Figura 22 - Representação gráfica da tensão mínima exigida pelo chip principal para seu pleno funcionamento. Note que a tensão mínima possível é de 1.8 para uma frequência de clock de 4 MHz ou inferior. Fonte:Atmel®.

Além das mudanças de *hardware* mencionadas, foram feitas algumas alterações igualmente importantes de *software*. A análise detalhada do *datasheet* do microcontrolador revelou uma série de modos de operação que se concentram em reduzir o consumo de energia, principalmente durante os períodos de inatividade do sistema. As Figuras 23 e 24 apresentam um resumo desses modos de operação e suas respectivas economias de energia para o funcionamento pleno do sistema, os quais foram implementados na segunda versão do dispositivo.

Figura 23 - Tabela de registradores e modos de economia de energia

	Active Clock Domains					Oscillators			Wake-up Sources						Software BOD Disable
	clk <sub>CPU</sub>	clk <sub>FLASH</sub>	clk <sub>IO</sub>	clk <sub>ADC</sub>	clk <sub>ASY</sub>	Main Clock Source Enabled	Timer Oscillator Enabled	INT1, INTO and Pin Change	TWI Address Match	Timer2	SPM/EEPROM Ready	ADC	WDT	Other I/O	
Idle			X	X	X	X	X <sup>(2)</sup>	X	X	X	X	X	X	X	
ADC Noise Reduction				X	X	X	X <sup>(2)</sup>	X	X	X <sup>(2)</sup>	X	X	X		
Power-down								X	X				X		X
Power-save					X		X <sup>(2)</sup>	X	X	X			X		X
Standby <sup>(1)</sup>						X		X	X				X		X
Extended Standby					X <sup>(2)</sup>	X	X <sup>(2)</sup>	X	X	X			X		X

Figura 23 - Tabela dos principais registradores utilizados para alterações e otimizações do programa e do sistema de alimentação do estimulador implantável. Os registradores foram identificados e selecionados a partir da análise do datasheet do microcontrolador utilizado no dispositivo e seu uso permitiu a implementação de modos de operação de baixo consumo de energia. Fonte: Atmel®

Figura 24 - Relação consumo de energia, frequência e modos de economia

Symbol	Parameter	Condition	Min.	Typ. <sup>(2)</sup>	Max.	Units
I <sub>CC</sub>	Power Supply Current <sup>(1)</sup>	Active 1MHz, V <sub>CC</sub> = 2V		0.3	0.5	mA
		Active 4MHz, V <sub>CC</sub> = 3V		1.7	2.5	
		Active 8MHz, V <sub>CC</sub> = 5V		5.2	9	
		Idle 1MHz, V <sub>CC</sub> = 2V		0.04	0.15	
		Idle 4MHz, V <sub>CC</sub> = 3V		0.3	0.7	
		Idle 8MHz, V <sub>CC</sub> = 5V		1.2	2.7	
	Power-save mode <sup>(3)</sup>	32kHz TOSC enabled, V <sub>CC</sub> = 1.8V		0.8		µA
		32kHz TOSC enabled, V <sub>CC</sub> = 3V		0.9		
	Power-down mode <sup>(3)</sup>	WDT enabled, V <sub>CC</sub> = 3V		4.2	8	
		WDT disabled, V <sub>CC</sub> = 3V		0.1	2	

Figura 24 - Figura apresentando um resumo da relação entre o consumo de energia do chip principal, sua frequência de clock e os modos de economia de energia disponíveis. O consumo de energia é expresso em miliamperes (mA) e microamperes (µA) para o pleno funcionamento do sistema e os modos de economia de energia, respectivamente. Fonte: Atmel®

Por fim, as dimensões do sistema foram reduzidas por meio da eliminação de alguns componentes eletrônicos externos e de uma das baterias. Outra mudança importante foi uma nova abordagem em relação ao isolamento. Na primeira versão, o isolamento foi realizado por meio de aplicação manual de polivinilsiloxano, enquanto na segunda versão, o PDMS (dimetil polissiloxano) foi utilizado devido às suas melhores características de biocompatibilidade, isolamento elétrico e modo de aplicação. O PDMS é um composto líquido que apresenta rápida cura a uma temperatura adequada, proporcionando melhor aplicação, melhor isolamento elétrico

do dispositivo e maior biocompatibilidade. A aplicação do PDMS também resultou em menores dimensões do dispositivo, conforme ilustrado na Figura 25.

Figura 25 - Otimização de isolamento elétrico

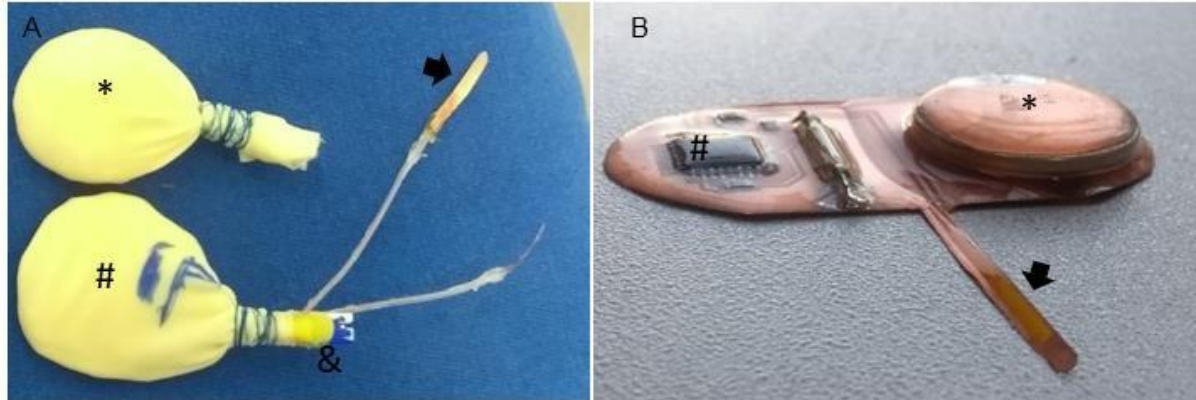


Figura 25 – Otimização do isolamento elétrico entre a primeira e a segunda versões do estimulador implantável. Na imagem A a primeira versão do dispositivo é mostrada com isolamento feito por polivinilsiloxano, que é dividido em três módulos: sistema de alimentação (\*), placa principal (#) e ponto de conexão intermódulos (&), além do estimulador (setas). Já na imagem B é apresentada a segunda versão do dispositivo, agora em layout integrado, com a bateria de alimentação (\*) e o microcontrolador (#) e o estimulador (seta).

## 1.9 Teste de eficiência da eletroestimulação epidural no modelo de lesão medular

### 1.9.1 Análises comportamentais

#### 1.9.1.1 Índice BBB

Os dois grupos de animais lesados, sem tratamento e tratados com estimulação epidural, apresentaram queda abrupta e importante do índice BBB, indo a 0 no momento imediatamente após o procedimento cirúrgico. Ambos se recuperaram lenta e progressivamente até a 8ª semana. No entanto, a recuperação do grupo submetido à estimulação foi significativamente mais expressiva ( $p < 0,05$ ) a partir da 5ª semana e até o final da 8ª, com relação ao grupo apenas lesado. Todavia, o pico da recuperação não chegou a atingir os níveis pré-lesão, permanecendo no valor máximo de 7 no grupo tratado (média=  $5 \pm 2$ ) com estimulação e 4 no grupo lesado (média=  $4 \pm 2$ ). O grupo controle não apresentou alterações no índice BBB e o grupo Implante mostrou pequena oscilação negativa entre a 1ª e a 3ª semana, todavia, com grande variabilidade (Fig. 26).

Figura 26 – Avaliação de recuperação motora BBB

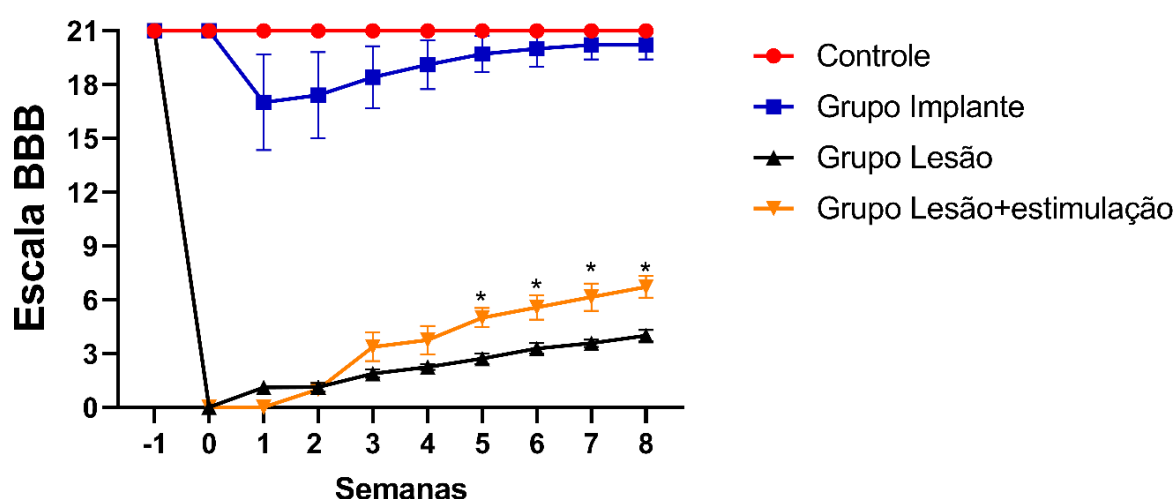


Figura 26 - Teste de gravidade da lesão medular: evolução do índice BBB ao longo de 8 semanas de observação entre os grupos controle, implante, lesão e lesão+estimulação. Observa-se uma evolução significativa no grupo lesão+estimulação a partir da terceira semana, alcançando um índice máximo de 7 pontos na escala BBB ao final das 8 semanas, seguido pelo Grupo lesão, que alcançou um índice máximo de 4 pontos. O Grupo implante apresentou um animal com alteração no índice BBB na primeira



semana, mas com tendência à normalidade até o final do estudo. Não foram observadas alterações significativas no índice BBB no Grupo controle. \* diferença estatística significativa entre o Grupo lesão e Grupo lesão+estimulação entre a 5ª e a 8ª semanas de estudo ( $p < 0,05$ ).

### 1.9.1.2 Evolução de peso corpóreo

A evolução do peso corporal dos animais observada e analisada neste estudo mostra que ambos os grupos submetidos à lesão apresentaram uma redução significativa de peso logo após os procedimentos cirúrgicos, atingindo seu valor mínimo na segunda semana do estudo (grupo lesão =  $268 \pm 6$  gramas; grupo estimulador =  $307 \pm 8$  gramas). A partir desse ponto, houve uma evolução positiva com um ganho de peso constante até o final do experimento e com diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Essa diferença permaneceu até o fim do estudo (média grupo controle =  $423 \pm 15$ , média grupo lesão =  $310 \pm 7$ ,  $p = 0,0001$  média grupo estimulação =  $338 \pm 8$ ,  $p = 0,02$ ). Assim, a análise isolada dos grupos submetidos à lesão também revelou diferença estatística entre ambos, com  $p = 0,002$  (Fig. 27).

No que se refere aos animais dos grupos controle e implante não foi observada diferença estatisticamente significativa. A análise gráfica dos resultados demonstrou que, ao longo de todo o período de estudo, ambos os grupos apresentaram ganho de peso constante e consistente (Fig. 27).

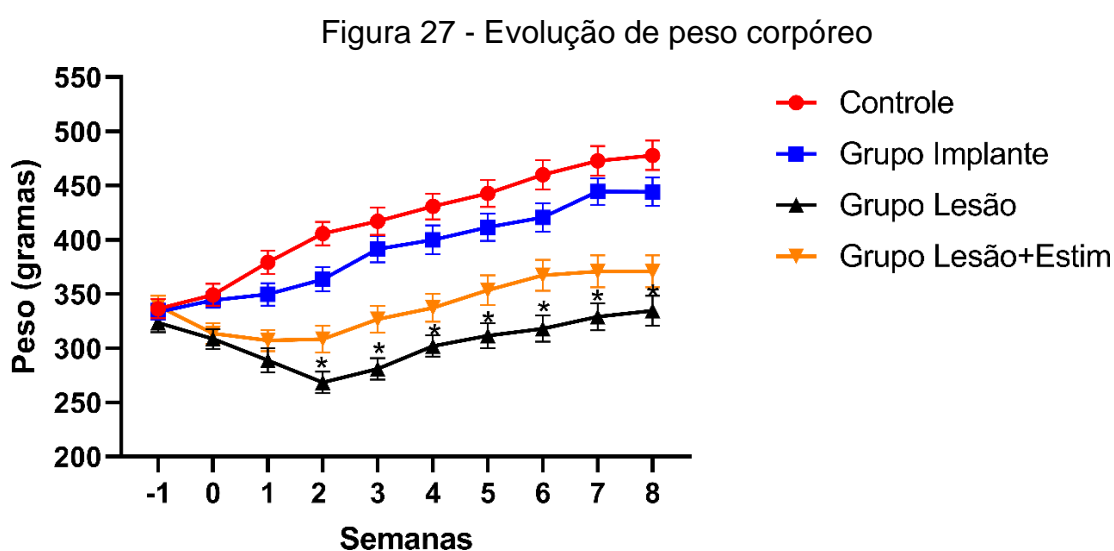


Figura 27 - Evolução de Peso ao longo de 8 semanas de duração do experimento, notando-se similaridade na perda de peso nos grupos lesão e lesão+estim até a 2ª, com ganho de peso idêntico, a partir de então até o fim do estudo. \* Diferença estatística entre grupos lesados e grupo controle  $P < 0,05$ .

## 1.9.1.3 Plano Inclinado

Os resultados obtidos indicam uma queda significativa no desempenho dos grupos de animais lesionados quando comparados ao grupo controle e a seus valores basais, com redução de  $85^\circ (\pm 1,7)$  para  $59^\circ (\pm 2,1)$  no grupo sem tratamento e de  $77^\circ (\pm 7,2)$  no grupo com tratamento. No entanto, a análise comparativa entre esses grupos revelou que aquele submetido à estimulação apresentou uma perda de desempenho menos acentuada em relação ao grupo controle. Além disso, os animais do grupo controle e implante não apresentaram mudanças significativas de desempenho no teste de plano inclinado nos momentos avaliados, conforme mostrado na Figura 28.

Figura 28 - Avaliação de plano inclinado

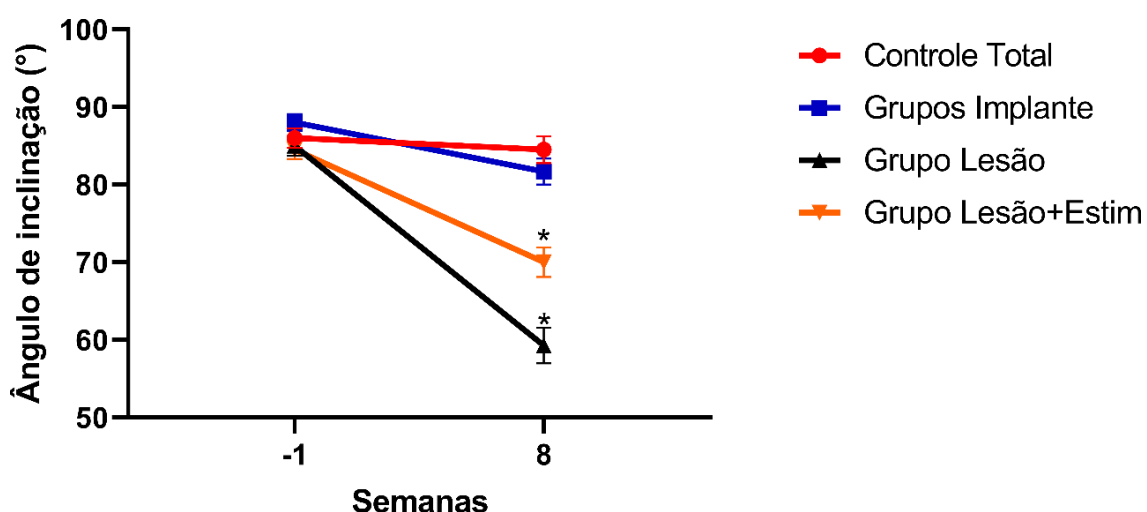


Figura 28 - Teste de plano inclinado. Avaliação de plano inclinado uma semana antes da lesão (-1) e após 8 semanas de estudo. Nota-se diferença estatística na 8ª semana de estudo entre grupos lesão e lesão+estim com relação ao controle. \* Diferença estatística com relação ao grupo controle.

### 1.9.1.4 Openfield

A análise do padrão de motricidade revelou que todos os grupos apresentaram uma redução na distância percorrida no teste comportamental de campo aberto após as 8 semanas de intervenção, em comparação aos valores basais. No entanto, as menores reduções foram observadas nos animais que foram submetidos à lesão medular isolada ( $705 \pm 607$ , centímetros) e no grupo tratado com estimulação epidural ( $603 \pm 537$  centímetros). Esses dois grupos apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). A análise comparativa entre os grupos lesionados não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Além disso, os grupos controle ( $1092 \pm 184$ , centímetros) e implante ( $1054 \pm 381$ , centímetros) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, como apresentado na Figura 29.

Figura 29 - Distância percorrida

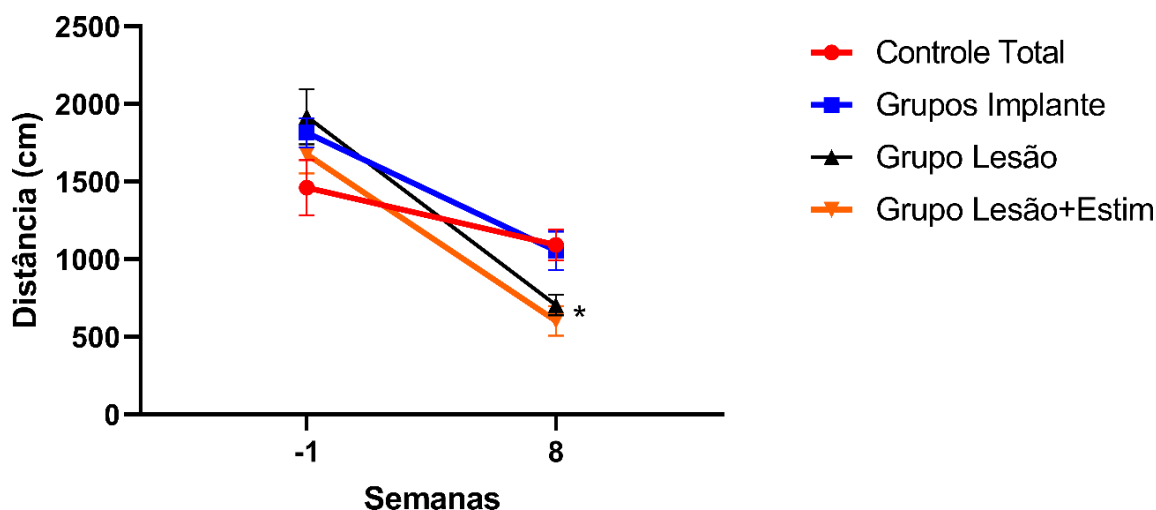


Figura 29 - O gráfico apresenta os resultados do teste comportamental de campo aberto, demonstrando a evolução da distância máxima percorrida pelos animais após 8 semanas de estudo. Observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos lesionados e o grupo controle após as 8 semanas de estudo, indicando uma redução na distância percorrida nos animais lesionados. \*diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$ .

Para concluir a análise pelo método de *openfield*, a velocidade de deslocamento dos animais foi medida antes do procedimento cirúrgico e após 8 semanas de estudo. A observação do gráfico revelou que todos os grupos apresentaram uma diminuição na velocidade de deslocamento entre o período pré-operatório e pós-operatório. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum momento. (Fig 30).

Figura 30 - Velocidade média de deslocamento

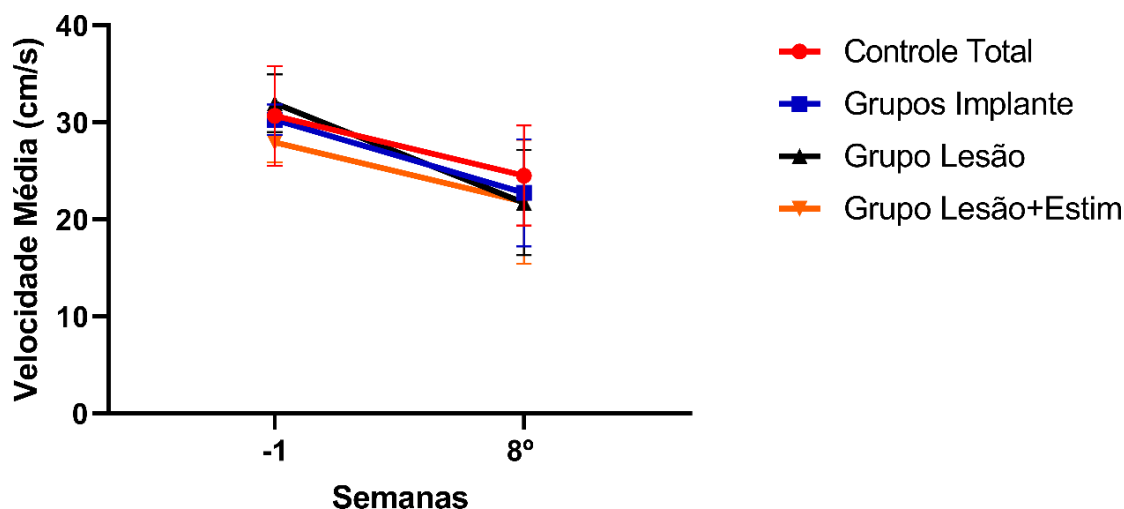


Figura 30 - Velocidade de deslocamento em centímetros por segundo dos grupos: controle, implante, lesão e lesão, antes e após os procedimentos cirúrgicos ao longo de 8 semanas de observação. Nota-se ausência de diferença estatística.

### 1.9.2 Análise morfológica e estereológica por imunohistoquímica de fluorescência

A marcação imunohistoquímica com anti-NeuN permitiu identificar alterações morfológicas importantes nas células neurais nos cornos anteriores da medula espinhal, principalmente nos motoneuronios alfa, naqueles animais submetidos à lesão. Dentre as principais alterações, verificou-se aumento globular do corpo celular, a presença de vacúolos citoplasmáticos (Fig. 31 C - Setas), bem como a localização nuclear periférica (Fig. 31 C - #), os quais constituem indicadores de degeneração Walleriana decorrente da desaferentação causada pela lesão. Também foi observado aumento no diâmetro do canal endimário desses animais, o que remete à siringomielia pós-traumática. É importante ressaltar que essas alterações foram identificadas em ambos os grupos lesados; entretanto, foram menos pronunciadas no grupo tratado com eletroestimulação (Fig. 31 D).

Por outro lado, nos grupos controle e implante, não foram identificados focos de lesão nem degeneração celular. Em ambos os casos as células neurais apresentaram-se bem delimitadas, com localização nuclear central e com uma quantidade relevante de células neurais em formato piramidal ou fusiforme (Fig.31 A e B, respectivamente).

Figura 31 - Análise morfológica neural

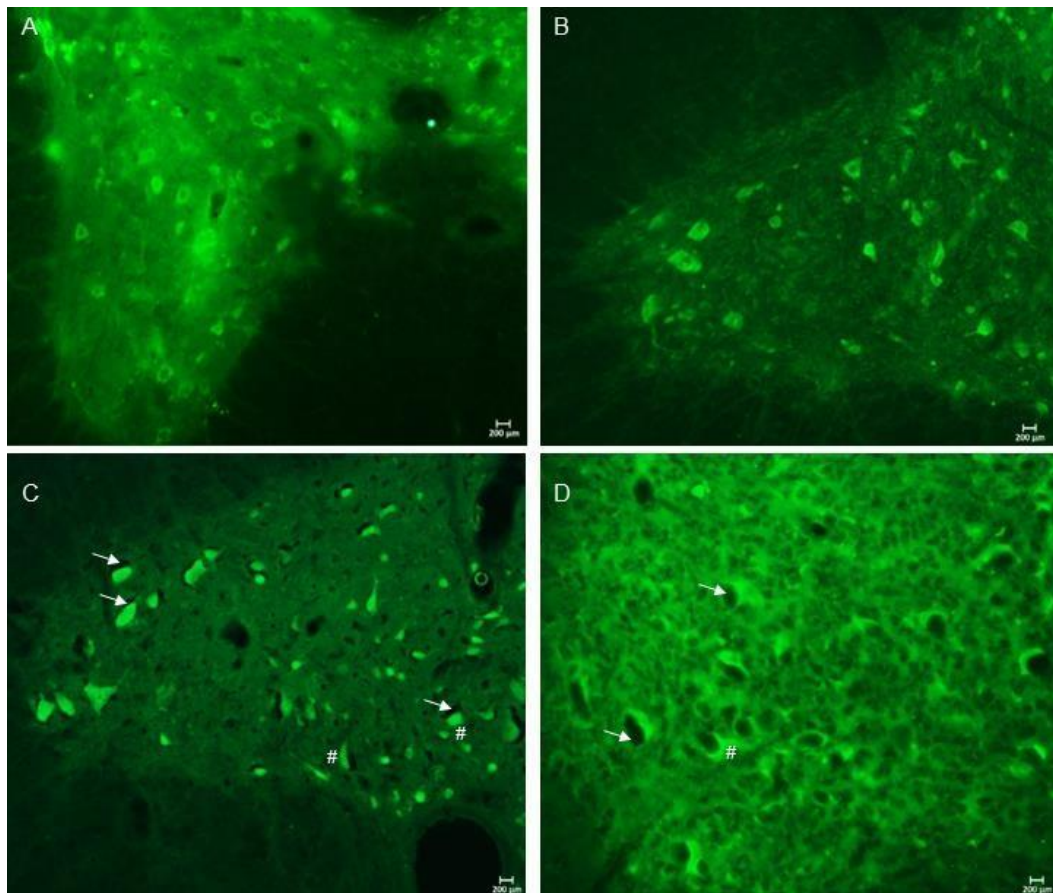


Figura 31 – Análise morfológica de neurônios NeuN positivos da região anterior do corno medular. A- Grupo controle e B- Grupo implante. Nota-se núcleo bem delimitado e central ao citoplasma, ausência de focos de lesão. C- Grupo lesão e D – Grupo lesão+estim. Nota-se núcleo com tendência na região periférica (#). Presença de vácuo células, refletindo a presença de focos de lesão da degeneração Walleriana (setas). \* Canal epidimário com dimensões anormais. Barra de escala 200µm.

Os resultados da análise estereológica das células NeuN-positivas indicaram que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os animais submetidos à lesão medular. O grupo tratado apresentou uma contagem média de  $1783 \pm 2$  células por animal, em comparação com o grupo lesado e não estimulado, que apresentou uma contagem média de células de  $897 \pm 3$  células por animal ( $p < 0,001$ ). Figura 32.

Além disso, também foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e implante. O grupo controle apresentou uma contagem média de corpos celulares em torno de  $4334 \pm 2$  células por animal, enquanto o grupo implante apresentou uma contagem média de  $2433 \pm 3$  células por animal. Esta diferença também foi estatisticamente significativa com  $p < 0,001$ , como pode ser visto na Figura 32.

Figura 32 - Quantificação estereológica

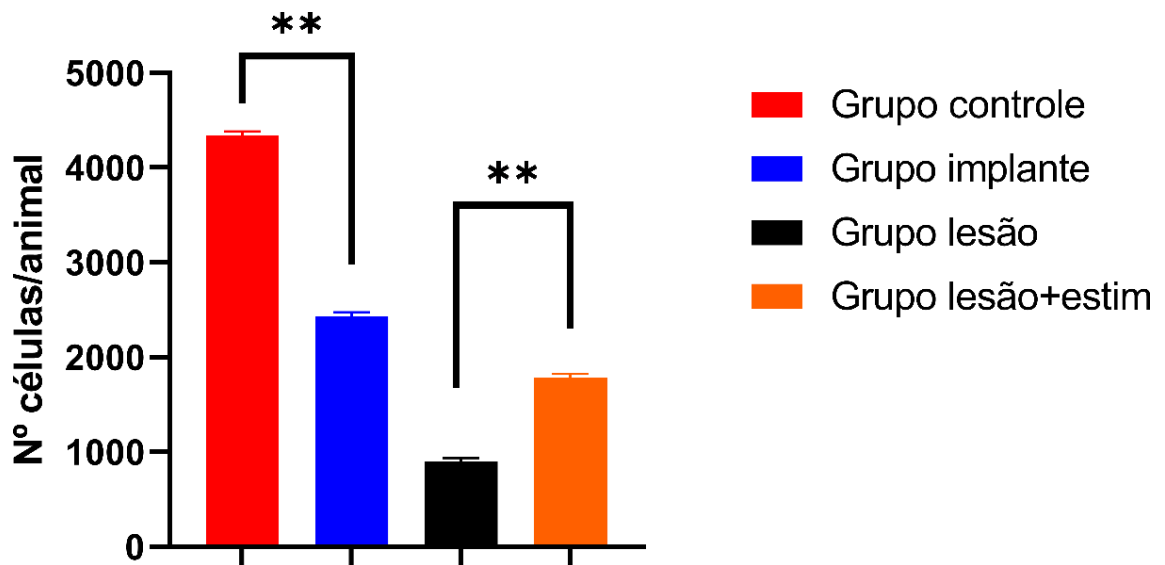


Figura 32 - Contagem de células dos Grupos controle, implante, lesão e Lesão+Estim. Nota-se diferença significativa entre os Grupos lesão e lesão+estim. Nota-se também diferença entre os Grupos controle e implante. \*\* Diferença estatística entre os Grupos lesão e lesão+estim e entre os Grupos controle e implante,  $P < 0,001$ .

### 1.9.3 Análise de intensidade de imunofluorescência

Quanto à análise de intensidade de fluorescência para sinaptofisina (Fig.33) e  $\beta$ -III-tubulina (Fig.34), observou-se quanto ao primeiro marcador diferença estatística significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo submetido à estimulação ( $1294 \pm 46$ , UA\*= unidade arbitrária) e o grupo lesado ( $1198 \pm 23$ , UA\*= unidade arbitrária). Ademais, os valores do grupo estimulado se equivaleram ao do grupo controle (Fig. 35).

Figura 33 - Intensidade de imunofluorescência - Sinaptofisina

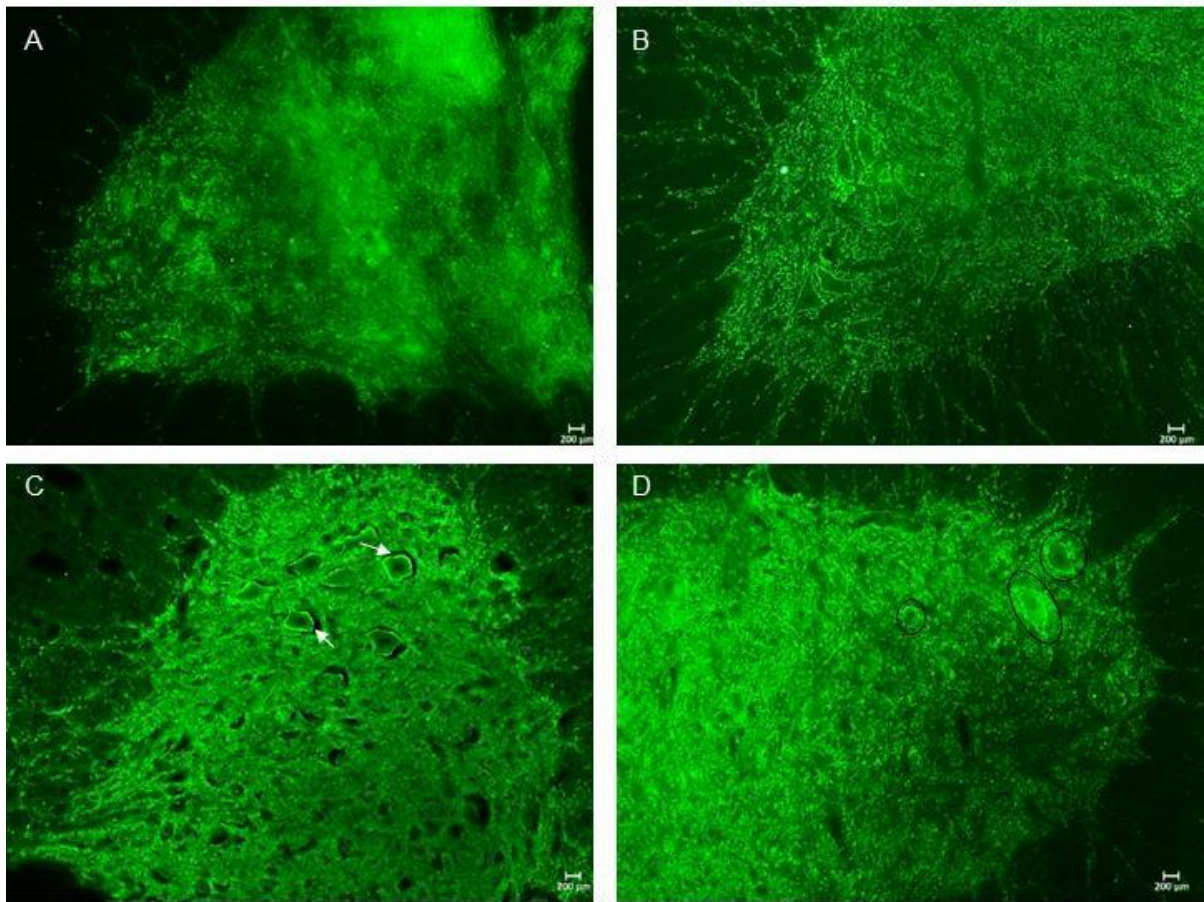


Figura 33 – Análise de intensidade luminosa de neurônios sinaptofisina positivos da região anterior do corno medular. A- Grupo controle e B- Grupo implante. C- Grupo lesão, com presença de vácuo celular (setas) e D – Grupo lesão+estim. Nota-se núcleo com perímetro celular com maior intensidade luminosa (círculos). Barra de escala 200µm

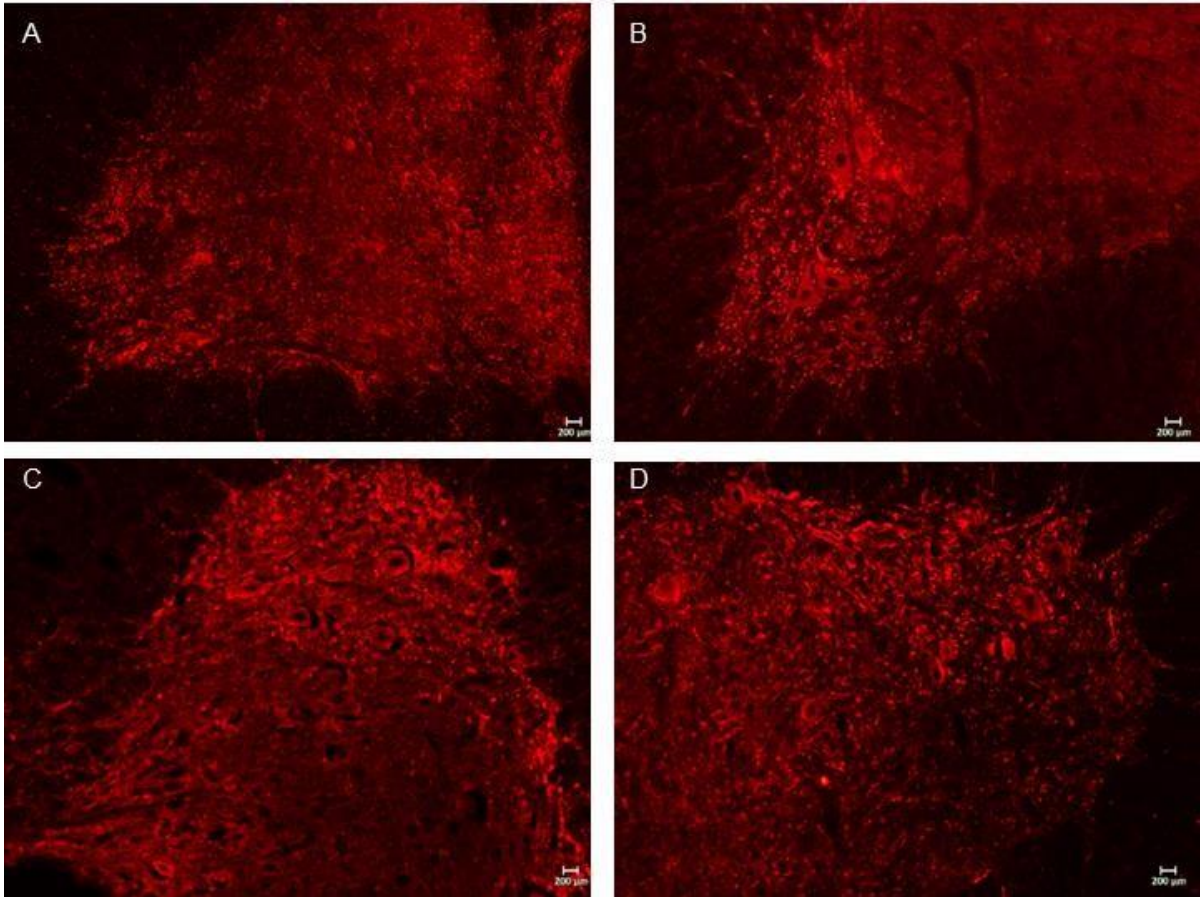
Figura 34 -Intensidade de imunofluorescência -  $\beta$ -tubulina

Figura 34 – Análise de intensidade luminosa de neurônios  $\beta$ -tubulina positivos da região anterior do corno medular. A- Grupo controle e B- Grupo implante. C- Grupo lesão, e D – Grupo lesão+estim. Barra de escala 200 $\mu$ m

Figura 35 - Intensidade de imunofluorescência - Sinaptofisina

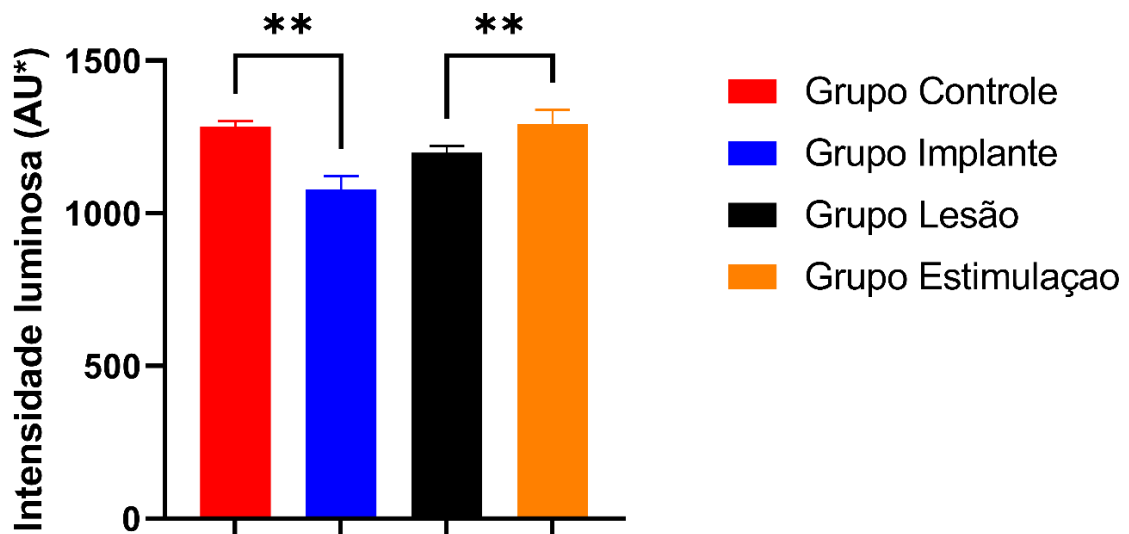


Figura 35 – Análise da intensidade de imunofluorescência utilizando marcação com Sinaptofisina. Observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Estimulação e lesão ( $p < 0,01$ ) e entre o grupo implante e controle ( $p < 0,01$ ); não houve diferença entre os grupos estimulação e controle.



Analogamente para  $\beta$ -III-tubulina, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos implante ( $859 \pm 23$ ), lesão ( $1049 \pm 21$ ) e lesão+estim ( $1116 \pm 32$ ) em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais lesados (Fig.36).

Figura 36 - Intensidade de imunofluorescência - $\beta$ -tubulina

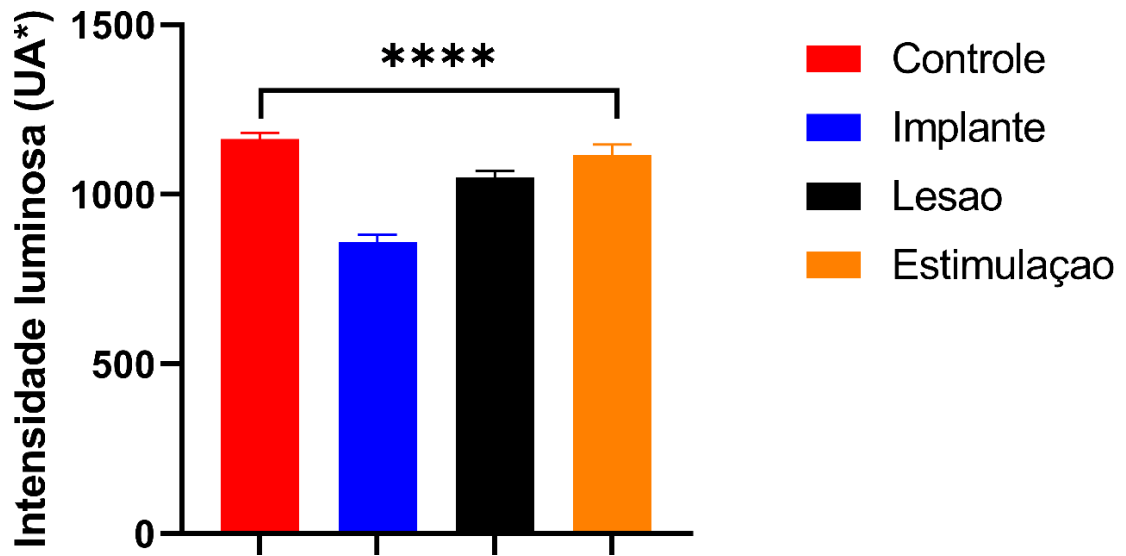


Figura 36 – Análise da intensidade de imunofluorescência utilizando marcação com  $\beta$ -tubulina. Observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de implante, lesão e estimulação em relação ao grupo controle. \*\*\*\* Diferença estatística  $p = 0,001$ .

## DISCUSSÃO

### 1.10 Sobre o modelo animal

Na literatura científica há diversos modelos descritos de lesão medular cada um com particularidades em relação à gravidade, recuperação e correspondência com a realidade clínica (Rivlin and Tator 1978; Watson et al., 1986; Bunge et al., 1994; Fiford et al., 2004; da Costa et al., 2008). O modelo mais antigo é o de contusão, que foi desenvolvido e testado pela primeira vez por Allen et al. (1911). Nesse modelo, os pesquisadores soltaram uma massa de determinada altura sobre a superfície dorsal da medula espinhal de cães, com o objetivo de padronizar a lesão medular por contusão. Contudo, Osterholm (1974), ponderou que as propriedades de absorção de impacto pela medula são diretamente proporcionais ao diâmetro da mesma e inversamente proporcional ao diâmetro do agente de lesão.

Tendo em vista essas questões, e por meio de testes experimentais em animais e simulação computacional, Koozekanani et al. (1976) afirmam que a metodologia utilizada por Allen pode resultar em diferentes tipos de lesão, mesmo quando a energia de lesão e o modelo animal se mantêm com valores constantes. Isso ocorre porque ao soltar um objeto sobre a medula espinhal este bate várias vezes no órgão até que sua energia cinética potencial em relação à medula seja igual a zero. Além disso, afirmam que variações mínimas na metodologia experimental podem facilmente causar grandes variações na gravidade da lesão medular.

Em 1992 um grupo de pesquisadores desenvolveu um dispositivo mais preciso, que foi adotado pelo MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) enomeado como MASCIS impactor. Embora tenha apresentado melhorias, como a regulação das características físicas da lesão, este equipamento ainda se baseava no princípio da conservação de energia proposto por Allen (Gruner et al., 1992).

Outro dispositivo que foi desenvolvido nessa época é o *Infinite Horizon*, que se baseia na aplicação de uma força de lesão predeterminada, associada a um mecanismo de retirada da ponta de lesão assim que a força configurada fosse exercida. Com isso, os pesquisadores reduziram os efeitos das múltiplas lesões causadas pelo princípio da ação e reação do modelo proposto por Allen, embora

mantivesse ainda alguma desvantagem em relação à variação da altura da medula durante a respiração do animal (Scheff et al., 2003).

A correta escolha e padronização do modelo animal é um aspecto essencial para a realização de estudos em lesão medular. A literatura demonstra que certos animais possuem vantagens para a execução do estudo, seja pela facilidade de manipulação, custos mais baixos ou translação clínica mais evidente (Khan et al., 1999; Moon and Bunge 2005). O modelo mais amplamente utilizado é o de roedores, particularmente ratos, devido às facilidades de manipulação, menor custo e alta taxa de reprodutibilidade. Além disso, ratos possuem um sistema imunológico resistente, apresentando poucas complicações decorrentes de infecções em procedimentos pós-cirúrgicos. Outro fator importante é que os ratos possuem uma anatomia bem conhecida, em decorrência de sua vasta aplicação em diferentes tipos de estudo (Talac et al., 2004; Nakae et al., 2011; Lee and Lee 2013; Kjell and Olson 2016; Haefeli et al., 2017; Sharif-Alhoseini et al., 2017).

Em concordância com essas premissas e com o objetivo de analisar o perfil da pesquisa científica relacionada à lesão medular, Verstappen et al. (2022) relatam que os roedores apresentam a maior representatividade nos estudos de lesão medular. Além disso, os resultados indicam que o modelo de contusão medular está entre as formas mais comumente aplicadas e que os níveis de lesão mais frequentemente estudados são T9, T8 e T10, respectivamente.

Além do modelo animal ser um aspecto crucial em estudos de lesão medular, pode existir diferentes respostas em decorrência da linhagem e do sexo podendo influenciar fortemente a recuperação motora após a lesão. Por exemplo, Mills et al. (2001), observaram uma recuperação mais rápida em ratos da linhagem *Sprague-Dawley* em comparação com a linhagem *Wistar*, o que foi atribuído a fatores intrínsecos da espécie. Além do exposto, pesquisas apontam que o sexo do animal, associado a fatores hormonais, pode exercer uma influência significativa no estabelecimento de lesões medulares. Chaovipoch et al. (2006), por exemplo, verificaram que ratas submetidas a doses de estradiol apresentaram prognóstico mais favorável para recuperação motora pós lesão medular, supondo que isso se deve, em parte, a um possível efeito neuroprotetor promovido pelo hormônio presente em fêmeas dessa espécie.

Com o intuito de investigar a recuperação motora de ratos após lesão medular induzida por *clip*, bem como os efeitos histológicos de diferentes forças de compressão aplicadas por esses dispositivos, Poon et al. (2007) realizaram um estudo experimental em ratos nos quais foram aplicados *clips* com forças de 20, 26 e 35 gramas, correspondente a lesões de intensidades variadas. Após a lesão, foi avaliada a recuperação motora dos animais semanalmente por meio do teste de BBB. Ao final das quatro semanas de avaliação, foi possível observar que os animais submetidos à força de lesão mais elevada apresentaram um escore BBB de 10, indicando uma recuperação espontânea significativa, mesmo após uma lesão teoricamente mais grave. Foi observado também que a gravidade da lesão foi diretamente proporcional ao dano histológico da medula espinhal, indicando uma correlação entre a força do *clip* e alterações histológicas da lesão. Correspondentemente, Alluin et al. (2011) observaram uma significativa recuperação espontânea motora em animais submetidos a uma lesão causada por aplicação de *clip* cuja força foi de 24 gramas. Embora a metodologia para indução da lesão medular ter causado déficits em um primeiro momento, estes foram amplamente recuperados, tornando inadequado o uso dessa técnica para avaliar a eficácia de tratamentos visando à recuperação motora.

Em consonância com esse enfoque, Wang et al. (2022) propuseram um estudo cujo objetivo foi investigar a utilização de *clips* com mecanismos distintos (em movimento de alavanca ou paralelo) como uma abordagem para induzir lesões na medula espinhal. Os resultados obtidos demonstraram que, apesar de ser uma abordagem promissora para induzir lesões, foi observada importante recuperação espontânea dos animais, os quais apresentaram um *score* de 9 no índice BBB após 21 dias de avaliação. Além disso, a quantificação da força de compressão, velocidade, tempo de permanência do *clip* e calibração podem apresentar variações de difícil mensuração, podendo levar a erros.

Com o objetivo de compreender as diferentes manifestações clínicas das lesões medulares, Khan and Griebel (1983) realizaram um estudo comparativo em ratos, avaliando três técnicas de lesão: queda de peso, *clip* e compressão por balão. Ao final do estudo foi concluído que o método por queda de peso apresentou pouca confiabilidade. O método por *clip* apresentou bons resultados no estabelecimento de uma lesão, embora apresente a desvantagem de requerer uma precisão elevada na

compressão. Por sua vez, no método por compressão por balão, embora inicialmente os animais tenham apresentado as características típicas da lesão, ao final do estudo estes tiveram uma recuperação espontânea significativamente maior em comparação a dos outros métodos, além da maior dificuldade em relação à localização precisa do balão. Nesse sentido, é evidente que os métodos propostos desempenham um papel relevante no estudo das lesões. No entanto, ainda há uma lacuna considerável entre esses métodos e as observações dos casos reais de lesão medular em humanos. Nessas situações, a presença da componente da velocidade de impacto sobre o órgão é amplamente predominante.

Com o objetivo de comparar os resultados histológicos de modelos de lesão medular, Chen et al. (2016) investigaram as diferentes respostas histológicas resultantes da lesão medular causada por deslocação, distração e contusão. Os autores observaram que o método de contusão, usando um atuador linear, apresentou a perda mais grave da substância branca da medula, decorrente da lesão axonal, resultando em uma diminuição do diâmetro do órgão no ponto de lesão. Da mesma forma, Mattucci et al. (2021) investigaram a progressão da lesão medular induzida por três diferentes mecanismos: distração, deslocação e contusão. Os resultados demonstraram uma progressão da lesão distintiva para cada método de lesão, sendo que a contusão se apresentou como a mais grave em relação à lesão axonal, demonstrando um dano precoce da mielina ainda na fase aguda da lesão

Na mesma linha de investigação sobre a progressão da lesão medular contusional, Ek et al. (2010) desenvolveram e testaram um dispositivo de lesão controlado por computador que utiliza a velocidade de deslocamento da ponta de lesão como base de funcionamento. Além disso, avaliaram a evolução histológica de ratos submetidos à lesão medular. A partir desse estudo, os autores concluíram que o método levou a uma instalação padronizada da lesão, adequada para avaliações da eficácia de tratamentos de lesão medular. Foi verificado também que houve degeneração da matéria cinzenta da medula, principalmente nas primeiras 24 horas, mantendo-se constante durante o período de 10 semanas do estudo. Já com relação à substância branca, observou-se uma perda mais evidente desse tecido na primeira semana, o que dificultou uma recuperação espontânea mais evidente.

Com base nos estudos mencionados, pode-se inferir que a gravidade da lesão medular é determinada pela magnitude e pela duração da compressão exercidas

sobre a medula espinhal, bem como pela altura e massa do objeto que causa a lesão. Além disso, a velocidade de deslocamento do tecido medular quando impactado por um objeto também pode influenciar a gravidade da lesão.

Baseando-se no fato de que o principal determinante da lesão medular seja a velocidade de impacto de um objeto sobre a medula, Wu et al. (2017) buscaram testar este modelo de lesão por impacto em um modelo de roedor. Como vantagens desse método relataram a alta precisão dos parâmetros, a alta reprodutibilidade e alto controle sobre a gravidade da lesão com conseqüente maior padronização dos resultados.

No contexto do presente estudo, necessitávamos de uma lesão que fosse grave o suficiente para que não houvesse recuperação espontânea significativa dentro do período observacional de 2 meses após o implante do estimulador e que também não fosse tão grave a ponto de impedir a observação de qualquer possível efeito benéfico da neuro-modulação. Nesse cenário, o modelo de lesão grave (ponta de impacto de 2 mm de diâmetro; velocidade de deslocamento 5m/s e profundidade de lesão, 2mm), por contusão (impacto) na medula torácica de ratos Wistar se revelou eficaz e reprodutível para a finalidade proposta.

A escolha de um modelo de lesão grave, todavia, acarreta preocupações adicionais a respeito das conseqüências fisiopatológicas da lesão para o organismo do animal. Dentre essas mudanças fisiológicas, destaca-se a perda de peso nas primeiras semanas, a desidratação (Landry et al., 2004), desregulação mitocondrial da musculatura esquelética (Scholpa et al., 2019), atividade espástica excessiva (Nevin et al., 2017), atrofia muscular e, alterações gastrointestinais (Duan et al., 2019, Bannerman and Ghasemlou 2022). No nosso estudo, o grupo submetido a lesão grave chegou a apresentar perda ponderal de peso nas primeiras quatro semanas, recuperando-se a seguir, atingindo seu valor basal em 6 semanas. Procurou-se manter o animal hidratado e sem dor, além do esvaziamento periódico da sua bexiga até a recuperação vegetativa, evitando-s,e assim, distensão abdominal e infecções urinárias. Essa abordagem permitiu garantir as condições ótimas para avaliação da recuperação espontânea ou induzida pela eletroestimulação.

### 1.11 Sobre o dispositivo de estimulação implantável

Entretanto, além dos fatores relacionados ao modelo animal, como espécie, linhagem e sexo, entre outros, é crucial que estudos envolvendo qualquer tipo de implante no sistema nervoso apresentem características específicas para evitar danos adicionais aos órgãos. No contexto da pesquisa sobre interfaces neuroprotéticas e com o objetivo de investigar as propriedades da poli-imida como material para implantes, Rousche et al. (2001) desenvolveram e testaram em ratos uma interface intracortical multicanal. Os resultados do estudo destacaram a excelente flexibilidade, estabilidade elétrica e biocompatibilidade da poli-imida, além de sua capacidade de ser utilizada como um dispositivo para liberação controlada de espécies bioativas devido a suas características químicas.

De forma análoga, Gandhi et al. (2006) realizaram o desenvolvimento e a avaliação de eletrodos baseados em poli-imida em um ambiente controlado de laboratório. Durante os experimentos, o material demonstrou propriedades físicas e elétricas que são compatíveis com sua aplicação em tecido neural vivo, tanto para a estimulação elétrica quanto para a captação de sinais neurais, indicando assim o potencial da poli-imida como um material adequado para a criação de interfaces neuroprotéticas eficazes e seguras.

Neste contexto, Lee et al. (2004) conduziram um estudo de implante cerebral no qual os eletrodos utilizados eram compostos por polímero de poli-imida associado a uma camada de silício para o registro da atividade neural cerebral. No referido estudo, os autores afirmam que o polímero empregado demonstrou flexibilidade adequada e biocompatibilidade, não causando danos mecânicos ou toxicidade ao tecido, o que se refletiu em uma resistência elétrica estável

Chang et al. (2014), em busca pelo desenvolvimento de um estimulador para estimulação epidural da medula espinhal, projetaram e fabricaram um dispositivo utilizando uma base de poli-imida com eletrodos de platina e realizaram testes *in vitro* para verificar a capacidade de estimulação. A partir deste estudo, os autores observaram que o eletrodo desenvolvido é altamente aplicável à estimulação elétrica, devido à sua natureza flexível, estável e versátil.

Por meio da técnica de fotolitografia com o uso de polímero de poli-imida, Wenger et al. (2016) desenvolveram e testaram um eletrodo para a aplicação de

estimulação elétrica medular em ratos com lesão medular contusa. A escolha desse material pelos pesquisadores foi fundamentada em sua excelente biossegurança, estabilidade e versatilidade, o que foi confirmado no estudo em decorrência da ausência de danos secundários pelo implante.

Considerando a importância crucial da biointegração dos materiais empregados na estimulação de tecido neural para o sucesso do tratamento, Wurth et al. (2017) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a estabilidade, funcionalidade e biocompatibilidade de implantes intraneurais baseados em poliimidadoo longo de um período de 6 meses. Os resultados obtidos revelaram que, embora tenha ocorrido inicialmente um encapsulamento induzido pelas células de defesa do organismo, resultando em um aumento no diâmetro do nervo estudado, ao longo do tempo foi observada uma redução desse encapsulamento ao ponto que, no final do estudo, os autores classificaram essa reação tecidual como leve e sem alterações funcionais; além de considerarem o polímero como estável e compatível para aplicações em tecido nervoso.

Com base nesses estudos e na necessidade de materiais compatíveis com a natureza do tecido nervoso, em nosso estudo os animais incluídos na fase de teste de biossegurança do estimulador apresentaram resultados consistentes com os achados relatados na literatura. Essa característica foi observada devido à ausência de alterações comportamentais ou funcionais de qualquer natureza, indicativos de dor ou intolerabilidade do animal em relação ao implante. Dessa forma, o implante desenvolvido em nosso laboratório nos permitiu investigar adequadamente os efeitos da eletroestimulação epidural na recuperação motora de ratos com lesão medular contusional.

### 1.12 Sobre a estimulação epidural na lesão medular

A estimulação elétrica para modular tecidos biológicos começou a ser destaque a partir da década de 1950 e se tornou mais difundida a partir da década de 1990 (Koketsu 1952; Salmons 1967).

Estudos em animais com lesão medular submetidos à estimulação epidural medular e reportando melhora da motricidade começaram a surgir no início dos anos 2000. Aoyagi, Mushahwar et al. (2004), estudando gatos, constataram que a



estimulação elétrica epidural oferece possibilidade de restaurar a função motora perdida após lesões na medula espinhal devido à sua capacidade de ativação sinérgica de grupos musculares.

De maneira semelhante, Liu and Jordan (2005) verificaram que a estimulação elétrica da medula espinhal é capaz de modular a amplitude das respostas do centro gerador de padrões em ratos, o que pode ser benéfico para a recuperação motora. Gerasimenko, Lavrov et al. (2006), ao aplicar essa abordagem para investigar os reflexos espinhais, analisaram os tempos de resposta muscular evocados por diferentes níveis da medula espinhal. Eles apontaram que a eletroestimulação medular é uma técnica viável para estudar os componentes medulares responsáveis pela contração muscular múltipla necessária à locomoção, além de discutirem a influência da ativação antidrômica das colunas posteriores nos padrões de contração de determinados músculos.

Em consonância com essas descobertas, Gaunt et al. (2006), em um estudo com gatos, também associaram as respostas musculares evocadas por estimulação elétrica com a atividade antidrômica e ortodrômica das fibras aferentes. Lavrov et al. (2008), por meio de sua pesquisa em ratos, relataram que o sistema sensorial desempenha um papel essencial na recuperação motora após lesões na medula espinhal e que a estimulação epidural tem a capacidade de facilitar a ativação dos centros motores medulares. Também observaram que frequências de estimulação entre 40 e 60 Hz são as mais adequadas para induzir contrações musculares mais consistentes, coordenadas e rítmicas.

Corroborando essas descobertas, Moritz et al. (2007), relataram em seu estudo que, devido à integração de informações aferentes e eferentes na medula espinhal, a estimulação epidural com intensidades entre 10 e 80  $\mu\text{A}$  e pulsos quadráticos é capaz de ativar adequadamente grupos musculares agonistas e antagonistas. Nesse sentido, Courtine et al. (2009) verificaram que a estimulação elétrica epidural foi capaz de ativar centros motores medulares em ratos submetidos a lesões medulares torácicas completas, recrutando regiões específicas da medula e refinando esse controle por meio das fibras sensoriais.

De forma semelhante, Rossignol and Frigon (2011) relatam em seu trabalho de revisão a importância das funções sensoriais na recuperação motora após lesão

medular e aponta que a estimulação elétrica pode atuar não apenas como facilitadora, mas também como agente de integração entre as funções sensoriais e motoras.

Com o objetivo de investigar a influência da estimulação elétrica epidural em ratos com lesão medular, Gad et al. (2013) desenvolveram e testaram um sistema de estimulação com múltiplos pontos de estimulação independentes e, assim, demonstraram que esses animais, quando submetidos a uma configuração bipolar específica de eletrodos com frequência de 40 Hz, foram capazes de manter-se em pé.

Nesse contexto, Alam et al. (2015) conduziram um estudo em ratos com o objetivo de identificar parâmetros mais confiáveis para a realização de movimentos específicos em ratos com lesão medular. Os resultados revelaram que a polaridade e a intensidade exercem influência na ativação de grupos musculares específicos, sendo que a configuração bipolar foi a mais adequada para uma ativação muscular consistente, requerendo menor carga elétrica. Seguindo essas descobertas, Lavrov et al. (2015) demonstraram em seu estudo com ratos lesionados que a combinação de estimulação elétrica e sensorial pode induzir respostas motoras vigorosas ou ritmadas, considerando que os principais parâmetros elétricos aplicados na estimulação epidural são intensidade, largura de pulso e frequência. Dose et al. (2016) investigaram em um estudo com medulas de ratos neonatos que a frequência e os tempos de entrega de carga são fatores mais importantes do que a intensidade para alcançar as respostas desejadas. Em consonância com essas descobertas, Shah et al. (2016), após três semanas de estudo, verificaram que modelos de roedores submetidos à lesão medular apresentaram melhores respostas quando a frequência de estimulação foi de 40 Hz, com escalonamento dos tempos de entrega de carga. Nesse sentido, Barra et al. (2018) relatam em seu estudo realizado em animais que para uma recuperação motora mais efetiva a estimulação medular deve ser mais seletiva em relação às estruturas neurais ativadas e parâmetros de estimulação.

Como notado, muitos estudos com estimulação epidural reportam melhora da motricidade no modelo animal de lesão medular. No entanto, poucos avançaram nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa recuperação. Um estudo que foi divisor de águas no contexto eletrofisiológico foi o de Moraud et al. (2016). Usando interessante modelo matemático de computação neural e verificação experimental em ratos do modelo, os autores procuraram prever o potencial de disparo das fibras eferentes motoras em função da corrente exógena aplicada pela estimulação epidural

e o disparo dos aferentes dos fusos neuromusculares carregados por fibras Ia e II. O modelo de aferências fusais se correlaciona a envelopes de *bursts* de atividade eletromiográfica, que, por sua vez, se correlacionam ao acoplamento de atividade motora alfa-gama, conforme descrito preliminarmente. Estudos prévios sugeriam que a resposta motora elicitada nos membros posteriores a cada pulso de estimulação epidural era preferencialmente mediada por fibras grossas mielinizadas, em particular fibras envolvidas no *feedback* sensorial fuso-muscular (Gerasimenko et al., 2006, Capogrosso et al., 2013, Wenger et al., 2014). As aferências fusais musculares se somam a modulações descendentes supra-tentoriais para elaborar segmentarmente padrões motores (Levine et al., 2014). Evidências eletrofisiológicas que remontam aos estudos de Sherrington (1910) sugerem que esses circuitos reguladores são ancestrais e comuns na regulação da atividade motora em vertebrados (Clarac et al., 2000), sendo extremamente conservados em mamíferos (Pierrot-Deseilligny 1989 e passíveis de serem recrutados por estimulação epidural em humanos (Sayenko et al., 2014; Hofstoetter et al., 2015).

Em termos de reabilitação motora em humanos sabe-se da importância da repetição de padrões motores (sejam reproduzidos pelas mãos do fisioterapeuta ou por próteses exoesqueléticas), na indução de plasticidade medular (Borton et al., 2013). Nesse sentido, a estimulação epidural atuaria como mais uma ferramenta (e poderosa) para prover essas repetições. A interpretação corrente dos efeitos da estimulação epidural provém de estudos em simulação matemática do funcionamento das redes neurais específicas da medula (Rattay et al., 2000; Capogrosso et al., 2013) e de estudos experimentais (Gerasimenko et al., 2006, Hofstoetter et al., 2015).

Ambas as linhas de evidência sugerem ativação preferencial de fibras grossas aferentes provenientes dos fusos neuromusculares, que, por sua vez, teriam o potencial de recrutar centros geradores de padrão (CPG, ou *central-pattern generators*) na medula espinhal (Angeli et al., 2014; Danner et al., 2015). Essa ativação de CPG contribuiria elevando a excitabilidade dos neurônios próprios espinhais, integrando-os em redes sensitivo-motoras funcionantes (Edgerton et al., 2008). Assim sendo, acredita-se que do ponto de vista eletrofisiológico a estimulação epidural module circuitos aferentes fusais no sentido de aprimoramento do programa motor (como por exemplo a mudança da velocidade da marcha).

Segundo os modelos mais atuais de entendimento, a estimulação epidural interage com estímulos sensoriais fusais de duas maneiras sinérgicas: i) primeiramente, a estimulação de fibras aferentes fusais favorece eferência excitatória mono- e di-sináptica para motoneurônios medulares; e ii) o fortalecimento da inibição

recíproca de antagonistas favorece o recrutamento alternado de agonistas e antagonistas necessário para a marcha apropriada (Talpalar et al., 2011). De acordo com esse modelo, a interação desses dois mecanismos proveria à medula espinhal capacidade de ajuste e de controle do padrão motor, independentemente de centros supra-tentoriais (Courtine et al., 2009; Talpalar et al., 2011). Um exemplo da complexidade dos padrões segmentares medulares é o que ocorre quando a esteira elétrica é parada com o animal andando sobre ela. Nesse instante, há aumento da atividade de músculos extensores e diminuição da atividade de músculos flexores, promovendo a transição do estado de marcha para ortostase estática (Quevedo et al., 2000). Essas observações, entretanto, provêm do nosso conhecimento rudimentar sobre circuitos excitatórios mono- e di-sinápticos medulares. Ainda restam largamente incompreendidas as complexas interações de interneurônios do CPG com esses circuitos medulares mais simples (Rybak et al., 2006).

Embora se tenha avançado nas alterações eletrofisiológicas induzidas pela corrente elétrica exógena, ainda muito pouco se sabe sobre os efeitos de tal estimulação sobre a estrutura neural medular. É nesse aspecto que nosso estudo representou avanço por demonstrar aumento da população neuronal nos animais estimulados, além de aumento do sinal correspondente a estruturas sinápticas. Quanto ao primeiro achado, a princípio poderíamos estar diante de aumento da neurogênese induzida pela eletroestimulação, efeito conhecido da modulação elétrica (Huang et al., 2006; Lavrov, et al., 2008; Sayenko et al., 2014; Moraud et al., 2016; Calvert et al., 2021). Por outro lado, sabe-se que a medula espinhal é muito pobre em neurogênese e, de fato, essa não ocorre na medula espinhal do animal adulto. Assim sendo, a hipótese mais plausível para esse achado parece ser a de diminuição de apoptose tardia após a lesão medular (> 1 semana no rato). É sabido que a apoptose ocorre na lesão secundária até 6 meses (Norenberg et al., 2004; Temkin et al., 2007), assim sendo, especulamos aqui que a estimulação esteja causando um efeito benéfico ao inibir a apoptose de células neuronais desafereadas. Reforça a compreensão de que essa hipótese seja coerente o fato que a entrada de corrente iônica na célula ativa diversos

mecanismos de maturação neuronal por meio de sinalização de cAMP, cálcio e ativação de fatores de transcrição envolvidos em processos neurogênicos (Lepski et al., 2013). O segundo achado patofisiológico encontrado em animais estimulados foi o aumento de sinal sináptico. Ora, é sabido que a corrente exógena promove maturação sináptica, pelos mesmos mecanismos citados acima e outros envolvendo BDNF e cálcio (Bischofberger et al., 2006; Hauser et al., 2022). Interessante foi a observação de que o brotamento axo-dendrítico, medido em nosso estudo por beta-III-tubulina, não mostrou diferença significativa entre animais lesados e estimulados.

### 1.13 Estimulação medular para recuperação motora em humanos

O sucesso das observações experimentais motivou o teste da estratégia de estimulação medular em pacientes vitimados por lesão medular traumática. Nesse contexto, Jilge et al. (2004) conduziram um estudo com cinco pacientes cronicamente lesionados, nos quais foi realizado o implante de uma gride de eletrodos na região lombossacral. A partir dessa pesquisa, os autores constataram que, mesmo em estágios crônicos da lesão, a medula espinhal é capaz de responder à estimulação elétrica epidural. Essa resposta foi observada pela capacidade de induzir ritmicidade motora com frequências de 25 a 50 Hz, sendo que frequências de 5 a 15 Hz foram mais efetivas para a extensão dos membros.

Com o objetivo de investigar a importância do posicionamento dos eletrodos para a estimulação epidural, Huang et al.(2006) conduziram um estudo com dois pacientes cronicamente lesados. Os eletrodos de estimulação foram posicionados na região lombossacral, sendo que em um paciente foi colocado na linha média e no outro com leve deslocamento. Ao final do estudo, os pesquisadores constataram que o paciente cujo eletrodo estava deslocado lateralmente apresentou resultados superiores em termos de magnitude e cinemática articular durante a marcha, em comparação com o outro paciente. Dessa forma, os autores concluíram que os efeitos da estimulação facilitam o recrutamento de motoneurônios lombares; porém, esse efeito é dependente da localização dos eletrodos e da história da lesão, ressaltando a importância de realizar uma análise individualizada para cada caso de lesão.

Em uma abordagem semelhante, Harkema et al. (2011) realizaram um estudo com um paciente em um estágio crônico de lesão medular. O paciente, já com 3 anos de evolução, foi submetido ao implante de um grid de eletrodos na região lombosacral. Por meio de um extenso mapeamento das configurações de estimulação e de treinamento fisioterapêutico, os pesquisadores observaram que a estimulação epidural possibilitou a ativação da circuitaria dos seguimentos medulares correspondentes à região da intumescência lombar, resultando no recrutamento de grupos musculares responsáveis pela sustentação do corpo. Esse efeito permitiu que o paciente suportasse mais de 50% do seu peso corporal por um período prolongado. Após sete meses da cirurgia, os autores constataram que houve recuperação parcial de alguns movimentos das pernas. No entanto, ainda era necessário o uso da estimulação epidural. Como conclusão, os autores destacam que o treinamento em conjunto com a estimulação epidural pode ter reativado circuitos neurais que foram preservados e silenciados após o evento da lesão ou ainda ter estimulado processos de neuroplasticidade.

Em consonância com essas descobertas, Rejc et al. (2015) conduziram um estudo envolvendo quatro pacientes que foram submetidos ao implante de um estimulador epidural medular. Dois desses pacientes foram classificados como ASIA-A e os outros dois como ASIA-B, de acordo com a classificação da *American Spinal Injury Association*. Em ambos os casos os pacientes apresentaram melhorias na sustentação do peso corporal, com o mínimo de assistência necessária. Além disso, os autores constataram que a configuração do eletrodo, com o catodo posicionado na região caudal em relação ao anodo, juntamente com frequências de estimulação variando entre 25 e 60 Hz, demonstrou ser a mais efetiva para a obtenção desses resultados. Dessa forma, os autores afirmam que a medula espinhal lombar possui a capacidade de gerar padrões motores consistentes para o suporte de peso, mas ressaltam que a seleção e a configuração adequadas dos parâmetros de estimulação são fatores primordiais e devem ser individualizados para cada caso específico.

No entanto, esses resultados não se restringem à recuperação dos movimentos dos membros inferiores. Lu et al. (2016) investigaram os efeitos do implante do estimulador na região da medula cervical em dois pacientes tetraplégicos, e constataram melhorias significativas tanto na força das mãos quanto no controle voluntário desses membros superiores. Em relação aos parâmetros de estimulação,

os melhores resultados foram obtidos quando a frequência foi configurada entre 20-30 Hz e a intensidade entre 1-3 mA, em ambos os casos. Esses achados confirmam a efetividade dessa abordagem para pacientes tetraplégicos. Além disso, assim como os estudos anteriores, esses resultados enfatizam a necessidade de ajustes individuais na configuração dos parâmetros para cada paciente específico.

No estudo conduzido por Angeli et al. (2018) quatro pacientes cronicamente lesionados foram submetidos à estimulação medular e os resultados revelaram que, após sessões de treinamento em esteira combinadas com estimulação epidural, esses indivíduos foram capazes de caminhar em superfície plana com um mínimo auxílio de suporte de peso. Além disso, apresentaram melhorias significativas na posição em pé e maior estabilidade do tronco, sugerindo que a combinação de treinamento e estimulação epidural pode potencializar a reabilitação motora voluntária

Considerando a importância da seletividade das regiões medulares na recuperação motora, Wagner et al. (2018) conduziram um estudo de estimulação epidural baseado no princípio de seletividade e acionamento cíclico em tempo real durante o processo de marcha, o que denominaram: Estimulação Espaço-temporal. Nesse estudo três pacientes cronicamente lesionados foram submetidos ao implante de um grid de eletrodos de estimulação na medula toracolombar. Os resultados revelaram melhorias significativas no controle motor com os pacientes conseguindo realizar movimentos em bicicleta e caminhar com auxílio de duas bengalas canadenses e tutores de membros inferiores, depois de 1 ano de observação. Esses achados demonstram o potencial da estimulação epidural seletiva como uma estratégia eficaz para melhorar a função motora em indivíduos com lesões crônicas.

## **CONCLUSÕES**

Pelo que foi exposto, vemos que há bastante coerência e reprodutibilidade nos achados pré-clínicos e clínicos a favor de estimulação epidural medular com a finalidade de recuperação motora após lesão medular traumática. Todavia, os mecanismos por trás dessa recuperação permanecem até o presente momento largamente obscuros. O esclarecimento dessa questão científica extremamente

relevante só é possível no animal de experimentação pela possibilidade de avaliação morfológica das medulas explantadas, após lesão e terapia de estimulação.

Os estudos apresentados anteriormente sugerem que, após uma lesão medular acima da intumescência lombar, a denervação segmentar consequente acaba por causar diminuição das correntes pós-sinápticas excitatórias nos motoneurônios medulares alfa e gama, impedindo que atinjam seu limiar de excitação e, por conseguinte, mediem ativação muscular periférica programada. Esses circuitos estariam presentes, mas, silentes; com tendência de degeneração apoptótica induzida pelo desuso. Entende-se que a aplicação de uma corrente elétrica exógena nesse circuito desaferentado possa aproximar tonicamente as células de seu limiar de disparo, de modo que uma pequena corrente excitatória por uma via descendente remanescente seja agora capaz de recrutar essa célula e reintegrá-la em uma rede funcional. Além das observações de melhora induzida por eletroestimulação, nosso estudo avança em mostrar evidências a favor de maior povoamento neuronal induzido pela estimulação (muito provavelmente por menor taxa de apoptose) e também maior grau de sinaptogênese na medula deaferentada. Esses achados evidenciam o substrato neural necessário para explicar a reabilitação motora, vista após estimulação medular, mesmo em fases muito tardias após o traumatismo.

As lesões medulares têm sido um desafio médico e científico ao longo dos séculos. Na era moderna, houve um investimento significativo de recursos e de tempo no desenvolvimento de agentes neuroprotetores (Wu et al., 2013; Nagoshi et al., 2015; Kjell and Olson, 2016) para minimizar as lesões secundárias resultantes do traumatismo medular, bem como nas terapias celulares restauradoras (Li and Lepski 2013). Mais recentemente, foi observado um grande potencial da terapia de estimulação medular em uso clínico desde 1969 para o tratamento da dor, no sentido de induzir plasticidade motora e prover ganhos funcionais relevantes. Neste estudo, apresentamos evidências experimentais que sustentam indução de plasticidade medular por meio de repovoamento neuronal e neo-sinaptogênese. O correto entendimento do mecanismo de ação da estimulação epidural para regeneração medular vai permitir o aprimoramento dessa técnica extremamente promissora, que já alcançando quantidade maior de doentes ou candidatos mais propensos a responder a essa abordagem.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, Z. and A. Wieraszko. Combined effects of acrobatic exercise and magnetic stimulation on the functional recovery after spinal cord lesions. *J Neurotrauma* 25(10): 1257-1269. (2008).
- Alam, M., G. Garcia-Alias, P. K. Shah, Y. Gerasimenko, H. Zhong, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Evaluation of optimal electrode configurations for epidural spinal cord stimulation in cervical spinal cord injured rats." *J Neurosci Methods* 247: 50-57.(2015)
- Allen. "Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury by fracture dislocation of spinal column: A preliminary report." *Journal of the American Medical Association* 57: 878 -880. (1911)
- Alluin, O., S. Karimi-Abdolrezaee, H. Delivet-Mongrain, H. Leblond, M. G. Fehlings and S. Rossignol. "Kinematic study of locomotor recovery after spinal cord clip compression injury in rats." *J Neurotrauma* 28(9): 1963-1981. (2011)
- Angeli, C. A., M. Boakye, R. A. Morton, J. Vogt, K. Benton, Y. Chen, C. K. Ferreira and S. J. Harkema. "Recovery of Over-Ground Walking after Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury." *N Engl J Med* 379(13): 1244-1250. (2018)
- Angeli, C. A., V. R. Edgerton, Y. P. Gerasimenko and S. J. Harkema. "Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans." *Brain* 137(Pt 5): 1394-1409. (2014)
- Aoyagi, Y., V. K. Mushahwar, R. B. Stein and A. Prochazka. "Movements elicited by electrical stimulation of muscles, nerves, intermediate spinal cord, and spinal roots in anesthetized and decerebrate cats." *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 12(1): 1-11. (2004)
- Bamford, J. A., R. Marc Lebel, K. Parseyan and V. K. Mushahwar. "The Fabrication, Implantation, and Stability of Intraspinal Microwire Arrays in the Spinal Cord of Cat and Rat." *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 25(3): 287-296. (2017)
- Bannerman, C. A. and N. Ghasemlou. "Spinal Cord Injury in the Mouse Using the Infinite Horizon Spinal Cord Impactor." *Methods Mol Biol* 2515: 193-201. (2022)
- Barolat, G. "Experience with 509 plate electrodes implanted epidurally from C1 to L1." *Stereotact Funct Neurosurg* 61(2): 60-79. (1993)
- Barra, B., C. Roux, M. Kaeser, G. Schiavone, S. P. Lacour, J. Bloch, G. Courtine, E. M. Rouiller, E. Schmidlin and M. Capogrosso. "Selective Recruitment of Arm Motoneurons in Nonhuman Primates Using Epidural Electrical Stimulation of the Cervical Spinal Cord." *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2018: 1424-1427. (2018)
- Bartholdi, D. and M. E. Schwab. "Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat." *Brain Res* 672(1-2): 177-186. (1995)

- Basso, D. M., M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, D. K. Anderson, A. I. Faden, J. A. Gruner, T. R. Holford, C. Y. Hsu, L. J. Noble, R. Nockels, P. L. Perot, S. K. Salzman and W. Young. "MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study." *J Neurotrauma* 13(7): 343-359. (1996)
- Batista, C. E., E. D. Mariano, S. K. Marie, M. J. Teixeira, M. Morgalla, M. Tatagiba, J. Li and G. Lepski. "Stem cells in neurology--current perspectives." *Arq Neuropsiquiatr* 72(6): 457-465. (2014)
- Batista, C. M., E. D. Mariano, C. S. Dale, A. F. Cristante, L. R. Britto, J. P. Otoch, M. J. Teixeira, M. Morgalla and G. Lepski. "Pain inhibition through transplantation of fetal neuronal progenitors into the injured spinal cord in rats." *Neural Regen Res* 14(11): 2011-2019. (2019)
- Bazley, F. A., A. Maybhate, C. S. Tan, N. V. Thakor, C. Kerr and A. H. All. "Enhancement of bilateral cortical somatosensory evoked potentials to intact forelimb stimulation following thoracic contusion spinal cord injury in rats." *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 22(5): 953-964. (2014)
- Bekhet, A. H., V. Bochkezanian, I. M. Saab and A. S. Gorgey. "The Effects of Electrical Stimulation Parameters in Managing Spasticity After Spinal Cord Injury: A Systematic Review." *Am J Phys Med Rehabil* 98(6): 484-499. (2019)
- Berger, R. and S. Soder. "Neuroprotection in preterm infants." *Biomed Res Int* 2015: 257139. (2015)
- Bischofberger, J., D. Engel, M. Frotscher and P. Jonas. "Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network." *Pflugers Arch* 453(3): 361-372. (2006)
- Borton, D., S. Micera, R. Millan Jdel and G. Courtine. "Personalized neuroprosthetics." *Sci Transl Med* 5(210): 210rv212. (2013)
- Bracken, M. B., W. F. Collins, D. F. Freeman, M. J. Shepard, F. W. Wagner, R. M. Silten, K. G. Hellenbrand, J. Ransohoff, W. E. Hunt, P. L. Perot, Jr. and et al.. "Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury." *JAMA* 251(1): 45-52. (1984)
- Bracken, M. B., M. J. Shepard, W. F. Collins, T. R. Holford, W. Young, D. S. Baskin, H. M. Eisenberg, E. Flamm, L. Leo-Summers, J. Maroon and et al.. "A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study." *N Engl J Med* 322(20): 1405-1411. (1990)
- Bracken, M. B., M. J. Shepard, W. F. Collins, Jr., T. R. Holford, D. S. Baskin, H. M. Eisenberg, E. Flamm, L. Leo-Summers, J. C. Maroon, L. F. Marshall and et al.. "Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study." *J Neurosurg* 76(1): 23-31. (1992)

Bracken, M. B., M. J. Shepard, T. R. Holford, L. Leo-Summers, E. F. Aldrich, M. Fazl, M. Fehlings, D. L. Herr, P. W. Hitchon, L. F. Marshall, R. P. Nockels, V. Pascale, P. L. Perot, Jr., J. Piepmeier, V. K. Sonntag, F. Wagner, J. E. Wilberger, H. R. Winn and W. Young. "Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study." *JAMA* 277(20): 1597-1604. (1997)

Bunge, M. B., V. R. Holets, M. L. Bates, T. S. Clarke and B. D. Watson. "Characterization of photochemically induced spinal cord injury in the rat by light and electron microscopy." *Exp Neurol* 127(1): 76-93. (1994)

Calvert, J. S., M. L. Gill, M. B. Linde, D. D. Veith, A. R. Thoreson, C. Lopez, K. H. Lee, Y. P. Gerasimenko, V. R. Edgerton, I. A. Lavrov, K. D. Zhao, P. J. Grahn and D. G. Sayenko. "Voluntary Modulation of Evoked Responses Generated by Epidural and Transcutaneous Spinal Stimulation in Humans with Spinal Cord Injury." *J Clin Med* 10(21). (2021)

Capogrosso, M., N. Wenger, S. Raspopovic, P. Musienko, J. Beauparlant, L. Bassi Luciani, G. Courtine and S. Micera. "A computational model for epidural electrical stimulation of spinal sensorimotor circuits." *J Neurosci* 33(49): 19326-19340. (2013)

Carhart, M. R., J. He, R. Herman, S. D'Luzansky and W. T. Willis. "Epidural spinal-cord stimulation facilitates recovery of functional walking following incomplete spinal-cord injury." *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 12(1): 32-42. (2004)

Casha, S., D. Zygun, M. D. McGowan, I. Bains, V. W. Yong and R. J. Hurlbert. "Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury." *Brain* 135(Pt 4): 1224-1236. (2012)

Chang, C. W., Y. K. Lo, P. Gad, R. Edgerton and W. T. Liu. "Design and Fabrication of a Multi-electrode Array for Spinal Cord Epidural Stimulation." 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (Embc): 6834-6837. (2014)

Chaovipoch, P., K. A. Jelks, L. M. Gerhold, E. J. West, S. Chongthammakun and C. L. Floyd. "17beta-estradiol is protective in spinal cord injury in post- and pre-menopausal rats." *J Neurotrauma* 23(6): 830-852. (2006)

Chen, D., W. Zeng, Y. Fu, M. Gao and G. Lv. "Bone marrow mesenchymal stem cells combined with minocycline improve spinal cord injury in a rat model." *Int J Clin Exp Pathol* 8(10): 11957-11969. (2015)

Chen, K., J. Liu, P. Assinck, T. Bhatnagar, F. Streijger, Q. Zhu, M. F. Dvorak, B. K. Kwon, W. Tetzlaff and T. R. Oxland. "Differential Histopathological and Behavioral Outcomes Eight Weeks after Rat Spinal Cord Injury by Contusion, Dislocation, and Distraction Mechanisms." *J Neurotrauma* 33(18): 1667-1684. (2016)

- Chen, M. S., A. B. Huber, M. E. van der Haar, M. Frank, L. Schnell, A. A. Spillmann, F. Christ and M. E. Schwab. "Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1." *Nature* 403(6768): 434-439. (2000)
- Clarac, F., D. Cattaert and D. Le Ray. "Central control components of a 'simple' stretch reflex." *Trends Neurosci* 23(5): 199-208. (2000)
- Courtine, G., Y. Gerasimenko, R. van den Brand, A. Yew, P. Musienko, H. Zhong, B. Song, Y. Ao, R. M. Ichiyama, I. Lavrov, R. R. Roy, M. V. Sofroniew and V. R. Edgerton. "Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input." *Nat Neurosci* 12(10): 1333-1342. (2009)
- da Costa, E. S., A. L. Carvalho, A. M. Martinez, B. De-Ary-Pires, M. A. Pires-Neto and R. de Ary-Pires. "Strapping the spinal cord: an innovative experimental model of CNS injury in rats." *J Neurosci Methods* 170(1): 130-139. (2008)
- Danner, S. M., U. S. Hofstoetter, B. Freundl, H. Binder, W. Mayr, F. Rattay and K. Minassian. "Human spinal locomotor control is based on flexibly organized burst generators." *Brain* 138(Pt 3): 577-588. (2015)
- Dimitrijevic, M. R., Y. Gerasimenko and M. M. Pinter. "Evidence for a spinal central pattern generator in humans." *Ann N Y Acad Sci* 860: 360-376. (1998)
- Ditunno, J. F., J. W. Little, A. Tessler and A. S. Burns. "Spinal shock revisited: a four-phase model." *Spinal Cord* 42(7): 383-395. (2004)
- Dose, F., R. Deumens, P. Forget and G. Taccola. "Staggered multi-site low-frequency electrostimulation effectively induces locomotor patterns in the isolated rat spinal cord." *Spinal Cord* 54(2): 93-101. (2016)
- Downey, R. J., M. J. Bellman, H. Kawai, C. M. Gregory and W. E. Dixon. "Comparing the Induced Muscle Fatigue Between Asynchronous and Synchronous Electrical Stimulation in Able-Bodied and Spinal Cord Injured Populations." *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 23(6): 964-972. (2015)
- Duan, W., Q. Huang, Z. Chen, S. N. Raja, F. Yang and Y. Guan. "Comparisons of motor and sensory abnormalities after lumbar and thoracic contusion spinal cord injury in male rats." *Neurosci Lett* 708: 134358. (2019)
- Edgerton, V. R., G. Courtine, Y. P. Gerasimenko, I. Lavrov, R. M. Ichiyama, A. J. Fong, L. L. Cai, C. K. Otsoshi, N. J. Tillakaratne, J. W. Burdick and R. R. Roy. "Training locomotor networks." *Brain Res Rev* 57(1): 241-254. (2008)
- Ek, C. J., M. D. Habgood, J. K. Callaway, R. Dennis, K. M. Dziegielewska, P. A. Johansson, A. Potter, B. Wheaton and N. R. Saunders. "Spatio-temporal progression of grey and white matter damage following contusion injury in rat spinal cord." *PLoS One* 5(8): e12021. (2010)

- Faleiros, F., M. Marcossi, O. Ribeiro, A. Tholl, G. Freitas and M. Riberto. "Epidemiological profile of spinal cord injury in Brazil." *J Spinal Cord Med* 46(1): 75-82. (2023)
- Fehlings, M. G., J. R. Wilson and N. Cho. "Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint." *Neurosurgery* 61 Suppl 1: 36-42. (2014)
- Fiford, R. J., L. E. Bilston, P. Waite and J. Lu. "A vertebral dislocation model of spinal cord injury in rats." *J Neurotrauma* 21(4): 451-458. (2014)
- Frankel, H. L., D. O. Hancock, G. Hyslop, J. Melzak, L. S. Michaelis, G. H. Ungar, J. D. Vernon and J. J. Walsh. "The value of postural reduction in the initial management of closed injuries of the spine with paraplegia and tetraplegia. I." *Paraplegia* 7(3): 179-192. (1969)
- Furlan, J. C., B. M. Sakakibara, W. C. Miller and A. V. Krassioukov. "Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury." *Can J Neurol Sci* 40(4): 456-464. (2013)
- Gad, P., J. Choe, M. S. Nandra, H. Zhong, R. R. Roy, Y. C. Tai and V. R. Edgerton. "Development of a multi-electrode array for spinal cord epidural stimulation to facilitate stepping and standing after a complete spinal cord injury in adult rats." *J Neuroeng Rehabil* 10: 2. (2013)
- Gandhi, D., P. J. Rousche, R. Das, L. Saggere and S. Krishnan. "Functionality evaluation of photo-definable polyimide, flexible interface for the central nervous system." 2006 1st IEEE Ras-Embs International Conference on Biomedical Robotics and Biomechatronics, Vols 1-3: 655. (2006)
- Gaunt, R. A., A. Prochazka, V. K. Mushahwar, L. Guevremont and P. H. Ellaway. "Intraspinal microstimulation excites multisegmental sensory afferents at lower stimulus levels than local alpha-motoneuron responses." *Journal of Neurophysiology* 96(6): 2995-3005. (2006)
- Gerardo-Nava, J., Mayorenko, II, T. Grehl, H. W. Steinbusch, J. Weis and G. A. Brook "Differential pattern of neuroprotection in lumbar, cervical and thoracic spinal cord segments in an organotypic rat model of glutamate-induced excitotoxicity." *J Chem Neuroanat* 53: 11-17. (2013).
- Gerasimenko, Y. P., R. M. Ichiyama, I. A. Lavrov, G. Courtine, L. Cai, H. Zhong, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Epidural spinal cord stimulation plus quipazine administration enable stepping in complete spinal adult rats." *J Neurophysiol* 98(5): 2525-2536. (2007)
- Gerasimenko, Y. P., I. A. Lavrov, G. Courtine, R. M. Ichiyama, C. J. Dy, H. Zhong, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Spinal cord reflexes induced by epidural spinal cord stimulation in normal awake rats." *J Neurosci Methods* 157(2): 253-263. (2006)
- Gerasimenko, Y. P., D. C. Lu, M. Modaber, S. Zdunowski, P. Gad, D. G. Sayenko, E. Morikawa, P. Haakana, A. R. Ferguson, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Noninvasive

Reactivation of Motor Descending Control after Paralysis." *J Neurotrauma* 32(24): 1968-1980. (2015)

Gibson, W., B. M. Wand and N. E. O'Connell. "Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for neuropathic pain in adults." *Cochrane Database Syst Rev* 9(9): CD011976. (2017)

Gill, M. L., M. B. Linde, R. F. Hale, C. Lopez, K. J. Fautsch, J. S. Calvert, D. D. Veith, L. A. Beck, K. L. Garlanger, D. G. Sayenko, I. A. Lavrov, A. R. Thoreson, P. J. Grahn and K. D. Zhao. "Alterations of Spinal Epidural Stimulation-Enabled Stepping by Descending Intentional Motor Commands and Proprioceptive Inputs in Humans With Spinal Cord Injury." *Front Syst Neurosci* 14: 590231. (2020)

Goganau, I., B. Sandner, N. Weidner, K. Fouad and A. Blesch. "Depolarization and electrical stimulation enhance in vitro and in vivo sensory axon growth after spinal cord injury." *Exp Neurol* 300: 247-258. (2018)

Griffin, L., M. J. Decker, J. Y. Hwang, B. Wang, K. Kitchen, Z. Ding and J. L. Ivy. "Functional electrical stimulation cycling improves body composition, metabolic and neural factors in persons with spinal cord injury." *J Electromyogr Kinesiol* 19(4): 614-622. (2009)

Gruner, J. A.. "A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat." *J Neurotrauma* 9(2): 123-126; discussion 126-128. (1992).

Gybels, J. and D. van Roost. "Spinal cord stimulation for spasticity." *Adv Tech Stand Neurosurg* 15: 63-96. (1987)

Haefeli, J., J. R. Huie, K. Morioka and A. R. Ferguson. "Assessments of sensory plasticity after spinal cord injury across species." *Neurosci Lett* 652: 74-81. (2017)

Hao, H. H., L. Wang, Z. J. Guo, L. Bai, R. P. Zhang, W. B. Shuang, Y. J. Jia, J. Wang, X. Y. Li and Q. Liu. "Valproic acid reduces autophagy and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats." *Neurosci Bull* 29(4): 484-492. (2013)

Harkema, S., Y. Gerasimenko, J. Hodes, J. Burdick, C. Angeli, Y. Chen, C. Ferreira, A. Willhite, E. Rejc, R. G. Grossman and V. R. Edgerton. "Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study." *Lancet* 377(9781): 1938-1947. (2011)

Hauser, D., K. Behr, K. Konno, D. Schreiner, A. Schmidt, M. Watanabe, J. Bischofberger and P. Scheiffele. "Targeted proteoform mapping uncovers specific Neurexin-3 variants required for dendritic inhibition." *Neuron* 110(13): 2094-2109 e2010. (2022)

Herman, R., J. He, S. D'Luzansky, W. Willis and S. Dilli. "Spinal cord stimulation facilitates functional walking in a chronic, incomplete spinal cord injured." *Spinal Cord* 40(2): 65-68. (2002)

Hofstoetter, U. S., S. M. Danner, B. Freundl, H. Binder, W. Mayr, F. Rattay and K. Minassian. "Periodic modulation of repetitively elicited monosynaptic reflexes of the human lumbosacral spinal cord." *J Neurophysiol* 114(1): 400-410. (2015)

Huang, H., J. He, R. Herman and M. R. Carhart. "Modulation effects of epidural spinal cord stimulation on muscle activities during walking." *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 14(1): 14-23. (2006)

Hurlbert, R. J.. "Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: point." *Neurosurgery* 61 Suppl 1: 32-35. (2014)

Injury, G. B. D. T. B. and C. Spinal Cord Injury. "Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *Lancet Neurol* 18(1): 56-87. (2019)

Jazayeri, S. B., S. F. Maroufi, E. Mohammadi, M. A. Dabbagh Ohadi, E. M. Hagen, M. Chalangari, S. B. Jazayeri, M. Safdarian, S. A. Zadegan, Z. Ghodsi and V. Rahimi-Movaghar. "Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: A systematic review, data integration, and update." *World Neurosurg* X 18: 100171. (2023)

Jilge, B., K. Minassian, F. Rattay, M. M. Pinter, F. Gerstenbrand, H. Binder and M. R. Dimitrijevic. "Initiating extension of the lower limbs in subjects with complete spinal cord injury by epidural lumbar cord stimulation." *Exp Brain Res* 154(3): 308-326. (2004)

Khan, M. and R. Griebel. "Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques." *Can J Neurol Sci* 10(3): 161-165. (1983)

Khan, T., R. M. Havey, S. T. Sayers, A. Patwardhan and W. W. King. "Animal models of spinal cord contusion injuries." *Lab Anim Sci* 49(2): 161-172. (1999)

Kjell, J. and L. Olson "Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies." *Dis Model Mech* 9(10): 1125-1137. (2016).

Koketsu, K. (1952). "Studies on the reaction of a single motoneuron in the spinal cord of a toad to electrical stimulation." *Jpn J Physiol* 2(4): 260-269.

Koozekanani, S. H., W. M. Vise, R. M. Hashemi and R. B. McGhee. "Possible mechanisms for observed pathophysiological variability in experimental spinal cord injury by the method of Allen." *J Neurosurg* 44(4): 429-434. (1976)

Korzhova, J., D. Sinitsyn, A. Chervyakov, A. Poydasheva, M. Zakharova, N. Suponeva, L. Chernikova and M. Piradov. "Transcranial and spinal cord magnetic stimulation in treatment of spasticity: a literature review and meta-analysis." *Eur J Phys Rehabil Med* 54(1): 75-84. (2018)

Landry, E., J. Frenette and P. A. Guertin "Body weight, limb size, and muscular properties of early paraplegic mice." *J Neurotrauma* 21(8): 1008-1016. (2004).

- Lavrov, I., G. Courtine, C. J. Dy, R. van den Brand, A. J. Fong, Y. Gerasimenko, H. Zhong, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Facilitation of stepping with epidural stimulation in spinal rats: role of sensory input." *J Neurosci* 28(31): 7774-7780. (2008)
- Lavrov, I., C. J. Dy, A. J. Fong, Y. Gerasimenko, G. Courtine, H. Zhong, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Epidural stimulation induced modulation of spinal locomotor networks in adult spinal rats." *J Neurosci* 28(23): 6022-6029. (2008)
- Lavrov, I., Y. Gerasimenko, J. Burdick, H. Zhong, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Integrating multiple sensory systems to modulate neural networks controlling posture." *J Neurophysiol* 114(6): 3306-3314. (2015)
- Lavrov, I., Y. P. Gerasimenko, R. M. Ichiyama, G. Courtine, H. Zhong, R. R. Roy and V. R. Edgerton. "Plasticity of spinal cord reflexes after a complete transection in adult rats: relationship to stepping ability." *J Neurophysiol* 96(4): 1699-1710. (2006)
- Lee, D. H. and J. K. Lee. "Animal models of axon regeneration after spinal cord injury." *Neurosci Bull* 29(4): 436-444. (2013)
- Lee, K., A. Singh, J. P. He, S. Massia, B. Kim and G. Raupp. "Polyimide based neural implants with stiffness improvement." *Sensors and Actuators B-Chemical* 102(1): 67-72. (2004)
- Lepski, G., C. E. Jannes, G. Nikkhah and J. Bischofberger. "cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels." *Front Cell Neurosci* 7: 155. (2013)
- Levine, A. J., C. A. Hinckley, K. L. Hilde, S. P. Driscoll, T. H. Poon, J. M. Montgomery and S. L. Pfaff. "Identification of a cellular node for motor control pathways." *Nat Neurosci* 17(4): 586-593. (2014)
- Li, J. and G. Lepski. "Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review." *Biomed Res Int* 2013: 786475. (2013)
- Liu, J. and L. M. Jordan. "Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT<sub>7</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors." *J Neurophysiol* 94(2): 1392-1404. (2005)
- Lu, D. C., V. R. Edgerton, M. Modaber, N. AuYong, E. Morikawa, S. Zdunowski, M. E. Sarino, M. Sarrafzadeh, M. R. Nuwer, R. R. Roy and Y. Gerasimenko. "Engaging Cervical Spinal Cord Networks to Reenable Volitional Control of Hand Function in Tetraplegic Patients." *Neurorehabil Neural Repair* 30(10): 951-962. (2016)
- Mariano, E. D., C. M. Batista, B. J. Barbosa, S. K. Marie, M. J. Teixeira, M. Morgalla, M. Tatagiba, J. Li and G. Lepski. "Current perspectives in stem cell therapy for spinal cord repair in humans: a review of work from the past 10 years." *Arq Neuropsiquiatr* 72(6): 451-456. (2014)



- Mariano, E. D., M. J. Teixeira, S. K. Marie and G. Lepski. "Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives." *World J Stem Cells* 7(2): 477-482. (2015)
- Mattucci, S., J. Speidel, J. Liu, W. Tetzlaff and T. R. Oxland. "Temporal Progression of Acute Spinal Cord Injury Mechanisms in a Rat Model: Contusion, Dislocation, and Distraction." *J Neurotrauma* 38(15): 2103-2121. (2021)
- Meletis, K., F. Barnabe-Heider, M. Carlen, E. Evergren, N. Tomilin, O. Shupliakov and J. Frisen. "Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells." *PLoS Biol* 6(7): e182. (2008)
- Melzack, R. and P. D. Wall. "Pain mechanisms: a new theory." *Science* 150(3699): 971-979. (1965)
- Meyerson, B. A. and B. Linderoth. "Mechanisms of spinal cord stimulation in neuropathic pain." *Neurol Res* 22(3): 285-292. (2000)
- Mills, C. D., B. C. Hains, K. M. Johnson and C. E. Hulsebosch. "Strain and model differences in behavioral outcomes after spinal cord injury in rat." *J Neurotrauma* 18(8): 743-756. (2001)
- Moon, L. and M. B. Bunge. "From animal models to humans: strategies for promoting CNS axon regeneration and recovery of limb function after spinal cord injury." *J Neurol Phys Ther* 29(2): 55-69. (2005)
- Moraud, E. M., M. Capogrosso, E. Formento, N. Wenger, J. DiGiovanna, G. Courtine and S. Micera. "Mechanisms Underlying the Neuromodulation of Spinal Circuits for Correcting Gait and Balance Deficits after Spinal Cord Injury." *Neuron* 89(4): 814-828. (2016)
- Morgalla, M., M. Fortunato, A. Azam, M. Tatagiba and G. Lepski. "High-Resolution Three-Dimensional Computed Tomography for Assessing Complications Related to Intrathecal Drug Delivery." *Pain Physician* 19(5): E775-780. (2016)
- Morgalla, M. H., A. Bolat, M. Fortunato, G. Lepski and B. S. Chander. "Dorsal Root Ganglion Stimulation Used for the Treatment of Chronic Neuropathic Pain in the Groin: A Single-Center Study With Long-Term Prospective Results in 34 Cases." *Neuromodulation* 20(8): 753-760. (2017)
- Morgalla, M. H., M. Fortunato, G. Lepski and B. S. Chander "Dorsal Root Ganglion Stimulation (DRGS) for the Treatment of Chronic Neuropathic Pain: A Single-Center Study with Long-Term Prospective Results in 62 Cases." *Pain Physician* 21(4): E377-E387. (2018).
- Moritz, C. T., T. H. Lucas, S. I. Perlmutter and E. E. Fetz. "Forelimb movements and muscle responses evoked by microstimulation of cervical spinal cord in sedated monkeys." *J Neurophysiol* 97(1): 110-120. (2007)

Nagoshi, N., H. Nakashima and M. G. Fehlings. "Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: from bench to bedside." *Molecules* 20(5): 7775-7789. (2015)

Nagoshi, N. and H. Okano. "iPSC-derived neural precursor cells: potential for cell transplantation therapy in spinal cord injury." *Cell Mol Life Sci* 75(6): 989-1000. (2018)

Nakae, A., K. Nakai, K. Yano, K. Hosokawa, M. Shibata and T. Mashimo. "The animal model of spinal cord injury as an experimental pain model." *J Biomed Biotechnol* 2011: 939023. (2011)

Nevin, A. N., K. Nguyen, S. Atresh, A. Vivanti and I. J. Hickman "Effective management of spasticity and impacts on weight change and resting energy expenditure in a female with spinal cord injury: a case report." *Spinal Cord Ser Cases*3: 17057. (2017).

Nishimura, S., A. Yasuda, H. Iwai, M. Takano, Y. Kobayashi, S. Nori, O. Tsuji, K. Fujiyoshi, H. Ebise, Y. Toyama, H. Okano and M. Nakamura. "Time-dependent changes in the microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neural stem cell transplantation for spinal cord injury." *Mol Brain* 6: 3. (2013)

Norenberg, M. D., J. Smith and A. Marcillo. "The pathology of human spinal cord injury: defining the problems." *J Neurotrauma* 21(4): 429-440. (2004)

Nori, S., Y. Okada, A. Yasuda, O. Tsuji, Y. Takahashi, Y. Kobayashi, K. Fujiyoshi, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Ikeda, Y. Toyama, S. Yamanaka, M. Nakamura and H. Okano. "Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(40): 16825-16830. (2011)

Osterholm, J. L. "The pathophysiological response to spinal cord injury. The current status of related research." *J Neurosurg* 40(1): 5-33. (1974)

Pierrot-Deseilligny, E.. "Peripheral and descending control of neurones mediating non-monosynaptic Ia excitation to motoneurons: a presumed propriospinal system in man." *Prog Brain Res* 80: 305-314; discussion 295-307. (1989)

Plane, J. M., Y. Shen, D. E. Pleasure and W. Deng. "Prospects for minocycline neuroprotection." *Arch Neurol* 67(12): 1442-1448. (2010)

Pointillart, V., M. E. Petitjean, L. Wiart, J. M. Vital, P. Lassie, M. Thicoipe and P. Dabadie. "Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase." *Spinal Cord* 38(2): 71-76. (2000)

Poon, P. C., D. Gupta, M. S. Shoichet and C. H. Tator. "Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates." *Spine (Phila Pa 1976)* 32(25): 2853-2859. (2007)

Quevedo, J., B. Fedirchuk, S. Gosgnach and D. A. McCrea. "Group I disynaptic excitation of cat hindlimb flexor and bifunctional motoneurons during fictive locomotion." *J Physiol* 525 Pt 2(Pt 2): 549-564. (2000)

Rao, T., F. Wu, D. Xing, Z. Peng, D. Ren, W. Feng, Y. Chen, Z. Zhao, H. Wang, J. Wang, W. Kan and Q. Zhang. "Effects of valproic Acid on axonal regeneration and recovery of motor function after peripheral nerve injury in the rat." *Arch Bone Jt Surg* 2(1): 17-24. (2014)

Rattay, F., K. Minassian and M. R. Dimitrijevic. "Epidural electrical stimulation of posterior structures of the human lumbosacral cord: 2. quantitative analysis by computer modeling." *Spinal Cord* 38(8): 473-489. (2000)

Rejc, E., C. Angeli and S. Harkema. "Effects of Lumbosacral Spinal Cord Epidural Stimulation for Standing after Chronic Complete Paralysis in Humans." *PLoS One* 10(7): e0133998. (2015)

Rivlin, A. S. and C. H. Tator. "Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat." *J Neurosurg* 47(4): 577-581. (1977).

Rivlin, A. S. and C. H. Tator. "Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat." *Surg Neurol* 10(1): 38-43. (1978)

Rodriguez-Barrera, R., M. Rivas-Gonzalez, J. Garcia-Sanchez, D. Mojica-Torres and A. Ibarra. "Neurogenesis after Spinal Cord Injury: State of the Art." *Cells* 10(6). (2021)

Rosenzweig, E. S., G. Courtine, D. L. Jindrich, J. H. Brock, A. R. Ferguson, S. C. Strand, Y. S. Nout, R. R. Roy, D. M. Miller, M. S. Beattie, L. A. Havton, J. C. Bresnahan, V. R. Edgerton and M. H. Tuszynski. "Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury." *Nat Neurosci* 13(12): 1505-1510. (2010)

Rossignol, S. and A. Frigon. "Recovery of Locomotion After Spinal Cord Injury: Some Facts and Mechanisms." *Annual Review of Neuroscience*, Vol 34 34: 413-440. (2011)

Rousche, P. J., D. S. Pellinen, D. P. Pivin, J. C. Williams, R. J. Vetter and D. R. Kipke. "Flexible polyimide-based intracortical electrode arrays with bioactive capability." *Ieee Transactions on Biomedical Engineering* 48(3): 361-371. (2001)

Ruzicka, J., L. Machova-Urdzikova, J. Gillick, T. Amemori, N. Romanyuk, K. Karova, K. Zaviskova, J. Dubisova, S. Kubinova, R. Murali, E. Sykova, M. Jhanwar-Uniyal and P. Jendelova. "A Comparative Study of Three Different Types of Stem Cells for Treatment of Rat Spinal Cord Injury." *Cell Transplant* 26(4): 585-603. (2017)

Rybak, I. A., K. Stecina, N. A. Shevtsova and D. A. McCrea. "Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation." *J Physiol* 577(Pt 2): 641-658. (2006)

Salewski, R. P., R. A. Mitchell, L. Li, C. Shen, M. Milekovskaia, A. Nagy and M. G. Fehlings. "Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Mediate Functional Recovery Following Thoracic Spinal Cord Injury Through Remyelination of Axons." *Stem Cells Transl Med* 4(7): 743-754. (2015)

Salewski, R. P., R. A. Mitchell, C. Shen and M. G. Fehlings. "Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury." *Stem Cells Dev* 24(1): 36-50. (2015)

Salmons, S. "An implantable muscle stimulator." *J Physiol* 188(2): 13P-14P. (1967)

Sato, K. L., E. W. King, L. M. Johaneck and K. A. Sluka. "Spinal cord stimulation reduces hypersensitivity through activation of opioid receptors in a frequency-dependent manner." *Eur J Pain* 17(4): 551-561. (2013)

Sayenko, D. G., C. Angeli, S. J. Harkema, V. R. Edgerton and Y. P. Gerasimenko. "Neuromodulation of evoked muscle potentials induced by epidural spinal-cord stimulation in paralyzed individuals." *J Neurophysiol* 111(5): 1088-1099. (2014)

Scheff, S. W., A. G. Rabchevsky, I. Fugaccia, J. A. Main and J. E. Lumpp, Jr.. "Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device." *J Neurotrauma* 20(2): 179-193. (2003)

Scholpa, N. E., E. C. Simmons, D. G. Tilley and R. G. Schnellmann. "beta2-adrenergic receptor-mediated mitochondrial biogenesis improves skeletal muscle recovery following spinal cord injury." *Exp Neurol* 322: 113064. (2019)

Shah, P. K. and Y. Gerasimenko. "Multi-site spinal stimulation strategies to enhance locomotion after paralysis." *Neural Regen Res* 11(12): 1926-1927. (2016)

Shah, P. K. and I. Lavrov. "Spinal Epidural Stimulation Strategies: Clinical Implications of Locomotor Studies in Spinal Rats." *Neuroscientist* 23(6): 664-680. (2017)

Sharif-Alhoseini, M., M. Khormali, M. Rezaei, M. Safdarian, A. Hajighadery, M. M. Khalatbari, M. Safdarian, S. Meknatkhah, M. Rezvan, M. Chalangari, P. Derakhshan and V. Rahimi-Movaghar. "Animal models of spinal cord injury: a systematic review." *Spinal Cord* 55(8): 714-721. (2017)

Shealy, C. N., J. T. Mortimer and J. B. Reswick. "Electrical inhibition of pain by stimulation of the dorsal columns: preliminary clinical report." *Anesth Analg* 46(4): 489-491. (1967)

Sherrington, C. S.. "Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing." *J Physiol* 40(1-2): 28-121. (1910)

Siegfried, J., J. U. Krainick, H. Haas, C. Adorjani, M. Meyer and U. Thoden. "Electrical spinal cord stimulation for spastic movement disorders." *Appl Neurophysiol* 41(1-4): 134-141. (1978)

Singh, A., L. Tetreault, S. Kalsi-Ryan, A. Nouri and M. G. Fehlings. "Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury." *Clin Epidemiol* 6: 309-331. (2014)

Streijger, F., K. So, N. Manouchehri, S. Tigchelaar, J. H. T. Lee, E. B. Okon, K. Shortt, S. E. Kim, K. McInnes, P. Cripton and B. K. Kwon. "Changes in Pressure,

- Hemodynamics, and Metabolism within the Spinal Cord during the First 7 Days after Injury Using a Porcine Model." *J Neurotrauma* 34(24): 3336-3350. (2017)
- Talac, R., J. A. Friedman, M. J. Moore, L. Lu, E. Jabbari, A. J. Windebank, B. L. Currier and M. J. Yaszemski. "Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies." *Biomaterials* 25(9): 1505-1510. (2004)
- Talpalar, A. E., T. Endo, P. Low, L. Borgius, M. Hagglund, K. J. Dougherty, J. Ryge, T. S. Hnasko and O. Kiehn "Identification of minimal neuronal networks involved in flexor-extensor alternation in the mammalian spinal cord." *Neuron* 71(6): 1071-1084. (2011).
- Tator, C. H., R. Hashimoto, A. Raich, D. Norvell, M. G. Fehlings, J. S. Harrop, J. Guest, B. Aarabi and R. G. Grossman. "Translational potential of preclinical trials of neuroprotection through pharmacotherapy for spinal cord injury." *J Neurosurg Spine* 17(1 Suppl): 157-229. (2012)
- Temkin, N. R., G. D. Anderson, H. R. Winn, R. G. Ellenbogen, G. W. Britz, J. Schuster, T. Lucas, D. W. Newell, P. N. Mansfield, J. E. Machamer, J. Barber and S. S. Dikmen. "Magnesium sulfate for neuroprotection after traumatic brain injury: a randomised controlled trial." *Lancet Neurol* 6(1): 29-38. (2007)
- Tharu, N. S., M. Alam, Y. T. Ling, A. Y. Wong and Y. P. Zheng. "Combined Transcutaneous Electrical Spinal Cord Stimulation and Task-Specific Rehabilitation Improves Trunk and Sitting Functions in People with Chronic Tetraplegia." *Biomedicines* 11(1). (2022)
- Verstappen, K., R. Aquarius, A. Klymov, K. E. Wever, L. Damveld, S. C. G. Leeuwenburgh, R. Bartels, C. R. Hooijmans and X. F. Walboomers. "Systematic Evaluation of Spinal Cord Injury Animal Models in the Field of Biomaterials." *Tissue Eng Part B Rev* 28(6): 1169-1179. (2022)
- Wagner, F. B., J. B. Mignardot, C. G. Le Goff-Mignardot, R. Demesmaeker, S. Komi, M. Capogrosso, A. Rowald, I. Seanez, M. Caban, E. Pirondini, M. Vat, L. A. McCracken, R. Heimgartner, I. Fodor, A. Watrin, P. Seguin, E. Paoles, K. Van Den Keybus, G. Eberle, B. Schurch, E. Pralong, F. Becce, J. Prior, N. Buse, R. Buschman, E. Neufeld, N. Kuster, S. Carda, J. von Zitzewitz, V. Delattre, T. Denison, H. Lambert, K. Minassian, J. Bloch and G. Courtine. "Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury." *Nature* 563(7729): 65-71. (2018)
- Wang, A., G. Zhang, C. Zhang, C. Wu, T. Song and X. Huo. "Simulation of injury potential compensation by direct current stimulation in rat spinal cord." *Biomed Mater Eng* 24(6): 3693-3700. (2014)
- Wang, X. H., C. Jiang, Y. Y. Zhang, Z. Chen, Z. Y. Wang, H. Yang and D. J. Hao. "Analysis and comparison of a spinal cord injury model with a single-axle-lever clip or a parallel-moving clip compression in rats." *Spinal Cord* 60(4): 332-338. (2022)
- Watson, B. D., R. Prado, W. D. Dietrich, M. D. Ginsberg and B. A. Green. "Photochemically induced spinal cord injury in the rat." *Brain Res* 367(1-2): 296-300. (1986)

Webber, D. J., E. J. Bradbury, S. B. McMahon and S. L. Minger. "Transplanted neural progenitor cells survive and differentiate but achieve limited functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord." *Regen Med* 2(6): 929-945. (2007)

Wenger, N., E. M. Moraud, J. Gandar, P. Musienko, M. Capogrosso, L. Baud, C. G. Le Goff, Q. Barraud, N. Pavlova, N. Dominici, I. R. Minev, L. Asboth, A. Hirsch, S. Duis, J. Kreider, A. Mortera, O. Haverbeck, S. Kraus, F. Schmitz, J. DiGiovanna, R. van den Brand, J. Bloch, P. Detemple, S. P. Lacour, E. Bezdard, S. Micera and G. Courtine. "Spatiotemporal neuromodulation therapies engaging muscle synergies improve motor control after spinal cord injury." *Nat Med* 22(2): 138-145. (2016)

Wenger, N., E. M. Moraud, S. Raspopovic, M. Bonizzato, J. DiGiovanna, P. Musienko, M. Morari, S. Micera and G. Courtine. "Closed-loop neuromodulation of spinal sensorimotor circuits controls refined locomotion after complete spinal cord injury." *Sci Transl Med* 6(255): 255ra133. (2014)

Witiw, C. D. and M. G. Fehlings. "Acute Spinal Cord Injury." *J Spinal Disord Tech* 28(6): 202-210. (2015)

Wu, X., Y. P. Zhang, W. Qu, L. B. E. Shields, C. B. Shields and X. M. Xu. "A Tissue Displacement-based Contusive Spinal Cord Injury Model in Mice." *J Vis Exp*(124). (2017)

Wu, Y., K. Satkunendrarajah, Y. Teng, D. S. Chow, J. Buttigieg and M. G. Fehlings. "Delayed post-injury administration of riluzole is neuroprotective in a preclinical rodent model of cervical spinal cord injury." *J Neurotrauma* 30(6): 441-452. (2013).

Wurth, S., M. Capogrosso, S. Raspopovic, J. Gandar, G. Federici, N. Kinany, A. Cutrone, A. Piersigilli, N. Pavlova, R. Guiet, G. Taverni, J. Rigosa, P. Shkorbatova, X. Navarro, Q. Barraud, G. Courtine and S. Micera. "Long-term usability and bio-integration of polyimide-based intra-neural stimulating electrodes." *Biomaterials* 122: 114-129. (2017)

Yasuda, A., O. Tsuji, S. Shibata, S. Nori, M. Takano, Y. Kobayashi, Y. Takahashi, K. Fujiyoshi, C. M. Hara, A. Miyawaki, H. J. Okano, Y. Toyama, M. Nakamura and H. Okano. "Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord." *Stem Cells* 29(12): 1983-1994. (2011)

Yip, P. K. and A. Malaspina. "Spinal cord trauma and the molecular point of no return." *Mol Neurodegener* 7: 6. (2012)

Zhang, X., C. B. Liu, D. G. Yang, C. Qin, X. C. Dong, D. P. Li, C. Zhang, Y. Guo, L. J. Du, F. Gao, M. L. Yang and J. J. Li. "Dynamic changes in intramedullary pressure 72 hours after spinal cord injury." *Neural Regen Res* 14(5): 886-895. (2019)

Zhivolupov, S. A., M. M. Odinak, N. A. Rashidov, L. S. Onischenko, I. N. Samartsev and A. A. Jurin. "Impulse magnetic stimulation facilitates synaptic regeneration in rats following sciatic nerve injury." *Neural Regen Res* 7(17): 1299-1303. (2012)

Zhu, S., I. G. Stavrovskaya, M. Drozda, B. Y. Kim, V. Ona, M. Li, S. Sarang, A. S. Liu, D. M. Hartley, D. C. Wu, S. Gullans, R. J. Ferrante, S. Przedborski, B. S. Kristal and R. M. Friedlander. "Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice." *Nature* 417(6884): 74-78 (2002).

## ANEXO

### A- Aprovação comitê de ética no uso de animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Estimulação Elétrica Intramedular Para Recuperação Motora de Ratos com Lesão medular**”, registrada com o nº **1013/2018**, sob a responsabilidade de **Guilherme Alves Lepski** e **Leonidas Gomes Angelin**, apresentada pelo Departamento de Neurologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 21.05.18

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 02-04-2018 Término: 01-04-2022
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	<b>20</b>
Peso/Idade	2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério ICB

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 21 de Maio de 2018

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



## B- Aprovação de submissão de trabalho Científico

E-mail de Universidade de São Paulo - A manuscript number has been... <https://mail.google.com/mail/u/2/?ik=f15d9392d2&view=pt&search=...>



Leonidas Gomes Angelin <leonidasangelin@usp.br>

### A manuscript number has been assigned to **Regeneration and plasticity induced by epidural stimulation in the rodent model of spinal cord injury**

1 mensagem

Neural Regen Res <em@editorialmanager.com>

5 de julho de 2023 às 20:49

Responder a: Neural Regen Res <szb@nrren.org>

Para: Leonidas Gomes Gomes Angelin <leonidasangelin@usp.br>

Dear Mr Gomes Angelin,

Your submission entitled "Regeneration and plasticity induced by epidural stimulation in the rodent model of spinal cord injury" has been assigned the following manuscript number: NRR-D-23-01131.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/nrr/>.

Neural Regeneration Research (NRR, [www.nrronline.org](http://www.nrronline.org)) is the one and only open-access, peer-reviewed international journal focusing exclusively on the exciting field of neural regeneration. NRR is devoted to publishing basic research, translational medicine and randomized clinical trial articles, as well as prospective reviews written by invited experts in the field of neural regeneration. NRR publishes a diverse array of topics in neural regeneration, including brain, spinal cord, peripheral nerve injuries; neurodegenerative diseases; and neuroimaging. Papers regarding the treatment of central and peripheral nervous system diseases using cell therapy, gene therapy, neural regulation technique, tissue engineering, bioengineering, medication, and biomaterial/neuroprosthesis applications are of great interest. Papers should clearly describe neuronal changes after injury; state how to alleviate neuronal injury and evaluate the injury; explain the procedures and methods of protecting injured neurons; and investigate the mechanisms underlying neuronal injury, prognosis and neural regeneration at the cellular and molecular level.

Thank you for submitting your valuable work to our journal. For further question, please contact [szb@nrren.org](mailto:szb@nrren.org).

Kind regards,

Neural Regeneration Research

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/nrr/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

## C- Artigo científico submetido

**Regeneration and plasticity induced by epidural stimulation in the rodent model of spinal cord injury**

Angelim, Leonidas; Lepski, Guilherme

Affiliations: Laboratory of Medical Investigation, LIM26, Department of Experimental Surgery, Medical School, University of Sao Paulo

**Abstract**

Introduction: Traumatic spinal cord injury is a major cause of disability, and currently, there are no fully effective treatments for this condition. However, studies based on epidural electrical stimulation have shown significant advances in motor rehabilitation, even in chronic phases of the disease. Objective: The present study aims at investigating the effectiveness of epidural electric stimulation in the motor recovery of rats with spinal cord injury, and secondarily, aims at clarifying the mechanisms beyond a possible recovery. Methods: (1) We improved the impact spinal cord injury model in order to cause severe and permanent motor deficits lasting 2 months. (2) We developed and tested an implantable epidural spinal cord stimulator device for rats, which included electrode and implantable generator. (3) We evaluated the efficacy of epidural electrical stimulation on motor recovery after spinal cord injury in Wistar rats. To this end, 60 animals were divided into the following groups: i) severe injury with epidural electrical stimulation (n=15), ii) severe injury without stimulation (n=15), iii) sham implantation without battery (n=15), iv) control group, without surgical intervention. All animals underwent weekly evaluations using the BBB index, inclined plane and OpenField test, starting one week before lesion, and continuing for eight weeks. After this period, the animals were sacrificed, their spinal cords were explanted and prepared for histological analysis (hematoxylin-eosin), and immunohistochemistry for NeuN, beta-III-tubulin and synaptophysin. Finally, NeuN-positive neuronal nuclei were quantified through stereology, and fluorescence signal intensity for beta-tubulin and synaptophysin was measured in epifluorescence microscope. Results: the stimulated group showed significant improvement in the BBB index in relation to the sham group (5.2 ± 1.9 vs. 4 ± 1.9, p<0.05, respectively). Stereological analysis showed a significantly higher average count of neural cells in the stim group in relation to sham (1783 ± 2 vs. 897 ± 3, p<0.001). Additionally, fluorescence signal intensity for synaptophysin was significantly higher in the stim group in relation to sham (1294 ± 46, Unit Arbitrary (U.A) vs. 1198 ± 23, (U.A) p<0,01). Our data suggest a potential regenerative and protective effect of epidural electrical stimulation in rats subjected to impact-induced traumatic spinal cord injury.

**Keywords:** Spinal cord injury, motor recovery, epidural electric stimulation, neuroplasticity

## Introduction

Spinal cord injury represents a major concern in the health system worldwide. In global terms, the global burden of disease study estimated the prevalence as high as 27.042 million persons affected by spinal cord injury in the reference year of 2016, with age-standardized rate of 368 victims per 100,000 inhabitants(1), with a global health impact of 9.5 million DALYS (disability-adjusted life years)(2).

Attempts to overcome the insurmountable obstacle of spinal cord regeneration after trauma have been made in numerous directions, mostly based on identification of neuroprotective pharmacological agents(3), transplantation of stem cells(4, 5), or neuro-modulation (6). In the first line, promising agents arouse in animal studies or phase I/II trials. One of them was the sodium channel blocker Riluzole, which antagonizes pre-synaptic release of glutamate and was used to treat acute cervical trauma; a phase II/III trial is under way(7). Another initially promising agent, the tetracyclic antibiotic agent Minocycline, was shown to provide neuroprotection in 25 patients enrolled in a phase II study(8), but no further report on the phase III trial followed. Similarly, a supposed beneficial effect of G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) on reducing lesion size has yet to be confirmed in clinical trials(9). In another line, neural stem cells (NSCs) have also been explored due to their ability to differentiate into neural cell types and promote some degree of tissue repair and pain control in animals (10, 11). Moreover, oligodendrocyte precursors have been investigated in a phase I/II to test the potential to promote remyelination in the damaged cord(12); nevertheless, no further supporting evidence arouse. Another promising type of stem cells is the mesenchymal from bone marrow, which mechanism of action is thought to be mediated by local and systemic immunomodulation and trophic factor support. Nonetheless, pre-clinical evidences in this favor(13) were not confirmed by phase II clinical trials(14).

This negative scenario changed drastically after initial reports on the potential benefit of epidural spinal cord stimulation. In fact, epidural spinal cord stimulation has recently emerged as a promising approach to promote motor recovery in individuals with SCI. Animal studies have demonstrated that electrical stimulation applied to the epidural space can induce neuroplasticity and facilitate functional improvements(6, 15). These findings have paved the way for clinical investigations in humans. In this sense, various studies involving individuals with chronic complete SCI demonstrated significant improvements in volitional motor control, and quality of life after epidural stimulation (16-19). These studies highlight the potential of epidural spinal cord stimulation as a viable therapeutic strategy for SCI in humans. Although the electrophysiological changes in the damaged cord induced by epidural stimulation have been satisfactorily clarified, specially in the animal model, possible cytoarchitectural modifications remain largely obscure. Based on this, the main goal of the present study is to investigate changes of neuronal population, axo-dendritic fibers and synaptic density induced by epidural stimulation in the animal impact model of spinal cord injury.

## Methods

### Animals and ethics

All surgical procedures and handling methods with the animals were previously approved by the Animal Ethics Committee of the Medical School of the University of São Paulo (protocol number 1013/2018). Rats were divided into four groups: control group (without spinal cord injury, SCI,  $n = 15$ ), sham group (implanted with spinal cord stimulation, SCS, without the battery,  $n = 15$ ); Lesion group (traumatic SCI,  $n = 15$ ), and Stimulation group (submitted to traumatic SCI and SCS,  $n = 15$ ).

### Impact lesion model

Thirty male Wistar rats from the University of São Paulo School of Medicine, weighing 250 to 300 g, were subjected to intraperitoneal anesthesia with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After hair removal and antiseptics of the surgical area, a median longitudinal skin incision was performed at levels T7–12; then, the paravertebral musculature was carefully separated from the vertebra laminae. Laminectomy was performed at levels T9 and T10, exposing the spinal cord and the intact dura mater. The SCI was applied using Benchmark Stereotaxic Impactor equipment (Impact One, Leica Biosystems, Richmond, USA). Animals were fixed by the upper and lower vertebrae and a moderate injury was inflicted by dropping a weight of 2mm in diameter, at a velocity of 5m/s, indentation depth in the cord programmed to be 2mm, lesion duration 0,1ms. These lesion parameters were defined in a pilot study, to ensure severe spinal cord injury, with little spontaneous recovery over 8 weeks of observation. During the surgical procedure, saline was replaced intraperitoneally to avoid hemodynamic instability. At the end of the procedure, the muscle planes, subcutaneous tissue and skin were sutured in multiple layers. Immediately post-operatively, animals were warmed under bright light. The animals were housed in a temperature-controlled environment under a 12-hour light-dark cycle, with access to food and water *ad libitum*. All animals received subcutaneous injection of antibiotic (Flotril, 1 mg/kg) during 3 days and dipyrone (1 mg/kg) during 5 days and bladder emptying was performed twice daily until the return of function.

### Spinal cord stimulation

First, we designed and manufactured in our Lab a implantable and miniaturized epidural stimulator (supplemental material 1). It was conceived as a single piece, covered with dimethyl polysiloxane to avoid battery leak. The battery was enough to deliver a quadratic pulse of 40Hz, 500us, 100mV for 40 minutes a day over 60 days. Extensive electrical and duration testing, as well as biosecurity testing in rats were conducted preliminarily to the present study (data not shown).

Seven days after SCI, 30 animals (15 from sham and 15 from stim group) had their spinal cord re-exposed under general intraperitoneal anesthesia, ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), paravertebral muscles were gently pulled away from the midline, thus exposing the dura. The paddle electrode was then carefully inserted from cranial to cranial through the previous laminectomy. The connected chip and battery were finally implanted in a prepared subcutaneous pouch, and the skin was sutured with

mononylon 5-0. Immediately post-operatively, animals were warmed under bright light. The animals were housed in a temperature-controlled environment under a 12-hour light-dark cycle, with access to food and water *ad libitum*. All animals received subcutaneous injection of antibiotic (Flotril, 1 mg/kg) during 3 days and dipyron (1 mg/kg) during 5 days.

#### Behavioral analysis

##### *Motricity/Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) locomotor rating scale*

All behavioral analyses were performed 1 day before SCI and then weekly until the end of 8 weeks. Locomotor evaluation was measured with the BBB scale (Basso et al., 1996), whose scores represent the sequential stages of recovery after SCI. The scale ranges from 0 to 21, where 0 represents no spontaneous movement of the hind paws and a score of 21 indicates normal locomotion(16).

##### *Inclined plane*

Muscle strength and endurance was evaluated using the inclined plane test. For this test, animals are placed face down on an adjustable inclined plane and the angle is increased from 0° to the point where the rat cannot maintain its position for 5 seconds. Two measurements were performed for each rat(17).

##### *Open field*

Locomotor overall activity was recorded in the Open Field device (Insight- 06250-Insight®, Ribeirão Preto, Brasil), which tracks animal's trajectory and additionally provides information about velocity and walked distance(17).

#### Immunohistochemistry and stereology

##### *Immunofluorescence staining*

After 8 weeks, the animals were euthanized by intraperitoneal lethal injection of ketamine (200 mg/kg), followed by transcardiac perfusion. Their spinal cords were extracted and a 2 cm segment, including the entire area of lesion (1.0 cm above and below the lesion epicenter), was frozen using isopentane and dry ice. Serial 60 µm sections were obtained from all spinal cord segments using a cryostat (CM3000, Leica, Nussloch, Germany).

The staining procedure was performed on glass slides as previously reported(18, 19). In brief, the sections were washed many times with Tween 0.05% diluted in PBS and incubated in a blocking solution containing 5% of goat serum and 0.3% of Triton X-100 diluted in PBS during one hour at room temperature over a shaker. Next, the sections were incubated with the primary antibodies anti-neuronal nuclei (NeuN, a neuronal marker) (monoclonal, mouse, 1:1000, Millipore, Temecula, CA, USA), anti-βIII-tubulin (monoclonal, mouse, 1:1000, Millipore-ab18207, Temecula, CA, USA), and anti-synaptophysin (monoclonal, mouse, 1:1000, Millipore- MAB5258, Temecula, CA, USA), diluted in blocking solution and maintained at 4°C for 24 hours. After this period, the sections were rinsed again in PBS-Tween and incubated for a further 2 hours at room temperature with anti-mouse and anti-rabbit Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, CA, USA) diluted in 0.3% TritonX-100 in PBS. After another series of

washes, the coverslips were mounted on slides using fluorescent mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark) to preserve immunofluorescence.

#### *Stereological quantification*

Transplanted cell counts were performed in all sections above, below and in the lesion area, using a Zeiss Axio Imager A2 microscope (Carl Zeiss, Gottingen, Germany) and the Zen blue software (Carl Zeiss). The total number of positive NeuN cells was estimated using Abercrombie's correction formula, as follows:  $P = M / (D + M) A \times N$ , where  $P$  = total cell number,  $M$  = section thickness,  $D$  = average diameter of the positive cells,  $A$  = number of counted cells, and  $N$  = number of cut series (10, 20).

#### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using JMP v.16.0 (SAS Institute, Cary, USA), and graphs were built with GraphPad Prism (GraphPad software, Inc, San Diego, CA, USA). We first tested normal distribution with Shapiro-Wilk test. Normal data were compared by means of Student t test and ANOVA, whereas non parametric data were compared with Wilcoxon n test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test to compare among three or more samples. Significance was set at  $P$  equal to or less than 0.05. Summary statistics is presented in terms of means and standard deviations. Mean profile graphs are shown to illustrate the differences among groups, and the bars represent the standard error, highlighting the accuracy of the measurements.

## **Results**

### *BBB*

The two groups of injured animals, untreated and treated with epidural stimulation, showed an abrupt and important drop in the BBB index, going to 0 immediately after the surgical procedure. Both recovered slowly and progressively until the 8th week. Noteworthy, the recovery of the group submitted to stimulation was significantly more expressive than observed in the injured group ( $p < 0.05$ ) from the 5th week until the end of the 8th week. However, the recovery peak did not reach pre-injury levels, remaining at a maximum value of 7 in the stim group (mean =  $5 \pm 2$ ), and 5 in the injured group (mean =  $4 \pm 2$ ). The control group did not show changes in the BBB index, and the sham group showed a small negative oscillation between the 1st and 3rd week, however with great variability (Fig. 1A).

### *Inclined plane*

The results obtained in the inclined plane indicate a significant decrease in the performance of all injured groups when compared to control. Specifically, a reduction from  $85^\circ \pm 2$  to  $59^\circ \pm 2$  in the lesion group and  $77^\circ \pm 7$  in the stim group. However, the comparative analysis between these groups revealed that the group submitted to stimulation presented a less accentuated loss of performance in relation to the control group. In addition, the animals in the control and stim groups did not show significant changes in performance in the inclined plane test at the evaluated moments, as shown in Figure 1C.

### *Open field*

The analysis of the motricity pattern revealed that all groups showed a reduction in the distance covered in the open field behavioral test after the 8 weeks of intervention, compared to baseline values. However, the smallest reductions were observed in animals that underwent isolated spinal cord injury ( $705 \pm 607$ ) and in the group treated with epidural stimulation ( $603 \pm 537$ ). Both groups showed a statistically significant difference in relation to the control group ( $p=0.001$ ). The comparative analysis between injury and stim groups, however, did not show a statistically significant difference. Furthermore, the control ( $1092 \pm 184$ ) and sitim ( $1054 \pm 381$ ) groups showed no statistically significant difference between them, as shown in Figure 1B. Moreover, the animals' displacement speed analysis revealed that all groups showed a decrease in speed as compared with preoperative values. However, no statistically significant differences were observed at any time, as shown in Figure 1D.

### *Immunohistochemistry and Stereology*

Immunohistochemical staining with anti-NeuN allowed identifying important morphological alterations in neural cells in the anterior horns of the spinal cord from injured animals, mainly in the alpha motor neurons. Among the main changes, there was a globular increase in the cell body, the presence of cytoplasmic vacuoles, as well as peripheral nuclear location, which are known hallmarks of wallerian degeneration resulting from the deafferentation caused by the injury. An increase in the diameter of the ependymal canal of these animals was also observed, which refers to post-traumatic syringomyelia. It is important to point out that these alterations were identified in both injured groups; however, they were less pronounced in the group treated with electrostimulation (see figure 2A-D).

Stereological analysis of the NeuN-positive cells indicated that there was a statistically significant difference between the animals submitted to spinal cord injury. The treated group had a mean cell count of  $1783 \pm 2$  cells per animal, compared to the injured, non-stimulated group, which had a mean cell count of  $897 \pm 3$  cells per animal ( $p<0.001$ ), figure 2E. In addition, a statistically significant difference was also observed between the control and implant groups. The control group had an average cell body count of around  $4334 \pm 2$  cells per animal, while the implant group had an average count of  $2433 \pm 3$  cells per animal. This difference was also statistically significant with  $p<0.001$ , as can be seen in Figure 2E.

Analysis of fluorescence intensity for synaptophysin revealed significantly higher signal in the stim group ( $1294 \pm 46$  a.u.) as compared with lesion group ( $1198 \pm 23$  a.u.) ( $p<0.01$ ). Furthermore, the values of the stimulated group were equivalent to those of the control group (Figure 2G). Analogously for  $\beta$ -III-tubulin, significant differences were observed between sham ( $859 \pm 23$  a.u.), lesion ( $1049 \pm 21$  a.u.) and stim ( $1116 \pm 32$  a.u.)

in relation to the control group ( $p < 0.001$ ). However, no significant difference was observed between lesion and stim animals (figure 2F).

## Discussion

As previously addressed, many studies on epidural stimulation have shown improvement in the motor pattern in the animal model of spinal cord injury. However, few advanced in the pathophysiological mechanisms involved in this recovery. A study that was a watershed in the electrophysiological context was that of Moraud et al. in 2016(6). Using an interesting mathematical model of neural computation and experimental verification in model rats, the authors sought to predict the firing potential of motor efferent fibers as a function of the exogenous current applied by epidural stimulation and the firing rate of afferents from neuromuscular spindles carried by fibers Ia and II. Previous studies had shown that the spindle afferent model correlates to envelopes of bursts of electromyographic activity, which in turn correlate to the coupling of alpha-gamma motor activity (21, 22). It is believed that the motor response elicited in the hindlimbs to each pulse of epidural stimulation be preferentially mediated by thick myelinated fibers, in particular fibers involved in spindle-muscle sensory feedback (23-25). Those muscle spindle afferents would interact with supratentorial descending modulations to segmentally elaborate motor patterns(26). Electrophysiological evidence dating back to Sherrington's studies suggests that these regulatory circuits are common ancestors in the regulation of motor activity in vertebrates (27, 28), being extremely conserved in mammals (29), and probably able to be recruited by epidural stimulation in humans (30, 31).

In terms of motor rehabilitation in humans, we know the importance of repeating motor patterns (whether reproduced by the physiotherapist's hands or by exoskeletal prostheses), in inducing medullary plasticity (32). In this sense, epidural stimulation would act as one more tool (and a powerful one) to provide these repetitions. The current interpretation of the effects of epidural stimulation comes from studies in mathematical simulation of the functioning of spinal cord-specific neural networks (23, 33) and from experimental studies (24, 30). Both lines of evidence suggest preferential activation of thick afferent fibers from neuromuscular spindles, which in turn would have the potential to recruit central-pattern generator centers (CPG) in the spinal cord (34, 35). This CPG activation would contribute by increasing the excitability of spinal neurons themselves, integrating them into functioning sensory-motor networks (36). Therefore, it is believed that from an electrophysiological point of view, epidural stimulation modulates spindle afferent circuits in order to improve the motor program (such as changing gait speed). According to the most current models of understanding, epidural stimulation interacts with fusar sensory stimuli in two synergistic ways: i) firstly, stimulation of fusar afferent fibers favors mono- and dysynaptic excitatory efferent to medullary motoneurons; and ii) the strengthening of the reciprocal inhibition of antagonists favors the alternating recruitment of agonists and antagonists necessary for proper gait (37). According to this model, the interaction of these two mechanisms would provide the spinal cord with the ability to adjust and control the motor pattern,



regardless of supratentorial centers (15, 36). An example of the complexity of medullary segmental patterns is what happens when the electric treadmill is stopped with the animal walking on it. At that moment, there is an increase in the activity of the extensor muscles and a decrease in the activity of the flexor muscles, promoting the transition from the gait state to static orthostasis (38). These observations, however, come from our rudimentary knowledge of medullary mono- and dysynaptic excitatory circuits. The complex interactions of CPG interneurons with these simpler medullary circuits remain largely misunderstood (39).

Although advances have been made in the electrophysiological changes induced by exogenous electrical current, very little is known about the effects of such stimulation on the medullary neural structure. It is in this aspect that our study represented progress, as it demonstrated an increase in the neuronal population in stimulated animals, in addition to an increase in the signal corresponding to synaptic structures. As for the first finding, at first, we could be facing an increase in neurogenesis induced by electrical stimulation, a known effect of electrical modulation (cite a reference for this). On the other hand, we know that the spinal cord is very poor in neurogenesis, and in fact neurogenesis does not occur in the adult animal's spinal cord (find another reference for this statement). Therefore, the most plausible hypothesis, in our view, for this finding would be a decrease in late apoptosis after spinal cord injury (> 1 week in rats). It is known that apoptosis occurs in the secondary lesion up to 6 months (40); therefore, we speculate here that the stimulation is causing a beneficial effect by inhibiting the apoptosis of deafferented neuronal cells. The hypothesis is supported by the fact that the entry of ionic current into the cell activates several mechanisms of neuronal maturation through cAMP signaling, calcium and activation of transcription factors involved in neurogenic processes (41). The second pathophysiological finding in stimulated animals was an increase in the synaptic fluorescence signal. It is well established that the exogenous current promotes synaptic maturation, through the same mechanisms mentioned above and others involving BDNF and calcium (42). Interestingly, the dendritic-axonal sprouting, which could theoretically also be induced by exogenous current, has not been observed by  $\beta$ III-tubulin fluorescence measurement in our study.

Finally, we believe that the results reported here provide important insights about the plastic changes induced in the damaged spinal cord by epidural stimulation in the animal model. The complete understanding of those mechanisms may contribute to further improvements in the neuromodulation strategies for motor recovery in humans.

### References

1. Injury GBDTB, Spinal Cord Injury C. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(1):56-87.
2. Group GBDNDC. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* 2017;16(11):877-97.
3. Hachem LD, Ahuja CS, Fehlings MG. Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *J Spinal Cord Med.* 2017;40(6):665-75.

4. Mariano ED, Batista CM, Barbosa BJ, Marie SK, Teixeira MJ, Morgalla M, et al. Current perspectives in stem cell therapy for spinal cord repair in humans: a review of work from the past 10 years. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014;72(6):451-6.
5. Li J, Lepski G. Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2013;2013:786475.
6. Moraud EM, Capogrosso M, Formento E, Wenger N, DiGiovanna J, Courtine G, et al. Mechanisms Underlying the Neuromodulation of Spinal Circuits for Correcting Gait and Balance Deficits after Spinal Cord Injury. *Neuron*. 2016;89(4):814-28.
7. Fehlings MG, Nakashima H, Nagoshi N, Chow DS, Grossman RG, Kopjar B. Rationale, design and critical end points for the Riluzole in Acute Spinal Cord Injury Study (RISCIS): a randomized, double-blinded, placebo-controlled parallel multi-center trial. *Spinal Cord*. 2016;54(1):8-15.
8. Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, Hurlbert RJ. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain*. 2012;135(Pt 4):1224-36.
9. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, et al. Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. *Eur Spine J*. 2012;21(12):2580-7.
10. Batista CM, Mariano ED, Dale CS, Cristante AF, Britto LR, Otoch JP, et al. Pain inhibition through transplantation of fetal neuronal progenitors into the injured spinal cord in rats. *Neural Regen Res*. 2019;14(11):2011-9.
11. Lepski G. Transplantation of GABAergic precursors into the spinal cord to alleviate neuropathic pain. *Ann Palliat Med*. 2020;9(5):2437-41.
12. Fessler RG, Ehsanian R, Liu CY, Steinberg GK, Jones L, Lebkowski JS, et al. A phase 1/2a dose-escalation study of oligodendrocyte progenitor cells in individuals with subacute cervical spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2022;37(6):812-20.
13. Morita T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Nagahama H, Oka S, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a model of chronic spinal cord injury. *Neuroscience*. 2016;335:221-31.
14. Saini R, Pahwa B, Agrawal D, Singh PK, Gujjar H, Mishra S, et al. Efficacy and outcome of bone marrow derived stem cells transplanted via intramedullary route in acute complete spinal cord injury - A randomized placebo controlled trial. *J Clin Neurosci*. 2022;100:7-14.
15. Courtine G, Gerasimenko Y, van den Brand R, Yew A, Musienko P, Zhong H, et al. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1333-42.
16. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma*. 1996;13(7):343-59.
17. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg*. 1977;47(4):577-81.
18. Lepski G, Jannes CE, Wessolleck J, Kobayashi E, Nikkhah G. Equivalent neurogenic potential of wild-type and GFP-labeled fetal-derived neural progenitor cells before and after transplantation into the rodent hippocampus. *Transplantation*. 2011;91(4):390-7.

19. Lepski G, Jannes CE, Strauss B, Marie SK, Nikkhah G. Survival and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells transplanted into the rodent brain are dependent upon microenvironment. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(9):2769-82.
20. Furlanetti LL, Cordeiro JG, Cordeiro KK, Garcia JA, Winkler C, Lepski GA, et al. Continuous High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus Improves Cell Survival and Functional Recovery Following Dopaminergic Cell Transplantation in Rodents. *Neurorehabil Neural Repair*. 2015;29(10):1001-12.
21. Prochazka A, Gorassini M. Models of ensemble firing of muscle spindle afferents recorded during normal locomotion in cats. *J Physiol*. 1998;507 ( Pt 1)(Pt 1):277-91.
22. Prochazka A, Gorassini M. Ensemble firing of muscle afferents recorded during normal locomotion in cats. *J Physiol*. 1998;507 ( Pt 1)(Pt 1):293-304.
23. Capogrosso M, Wenger N, Raspopovic S, Musienko P, Beauparlant J, Bassi Luciani L, et al. A computational model for epidural electrical stimulation of spinal sensorimotor circuits. *J Neurosci*. 2013;33(49):19326-40.
24. Gerasimenko YP, Lavrov IA, Courtine G, Ichiyama RM, Dy CJ, Zhong H, et al. Spinal cord reflexes induced by epidural spinal cord stimulation in normal awake rats. *J Neurosci Methods*. 2006;157(2):253-63.
25. Wenger N, Moraud EM, Raspopovic S, Bonizzato M, DiGiovanna J, Musienko P, et al. Closed-loop neuromodulation of spinal sensorimotor circuits controls refined locomotion after complete spinal cord injury. *Sci Transl Med*. 2014;6(255):255ra133.
26. Levine AJ, Hinckley CA, Hilde KL, Driscoll SP, Poon TH, Montgomery JM, et al. Identification of a cellular node for motor control pathways. *Nat Neurosci*. 2014;17(4):586-93.
27. Clarac F, Cattaert D, Le Ray D. Central control components of a 'simple' stretch reflex. *Trends Neurosci*. 2000;23(5):199-208.
28. Sherrington CS. Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *J Physiol*. 1910;40(1-2):28-121.
29. Pierrot-Deseilligny E. Peripheral and descending control of neurones mediating non-monosynaptic Ia excitation to motoneurons: a presumed propriospinal system in man. *Prog Brain Res*. 1989;80:305-14; discussion 295-7.
30. Hofstoetter US, Danner SM, Freundl B, Binder H, Mayr W, Rattay F, et al. Periodic modulation of repetitively elicited monosynaptic reflexes of the human lumbosacral spinal cord. *J Neurophysiol*. 2015;114(1):400-10.
31. Sayenko DG, Angeli C, Harkema SJ, Edgerton VR, Gerasimenko YP. Neuromodulation of evoked muscle potentials induced by epidural spinal-cord stimulation in paralyzed individuals. *J Neurophysiol*. 2014;111(5):1088-99.
32. Borton D, Micera S, Millan Jdel R, Courtine G. Personalized neuroprosthetics. *Sci Transl Med*. 2013;5(210):210rv2.
33. Rattay F, Minassian K, Dimitrijevic MR. Epidural electrical stimulation of posterior structures of the human lumbosacral cord: 2. quantitative analysis by computer modeling. *Spinal Cord*. 2000;38(8):473-89.
34. Angeli CA, Edgerton VR, Gerasimenko YP, Harkema SJ. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain*. 2014;137(Pt 5):1394-409.
35. Danner SM, Hofstoetter US, Freundl B, Binder H, Mayr W, Rattay F, et al. Human spinal locomotor control is based on flexibly organized burst generators. *Brain*. 2015;138(Pt 3):577-88.

36. Edgerton VR, Courtine G, Gerasimenko YP, Lavrov I, Ichiyama RM, Fong AJ, et al. Training locomotor networks. *Brain Res Rev.* 2008;57(1):241-54.
37. Talpalar AE, Endo T, Low P, Borgius L, Hagglund M, Dougherty KJ, et al. Identification of minimal neuronal networks involved in flexor-extensor alternation in the mammalian spinal cord. *Neuron.* 2011;71(6):1071-84.
38. Quevedo J, Fedirchuk B, Gosgnach S, McCrea DA. Group I disynaptic excitation of cat hindlimb flexor and bifunctional motoneurons during fictive locomotion. *J Physiol.* 2000;525 Pt 2(Pt 2):549-64.
39. Rybak IA, Stecina K, Shevtsova NA, McCrea DA. Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation. *J Physiol.* 2006;577(Pt 2):641-58.
40. Temkin NR, Anderson GD, Winn HR, Ellenbogen RG, Britz GW, Schuster J, et al. Magnesium sulfate for neuroprotection after traumatic brain injury: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2007;6(1):29-38.
41. Lepski G, Jannes CE, Nikkhah G, Bischofberger J. cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:155.
42. Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature.* 2004;429(6988):184-7.

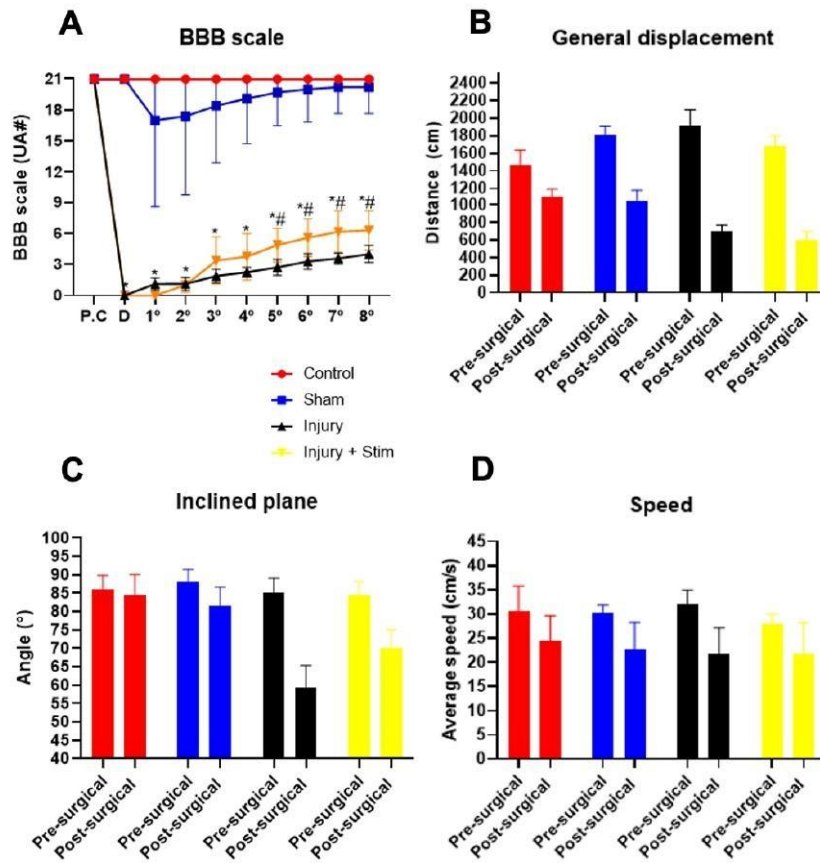


Figure 1. Behavioural tests after spinal cord injury and epidural stimulation. Four groups of animals were used for this purpose, 15 animals each: control, sham (stimulator implant but without battery), injury (laminectomy and spinal cord injury through implant), and injury + stimulation. In A, BBB score values recorded weekly throughout 8 weeks of observation; note that after the 5th week, a significant difference (for  $p < 0.05$ ) was observed between stim and injury groups, in favour of the stimulated group. In terms of general displacement in the open field test (B), inclined plane (C), or speed (D), no significant difference has been observed.

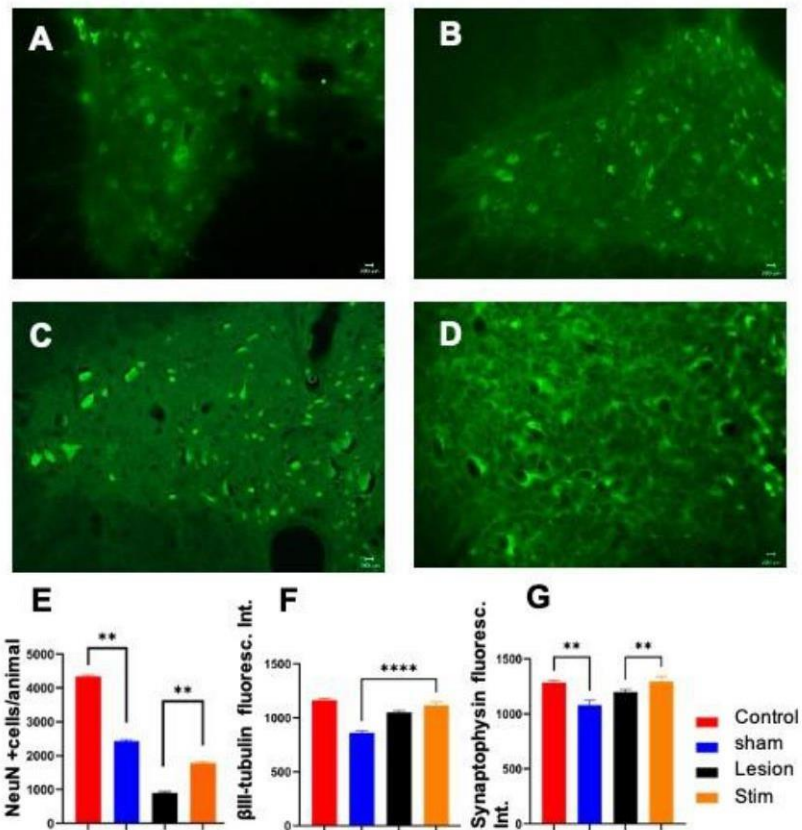
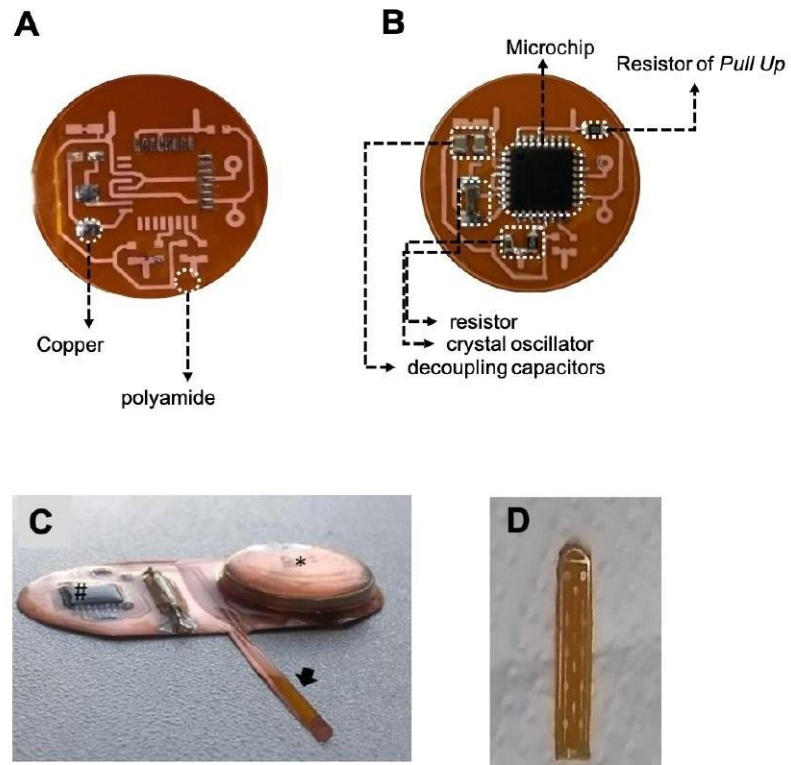


Figure 2. Citoarquitectural changes induced by epidural stimulation. A to D, epifluorescence microscope pictures demonstrating anti-NeuN revealed with AlexaFluor 488 (green), in a representative spinal cord axial slice in the control group (A), sham (B), injury (C), and stim (D). Note the formation of cytoplasmic vacuoles, peripheral migration of cell nuclei, and enlargement of pericarium in the lesioned animals (C and D), which are hallmarks of wallerian degeneration. In E, stereological quantification of NeuN-positive neuronal nuclei, in terms of total cells per animal; note significant larger amount of NeuN+ cells in the stim group, as compared with the injury group. In F,  $\beta$ III-tubulin fluorescence signal intensity was determined in epifluorescence microscope (background fluorescence intensity subtracted from the mean value in the frame); no difference was seen between stim and injury. In G, same quantification was applied for synaptophysin signal intensity, and a significant difference was measure in favour of stim, as compared with the injury group ( $p < 0.05$ ).



Supplemental material 1. The implantable pulse generator was designed and manufactured in our Laboratory. It was conceived as a single piece, covered with dimethyl polysiloxane to avoid battery leak. The battery was enough to deliver a quadratic pulse of 40Hz, 500us, 100mV for 40 minutes a day over 60 days.