

**UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**EFEITOS DO TREINO DE
MARCHA EM ESTEIRA COM
SUPORTE DE PESO CORPORAL
NO MODELO DE LESÃO
MEDULAR POR COMPRESSÃO
EM RATOS**

FÁBIO LOPES TELLES

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EFEITOS DO TREINO DE MARCHA EM ESTEIRA COM
SUPORTE DE PESO CORPORAL NO MODELO DE LESÃO
MEDULAR POR COMPRESSÃO EM RATOS**

FÁBIO LOPES TELLES

Sob a orientação da professora

Magda Alves de Medeiros

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ
Agosto de 2013

617.482

T274e

T

Telles, Fábio Lopes, 1981-

Efeitos do treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal no modelo de lesão medular por compressão em ratos / Fábio Lopes Telles. - 2013.

iv, 68 f.: il.

Orientador: Magda Alves de Medeiros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.

Bibliografia: f. 63-68.

1. Medula espinhal - Ferimentos e lesões - Teses. 2. Medula espinhal - Ferimentos e lesões - Tratamento - Teses. 3. Neurofisiologia - Teses. 4. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Medeiros, Magda Alves de, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

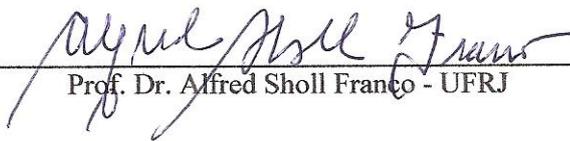
FÁBIO LOPES TELLES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, área de concentração em Fisiologia.

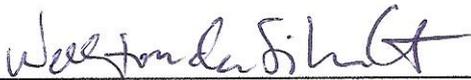
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/08/2013 (Data da defesa)



Prof. Dra. Magda Alves de Medeiros - UFRRJ
(Orientadora)



Prof. Dr. Alfred Sholl Franco - UFRJ



Prof. Dr. Wellington da Silva Cortes - UFRRJ

Dedico este trabalho aos animais de experimentação...

AGRADECIMENTOS

À Deus, a quem tudo pertence, dono da verdade e do futuro, e sem quem, eu, nada seria, nem nada alcançaria. Meu eterno agradecimento...

A minha família, em especial minha mãe Consuelo, meu pai Pasquale, minha tia Mariângela e aos meus amigos pelo apoio durante este caminho...

A minha orientadora Profa. Magda Alves de Medeiros, que entendeu o quanto este título seria importante pra mim e me deu esta oportunidade de estar aqui hoje. Obrigado pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha; pela confiança e pela amizade...

Aos demais professores do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial ao mestre Luís Carlos Reis, pelos ensinamentos ao cursar sua disciplina e os “ensinamentos de vida”, pelos conselhos e pela força; ao mestre Wellington da Silva Côrtes, pelas palavras de amizade e por estar sempre disposto a ajudar no que fosse necessário, ao mestre Emerson Lopes Olivares, com quem pude aprender muito em sua disciplina e pela amizade e consideração comigo, ao mestre Frederico Argollo Vanderlinde, por ter me recebido tão bem na primeira vez em que fui à UFRRJ e por me tratar sempre tão bem quando nos falamos, sempre com um sorriso no rosto; aos mestres Bruno, Alba e Jairo... Enfim, meu muito obrigado a todos os mestres...

Ao Sr. Cláudio Daddazio, quem projetou e construiu todo o dispositivo eletrônico que foi utilizado na esteira, com tanta boa vontade, alegria e eficiência. Obrigado pela preocupação em ajudar e pela preocupação em contribuir para o bem da ciência...

Ao Marcelo da marcenaria da USS, quem construiu as raias e o corredor utilizado no teste comportamental, obrigado pela sua preocupação com os detalhes envolvidos nesta construção e pela vontade de “querer ajudar”...

Ao meu tio Sérgio, quem fez todo o trabalho de solda na esteira e nos suportes de peso utilizados pelos animais....

Mais uma vez a minha mãe, que confeccionou com tanto carinho os coletes utilizados pelos animais...

Gostaria de agradecer profundamente a todos os envolvidos direta ou indiretamente neste trabalho, Iana Mattos, Liliam Almeida, Natália Monnerat, Fernanda Kohn, Paula Araújo, Eduardo Assis, Thaís Cristina, Júnior Fraga, Letícia Pinto e a duas pessoas em especial, Raquel do Nascimento de Souza e Andréa de Menezes Machado. Agradeço a todos vocês de coração, pela amizade, paciência, preocupação, pela boa vontade em ajudar, e tenho total certeza, de que sem a ajuda de vocês, eu, não teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigado mesmo...

Aos meus amigos do Departamento de Ciências Fisiológicas: Claudinho, Robertinho, Marissa, Rodrigo, Fabrícia, Rafael, Anderson, Ana Paula, Raoni, Fernando, Iracema, Bruno, Natália, Alex...

Aos funcionários do Departamento Franklin, Maria Rita, Dona Leni, Sr Ney, Juca, Seu Ambrósio, Paulo, Gérson, Vicente, Dione...

Aos colegas da USS que me apoiaram neste processo...

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um não.
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

Augusto Cury

RESUMO

Telles, Fábio Lopes. **Efeito do treinamento em esteira no modelo de lesão medular por compressão em ratos**. 2013. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A lesão da medula espinal (SCI) é uma síndrome neurológica altamente incapacitante que pode ocorrer por traumas ou doenças, levando à deficiências como as paraplegias e tetraplegias. Acredita-se que o treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal (BWSTT) é capaz de promover plasticidade de circuitos neuronais responsáveis pela locomoção independentemente de comandos neurais superiores à lesão. O BWSTT consiste num sistema que suspende e segura parcialmente o peso do corpo sobre uma esteira, diminuindo a carga sobre o aparelho musculoesquelético, facilitando a marcha. O objetivo deste estudo foi implantar esta técnica no Laboratório de Neurofisiologia da UFRRJ e avaliar seus efeitos na recuperação da capacidade de locomoção em ratos submetidos à lesão medular por compressão. Para sua realização, inicialmente os animais foram adaptados ao treino na esteira e submetidos à SCI por compressão na qual um cateter de embolectomia foi inflado com 15 μ L de salina no espaço extradural, entre as vértebras T8 e T9, por 5 min. No dia seguinte à SCI, os animais foram submetidos à avaliação da capacidade locomotora pelo uso da escala Basso-Beattie-Bresnahan (BBB), onde o escore 0 representa ausência de movimento e 21 locomoção normal. Animais com escore BBB zero foram divididos em 3 grupos: LM - Animais sem qualquer manipulação; LMST - Animais que realizaram treinamento de marcha em esteira com suporte de peso corporal diariamente; LMS - Animais colocados diariamente na esteira desligada utilizando apenas o suporte de peso corporal. As sessões de BWSTT tiveram início no quarto dia pós-lesão sendo realizadas 3 sessões diárias, com duração de 10 min cada e intervalo de 5 min, 5 dias/semana e velocidade de 5,8 cm/seg. Vinte e quatro horas e semanalmente após a SCI, os animais foram submetidos ao teste BBB. Na quinta semana foram submetidos ao teste da impressão de pegadas (footprint) e perfundidos para avaliação histológica da medula. O grupo LMST produziu índices BBB significativamente maiores que o grupo LM, além de um aumento no comprimento da passada e redução da rotação das patas, verificado pelo teste footprint. No entanto, o BWSTT não reduziu o tamanho da lesão e nem o estrangulamento da medula produzido pela lesão, indicando que o BWSTT não alterou a severidade do trauma. Nossos resultados indicam que o BWSTT produziu melhor recuperação locomotora e pode ser um tratamento promissor adjuvante na recuperação da lesão medular.

Palavras-chave: Lesão medular - Treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal - Teste BBB - Teste da impressão de pegadas – Severidade do trauma medular.

ABSTRACT

Telles, Fábio Lopes. **Body weight–supported treadmill training on the model of spinal cord compression in rats.** 2013.68 p. Dissertation (Masters in Physiological Sciences). Institute of Biology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Spinal cord injury (SCI) is a highly incapacitating neurological syndrome that can occur from trauma or disease, leading to disabilities such as paraplegia and tetraplegias. It is believed that body weight support treadmill training (BWSTT) is able to promote plasticity of locomotion neuronal circuits regardless of neural commands above the injury. BWSTT consists of a system that partially lifts and supports the body weight on a treadmill, reducing the musculoskeletal unit load and facilitating the march. The aim of this study was to deploy this technique in the UFRRJ Neurophysiology Laboratory and evaluate its effect on locomotion capacity recovery in rats subjected to spinal cord compression. The animals were initially adapted to training on the treadmill and subjected to SCI by compression in which an embolectomy catheter was inflated with 15 μ L of saline in the epidural space between the vertebrae T8 and T9, for 5 min. The day after SCI, the animals were evaluated for locomotor capacity by use of the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale, where a score of 0 represents no movement and 21 normal locomotion. Animals with score zero were divided into groups: LM - animals without any manipulation; LMST - treadmill training with body weight support daily; LMS - animals placed daily on the turned off treadmill using only body weight support. BWSTT sessions started on the fourth day after SCI was performed in 3 daily 10-minute sessions each with 5-minute intervals, 5 days a week at a velocity of 5.8 cm/sec. Twenty-four hours and weekly after SCI, the animals were subjected to the BBB test. In the fifth week after SCI the rats were subjected to footprint test and perfused for histological evaluation. The LMST group produced significantly higher BBB scores than the LM group, and an increased stride length and reduced rotation of the feet on the footprint test. However, the BWSTT did not reduce lesion size and throttling produced by the injury in the spinal cord, indicating that BWSTT did not change the severity of the trauma. Our results indicate that the BWSTT produced better locomotor recovery and may be a promising adjuvant treatment in recovery from spinal cord injury.

Keywords: Spinal cord injury - Body weight support treadmill training - BBB Test - Footprints test - Severity of spinal cord trauma.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala Basso, Beattie e Bresnahan para avaliação da capacidade de locomoção de ratos pós-lesão medular. p. 45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Medula espinal. p. 17
- Figura 02:** Coluna vertebral, medula espinal e raízes nervosas humanas. p. 18
- Figura 03:** Coluna vertebral, medula espinal e raízes nervosas do rato. p. 19
- Figura 04:** Distribuição das substâncias cinzenta e branca no homem e no rato. p. 20
- Figura 05:** Organização da substância cinzenta na medula espinal. p. 21
- Figura 06:** Pacientes acometidos por lesões medulares, com diversos níveis de incapacidade funcional. p. 22
- Figura 07:** Lesão Traumática. p. 22
- Figura 08:** Segmentos medulares e níveis de perda funcional. p. 24
- Figura 09:** Danos primários e secundários após lesão da medula espinal. p. 26
- Figura 10:** Atividade rítmica de andar é gerada por redes de neurônios na medula espinal. p. 28
- Figura 11:** Rede neuronal da lampreia responsável por sua locomoção. p. 29
- Figura 12:** Imunomarcção para cFos após SCI e prática de exercício. p. 31
- Figura 13:** Paciente realizando técnica de BWSTT. p. 34
- Figura 14:** Ilustração esquemática da entrada de sinais aferentes importantes para a geração e formação dos padrões de locomoção em pacientes com SCI. p. 36
- Figura 15:** Esquema do desenho experimental. p. 39
- Figura 16:** Período de Adaptação na esteira. p. 40
- Figura 17:** Fotografia ilustrando a adaptação realizada na esteira. p. 41
- Figura 18:** Implantação da técnica e realização do BWSTT. p. 42
- Figura 19:** Cirurgia de lesão medular. p. 43
- Figura 20:** Teste BBB. p. 44
- Figura 21:** Corredor utilizado no Teste Foot Print. p. 46
- Figura 22:** Fita de papel contendo o registro das pegadas. p. 47

Figura 23: Análise das imagens através do ImageJ. p. 47

Figura 24: Critérios analisados no Teste Foot Print. p. 48

Figura 25: Esquema da quantificação do estrangulamento da área da lesão. p. 50

Figura 26: Efeito do BWSTT na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. p. 53

Figura 27: Efeito do BWSTT no comprimento da passada (teste de impressão de pegadas) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. p. 55

Figura 28: Efeito do BWSTT na base de apoio (teste de impressão de pegadas) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. p. 56

Figura 29: Efeito do BWSTT no ângulo de rotação entre as patas direita e esquerda (teste de impressão de pegadas) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. p. 57

Figura 30: Imagens representativas das impressões das patas. p. 58

Figura 31: Efeito do BWSTT na porcentagem da área de lesão em relação ao tecido sadio de ratos submetidos à lesão medular por compressão. p. 59

Figura 32: Efeito do BWSTT na porcentagem da área de estrangulamento em relação ao tecido sadio de ratos submetidos à lesão medular por compressão. p. 59

Figura 33: Severidade do trauma medular (substâncias branca e cinzenta). p. 60

Figura 34: Severidade do trauma medular (área de lesão). p. 61

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ASIA	Associação Americana de Lesão Espinal (do inglês <i>American Spinal Injury Association</i>)
ANOVA	Análise de variância
BWSTT	Treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal (traduzido do inglês <i>body weight-supported treadmill training</i>)
CPG	Gerador central de padrão
DBF	Distância entre as duas patas (do inglês <i>Distance Between Foot</i>),
HE	Hematoxilina-eosina
IMSOP	Sociedade Médica Internacional de Paraplegia (do inglês, <i>International Medical Society of Paraplegia</i>)
i.p.	Intraperitoneal
LS	Comprimento da passada (do inglês <i>Stride Length</i>)
PAF	Projétil de arma de fogo
R	Rotação (do inglês <i>rotation</i>)
TRM	Traumatismo raqui-medular
LM	Grupo de animais Lesionados Medulares, não submetidos a nenhuma manipulação
LMS	Grupo de animais Lesionados Medulares, que foram colocados no Suporte de Peso Corporal sob a esteira desligada diariamente.
LMST	Grupo de animais Lesionados Medulares, que foram colocados no Suporte de Peso Corporal e que realizaram Treinamento em Esteira diariamente;
MAR	Mergulho em água rasa
NSCISC	Centro Estatístico Nacional de Lesão Medular (do inglês <i>National Spinal Cord Injury Statistical Center</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
s.c.	Subcutânea
SCI	Lesão da Medula Espinal (traduzido do inglês – <i>Spinal Cord Injury</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
Teste BBB	Teste implementado por Basso, Beattie e Bresnahan
UI	Unidades internacionais
µL	Microlitro
µM	Micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	XIII
SUMÁRIO	XIV
1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1. ANATOMIA DA MEDULA ESPINAL	17
2.2. LESÃO MEDULAR	21
2.3. CLASSIFICAÇÃO NEUROLÓGICA E FUNCIONAL DAS LESÕES MEDULARES	24
2.4. FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES MEDULARES	25
2.5. LOCOMOÇÃO APÓS A OCORRÊNCIA DE LESÃO MEDULAR	27
2.6. ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO DAS LESÕES MEDULARES	30
2.7. TREINO DE MARCHA EM ESTEIRA COM SUPORTE DE PESO CORPORAL: BWSTT	32
2.8. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RECUPERAÇÃO DA MARCHA ATRAVÉS DO BWSTT	34
3 OBJETIVOS	37
3.1. OBJETIVO GERAL	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. ANIMAIS	38
4.2. DESENHO EXPERIMENTAL	38
4.3. ADAPTAÇÃO À ESTEIRA	40
4.4. TREINO DE MARCHA EM ESTEIRA COM SUPORTE DE PESO CORPORAL (BWSTT)	40
4.5. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA LESÃO MEDULAR	42
4.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE LOCOMOTORA DE RATOS PÓS-LESÃO MEDULAR: TESTE BBB	43
4.7. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA: TESTE FOOT PRINT	46
4.8. PERFUSÃO, FIXAÇÃO E CORTE DAS MEDULAS	48
4.9. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA: ANÁLISE DA SEVERIDADE DO TRAUMA MEDULAR	49

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. MODELO DE LESÃO MEDULAR POR COMPRESSÃO EM RATOS	51
5.2. IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE BWSTT NO LABORATÓRIO DE NEUROFISIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	51
5.3. EFEITO DO BWSTT NA CAPACIDADE LOCOMOTORA AVALIADA PELO TESTE BBB DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR POR COMPRESSÃO	52
5.4. EFEITO DO BWSTT NA CAPACIDADE LOCOMOTORA AVALIADA PELO TESTE DE IMPRESSÃO DE PEGADAS DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR POR COMPRESSÃO	54
5.5. EFEITO DO BWSTT NA SEVERIDADE DO TRAUMA DA MEDULA ESPINAL DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR POR COMPRESSÃO	58
6 CONCLUSÕES	62
7 REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal é considerada uma síndrome neurológica altamente incapacitante, que repercute na qualidade de vida e no potencial funcional do indivíduo, além de ser uma causa freqüente de mortalidade. Este tipo de lesão pode ocorrer por traumas, doenças na coluna vertebral ou na própria medula espinal, afetando em diferentes graus sua capacidade de mandar e receber informações e levando às deficiências sensoriais, motoras e autonômicas. Suas principais causas são traumas decorrentes de acidentes de trânsito, violência, quedas e acidentes durante práticas esportivas.

Existe uma estimativa de que 2,8 milhões de pessoas vivem com algum tipo de lesão medular e uma incidência de 130 mil novos casos por ano no mundo. No Brasil estima-se que 250 mil pessoas apresentam este tipo de lesão, e sua incidência anual é de cerca de 6 a 8 mil casos, sendo que destes casos, 80% das vítimas são homens e 60% se encontram entre os 10 e 30 anos de idade, fazendo desta lesão uma patologia de alto impacto sócio-econômico em nosso país, sendo que o custo para a sociedade por paciente permanece alto.

A seqüela fisiopatológica depois do trauma medular agudo é dividida em dois eventos cronológicos distintos, a lesão primária e a lesão secundária, sendo o dano primário mecânico, de natureza destrutiva, como quando ocorre uma fratura e/ou deslocamento de vértebras adjacentes, promovendo um dano local e segmentar na medula espinal. O dano secundário progressivo é produzido por uma série de eventos moleculares e celulares desencadeados pela lesão inicial. Na maioria dos casos a incapacidade é severa e irreversível e os tratamentos atuais são extremamente limitados, não existindo ainda uma terapia que seja realmente eficiente em reverter completamente estas perdas neurológicas.

A plasticidade do sistema nervoso central tem sido o grande alvo dos programas de reabilitação, principalmente no que se refere aos circuitos neuronais na medula espinal, os quais interagem com a informação sensorial específica, denominados CPGs (geradores centrais de padrão). Os CPGs são capazes de gerar um padrão rítmico de atividade nos músculos durante a locomoção, independente de comandos supra-espinais que são afetados pela lesão medular.

Acredita-se que o treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal (BWSTT) é capaz de promover plasticidade destes circuitos neuronais, estimulando a locomoção independentemente de comandos neurais superior à lesão. Sendo assim, o presente estudo propõe implantar a técnica de BWSTT no Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e avaliar seus efeitos na recuperação da capacidade de locomoção e na severidade do trauma na medula espinal de ratos Wistar submetidos à lesão medular por compressão.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Anatomia da medula espinal

A medula espinal é o principal centro reflexo e via de condução de estímulos entre o corpo e o encéfalo. Esta estrutura longa e quase cilíndrica, ligeiramente achatada anterior e posteriormente, é protegida pelas vértebras, seus ligamentos e músculos associados, além das meninges espinais (dura-máter, aracnóide e pia-máter) e líquido cefalorraquidiano (Figura 01). Ela é a continuação do bulbo (comumente denominada medula oblonga), a parte caudal do tronco encefálico (GARDNER et al., 1988; MOORE et al., 2010).

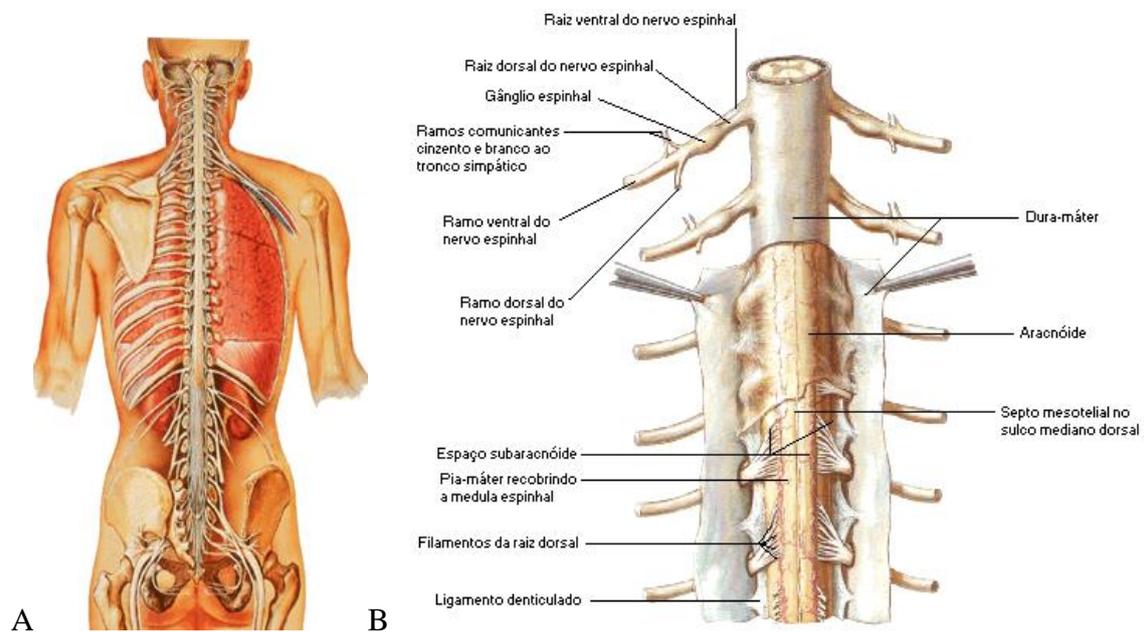


Figura 01: Medula espinal: (A) Medula espinal “in situ” e sua relação com estruturas ósseas e ligamentares, vista posterior. (B) Meninges espinais e raízes nervosas, vista posterior (Modificado de NETTER, 2011).

No homem adulto a medula espinal possui um comprimento médio de 42 a 45 cm, com 1 cm de diâmetro e peso de 30 gramas. Estende-se do forame magno no osso occipital até o nível da vértebra L1 ou L2, ocupando desta maneira apenas os dois terços superiores do canal vertebral. Trinta e um pares de nervos espinais se originam dela, cada um com uma raiz ventral ou anterior (motora) e uma raiz dorsal ou posterior (sensitiva). Estes pares de nervos são agrupados em 8 nervos cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 coccígeo (Figura 02) (GRAY, 1988; MOORE et al., 2010).

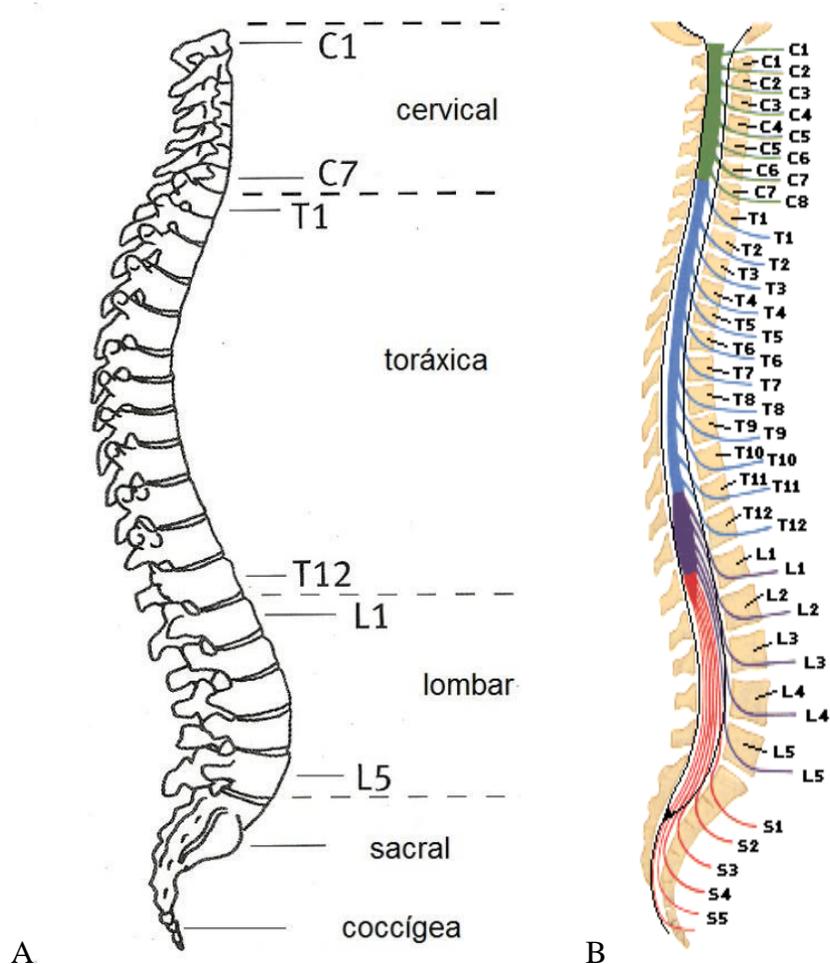


Figura 02: Coluna vertebral, medula espinal e raízes nervosas humanas: (A) Coluna vertebral Humana: Sete vértebras cervicais (C1 a C7), doze vértebras torácicas (T1 a T12), cinco vértebras lombares (L1 a L5), cinco vértebras sacrais (que se fundem e formam o sacro) e quatro vértebras coccígeas (vértebras rudimentares, que se fundem e formam o cóccix), (Modificado de WATSON et al., 2010a). (B) Relação das raízes nervosas com as vértebras (Modificado de NETTER, 2011).

Embora existam semelhanças anatômicas entre a medula espinal de humanos e a de roedores, o rato apresenta um perfil de segmentação medular um pouco diferente (Figura 03). Seus pares de nervos espinais são agrupados em 8 cervicais, 13 torácicos, 6 lombares, 4 sacrais e 3 coccígeos (GRANT, 2004).

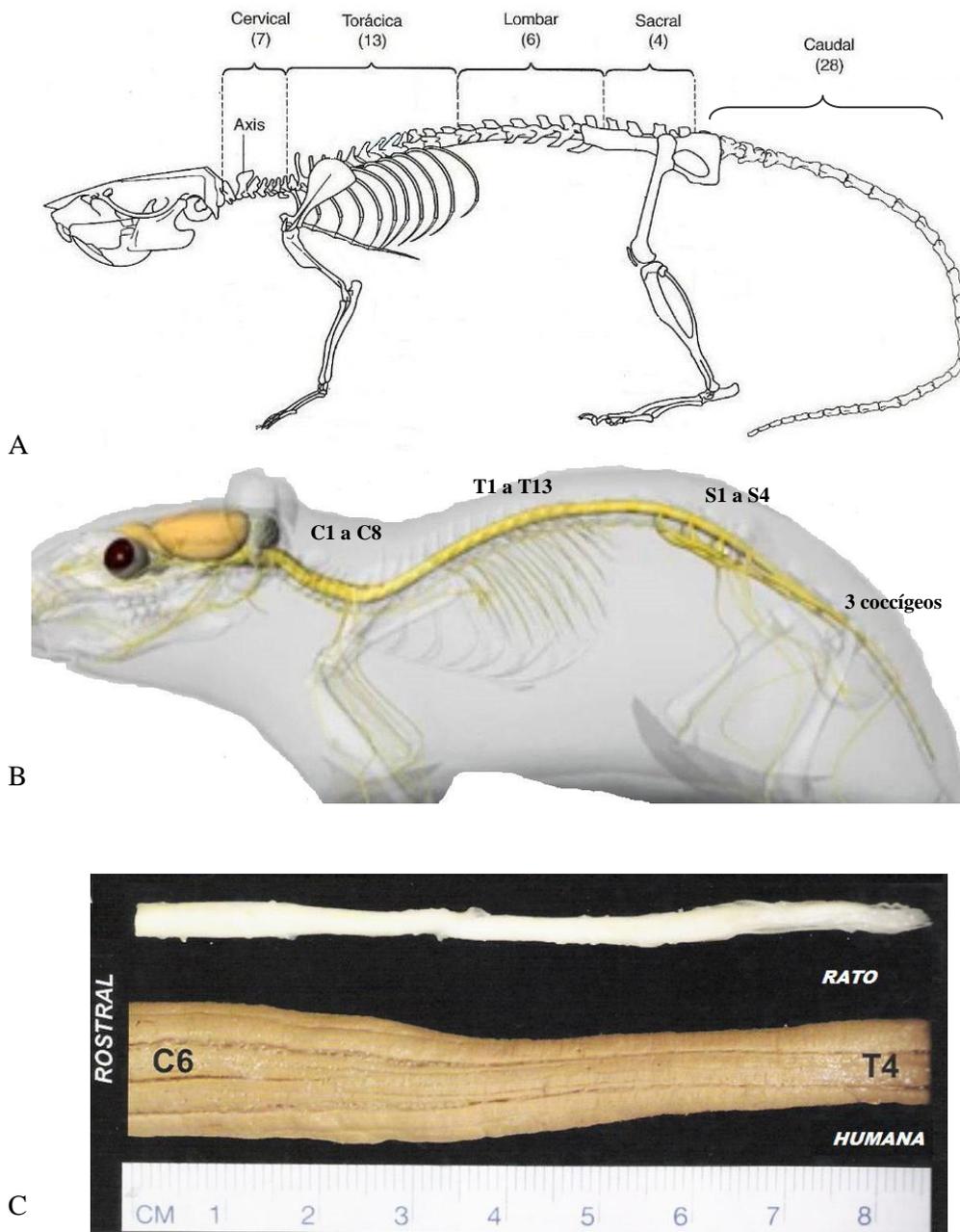


Figura 03: Coluna vertebral, medula espinal e raízes nervosas do rato: (A) Esqueleto do rato e sua coluna vertebral, formada por sete vértebras cervicais, treze torácicas, seis lombares, quatro sacrais e 28 caudais. Vista lateral. (Modificado de ANDERSEN e TUFIK, 2010). (B) Medula espinal e nervos espinais agrupados em 8 cervicais, 13 torácicos, 6 lombares, 4 sacrais e 3 coccígeos (Modificado de <http://biosphera.com.br>, consultado em 10 de agosto de 2013). (C) Comparação entre as medulas espinais do rato e do homem em tamanho natural; Vista posterior (Modificado de WATSON et al., 2010).

Internamente a medula espinal consiste em uma região central de substância cinzenta, circundada por substância branca, quando observada em corte transversal Na substância cinzenta estão contidos os principalmente corpos celulares dos neurônios e fibras amielínicas, enquanto a substância branca é composta de feixes de fibras mielinizadas. A substância cinzenta está configurada numa forma característica de H, ou de borboleta, que tem projeções designadas como colunas (cornos) posteriores ou anteriores. Os cornos posteriores possuem um arranjo ordenado de neurônios sensoriais,

que recebem predominantemente os estímulos da periferia, enquanto os cornos ventrais possuem predominantemente neurônios motores que inervam músculos específicos, e recebem direta ou indiretamente as aferências do córtex motor, além de possuir interneurônios e fibras espinais (COSENZA, 2012; STANDRING, 2010; KANDEL, 2003). A distribuição da forma e quantidade de ambas as substâncias varia de acordo com o nível da medula no homem e no rato (Figura 04).

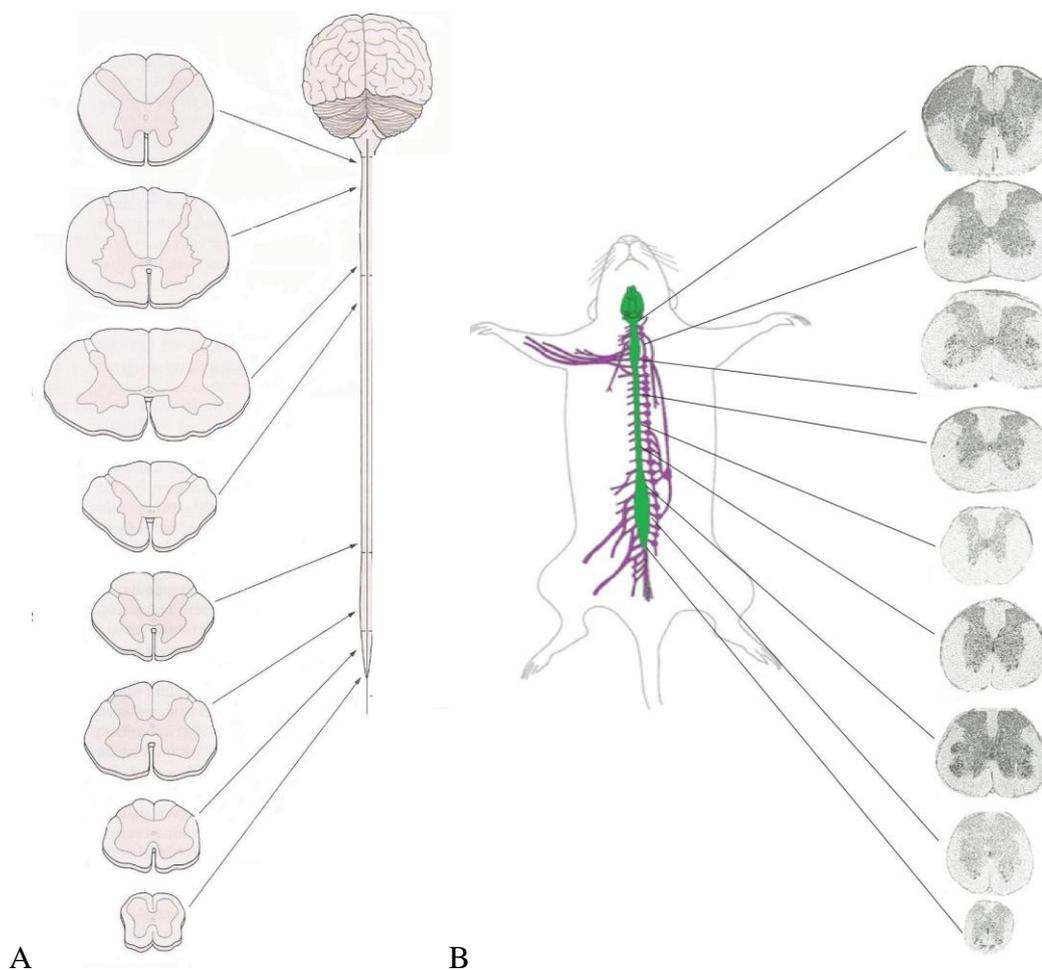


Figura 04: Distribuição das substâncias cinzenta e branca no homem e no rato: (A) Esquema do padrão de distribuição da substância cinzenta e substância branca ao longo dos diferentes níveis de segmentação da medula humana em cortes transversais. (B) Esquema do padrão de distribuição da substância cinzenta e substância branca ao longo dos diferentes níveis de segmentação da medula do rato em cortes transversais. (Modificado de MACHADO, 2012)

A substância cinzenta é organizada em 10 microrregiões laminares, onde os neurônios se agrupam de maneira uniforme (Fig. 05). Essas microrregiões se distribuem em extratos ou lâminas, denominadas lâminas de Rexed (REXED, 1954). Essas foram inicialmente descritas em gatos, e posteriormente descritas também em outras espécies como ratos (MOLANDER e GRANT, 2004) e no homem (SCHOENEN, 1982). Entre mamíferos a sua estruturação não difere muito (WATSON et al., 2010b). As lâminas de Redex são organizadas em camadas seriadas, numeradas de I a X, no sentido dorso-ventral, e apenas a lâmina X localizada em torno do canal central. As lâminas I – VI,

estão no corno dorsal, área receptora de fibras exteroceptivas (estímulos de dor, mecânicos e tato), estas fibras penetram pelas raízes dorsais; as lâminas VII recebem informações associadas ao sistema autonômico e estão na zona intermediária; as lâminas VIII - IX contêm neurônios motores descendentes e se localizam na região ventral; a lâmina X possui corpos celulares próximos ao canal central, que respondem a estímulos nociceptivos (CHENG e CAO, 1996; GRANT, 2004).

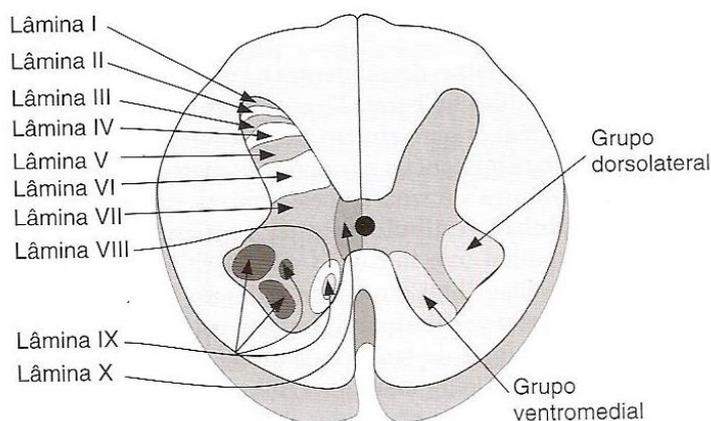


Figura 05: Organização da substância cinzenta na medula espinal. À esquerda, observam-se as Lâminas de Rexed, enquanto à direita é mostrada a localização dos dois principais grupos de motoneurônios (COSENZA, 2012).

2.2. Lesão medular

A lesão da medula espinal (referida em inglês como Spinal Cord Injury - SCI) é uma síndrome neurológica altamente incapacitante que pode ocorrer por traumas ou doenças na coluna vertebral ou na medula espinal em si, afetando em diferentes graus a capacidade da medula de enviar e receber informações, levando à deficiências sensoriais, motoras e autonômicas. A associação de outros sintomas decorrentes destas deficiências como dor, espasticidade, úlceras por pressão, disfunção urinária, disfunção intestinal, disreflexia autonômica, disfunções cardiovasculares, embolia pulmonar e distúrbios psicológicos faz com que o trauma medular seja considerado um dos mais devastadores tanto fisicamente quanto psicologicamente. Desta forma a SCI repercute na qualidade de vida e no potencial funcional do indivíduo, além de ser uma causa freqüente de mortalidade. O nível de incapacitação individual é variável e demanda mudanças radicais no estilo de vida, além de provocar custos financeiros elevados para a sociedade (Figura 06) (DEFINO, 1999; LIANZA et al., 2001; SCHMITZ, 2004; www.sarah.br, consultado em 14 de abril de 2013).

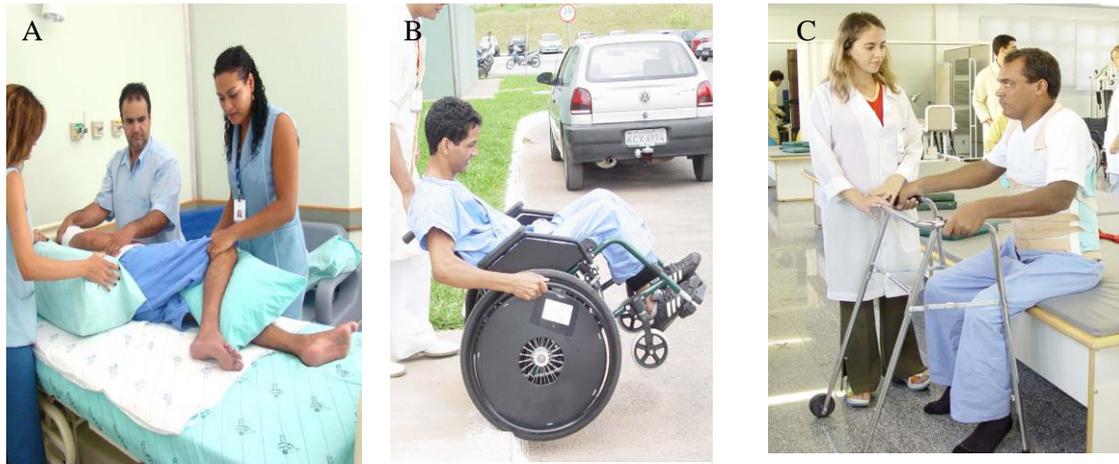


Figura 06: Pacientes acometidos por lesões medulares, com diversos níveis de incapacidade funcional: (A) Paciente tetraplégico sendo mobilizado passivamente no leito para prevenção de complicações como úlceras por pressão ou deformidades. (B) Paciente em cadeira de rodas em treinamento de subir e descer rampas e meio fio. (C) Paciente sendo adaptado ao uso de órteses para deambulação e máxima independência (Ministério da Saúde, <http://bvsmms.saude.gov.br>, consultado em 17 de abril de 2013).

A SCI pode ser classificada de acordo com sua etiologia em traumáticas e não-traumáticas, herdando sua nomenclatura de acordo com o seu fato gerador. As traumáticas são provocadas principalmente por acidentes automobilísticos ou motociclísticos, ferimentos por projétil de arma de fogo (PAF), lesões por objeto perfurante, acidentes por mergulho em água rasa (MAR) e quedas (Figura 07). As não-traumáticas têm seu fato gerador em decorrência de uma doença, como poliomielite, meningite, tumores na coluna vertebral entre outros. Em ambos os casos a medula espinal acaba sendo afetada interferindo em diferentes graus na sua capacidade de mandar e receber informações, levando às deficiências sensoriais, motoras (voluntária e involuntária) e autonômicas (DEFINO, 1999; LIANZA et al., 2001, BOTELHO et al., 2001; HAGG e OUDEGA, 2006).

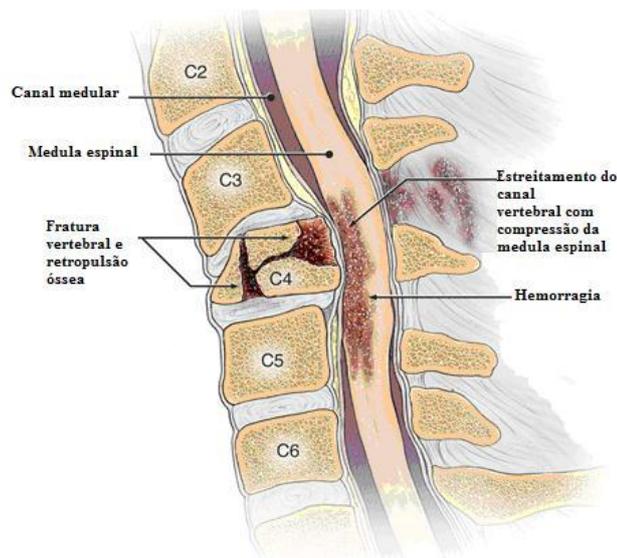


Figura 07: Lesão Traumática. O desenho esquemático ilustra uma fratura óssea promovendo uma lesão na medula espinal. Fonte: Modificado de: <http://www.pialaw.ca/areas-of-practice/spinal-cord-injuries> (acesso em 23/06/2013).

Estima-se que em todo o mundo 2,8 milhões de indivíduos sofrem com algum tipo de SCI crônica. Segundo o Centro Estatístico Nacional de Lesão Medular Americano (National Spinal Cord Injury Statistical Center - NSCISC), a incidência anual deste tipo de lesão nos Estados Unidos, não incluindo aqueles que morrem no local do acidente, é de aproximadamente 40 casos por milhão de habitantes, ou seja, cerca de 12 mil novos casos a cada ano. Em 2013 foi estimado que 273.000 pessoas estejam vivendo com algum tipo de SCI nos EUA, sendo que a taxa de mortalidade para esta injúria chega a 4,5% dos vitimados após um ano de lesão. A principal causa são os traumas, representados por acidentes automobilísticos, responsáveis por cerca de 44% dos casos, seguidos por agressão (24%), quedas (22%), lesões associadas a atividades esportivas (8%) e outras causas (2%) (<https://www.nscisc.uab.edu/>, consultado em 14 de abril de 2013).

No Brasil estima-se que 250 mil pessoas apresentam este tipo de lesão, e sua incidência é de cerca de 6 a 8 mil novos casos por ano, sendo 80% das vítimas homens, e 60% se encontram entre os 10 e 30 anos de idade, sendo o trauma a causa predominante (D'ANDREA e GREVE, 1997; MASINI, 2000).

Especificamente, a incidência de lesão medular traumática no Brasil é desconhecida, pois esta condição não é sujeita à notificação. Sabe-se porém que nos últimos 10 anos, só a Rede SARAH de Hospitais, atendeu 9.019 pacientes com seqüela de lesão medular traumática. Em 37,2%, a causa foi acidente de trânsito, em 28,7% projéteis de arma de fogo (PAF), em 16,8% quedas, em 8,9% mergulho e 8,5% com outras causas (www.sarah.br, consultado em 14 de abril de 2013). Trata-se definitivamente de uma patologia de alto impacto sócio-econômico em nosso país, sendo que o custo para a sociedade por paciente permanece alto (STRIPLING, 1990).

A incapacidade numa SCI varia de acordo com o grau da lesão, do segmento medular e das vias nervosas e neurônios da medula envolvidos. De uma maneira geral os pacientes podem apresentar tetraplegia se possuem lesão em um dos oito segmentos cervicais ou paraplegias se possuem lesão nas regiões torácica, lombar ou sacral (Figura 08). Na maioria dos casos os pacientes apresentam uma melhora que se inicia a partir da primeira semana indo até o sexto mês, ocorrendo uma diminuição da melhora espontânea após este tempo. Estratégias de reabilitação instituídas precocemente podem minimizar a incapacidade a longo prazo (www.sarah.br, consultado em 14 de abril de 2013).

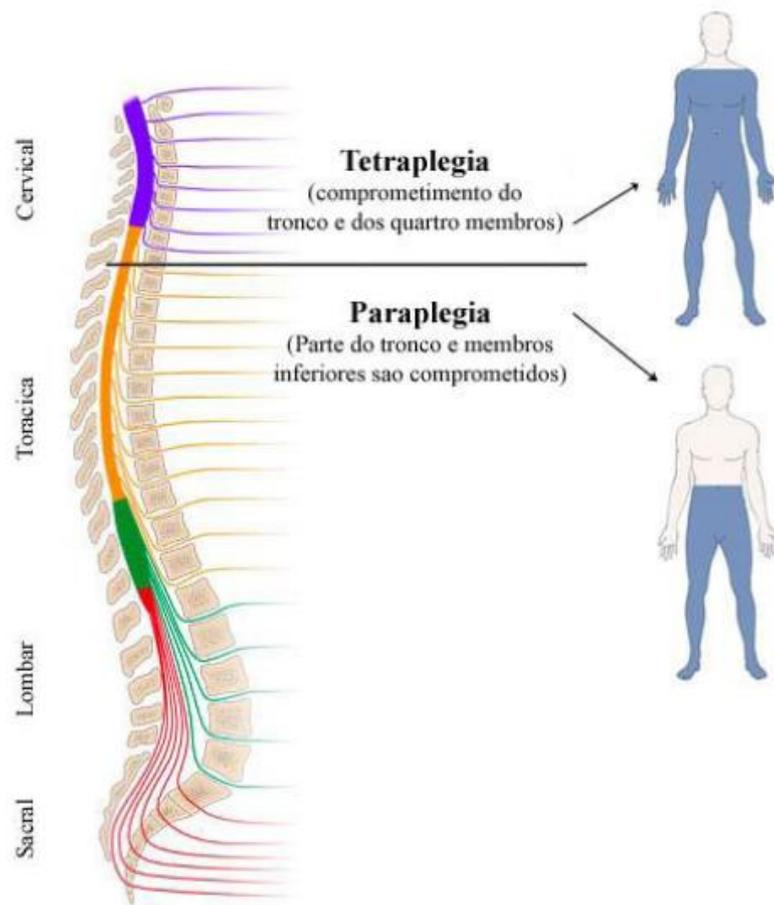


Figura 08: Segmentos medulares e níveis de perda funcional. Desenho esquemático mostrando os segmentos medulares e os relacionando às tetraplegias ou paraplegias após lesões medulares em humanos (ILHA et al., 2011)

Os pacientes portadores de lesão medular passam por várias fases comportamentais. Elas são descritas como fases de choque, negação, reconhecimento e adaptação. Na fase de choque o paciente fica confuso e não tem noção da magnitude do fato ocorrido. Na fase de negação, o paciente começa a fazer contato com a realidade, mas de forma distorcida devido à fragilidade emocional. Nesta fase é muito comum essa frase: “Eu voltarei a andar, estou paralisado apenas temporariamente”. Na fase de reconhecimento o paciente visualiza a deficiência/paralisia como definitiva, gerando intensos sentimentos de desamparo e ansiedade podendo levar a um quadro de depressão e idéias suicidas. Na fase de adaptação o paciente põe seus esforços utilizando ao máximo sua capacidade, visualizando o processo de reabilitação como facilitador para sua reintegração biopsicossocial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995; <http://bvsmms.saude.gov.br>, consultado em 17 de abril de 2013). Estas informações nos levam a crer que a maior dificuldade de um paciente lesado medular seja a de conviver com sua incapacidade de locomoção.

2.3. Classificação neurológica e funcional das lesões medulares

A American Spinal Injury Association (ASIA) em parceria com a International Medical Society of Paraplegia (IMSOP) publicaram e validaram os “Padrões Internacionais para Classificação Neurológica e Funcional das Lesões Medulares”. O modelo proposto é considerado de excelência na avaliação de pacientes com SCI,

facilitando não só a comunicação entre a equipe transdisciplinar como também possibilitando um registro confiável da evolução do paciente e a comparação de achados clínicos entre serviços e pesquisadores de diferentes países e localidades. A ASIA/IMSOP aperfeiçoou também a escala de Frankel, desenvolvendo posteriormente um indicador de comprometimento referente ao tipo e gravidade das lesões (BEHRMAN e HARKEMA 2000; NEVES et al., 2007).

De acordo com a ASIA (<http://www.asia-spinalinjury.org>, consultado em 19 de julho de 2013) é possível classificar o paciente com TRM (traumatismo raqui-medular) em uma de 5 categorias, de acordo com o resultado do exame dos componentes sensitivo e motor:

A = COMPLETA: Sem preservação das funções motora e sensitiva no segmento sacral S4 - S5;

B = SENSORIAL INCOMPLETO: Perda da função motora, porém função sensitiva preservada abaixo do nível neurológico e inclui sensibilidade do segmento sacral S4-S5;

C = MOTOR INCOMPLETO: Função motora preservada abaixo do nível neurológico, e mais da metade dos músculos-chave abaixo do nível neurológico possuem grau de força inferior a 3 (apesar de haver contração muscular, não são capazes de vencer a gravidade);

D = MOTOR INCOMPLETO: Função motora preservada abaixo do nível neurológico, e mais da metade dos músculos-chave abaixo do nível neurológico possuem grau de força igual ou superior a 3 (vencem a gravidade);

E = NORMAL: Funções Motora e sensitiva são normais.

Embora esta avaliação seja facilmente realizada no homem, em ratos se torna de difícil verificação. Nenhum teste funcional sozinho é suficiente para avaliar a recuperação neurológica e funcional após a lesão medular em modelos animais. Por isso é necessária a combinação de dois ou mais testes, e que cada um compare a função motora do animal sadio e do animal lesado. Os métodos usados para avaliar a recuperação da função locomotora são específicos, sensíveis e permitem que os movimentos dos membros posteriores individualmente possam ser isolados e analisados. Tais métodos específicos permitem começar a abordar os mecanismos subjacentes à recuperação da função após um episódio de TRM nestes animais (KUNKEL-BAGDEN et al., 1993).

O teste mais aceito e mais utilizado para avaliação da capacidade locomotora após lesão medular foi descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (1995), conhecido como “Teste BBB”, no qual foi criada uma escala de 0 a 21 pontos que considera a movimentação da articulação do quadril, joelho, tornozelo, posição do tronco (se existe suporte do peso corporal), cauda, coordenação e rotação das patas posteriores (MOLINA, 2006). Este teste é amplamente utilizado e facilita a comparação de resultados. Nesta escala, 21 indica locomoção normal e zero indica nenhum movimento espontâneo no membro posterior. O teste “foot print” ou teste de impressão das pegadas é outro teste que também é amplamente utilizado (MEDINACELI et al., 1982; STIRLING et al., 2004), onde são mensuradas principalmente a base de apoio (que se encontra aumentada após lesão medular), o comprimento da passada (que diminuiu bilateralmente pós-lesão) e o ângulo de rotação (que aumenta após SCI) (KUNKEL-BAGDEN et al., 1993).

2.4. Fisiopatologia das lesões medulares

O papel da medula espinal em uma ampla gama de funções fisiológicas é claramente demonstrado pelas deficiências observadas após a SCI, e pelas condições

clínicas em que se desenvolvem as fases aguda e crônica após a lesão (HILLEN et al., 2013).

A SCI inicia um estado progressivo de degeneração, com mudanças estruturais, bioquímicas e fisiológicas que ocorrem ao longo de semanas ou meses após a lesão, e tendem a provocar danos adicionais ao sistema nervoso. Respostas secundárias ao trauma inicial incluem inflamação, excitotoxicidade, apoptose de neurônios e células gliais, retração axonal, cicatrizes gliais, desmielinização, mudanças nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios e plasticidade/brotamento aberrante das fibras nervosas poupadas. Pesquisas prévias sobre os mecanismos fisiopatológicos da lesão medular resultaram em um esquema classificatório de lesão primária e lesão secundária, e o conhecimento dos detalhes desta seqüência pode ajudar a determinar o momento adequado para a adoção de estratégias de reabilitação (CADOTTE et al., 2010; HILLEN et al., 2013; HOULE et al., 2013).

A lesão primária é mecânica, de natureza destrutiva, como quando ocorre uma fratura e/ou deslocamento de vértebras adjacentes promovendo um dano local e segmentar na medula espinal que resulta em axônios interrompidos juntamente com um fluxo de sangue reduzido, o que pode causar necrose isquêmica, bem como o edema subsequente na medula espinal (Figura 09). Estes eventos podem produzir alterações nas concentrações de íons extracelulares, que, ao longo do tempo (dias em modelos animais, semanas ou meses em seres humanos) levam à lesões secundárias, que por sua vez causam uma exacerbação da perda celular, não se limitando apenas ao mecanismo inicial (KWON et al., 2004; CADOTTE et al., 2010; HILLEN et al., 2013).

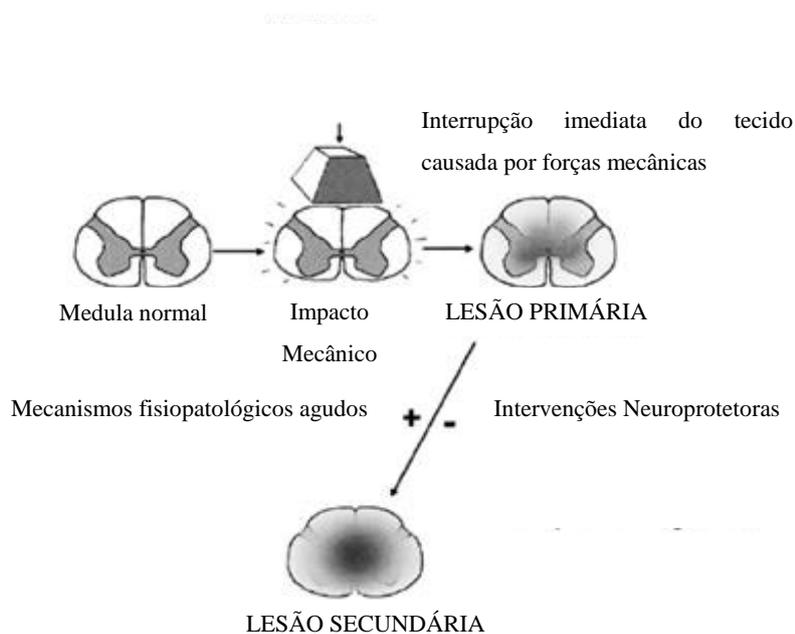


Figura 09: Danos primários e secundários após lesão da medula espinal. A força mecânica imposta à medula espinal no momento da lesão causa transecção e interrupção do tecido. Raramente esta transecção é completa, havendo tecido adjacente que sobrevive e é vulnerável aos danos secundários. As intervenções neuroprotetoras tem o objetivo de minimizar e reduzir a perda de tecido neural que são decorrentes dos danos secundários (modificado de KWON et al., 2004).

Desta maneira, os mecanismos da lesão secundária ocorrem durante semanas e meses após a lesão mecânica inicial, e os eventos que caracterizam esta fase são denominados de danos secundários, que podem progredir tanto rostral como cranialmente ao foco da lesão. Os danos secundários são produzidos por uma série de

eventos celulares, moleculares e bioquímicos que são desencadeados pela injúria inicial, que podem ser agravados por vários processos inter-relacionados, incluindo a perfusão micro-vascular, a geração de radicais livres e a peroxidação de lipídios, a morte celular necrótica ou apoptótica e o desequilíbrio na homeostase iônica (KWON et al., 2004; GENOVESE et al., 2008).

As alterações vasculares locais e a isquemia da medula espinal são considerados os aspectos mais importantes da lesão secundária. A interrupção mecânica da microcirculação causa petéquias hemorrágicas e trombose intravascular que em combinação com vasoespasmo de vasos intactos e edema no local da lesão podem levar a uma profunda hipoperfusão e isquemia. A geração de radicais livres causa uma progressiva oxidação de ácidos graxos nas membranas celulares (peroxidação lipídica) e o processo de oxidação forma geometricamente mais radicais que podem propagar a reação por toda a superfície celular. O local da lesão é rapidamente infiltrado por neutrófilos, macrófagos e linfócitos T. Embora eles desempenhem funções importantes na resposta do organismo à lesão, também pode ter efeitos prejudiciais no tecido do sistema nervoso central (KWON et al., 2004; HILLEN et al., 2013).

Em relação à morte celular, tanto a apoptose como a necrose ocorrem na SCI. Ambas são induzidas pelos mesmos insultos como a isquemia, o estresse oxidativo e a excitotoxicidade, no entanto em lesão mais severas, é mais comum a morte celular por necrose. De maneira geral, as células ao redor do epicentro da lesão, que sobreviveram ao trauma inicial podem receber insultos bioquímicos secundários suficientes para iniciar um programa de autodestruição através da ativação de caspases. Finalmente, pode haver formação de cicatriz significativa juntamente com desmielinização de algumas fibras e degeneração dos axônios que já não têm um alvo devido à perda de células imediatamente após a lesão ou nas fases posteriores da resposta (KWON et al., 2004; HILLEN et al., 2013).

Posteriormente, a medula espinal é submetida à reorganização substancial. Estas alterações incluem a plasticidade sináptica, axonal e proliferação celular em toda a medula e não somente caudal ao ferimento. Algumas das alterações podem envolver a formação de novas vias para contornar as regiões danificadas, enquanto que outras alterações podem envolver reorganização em regiões não danificadas para assumir funções novas ou modificadas, tal como ocorre na reorganização dos mapas corticais (HILLEN et al., 2013).

De maneira geral a SCI causa uma interrupção entre as regiões craniais (córtex e tronco encefálico) e as caudais (circuitos espinais e motoneurônios), causando assim importantes perdas das funções motora e sensorial, inferior ao nível espinal da lesão (VAN de CROMMERT, 1998).

2.5. Locomoção após a ocorrência de lesão medular

Uma característica essencial da vida do animal é a capacidade de mover-se de um local para o outro, denominada locomoção. Ela pode assumir diversas formas: propulsão ondulatória, como nos peixes; rastejamento ondulatório, como nos répteis; vôo, como nas aves; marcha, trote e galope, nos mamíferos quadrúpedes e marcha e corrida nos seres humanos. Em todas estas formas, apesar das óbvias diferenças, uma característica comum é o movimento rítmico, alternado e cíclico do corpo ou seus apêndices durante os movimentos locomotores. Sua natureza rítmica e semi-automática faz a locomoção parecer uma ação estereotipada envolvendo repetições dos mesmos

movimentos, e, esta característica, fez com que os primeiros pesquisadores, como Sherrington, atribuíssem um caráter reflexo a ela (LENT, 2004; KANDEL et al., 2003).

Charles Sherrington (citado por Lent, 2004) observou em suas pesquisas, que um cão que era submetido à transecção cervical alta da medula espinal, ao ser colocado de pé, ainda executava alguns movimentos alternados típicos da locomoção, concluindo então que seria uma série de reflexos. Todavia, mais tarde, essa natureza reflexa da locomoção foi questionada, pois animais que tinham a medula espinal transecionada e eram submetidos à secção das raízes dorsais de vários segmentos bilateralmente (desaferentados), de modo que as informações sensoriais dos membros não pudessem alcançar a medula, ainda assim foram capazes de se locomoverem quando colocados em uma esteira rolante, através da realização de movimentos locomotores rítmicos, alternados e cíclicos (Figura 10) (LENT, 2004; KANDEL et al., 2003).

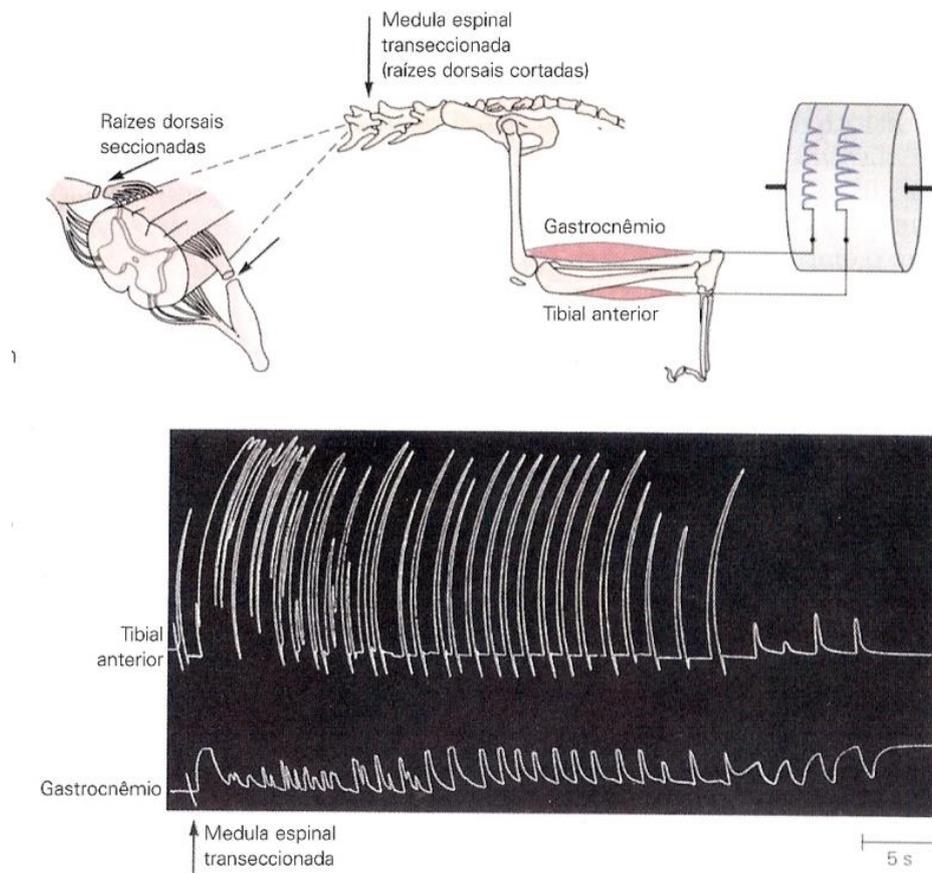


Figura 10: Atividade rítmica de andar é gerada por redes de neurônios na medula espinal. A existência de tais redes foi comprovada através de um sistema experimental animal no qual nervos da raiz dorsal foram cortados de modo que informações sensoriais dos membros não podiam alcançar a medula espinal. Um registro original deste estudo mostra que contrações alternadas rítmicas do músculo flexor do tornozelo (tibial anterior) e extensor (gastrocnêmio) se iniciam logo depois da transecção da medula espinal (KANDEL et al., 2003).

Atualmente a concepção que prevalece é a de existem Geradores Centrais de Padrão. Um gerador central de padrão (CPG, do inglês *central pattern generator*) é definido como uma rede neuronal capaz de gerar um padrão rítmico de atividade motora, como na respiração, no ato de coçar, ou no comando seqüencial dos músculos durante as diversas formas de locomoção (LENT, 2004; KANDEL et al., 2003). A compreensão dos princípios básicos da função de um CPG é baseada em pesquisas em

invertebrados e peixes primitivos, como a lampreia (Figura 11), onde foi comprovado que um grau significativo do controle da locomoção é mediado em nível da medula espinal (DIETZ e HARKEMA, 2004).

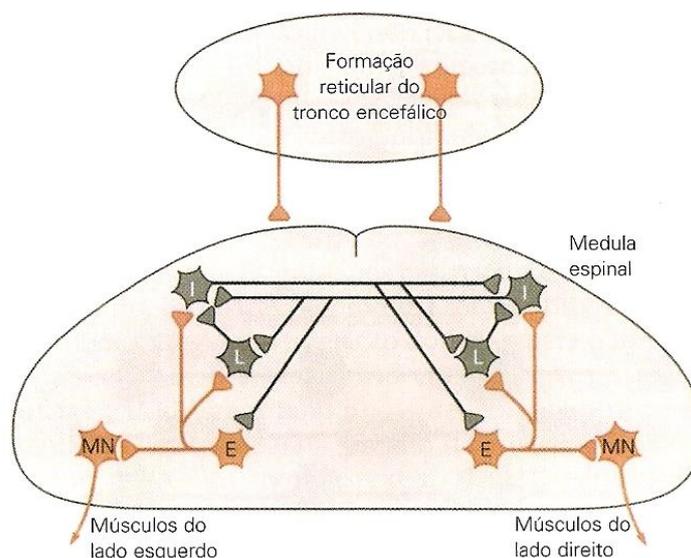


Figura 11: Rede neuronal da lampreia responsável por sua locomoção. Na imagem observa-se as principais características da rede neuronal de cada segmento do corpo da lampreia, responsável pelo padrão de locomoção rítmica para a natação. A ação em cada rede segmentar é iniciada pela atividade em axônios glutaminérgicos descendentes da formação reticular. Em cada lado da rede, interneurônios excitatórios (E) ativam os neurônios motores (MN) e duas classes de interneurônios inibitórios (I e L). Os axônios dos interneurônios I cruzam a linha média e inibem todos os neurônios na metade contralateral da rede, assegurando que, quando os músculos de um lado estiverem ativos, músculos do outro lado estarão silentes. Os interneurônios L inibem os interneurônios I do mesmo lado (KANDEL et al., 2003)

Os neurônios da medula espinal que constituem estas redes ainda não foram identificados, mas sabe-se que eles formam circuitos oscilatórios envolvendo motoneurônios extensores e flexores: Em um ciclo os extensores de uma perna são ativados e os flexores são inibidos, ocorrendo o contrário na outra perna. No ciclo seguinte inverte-se o padrão: os flexores são ativados e os extensores inibidos, e novamente o padrão oposto move a outra perna. Esse padrão básico produzido pelo CPG é geralmente modificado por informações sensoriais veiculadas pelas raízes dorsais e informações dos centros supra-espinais veiculadas pelas vias descendentes (LENT, 2004; KANDEL et al., 2003).

Foi observado que gatos submetidos a transecção total da medula espinal podiam reaprender a andar com os membros posteriores mesmo na ausência da entrada de informações do cérebro, graças à estas redes neuronais na medula espinal (DIETZ e HARKEMA, 2004). De fato, em quadrúpedes a transecção da medula inicialmente causa uma paralisia completa dos membros posteriores, entretanto, essa operação não impede permanentemente a capacidade das pernas traseiras de fazerem movimentos de caminhar (KANDEL et al., 2003). Essa constatação foi importante pois com ela surge a hipótese dessa plasticidade dos CPGs ser priorizada nos programas de reabilitação (DIETZ, 2009).

O papel do CPG nos seres humanos é controverso e de difícil demonstração. Pesquisas deste tipo envolvendo humanos necessitariam de indivíduos que tivessem sofrido lesões completas da medula espinal e também que fossem desaferentados. No entanto, muitos estudos em humanos forneceram evidências da existência destas redes

neurais oscilatórias, que interagem com entradas aferentes (informações sensoriais), com pouca ou nenhuma entrada supra-espinhal detectável (DIETZ e HARKEMA, 2004). Entretanto humanos com medula espinal completamente transeccionada, ao contrário do que foi demonstrado nas pesquisas em gatos, nunca serão capazes de melhorar até o estágio de serem capazes de andar sem a ajuda do sistema de suporte de peso num piso estático (VAN de CROMMERT et al., 1998). Isso se dá provavelmente devido a estes CPGs serem muito mais dependentes de comandos supra-espinhais e/ou entradas proprioceptivas do que os CPGs de quadrúpedes (MULTON et al., 2003).

2.6. Estratégias para o tratamento das lesões medulares

A maior parte das investigações realizadas na área de lesão da medula espinal concentra-se em tratamentos concebidos para evitar a propagação da lesão (ou lesão secundária) ou para aumentar a excrescência de feixes de fibras ascendentes e/ou descendentes em torno ou através da lesão (LANKHORST, 2001).

Muitos estudos com transplantes, fatores neurotróficos e bloqueadores dos inibidores de crescimento neural associados à mielina revelaram alguns resultados promissores na recuperação funcional em modelos animais (HOUWELING et al., 1998; RABCHEVSKY et al., 1999; BOYCE et al., 2007; FORET et al., 2010; MACHADO, 2012). Os fatores neurotróficos exercem um importante papel na fisiopatologia do reparo tecidual endógeno nos processos degenerativos de lesões do sistema nervoso central, por possuírem receptor tipo tirosina-quinase, que exerce uma ação protetora sobre vários tipos celulares, tanto no encéfalo (SUN et al., 2002) como na medula espinal (SHIMAMURA et al., 2007).

Efeitos positivos também foram apontados para o exercício físico praticado após SCI, como o aumento do BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) e da sinapsina I. O efeito sobre a sinapsina é particularmente interessante, porque a ela é postulado um papel importante na libertação de neurotransmissores e de manutenção de contatos sinápticos. Numa série de estudos, verificou-se que o exercício após SCI conduziu a um aumento significativo na distribuição de sinapsina em torno de neurônios do corno ventral e cinzento intermédio da medula espinal lombar. Correlacionando a isto, foi observado um aumento do número de neurônios que expressam cFos no corno dorsal e regiões cinzentas intermediárias da medula espinal lombar após o exercício dos membros posteriores dos ratos submetidos à SCI (Figura 12). Um aumento na cFos é uma indicação de um aumento da atividade neuronal resultante de atividade sináptica, neste caso durante o exercício (HOULE, 2013).

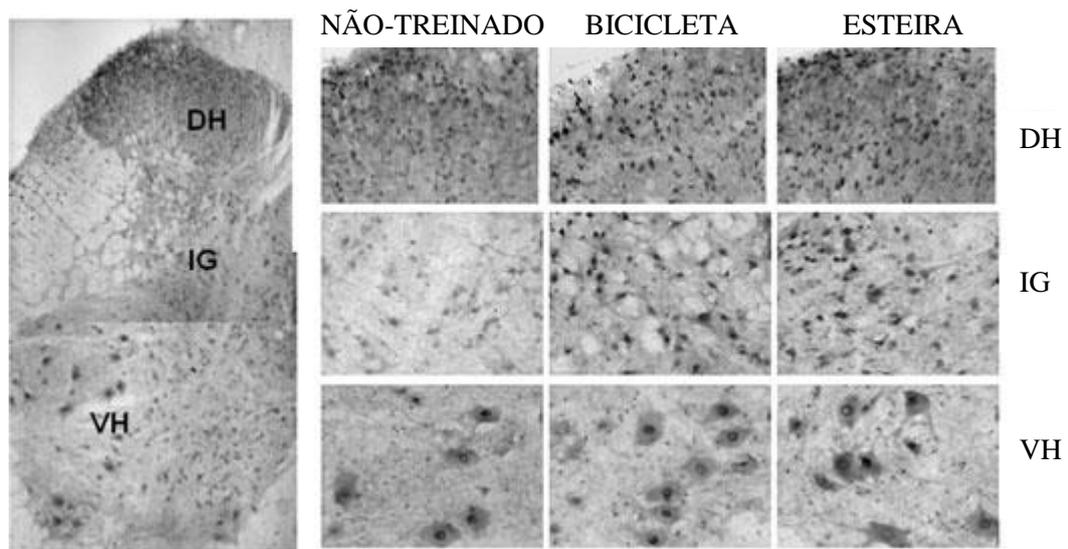


Figura 12: Imunomarcção para cFos após SCI e prática de exercício. Com a prática de bicicleta ou esteira, há um aumento no número de neurônios cFos positivos no corno dorsal (DH, do inglês “*dorsal horn*”) e na substância cinzenta intermediária (IG do inglês “*intermediate gray*”) em comparação com os neurônios de animais não treinados, ambos no segmento L4. A quantidade de cFos em motoneurônios do corno ventral (VH do inglês, “*ventral horn*”) não parece ser alterada com o exercício. A expressão de cFos é usado como um indicador da atividade neuronal após o exercício dos membros posteriores de ratos submetidos à SCI (Modificado de HOULE, 2013).

Nas últimas décadas, vários autores demonstraram também que é possível melhorar a função locomotora em pacientes (humanos ou animais) com lesão medular, através de evidências experimentais que sugerem que o CPG espinal pode ser treinado para funcionar mesmo quando desprovido de entrada supra-espinal (WERNIG et al., 1995; LANKHORST, 2001; DIETZ e HARKEMA, 2004; DIETZ, 2009).

Para que uma intervenção terapêutica seja então realmente eficiente em promover uma melhora neurológica funcional após lesão medular, ela deverá combinar varias estratégias, uma vez que o agravamento após a lesão medular não é ocasionado por um fator único (CIZKOVA et al., 2011). As terapias devem ser direcionadas de maneira a atenuar os processos do dano secundário, como inflamação e a excitotoxicidade (ESPOSITO et al., 2011) e promover um ambiente mais favorável para a regeneração axonal, além da estimulação da neurogênese na medula espinal gerando novos progenitores espinais que podem ser obtidos através de atividade física (CIZKOVA et al., 2011).

Todavia, na prática clínica após a ocorrência de uma lesão da medula espinal em humanos, o tratamento realizado na maioria das vezes ainda é bastante obsoleto. De uma maneira geral o paciente é internado em uma unidade especial que trata de lesões da coluna o mais rápido possível. Uma vez internado é preciso tomar a decisão sobre a necessidade de tratamento conservador ou intervenção cirúrgica. Em geral o tratamento conservador é o tratamento de escolha quando o dano já ocorreu. A intervenção cirúrgica se faz necessária quando o alívio de pressão na medula espinal pode permitir certa recuperação (THOMSON et al., 2002). Em geral, os tratamentos para SCI são extremamente limitados a ressuscitação, estabilização do paciente traumatizado e a administração de doses de metilprednisolona, uma droga cuja atividade é presumivelmente derivada a partir da sua capacidade de inibir a peroxidação da membrana e, assim, evitar parte do dano secundário, embora a melhora neurológica ainda seja muito modesta mesmo com a utilização de altas doses. Ainda no período em que ele se encontra internado nesta unidade especial de tratamento, o paciente é

indicado para o acompanhamento fisioterápico (LANKHORST et al., 2001; THOMSON et al., 2002; ESPOSITO et al., 2011).

As estratégias fisioterápicas com estes pacientes incluem numa primeira fase, posicionamento correto no leito, evitando pressão sobre proeminências ósseas e consequente úlceras por pressão; prevenção de problemas circulatórios como trombose venosa profunda através da mobilização no leito e realização de movimentos passivos nos membros inferiores; prevenção de deformidades, como contraturas onde novamente os movimentos passivos irão manter a variação articular e o comprimento funcional dos tecidos moles; cuidados com o tórax, importante em pacientes tetraplégicos por conta do movimento respiratório deficiente e risco de desenvolvimento de infecções respiratórias; e finalmente o cuidado com a bexiga urinária, que por ter o suprimento neurológico oriundo dos nervos lombar e sacral, na maioria das lesões pode haver disfunção, sendo necessário inicialmente o uso de cateterismo intermitente e posteriormente o treino dos pacientes para que possam realizar o esvaziamento de suas bexigas em intervalos regulares (UMPHRED, 1994; THOMSON et al., 2002).

Após esta fase, o paciente recebe alta da unidade hospitalar, mas ainda continua a necessitar de tratamento por meio de uma equipe multidisciplinar capacitada, que inclui médicos de diversas especialidades, fisioterapeuta, psicólogo e terapeuta ocupacional (bvsm.sau.gov.br, consultado em 17 de abril de 2013). A reabilitação deste paciente visa o desenvolvimento da máxima independência em cada caso, dado pela gravidade de sua lesão. Em geral as estratégias fisioterápicas nesta fase, visam fortalecimento de membros superiores para mudanças de posturas no leito, passagem do leito para a cadeira de rodas e mobilização nesta cadeira. Seguido a isto, é trabalhado controle de tronco, e por fim, quando possível, o treino da marcha, sendo esta fase o “grande desafio” tanto para o paciente como para o terapeuta (UMPHRED, 1994; THOMSON et al., 2002).

O grande desafio nesta fase é que estes pacientes muitas vezes não possuem força muscular adequada para manter a postura e caminhar, fazendo com que a recuperação da marcha se torne uma tarefa difícil e dispendiosa (FINCH et al., 1999). Nestes casos, é necessário prover um suporte para proteger estas pessoas de quedas, por meio dos sistemas convencionais de ajuda para auxílio na marcha como o uso de barras paralelas, andadores, muletas e bengalas, embora a quantidade de peso aliviada não seja constante e é difícil de ser quantificada. Outro fato é que estes dispositivos dependem da força, controle de tronco e coordenação dos pacientes. Além disso, o consumo energético do paciente com a utilização destes auxílios para a marcha é maior. Assim, com estes dispositivos, muitas vezes, não se conseguem gerar as condições necessárias para um treino de marcha seguro e eficaz (GAZZANI et al., 2000). No treino de marcha convencional, muitas vezes, o resultado não satisfaz o paciente, com padrões assimétricos de movimento e principalmente, com dificuldade de percorrer maiores distâncias (COELHO et al., 2004; DALY et al., 2004). Para aperfeiçoar este processo deu-se início a utilização da esteira em paraplégicos humanos objetivando a recuperação funcional, principalmente após uma lesão moderada da medula espinal (SULLIVAN et al., 2002), e mais tarde o treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal (CUNHA et al., 2002).

2.7. Treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal: BWSTT

O treino de marcha na esteira com suporte de peso corporal (BWSTT, do inglês “*body weight-supported treadmill training*”) é um sistema que suspende e segura parcialmente o peso do corpo do paciente, diminuindo a carga sobre o aparelho

musculoesquelético, e facilitando desta maneira a marcha. O BWSTT é uma estratégia de reabilitação neurológica que incorpora os resultados recentes da ciência para promover a recuperação funcional locomotora após lesão da medula espinal (VISINTIN et al., 1998; WILSON et al., 2001; SULLIVAN et al., 2002).

O surgimento desta técnica advém de estudos em gatos com lesão medular lombar, que demonstraram recuperação da capacidade de locomoção após receberam treinamento em esteira com apoio de tronco e movimentos assistidos das patas posteriores (SULLIVAN et al., 2002; THRELKELD et al. 2003).

Após o sucesso da reabilitação com animais, por volta dos anos 80, surgiram os primeiros estudos em seres humanos a partir dos trabalhos de Lois Finch e Hugues Barbeau (VISINTIN, 1989). A proposta destes pesquisadores era de suspender na esteira através de um elevador os pacientes que sofreram lesão da medula espinal, sendo os movimentos das pernas destes pacientes auxiliados por fisioterapeutas treinados (SULLIVAN et al., 2002).

Vieira e colaboradores em 2011 realizaram uma revisão literária sobre o uso do treino locomotor com suporte de peso corporal em humanos portadores de lesão medular incompleta, a fim de verificar os seus efeitos na marcha destes pacientes. Após todos os critérios da exclusão (foram excluídos os artigos que apresentavam pacientes com classificações ASIA A e/ou B, artigos comparando o suporte de peso corporal manual com o robótico e artigos associando a utilização de drogas ou outros tratamentos ao BWSTT) restaram 21 artigos, e destes, 16 apresentavam algum efeito positivo do BWSTT sobre os parâmetros espaciais e temporais da marcha (VIEIRA et al., 2011).

O protocolo para realização do BWSTT em humanos normalmente se baseia no posicionamento do paciente sobre uma esteira, preso a um sistema de suspensão de peso. Este sistema de suporte é composto por um elevador pneumático que possui um sistema de leitura digital que permite regular a quantidade de peso que está sendo sustentada. Inicialmente a quantidade de peso “suspensa” corresponde a 40% do peso corporal que vai sendo reduzida progressivamente. Os pacientes são treinados por dois fisioterapeutas. Um deles fica posicionado posterior ao paciente objetivando corrigir a postura, ao mesmo tempo em que estabiliza e posiciona corretamente o quadril durante a mudança de peso realizada durante a marcha. O segundo fisioterapeuta é posicionado de maneira que ele possa assistir os membros inferiores paréticos, monitorando as características normais da passada e a cadência (Figura 13). Os componentes-chave neste processo foram o alinhamento vertical do tronco, a mudança de peso durante a passada, a cinemática dos membros de apoio e de balanço, as características das passadas coordenadas entre os dois membros e finalmente a oscilação recíproca dos membros superiores, através do treinamento de dissociação de cinturas. Os pacientes normalmente não são autorizados a usar nenhum outro tipo de órtese durante o treinamento, a fim de deixarem os braços livres para balanceio. Por razões de segurança existem barras paralelas que só deverão ser usadas em situações emergenciais. A velocidade de caminhada precisa ser confortável para o paciente e estar dentro de suas limitações, sendo avaliada para possíveis aumentos em intervalos regulares de tempo. Normalmente, todo este processo é filmado para posteriores análises (SULLIVAN et al., 2002).

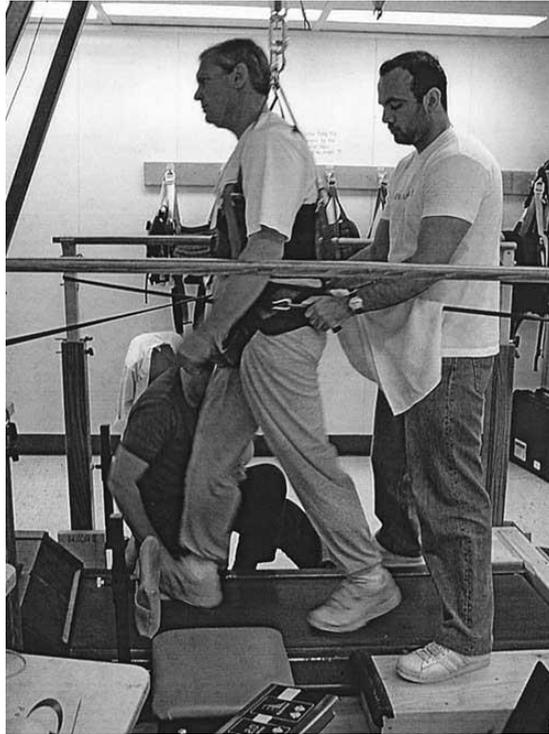


Figura 13: Paciente realizando técnica de BWSTT. A fotografia mostra o paciente realizando o BWSTT posicionado no suporte de peso corporal, a esteira e os fisioterapeutas (SULLIVAN et al., 2002).

Em ratos, o protocolo de BWSTT mais utilizado em função da viabilidade consiste em posicionar o animal horizontalmente num suporte de peso ajustado ao seu tronco, de maneira que ele possa mover seus quatro membros, sobre a esteira (FOUAD et al., 2000; MULTON et al., 2003). Aproximadamente 15% do peso corporal do animal é “descarregado” sobre suas patas traseiras (ILHA et al., 2011). Este protocolo é iniciado de 2 a 4 dias após a SCI, com uma velocidade de 5,8 cm/seg., 30 minutos por dia, sendo este tempo dividido em três sessões de 10 minutos cada, com intervalos de 5 minutos entre essas sessões. Durante o treinamento o movimento padrão de marcha dos membros posteriores é auxiliado manualmente pelo pesquisador, até que os animais possam realizá-los sozinhos (MULTON et al, 2003).

2.8. Mecanismos envolvidos na recuperação da marcha através do BWSTT

Existe uma estimativa que na maioria das lesões medulares apenas 10 a 15% das vias espinais descendentes são poupadas (DIETZ, 2009). Contudo, um considerável grau de recuperação locomotora em mamíferos com uma lesão da medula espinal pode ser conseguido. Isto pode ser atribuído a uma reorganização das vias neurais poupadas e de redes neurais (CPGs) existentes abaixo do nível da lesão que irão se adaptar para gerar atividade locomotora, mesmo na ausência da chegada de comandos supra-espinais (HOULE e CÔTÉ, 2013). A plasticidade destes centros espinais que podem assumir o controle da locomoção deve então passar a ser priorizada nos programas de reabilitação (DIETZ, 2009).

A elaboração de qualquer tarefa motora fornece estimulação suficiente para iniciar uma adaptação desses CPGs no interior da medula espinal e, por exemplo, para gerar a locomoção. Entretanto, a perda da capacidade motora após lesão medular pode se tornar maior quando estas redes centrais da locomoção já não são mais utilizadas (DIETZ, 2009). Observações realizadas em gatos submetidos a transecção medular alta

indicaram que, se a realização de uma tarefa motora é descontinuada, tal como ocorre após SCI, o processamento neural para a realização desta tarefa também se deteriora (EDGERTON et al., 1997). Estes resultados mostram que o treinamento motor repetitivo, tal como ocorre nos protocolos do BWSTT (o treinamento normalmente é realizado 5 dias por semana), fornece estimulação suficiente de caminhos neurais específicos para facilitar a reorganização funcional dentro da medula espinal e melhorar e/ou manter a resposta motora (DIETZ e HARKEMA, 2004).

Outro aspecto importante a ser considerado é que a entrada sensorial deve ser apropriada. Isso quer dizer que o treinamento deve ser específico, e isso tem fundamental importância para alcançar uma resposta motora ideal dos CPGs espinais. Consequentemente, a perda da capacidade motora após a lesão medular resultante da perda dos comandos supra-espinais, pode tornar-se maior, quando estes CPGs não são mais ativados por entradas sensorial funcionalmente relevantes (DIETZ e HARKEMA, 2004). Os bons resultados das pesquisas envolvendo o BWSTT, aponta que este método de tratamento fornece entradas sensoriais adequadas (DIETZ, 2009).

Há cada vez mais evidências de que a “utilização defeituosa” destes estímulos aferentes, em combinação com os processos secundários de compensação estão envolvidos em distúrbios típicos, tais como espasticidade. Portanto, um programa de reabilitação deve concentrar-se na melhoria da função, aproveitando a plasticidade dos centros neuronais e deve ser menos orientado para a correção de sinais clínicos isolados, tais como a excitabilidade reflexa (DIETZ, 2009).

Vários estudos demonstraram ainda, que a simples movimentação dos membros inferiores quando inexistente peso incidindo sobre eles não é suficiente para gerar ativação dos músculos da perna tanto em indivíduos saudáveis como em pacientes com total tetraplegia. No entanto, os movimentos dos membros inferiores em combinação com o peso incidindo sobre eles resultou numa apropriada ativação muscular. Registros eletromiográficos de indivíduos com SCI foram realizados durante a execução de movimentos que obedeciam exatamente aos padrões fisiológicos da marcha, mas que eram realizados sem a descarga de peso sobre os membros inferiores. Estes registros indicaram que os reflexos de estiramento nestas circunstâncias contribuem pouco para a ativação muscular nas pernas quando comparado durante as condições normais de locomoção. Ficou estabelecido então que a amplitude de ativação muscular nas pernas estava diretamente relacionada com o nível de carga imposto sobre esses membros (DIETZ e HARKEMA, 2004).

Pesquisas também sugeriram que informações aferentes oriundas das articulações do quadril quando mobilizadas são importantes para a ativação muscular durante a locomoção em mamíferos, principalmente porque o quadril é quem inicia a transição das fases de apoio para o balanceio (oscilação), e isso se dá pelo sincronismo de músculos flexores e o início da fase de oscilação (DIETZ e HARKEMA, 2004).

Portanto, não é surpreendente que o fato de poder “descarregar e recarregar” o peso do corpo sobre os membros inferiores durante a locomoção desempenha um papel essencial para o sucesso de uma formação locomotora em pacientes paraplégicos e hemiplégicos (HESSE et al., 1997; DIETZ e HARKEMA, 2004). O BWSTT é uma estratégia que permite o paciente treinar sua marcha, tendo peso incidindo sobre suas pernas enquanto ele as movimenta, auxiliados por fisioterapeutas.

De maneira geral, a interação da informação sensorial específica e repetitiva aliada com o fato de poder descarregar o peso do corpo parcialmente sobre os membros inferiores durante a locomoção são os mecanismos que podem estar envolvidos na recuperação da marcha através do BWSTT (Figura 14).

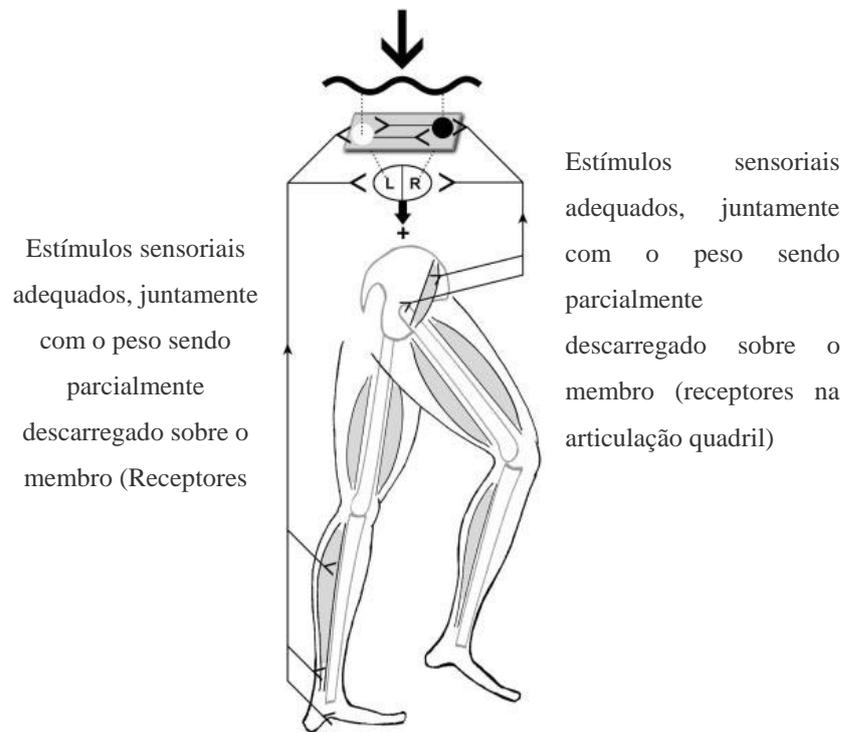


Figura 14: Ilustração esquemática da entrada de sinais aferentes importantes para a geração e formação dos padrões de locomoção em pacientes com SCI. (SETA MAIOR) indica a entrada de comandos supra-espinais que foram interrompidos (LINHA ONDULADA) após a lesão. Vias aferentes oriundas de receptores nas articulações do quadril, musculares e mecanorreceptores do pé (SETAS PEQUENAS), influenciando sistemas interneurais e motoneurônios (L, ESQUERDA, R, DIREITA), resultando na saída eferente final (locomoção) (Modificado de DIETZ e HARKEMA, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Implantar a técnica do BWSTT no Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).
- Avaliar parâmetros morfológico-funcionais do BWSTT em ratos submetidos à lesão medular por compressão através da inflação de balão.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito BWSTT na recuperação funcional da capacidade de locomoção em ratos submetidos à lesão medular por compressão através da inflação de balão.
- Avaliar se o BWSTT pode interferir na severidade do trauma da medula espinal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram usados ratos adultos (90 dias) machos da raça Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, pesando entre 270 e 310 gramas, sendo mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas, em temperatura constante, com água e comida “*ad libitum*”.

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram submetidos à apreciação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.2. Desenho experimental

O desenho experimental adotado está esquematizado na figura 15. Inicialmente, os animais foram submetidos às sessões diárias de adaptação na esteira e então à cirurgia de SCI por compressão. No dia seguinte à SCI, os animais foram submetidos à avaliação da capacidade locomotora (Teste BBB) e através deste teste os animais com escore BBB acima de 0,5 foram excluídos do estudo. Os animais com escore BBB 0 (zero) foram randomicamente divididos nos seguintes grupos de tratamento:

- LM (Lesionados Medulares) – Grupo de animais submetidos ao modelo de lesão medular sem qualquer manipulação/tratamento adicional;
- LMST (Lesionados Medulares, colocados no Suporte de peso e submetidos ao Treino de marcha) – Grupo de animais submetidos ao modelo de lesão medular e ao treino de marcha na esteira com suporte de peso corporal (BWSTT), diariamente;
- LMS (Lesionados Medulares e colocados no Suporte de peso) - Grupo de animais submetidos ao modelo de lesão medular e colocados no suporte de peso corporal sob a esteira desligada diariamente.

Para servir de controle da cirurgia, foi incluído um grupo SHAM – Grupo de animais falso-operados (apresentavam escore BBB 21).

Os animais foram submetidos à avaliação da capacidade locomotora pelo teste BBB semanalmente. Ao final da quinta semana foram submetidos à análise da locomoção através do teste de impressão das pegadas (teste “foot print”) e depois eutanasiados.

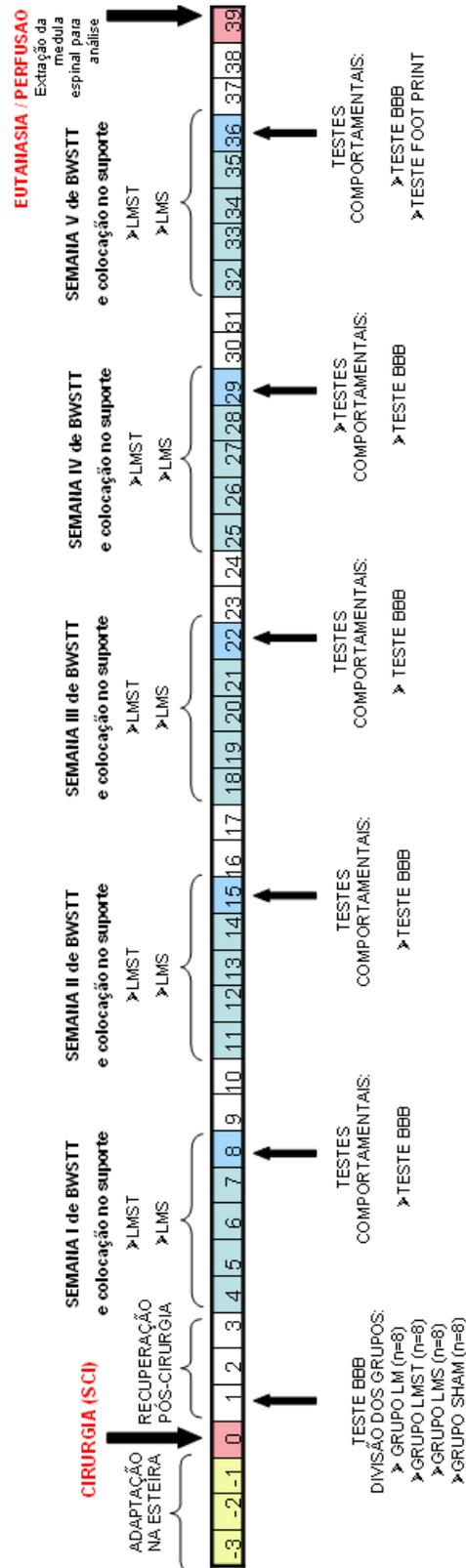


Figura 15: Esquema do desenho experimental. Dias em que foram realizadas a adaptação na esteira, a cirurgia de SCI, a divisão dos grupos, o período de recuperação pós-lesão, as sessões de BWSTT com os animais do grupo LMST e a colocação dos animais do grupo LMS no suporte corporal com a esteira desligada, os testes comportamentais em todos os grupos e a eutanásia dos animais através da perfusão transcardíaca para retirada das medulas espiniais para posterior análise histopatológica.

4.3. Adaptação à esteira

Previamente à cirurgia de lesão medular todos os animais foram submetidos à adaptação à esteira, que consistiu na colocação dos animais na mesma esteira que foi utilizada para o BWSTT numa velocidade de 17,5 cm/seg. Este treinamento foi realizado por 3 dias antes da cirurgia e cada sessão diária de treinamento durou de 10 a 15 minutos para cada animal (tempo máximo que os animais cooperavam). Os animais não foram submetidos a qualquer privação de alimento e nem receberam nenhum estímulo para que andassem na esteira. Caso algum animal virasse no sentido oposto, este era reposicionado manualmente na esteira em movimento (FOUAD et al., 2000; MULTON et al., 2003) (Figura 16).



Figura 16: Período de Adaptação na esteira. Fotografia mostrando os animais andando na esteira previamente à cirurgia de SCI.

4.4. Treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal (BWSTT)

Para realização do BWSTT utilizamos uma esteira ergométrica (marca Caloi, modelo CI 4004) adaptada. Na esteira, um dispositivo eletrônico ligado a um motor (Figura 17) permitiu regular velocidades mais baixas que as usuais de uma esteira ergométrica para humanos, obtendo velocidades de 0 a 0,72 Km/h (0 a 20 cm/seg).



Figura 17: Fotografia ilustrando a adaptação realizada na esteira. Seta “A” indica o motor conectado por intermédio de uma correia ao eixo que movimenta a lona da esteira. Seta “B” indica o dispositivo eletrônico contendo um regulador (dimmer) que permitiu usar velocidades de 0 a 20 cm/seg.

Em cima da lona da esteira ergométrica foram acopladas 9 raias, medindo 44 cm de comprimento, 10 cm de largura e 11 cm de espessura cada uma delas, semelhante às utilizadas por FOUAD e colaboradores em 2000.

O suporte de peso corporal (Figura 18 A) constituiu de uma haste metálica em forma de L que foi presa em cada raia. Nesta haste foi soldado um parafuso com um pequeno gancho preso em sua extremidade. Neste gancho foi preso um colete confeccionado em courvin (Figura 18 B), que foi preso no tronco dos animais com auxílio de um velcro. Para o suporte de cauda utilizamos uma fita adesiva hipoalergênica de uso hospitalar.

No quarto dia após a lesão medular foi iniciado o BWSTT com os animais do grupo LMST, que consistiu na colocação do colete no tronco dos animais, seguido da fixação deste colete no suporte de peso corporal de cada raia e na fixação da cauda com a fita para suporte (Figura 18 C). Desta maneira o animal permaneceu com seu peso suspenso parcialmente por este mecanismo, em posição horizontal sob a esteira. A esteira então foi ligada a uma velocidade de 5,8 cm/seg (FOUAD et al., 2000; MULTON et al., 2003). Foram realizadas 3 sessões diárias com 10 minutos de duração cada uma, com um intervalo de 5 minutos entre elas, totalizando 40 minutos, cinco dias por semana durante 5 semanas. Nos intervalos entre as sessões, os ratos permaneceram no suporte, sem que houvesse qualquer manipulação sobre eles.

Os animais do grupo LMS foram colocados no suporte de peso corporal e na esteira sem movimento com finalidade de exposição ao local e ao suporte utilizado durante o exercício. O tempo de exposição destes animais ao local de realização do BWSTT foi de 40 minutos, mesmo período de tempo em que os animais que realizavam o treino de marcha em esteira (grupo LMST) permaneciam durante toda esta atividade (LANA et al., 2008)

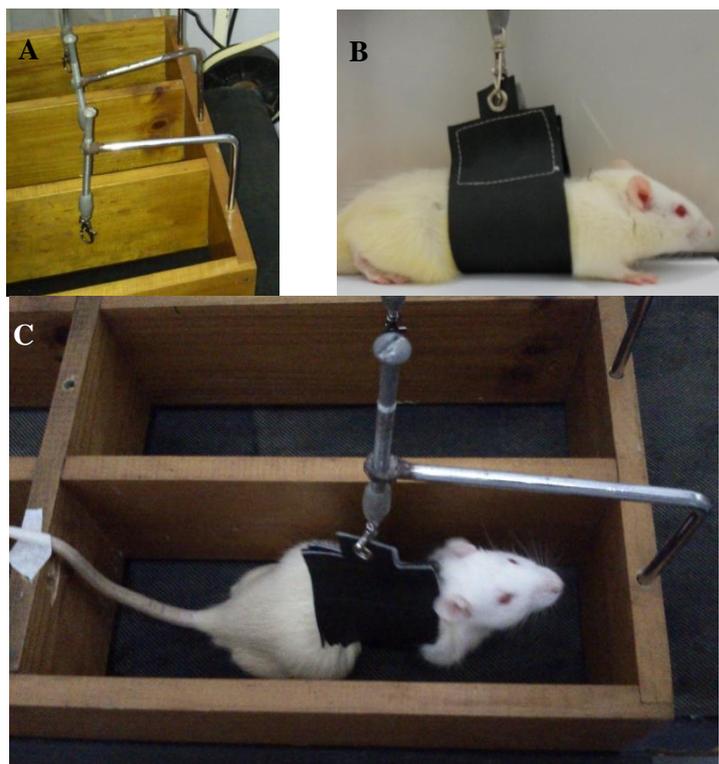


Figura 18: Implantação da técnica e realização do BWSTT. (A) Suporte de peso corporal: haste metálica em forma de “L” onde foi soldado um parafuso, por onde se aumentava ou diminuía a quantidade de peso suspensa. (B) Colete: Foto mostrando o colete confeccionado em courvin que foi preso ao tronco dos animais. (C) Animal realizando o BWSTT: A foto mostra o animal utilizando o suporte de peso corporal e o suporte de cauda realizando o treino de marcha na esteira.

4.5. Procedimento cirúrgico para lesão medular

Os animais foram inicialmente anestesiados com Ketamina (75mg/kg, i.p.) combinada à Xilasina (25mg/kg, i.p.). Após alcançar o plano anestésico, os animais foram posicionados numa placa em decúbito ventral e tricotomizados na região dorsal, onde em seguida foi feita uma incisão longitudinal da pele na linha média, em aproximadamente 3 a 4 cm, sobre os processos espinhosos de T7 a T11. Posteriormente, a musculatura sobre estes processos espinhosos foi dissecada, possibilitando a abertura de um pequeno orifício (laminectomia) de 2 mm de diâmetro na região caudal do processo espinhoso T10 através do auxílio de uma furadeira dental (Figura 19 A).

A lesão por compressão na medula espinal dos ratos foi realizada com a utilização de um cateter Fogarty do tipo 2 conectado a uma micro seringa Hamilton de 50 μ l previamente preenchido com solução salina 0,9% (VANICKÝ et al., 2001). A ponta do cateter foi então introduzida por este orifício no espaço epidural, sendo avançado cranialmente por 1 cm, para que o centro do balão fique entre T8-T9. Em seguida, o balão foi inflado com um volume definido de 15 μ l salina por 5 minutos. Após este período de 5 minutos o cateter foi desinflado e removido cuidadosamente e o animal teve o tecido muscular e a pele suturados em camadas anatômicas (Figura 19 B e 19 C).

Imediatamente após o procedimento cirúrgico de lesão medular, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico, 40.000 UI/kg, s.c.) e injeção subcutânea de 5 ml de uma solução de salina. Os animais foram mantidos em

câmara com temperatura controlada e 2 horas após a cirurgia os animais receberam uma injeção de Fentanil (0,032 mg/kg, s.c.). Após a lesão animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 5 animais por gaiola, sob condições adequadas de higiene, alimentação e hidratação.

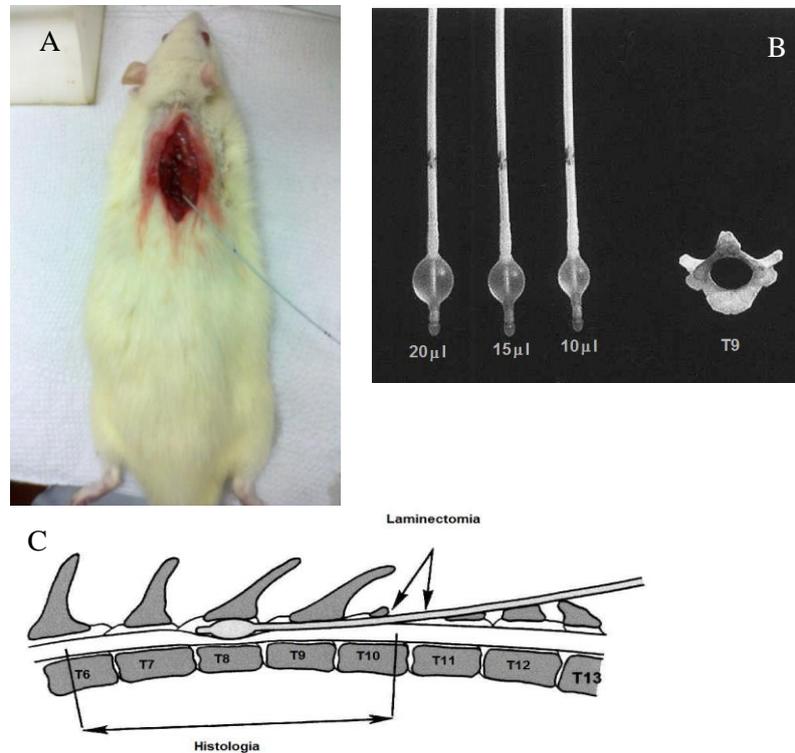


Figura 19: Cirurgia de lesão medular. (A) Fotografia do animal durante a cirurgia com a musculatura no nível dos processos espinhosos T7 e T11 dissecada, com orifício aberto (laminectomia) de 2 mm de diâmetro na região caudal do processo espinhoso T10 e cateter posicionado no canal medular. (B) Fotografia mostrando o tamanho da vértebra T9 e cateteres inflados com 10, 15, e 20 µl de soro fisiológico, respectivamente (modificado de VANICKÝ et al., 2001). (C) Esquema do cateter posicionado no canal medular no espaço epidural inflado com um volume definido de 15 µl salina (VANICKÝ et al., 2001).

4.6. Avaliação da capacidade locomotora de ratos pós-lesão medular: Teste BBB

O BBB é um teste que avalia a capacidade de locomoção em campo aberto dos animais que foram submetidos à cirurgia de SCI, descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (1995). Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto que consiste basicamente de uma caixa transparente de acrílico de 80x80x30cm, com fundo forrado de material antiderrapante na cor preta subdividido em 25 quadrantes iguais (16cm² cada) (Figura 20).



Figura 20: Teste BBB. Fotografia ilustrando um animal sendo submetido ao teste BBB para avaliação da capacidade locomotora 24 horas após SCI.

Neste teste os animais foram filmados por 4 minutos por uma câmera Nikon Coolpix S2500 e os filmes transferidos e armazenados em computador. A câmera filmadora foi posicionada lateralmente ao campo aberto, para a observação dos membros dos animais. As avaliações foram realizadas por dois examinadores que eram cegos ao experimento que atribuíram escores 0 a 21 de acordo com a escala funcional BBB (Tabela 01) que considera a movimentação da articulação do quadril, joelho, tornozelo, posição do tronco, cauda, coordenação, rotação das patas traseiras. Nesta escala, 21 indica locomoção normal e 0 (zero) indica nenhum movimento espontâneo no membro. Os valores foram representados como média \pm erro padrão.

Essa avaliação foi realizada 24 horas e semanalmente após a lesão, por cinco semanas, nos respectivos 1^o, 8^o, 15^o, 22^o, 29^o e 36^o dias após a lesão.

Tabela 01: Escala Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da capacidade de locomoção de ratos pós-lesão medular (BASSO et al., 1995)

<i>Pontos</i>	<i>Definições operacionais de categorias e atributos</i>
0	Nenhum movimento observável do membro posterior
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou de duas articulações, geralmente do quadril ou joelho
2	Movimento extenso de uma articulação e discreto na outra
3	Movimento extenso nas duas articulações e nulo na terceira
4	Movimento discreto das três articulações do membro posterior
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente na fase de apoio (ex. quando estático) ou passada dorsal ocasional , freqüente ou consistente com o suporte de peso e nenhuma passada plantar
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior
14	Passo plantar com suporte de peso consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante/ da pata rodada (interna ou externa/) durante a locomoção, no contato inicial com a superfície e antes de liberar os dedos na fase final de apoio ou passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante/ da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com freqüente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodado no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com freqüente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodado no instante da liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos e apresenta cauda para baixo em parte do tempo ou o tempo todo.
20	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos com consistente elevação da cauda e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, consistente liberação dos dedos, posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda fase de apoio, estabilidade consistente do tronco e consistente elevação da cauda.

4.7. Avaliação funcional da marcha: Teste Foot Print

No teste da “impressão de pegadas” (do inglês foot print), a região plantar das patas traseiras dos animais foi pintada com auxílio de um pincel macio e uma solução de cola colorida e tinta nanquim ambas na cor preta e atóxicas. Esta solução produziu uma tinta mais densa e aderente. Posteriormente cada animal foi posicionado na extremidade inicial de um corredor estreito de madeira de 1 m de comprimento por 7cm de largura. No final deste corredor foi conectada uma caixa (20 cm de largura, 15 cm de altura e 10 cm de comprimento) onde os animais poderiam entrar após percorrerem o corredor. O assoalho do corredor foi coberto com uma fita de papel de 7 cm de largura (mesma que o corredor), o que evitou a movimentação da mesma durante o teste (Figura 21 A). Na fita de papel foram feitas duas marcas nos seus 15 cm iniciais e finais, para delimitar uma distância de 70 cm a ser considerada na análise. Os animais tinham de 1 a 2 segundos para atravessar o corredor e se os animais não percorressem neste tempo fita era substituída e o teste repetido (Figura 21 B) (STIRLING et al., 2004).



Figura 21: Corredor utilizado no Teste Foot Print. Em (A) observa-se a fita de papel colocada no assoalho deste corredor e a caixa colocada ao seu final, para onde os animais se dirigiam. Em (B), animal percorrendo o corredor contendo a fita de papel em seu assoalho onde as marcas das pegadas são obtidas após o animal ter tido suas patas traseiras pintadas.

Uma vez obtido o registro das pegadas, as fitas de papel foram avaliadas previamente para determinar qual trecho de impressões apresentava pegadas características bem definidas e seria escaneado e avaliado (Figura 22). O trecho escolhido foi então digitalizado utilizando um scanner convencional da marca HP, modelo Photosmart C3180, com resolução de 300 pixels por polegada para imagem em preto e branco, em formato de imagem de alta qualidade (TIFF). A análise das imagens foi realizada através de um software de domínio público ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) (Figura 23).

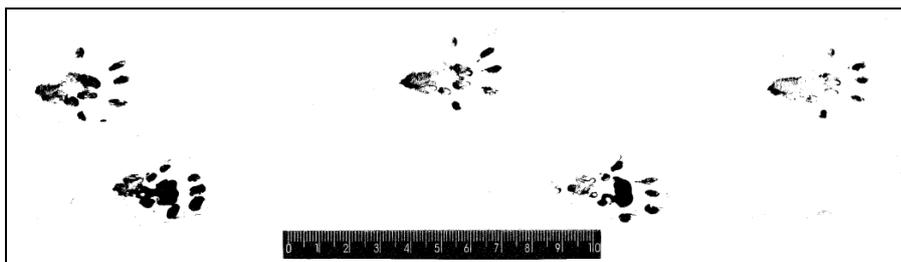


Figura 22: Fita de papel contendo o registro das pegadas. Imagens das pegadas de um animal SHAM (não submetidos à lesão medular) após serem escaneadas e digitalizadas. Na parte inferior da figura nota-se a imagem de uma régua (em centímetros) que foi utilizada como referência para calibrar o programa no qual foram mensuradas as distâncias.

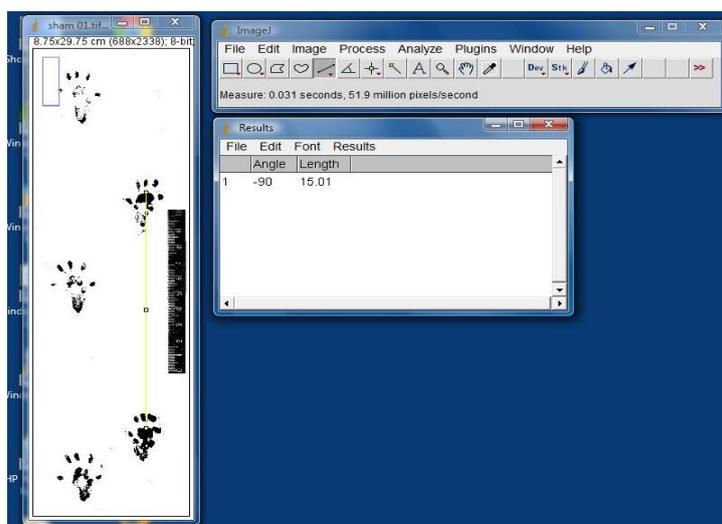


Figura 23: Análise das imagens através do ImageJ. A figura ilustra a impressão dos pés sendo analisadas mediante o software ImageJ. Nesta imagem observamos a medição da distância (comprimento) entre duas patas de um mesmo lado.

Os critérios analisados foram os descritos por Kunkel-Bagden e colaboradores (1993) neste modelo de lesão medular e estão ilustrados na figura 24. São eles:

1. Distância entre as duas patas (DBF, do inglês “Distance Between Foot”), determinada através da medição da distância entre as impressões dos coxins centrais das duas patas traseiras.
2. Comprimento da passada (LS, do inglês “Stride Length”) distância entre as duas impressões consecutivas de cada pata (direita e esquerda).
3. Rotação (R, do inglês “Rotation”) determinada pelo ângulo formado por linhas que passam pelo terceiro dedo e ponto médio dos calcanhares esquerdo e direito.

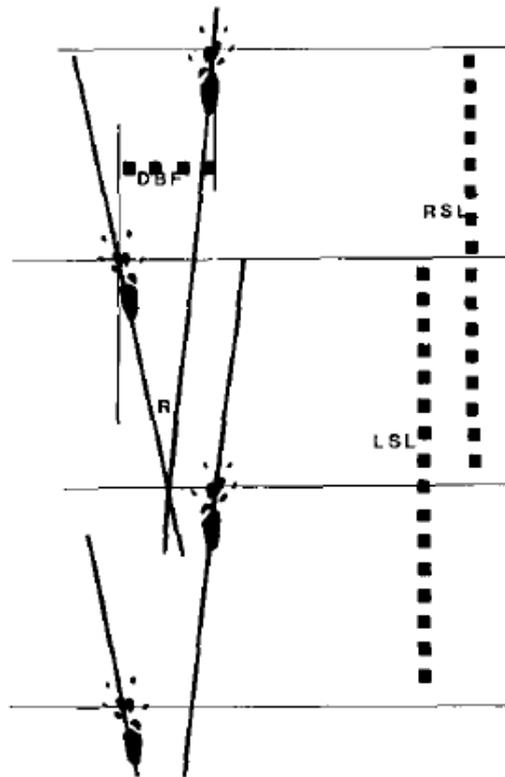


Figura 24: Critérios analisados no Teste Foot Print. Marcas das pegadas das patas posteriores ilustrando as medições realizadas: Base de apoio (DBF, do inglês “Distance Between Foot”); comprimento das passadas nos lados direito e esquerdo (RSL e LSL, do inglês Right Stride Length e Left Stride Length); rotação dos membros (R do inglês “rotation”) (KUNKEL-BAGDEN et al., 1993).

4.8. Perfusão, fixação e corte das medulas

Cinco semanas após a lesão medular os animais foram anestesiados e eutanasiados por perfusão transcardíaca. Para o procedimento da perfusão, os animais receberam uma anestesia profunda com Tiopental Sódico (50mg/kg, i.p., *Cristalia*) por via intraperitoneal e depois de certificada a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal. Foi realizada uma incisão a partir do processo xifóide seguindo superior e lateralmente para ambos os lados até próximo da região anterior da axila. Em seguida, desinseriu-se o diafragma, de modo a expor completamente o coração na cavidade torácica. Uma agulha calibrosa ligada através de um cateter a uma bomba peristáltica, foi inserida no ápice do ventrículo esquerdo, em direção à parte ascendente da aorta, local este onde ficou posicionada a ponta desta agulha. Em seguida, foi realizada uma pequena abertura no átrio direito para a saída do sangue e ligou-se a bomba. Por este procedimento, foram impulsionados 300 ml de solução de salina com Heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000ml de solução salina) por aproximadamente 10 minutos, seguida de 700ml de Paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C durante aproximadamente 20 minutos. O sítio da lesão medular foi identificado e a medula foi retirada e dissecada entre as vértebras T7 e T10 e pós-fixadas na mesma solução de perfusão. Posteriormente, as medulas foram armazenadas sob refrigeração a 4°C até o momento do corte.

4.9. Avaliação histopatológica: Análise da severidade do trauma medular

Para avaliação histopatológica, um segmento de 1,5 cm de cada medula contendo o sítio da lesão foi preparado e embebido em parafina e fatiados em micrótomo em cortes longitudinais de 5µm de espessura.

Para o processamento das medulas foram realizadas as etapas de desidratação com banhos seriados de 40 minutos na seguinte seqüência: Álcoois 70%, 80%, 90%, 95% e 100%; seguida de um banho intermediário de xilol e álcool, três banhos seriados em xilóis e outros três em parafinas (derretida a uma temperatura de 58 à 60°C). Posteriormente foi realizada a inclusão do material, onde as medulas foram posicionadas com a região ventral voltada para o fundo do cassete, contendo uma camada prévia de parafina no fundo, e embebidas no material de inclusão, de maneira que pudessem ser cortadas longitudinalmente.

As medulas foram cortadas em micrótomo em cortes seqüenciais de 5µm. Em cada lâmina foram dispostos 2 cortes. Para a coloração das lâminas utilizamos hematoxilina e eosina (HE). Inicialmente foi realizada uma etapa de desparafinização, na qual as lâminas permaneceram 4 horas na estufa (58-60°C), e depois passaram por uma seqüência de três banhos de xilol, seguidas de banhos de álcoois 100%, 95%, 70% e 50%. Para a coloração (HE) as amostras foram lavadas em água corrente e água destilada por 5 minutos, mergulhadas na hematoxilina por 8 minutos e lavadas novamente em água corrente por 5 minutos. Um banho de 5 minutos de solução de álcool ácido 3% e outro de água destilada. Para a etapa da eosina as lâminas permaneceram por apenas 30 segundos, sendo mergulhadas em seguida rapidamente em água acética 1% e deixadas em água corrente por 2 minutos. A última etapa foi a clarificação das lâminas com quatro banhos seqüenciais de álcool 100% por 5 minutos e três banhos de xilol por 10 minutos. Finalmente, as lâminas foram seladas com entelam.

As imagens das amostras foram capturadas em microscópio de campo claro (Nikon). Para a montagem das imagens panorâmicas, utilizamos o programa Adobe Phothoshop CS2. Cada colagem representa um aumento de objetiva de 10X e contém 80 a 100 fotos.

A quantificação da área da lesão foi realizada pela diferença entre a área total da medula e a área de lesão em porcentagem de segmentos medulares de 1,5 cm. Foram analisados 3 animais de cada grupo. Para tal procedimento escolhemos as lâmina que estão compreendidas entre as numerações 6 e 8 da seqüência de cortes. Essas alturas correspondem à região de maior extensão de dano tecidual.

Para a quantificação do estrangulamento da medula, utilizamos o Software ImagePro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc.). Selecionamos a ferramenta “measurements”, e traçamos linhas transversais na áreas caudal, rostral e do epicentro da lesão nas medulas. Os dados foram analisados através da diferença das médias das porções caudais e rostrais, em porcentagem, em relação aos valores do epicentro da lesão (através da porcentagem da perda de tecido) (Figura 22).

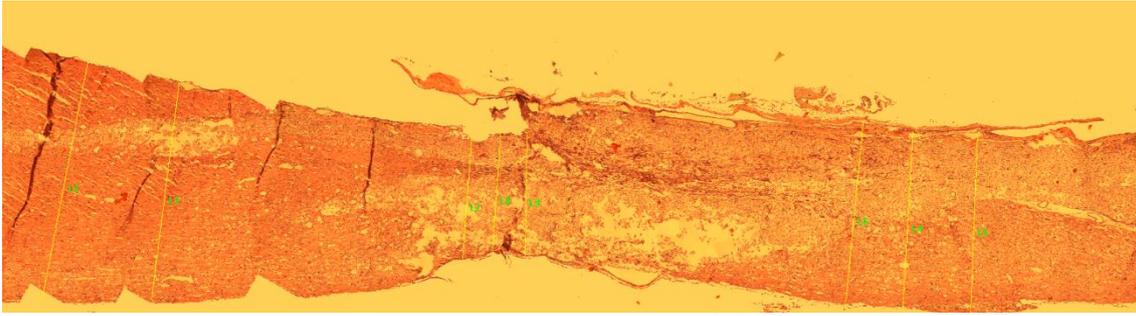


Figura 25: Esquema da quantificação do estrangulamento dá área da lesão. As linhas transversais representam as áreas rostral, caudal e do epicentro da lesão que foram quantificadas.

4.10. Análise Estatística

A capacidade locomotora foi avaliada pelo escore do teste comportamental (BBB) e a média entre os grupos expressa como média \pm erro padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância de duas vias para medidas repetidas, admitindo-se os fatores grupo, tempo e tratamento. Posteriormente, foi executado o pós-teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

Os parâmetros do foot print e avaliação da severidade do trauma (tamanho da lesão e porcentagem de estreitamento da medula na lesão) foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Student-Newman-keuls para comparações múltiplas, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$ em todas as análises.

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos programas SigmaStat 3.5 e as apresentações gráficas dos resultados foram obtidas pelo programa GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Modelo de lesão medular por compressão em ratos

A lesão medular típica em humanos é decorrente de traumas não perfurantes (como acidentes de carro e acidentes de mergulho) onde estruturas ósseas e ligamentos são deslocados e mecanicamente comprimem a medula espinal (SEKHON et al., 2001; DUMONT et al., 2001).

Muitos modelos experimentais de SCI foram desenvolvidos a fim de imitar os eventos mecânicos ocorridos em humanos. Estes modelos devem gerar confiabilidade e reprodutibilidade às experiências para propiciar ao pesquisador a possibilidade de reproduzir os mesmos resultados diversas vezes (BEHRMANN et al., 1992; VANICKÝ et al., 2001). As técnicas de lesão medular experimental por contusão e por compressão são as que mais se aproximam da realidade aos acidentes que ocorrem com humanos, sendo muito rara a ocorrência de transecção completa da medula espinal (KWON et al., 2004).

Atualmente, o modelo mais usado é o de contusão por queda de peso que consiste em soltar um peso através de um tubo a uma distância fixa, controlado por um sistema computadorizado, sobre a medula exposta ocorrendo assim uma instantânea deformação mecânica. Outro modelo usado nas pesquisas de SCI é o modelo de compressão. Neste modelo a lesão é induzida pela técnica de compressão progressiva, realizada através de mecanismos como um balonete inflável, cliques de aneurisma, entre outros. Desta forma, este modelo tem o objetivo, reproduzir a persistência de uma compressão na medula espinal, como observado na maioria dos casos em humanos (GENOVESE et al., 2008).

Neste trabalho, o modelo de SCI utilizado foi o modelo de lesão por compressão em ratos através da inflação de um balão que foi previamente padronizado por Vanický e colaboradores (VANICKÝ et al., 2001). Esta escolha foi feita levando em conta as vantagens apresentadas neste modelo, como o desenvolvimento gradual da lesão, reprodutividade, baixo custo e facilidade da técnica ser executada.

5.2. Implementação da técnica de BWSTT no laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Nesta etapa fizemos uma adaptação em uma esteira ergométrica para uso em humanos a fim de que pudesse ser utilizada em ratos. Primeiramente substituímos o motor original por um motor menor de uso automotivo, que foi conectado a um dispositivo eletrônico que nos permitiu regular através de um dimmer (dispositivo utilizado para variar a intensidade de uma corrente elétrica) velocidades entre 0 e 0,72 Km/h (0 a 20 cm/seg). Esta faixa de velocidade nos permitiu trabalhar animais sadios (adaptação na esteira, feita antes da SCI) e animais lesados (após SCI).

As raia onde os animais permaneceram durante o treino foram feitas através da construção de uma caixa de madeira sem fundo que foi colocada sobre a lona da esteira ergométrica, sendo apoiada lateralmente, de maneira que a lona podia correr abaixo dela sem atrito. Esta caixa foi dividida em 9 raia, que consistem em regiões retangulares medindo 44 cm de comprimento, 10 cm de largura e 11 cm de espessura cada uma delas. Essas medidas foram baseadas no modelo utilizado por Fouad e colaboradores em 2000.

Previamente á cirurgia de SCI, na fase de adaptação, regulamos a velocidade da esteira em 17,5 cm/seg, a mesma utilizada por Fouad e colaboradores (2000). Nesta etapa os animais iniciaram a locomoção na esteira sem que houvesse a necessidade de qualquer privação de alimento ou reforço. Alguns animais se viraram no sentido oposto. Na ocorrência deste fato eles foram reposicionados manualmente no sentido correto, ou eles mesmos se corrigiram. O tempo de duração deste treinamento variou entre 10 e 15 minutos. Após 15 minutos a maioria dos animais perdeu a motivação para andar continuamente, como descrito por Foud e colaboradores (2000). Isso era observado quando algum animal deixava com que a esteira o arrastasse até que seu corpo fosse de encontro com a parede posterior da raia. Quando seu corpo tocava essa região ele corria em direção a parede anterior da raia deixando a esteira arrastá-lo novamente. Este comportamento se repetia até que fosse retirado da esteira. Os ratos foram treinados em grupos de 9 por vez. Nas primeiras vezes em que realizamos esta adaptação, alguns animais passavam de uma raia para a outra. Por este motivo nosso grupo construiu uma tampa de acrílico transparente (contendo furos para que houvesse troca do ar), e tampou as raias, fazendo com que o animal ficasse habituado a permanecer sempre na mesma raia.

Segundo a literatura, para que se obtenham melhores resultados o treino nesses animais deve ser iniciado o mais precocemente possível, normalmente de 2 a 4 dias (MULTON et al., 2003). Optamos por iniciar o BWSTT no quarto dia pós-lesão. Esse tempo foi necessário para que houvesse cicatrização dos tecidos cutâneos e musculares, a fim de que fosse possível a colocação do colete no tronco destes animais, o qual foi preso ao suporte de peso corporal. A velocidade da esteira usada nesta etapa foi de 5,8 cm/seg, baseada em dados da literatura para este tipo de lesão (FOUAD et al., 2000; MULTON et al., 2003). Os animais se adaptaram bem a esta velocidade e pareciam realizar o treino de marcha de maneira confortável. O tempo total de treino diário foi de 40 minutos, sendo este tempo dividido em três sessões com 10 minutos de duração cada uma e um intervalo de 5 minutos entre cada uma delas (MULTON et al., 2003). Nos intervalos de 5 minutos entre uma sessão e outra, os animais permaneceram no suporte de peso sem serem manipulados. Alguns animais aproveitavam-se do fato de estarem neste suporte e ficavam movendo seus corpos, utilizando este suporte como “uma espécie de balanço”. Isso também foi observado nos animais do grupo LMSU que permaneciam 40 minutos presos a este suporte com a esteira desligada. Neste período de tempo se movimentavam dentro da raia, auxiliados por este suporte. Por vezes também assumiam a posição bípede ao apoiar os membros anteriores na parede da raia.

Desta forma, a padronização da técnica de BWSTT no laboratório de Neurofisiologia da UFRRJ foi satisfatória, e esta técnica será utilizada nos próximos estudos da área nesta Universidade.

5.3. Efeito do BWSTT na capacidade locomotora avaliada pelo teste BBB de ratos submetidos à lesão medular por compressão

A Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores grupo (LM, LMS e LMST) ($F_{(2,85)}= 3,801$; $p=0,043$), tempo (antes da lesão, 24h, 1^a. a 5^a. semanas após lesão) ($F_{(5,85)}= 136,8$; $p<0,001$) e interação ($F_{(10,85)}= 2.315$; $p=0,0184$). Os resultados demonstram (Figura 26) que no primeiro dia após a lesão, os animais apresentaram paraplegia e paresia, sendo atribuído índice zero na escala BBB, indicando incapacidade de movimento dos membros posteriores.

Quando considerado apenas o fator grupo (sem ser considerado o fator tempo), o teste Student-Newman-Keuls detectou que o grupo LMST foi significativamente

diferente do grupo LM ($p=0,035$). Neste caso, as médias do escore BBB destes grupos foram: LM: $5,472 \pm 1,046$; LMS: $7,819 \pm 1,046$ e LMST: $9,281 \pm 0,905$.

Quando considerado o fator tempo, o teste Student-Newman-Keuls também detectou diferença significativa nos escores BBB do grupo LMST em relação ao grupo LM na 3^a ($p=0,008$), 4^a ($p=0,008$) e 5^a ($p=0,006$) semanas após a SCI. Na quarta semana após SCI o grupo LMS também apresentou diferença significativa em relação ao grupo LM, mas esta diferença não foi mantida na 5^a semana de análise.

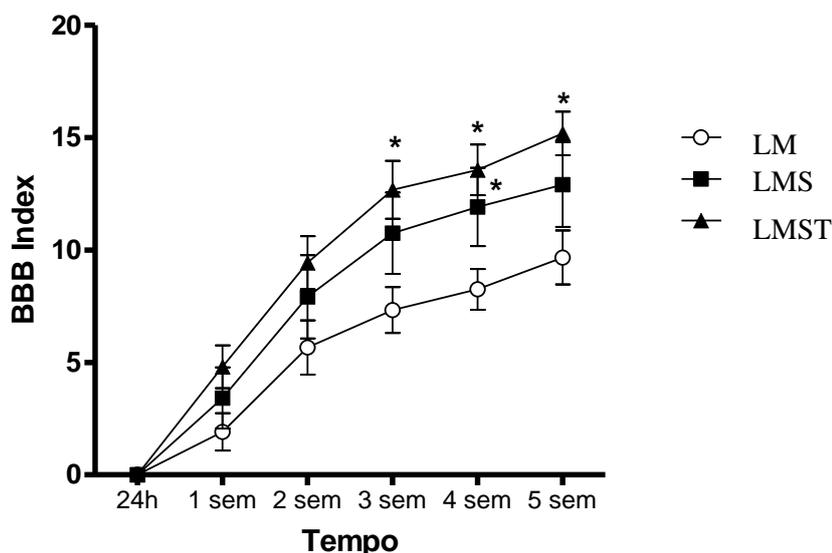


Figura 26: Efeito do BWSTT na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Após serem submetidos à lesão medular por compressão, ratos Wistar foram submetidos durante cinco semanas a uma destas condições: Treino de marcha de marcha em esteira com suporte de peso corporal, grupo LMST ($n=8$); colocados diariamente na esteira desligada utilizando o suporte de peso corporal, grupo LMS ($n=6$); ou não foram manipulados, grupo LM ($n=6$). Valores são apresentados como média \pm erro padrão do escore de capacidade locomotora (teste BBB). Teste Student-Newman-Keuls, $P<0,05$. * indica diferença significativa em relação ao grupo LM.

Nossos resultados corroboram com os resultados de MULTON e colaboradores (2003) que também demonstraram uma melhora da locomoção de ratos submetidos à SCI por compressão ao serem treinados na esteira com suporte de peso corporal. A diferença observada quando nossos resultados são comparados aos do grupo de Multon, esta no fato de que nossos animais apresentaram uma melhora maior. A média do escore BBB de nossos animais do grupo LMST ao final da quinta semana foi de 15,18 (que representa clinicamente passada plantar consistente, com suporte de peso consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior). Enquanto no grupo de MULTON os animais do grupo LMST apresentaram uma pontuação de 10 na escala BBB, também ao término da quinta semana (correspondente à passada plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação entre os membros). Já os animais LM obtiveram 9,66 em nossa pesquisa ao final da quinta semana (correspondente a passada plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior). Enquanto isso, os animais de Multon, atingiram apenas 8 na escala BBB (correspondente ao apoio plantar da pata sem suporte de peso). Isso pode ser explicado pela gravidade da lesão. Em nosso trabalho realizamos uma lesão medular por compressão moderada, através da inflação do balão com 15 μ l salina por 5 minutos. Já no trabalho de MULTON e colaboradores, a lesão foi realizada com a inflação do balão

com 20 µl salina por 5 minutos, caracterizando uma lesão grave, implicando em maior dano neurológico e conseqüentemente uma recuperação menor avaliada pelo teste BBB. Esta diferença na gravidade de lesões já foi comparado e descrito por VANICKY e colaboradores, criadores deste modelo de lesão, que testaram a recuperação espontânea de animais submetidos à SCI por compressão de balão com 10 µl, 15 µl e 20 µl de salina (VANICKY et al., 2001).

Nossos resultados também podem ser comparados aos resultados de FOUAD e colaboradores que também testaram o BWSTT em ratos submetidos à SCI. Na quinta semana de tratamento os animais do grupo LMST apresentavam a média do escore BBB igual à 14,49, muito próxima da nossa que foi de 15,18, e que correspondem clinicamente à passada plantar consistente com suporte de peso e coordenação entre os membros anterior e posterior consistentes. O grupo de Fouad não obteve diferença significativa entre os grupos tratado e não tratado (FOUAD et al., 2000).

Os resultados aqui apresentados, ainda estão de acordo com dados outros dados presentes na literatura sobre os efeitos benéficos do treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal em humanos como o estudo de Werning e colaboradores (1995). Estes pesquisadores avaliaram 89 pacientes (44 na fase crônica e 45 na fase aguda) com SCI incompleta que foram submetidos ao BWSTT, e os compararam com 64 pacientes controle (não eram submetidos ao BWSTT). Os pacientes tratados com BWSTT adquiriram marcha independente, e pacientes que já deambulavam, melhoraram a velocidade e o desempenho da marcha (WERNING et al., 1995). Em estudos comportamentais com gatos, como o realizado por BARBEAU e ROSSIGNOL (1987), animais submetidos ao treinamento em esteira com suporte de peso, também apresentaram uma recuperação da locomoção e manutenção dos movimentos locomotores. Outras pesquisas utilizando ratos submetidos à SCI também apresentaram resultados semelhantes aos nossos, como o trabalho de ILHA e colaboradores (2011), onde ratos que tiveram suas medulas transecionadas completamente a nível de T8-T9 e foram tratados com BWSTT, apresentaram uma melhora significativa no escore BBB nas oitava e décima semanas após SCI quando comparados aos animais não-tratados (ILHA et al., 2011).

5.4. Efeito do BWSTT na capacidade locomotora avaliada pelo teste de impressão de pegadas de ratos submetidos à lesão medular por compressão

5.4.1. Comprimento da Passada

No teste de impressão de pegadas, a Anova de uma via detectou diferença significativa no comprimento da passada ($F= 4,695$, $p=0,0116$) e o teste Student-Newman-Keuls detectou que os grupos SHAM (não operado) e o LMST apresentaram diferenças significativas em relação ao LM ($p<0,05$). Não foram detectadas diferenças entre os demais grupos (Figura 27).

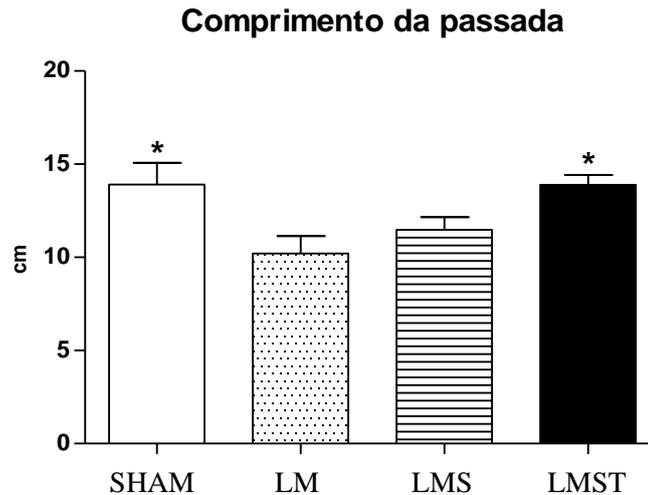


Figura 27: Efeito do BWSTT no comprimento da passada (teste de impressão de pegadas) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Após serem submetidos à lesão medular por compressão, ratos Wistar foram submetidos durante cinco semanas a uma destas condições: Treino de marcha de marcha em esteira com suporte de peso corporal, grupo LMST (n=8); colocados diariamente na esteira desligada utilizando o suporte de peso corporal, grupo LMS (n=6); ou não foram manipulados, grupo LM (n=5). Grupo SHAM (n=6) corresponde aos animais falso-operados. Valores são apresentados como média \pm erro padrão do comprimento da passada após as cinco semanas de tratamento. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. * indica diferença significativa em relação ao grupo LM.

Analisando nossos dados referentes ao comprimento da passada, podemos observar que os animais do grupo LMST obtiveram uma média igual à 13,91 cm, valor próximo à média obtida dos animais do grupo SHAM (falso-operados), que foi de 13,88 cm. Estes valores de ambos os grupos (LMST e SHAM) foram significativamente maiores que a média dos animais do grupo LM que foi de 10,20 cm. Segundo os resultados de KUNKEL-BAGDEN e colaboradores (1993), que descreveram a avaliação do comprimento da passada após SCI utilizando o teste footprint, espera-se que animais lesados, tenham uma diminuição do comprimento da passada. Nossos resultados então sugerem que o treinamento em esteira com suporte de peso corporal recuperou o comprimento da passada, uma vez que ela aumentou (Figura 28) em relação ao grupo LM, ficando igual ao grupo SHAM (falso-operado).

5.4.2. Base de Apoio

No teste de impressão de pegadas, a Anova de uma via detectou diferença significativa na base de apoio ($F = 13,99$, $p < 0,0001$) e o teste Student-Newman-Keuls detectou que os grupos SHAM (não operado) e LMS foram significativamente diferentes dos demais grupos ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças entre os grupos LM e LMST (Figura 28).

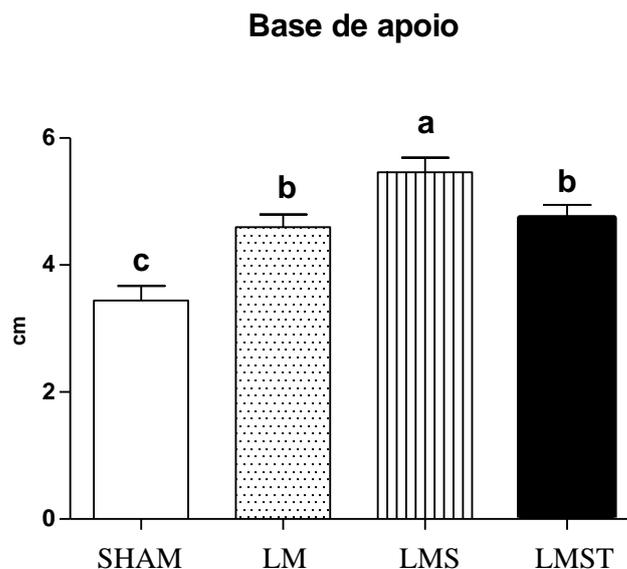


Figura 28: Efeito do BWSTT na base de apoio (teste de impressão de pegadas) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Após serem submetidos à lesão medular por compressão, ratos Wistar foram submetidos durante cinco semanas a uma destas condições: Treino de marcha de marcha em esteira com suporte de peso corporal, grupo LMST (n=8); colocados diariamente na esteira desligada utilizando o suporte de peso corporal, grupo LMS (n=6); ou não foram manipulados, grupo LM (n=5). Grupo SHAM (n=6) corresponde aos animais falso-operados. Valores são apresentados como média ± erro padrão da base de apoio após as cinco semanas de tratamento. As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos no teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$.

Os grupos submetidos à SCI (grupos LMST, LMS e LM) apresentaram uma largura da base de apoio significativamente maior que o grupo SHAM (falso-operado). Este dado está de acordo com os resultados de KUNKEL-BAGDEN e colaboradores (1993) que descreveu a avaliação da base de apoio utilizando o teste footprint e relatou que a base de apoio aumenta após a lesão medular. A hipótese da necessidade de ocorrer um aumento da base de apoio de maneira geral seria a de obter uma melhor distribuição do peso sobre os membros e conseqüentemente um melhor equilíbrio. No entanto a diferença entre os grupos SHAM e o LM foi pequena apesar de significativa. Além disso, o grupo LMST não foi diferente do grupo LM enquanto que o grupo LMS foi maior que os demais. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que os animais do grupo LM fazem passada plantar, mas não há suporte de peso consistente, e, uma vez em que o animal não sustenta seu peso de maneira consistente, não há razão para o aumento da base de apoio. Este fato pode limitar a utilização do teste footprint para comparação de animais com e sem suporte de peso consistente.

5.4.3. Ângulo de Rotação das Patas

No teste de impressão de pegadas, a Anova de uma via detectou diferença significativa no ângulo de rotação das patas ($F = 3,552$, $p < 0,0319$) e o teste Student-Newman-Keuls detectou que o grupo LMST foi significativamente diferente do grupo LMS ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças entre os demais grupos (Figura 29).

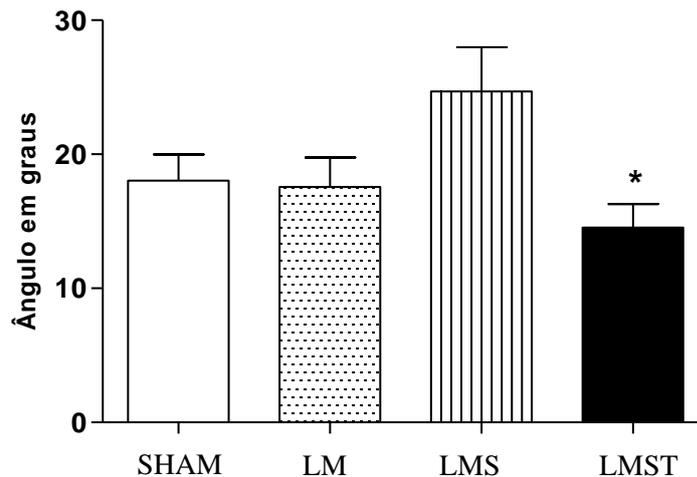


Figura 29: Efeito do BWSTT no ângulo de rotação entre as patas direita e esquerda (teste de impressão de pegadas) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Após serem submetidos à lesão medular por compressão, ratos Wistar foram submetidos durante cinco semanas a uma destas condições: Treino de marcha de marcha em esteira com suporte de peso corporal, grupo LMST (n=8); colocados diariamente na esteira desligada utilizando o suporte de peso corporal, grupo LMS (n=6); ou não foram manipulados, grupo LM (n=5). Grupo SHAM (n=6) corresponde aos animais falso-operados. Valores são apresentados como média ± erro padrão do ângulo de rotação entre as patas posteriores direita e esquerda. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. * indica diferença significativa em relação ao grupo LMS.

Nossos resultados indicam uma limitação do uso do ângulo de rotação das patas para avaliação de melhora funcional. Após SCI, os animais não apresentam um padrão na posição das patas traseiras, que podem se colocar rodadas interna ou externamente, ou ainda paralelas ao corpo, como descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BASSO et al., 1995). Assim, a SCI não produziu a rotação das patas traseiras e nem o BWSTT alterou este parâmetro, indicando que interpretação dos resultados do ângulo de rotação das patas do teste footprint é limitada.

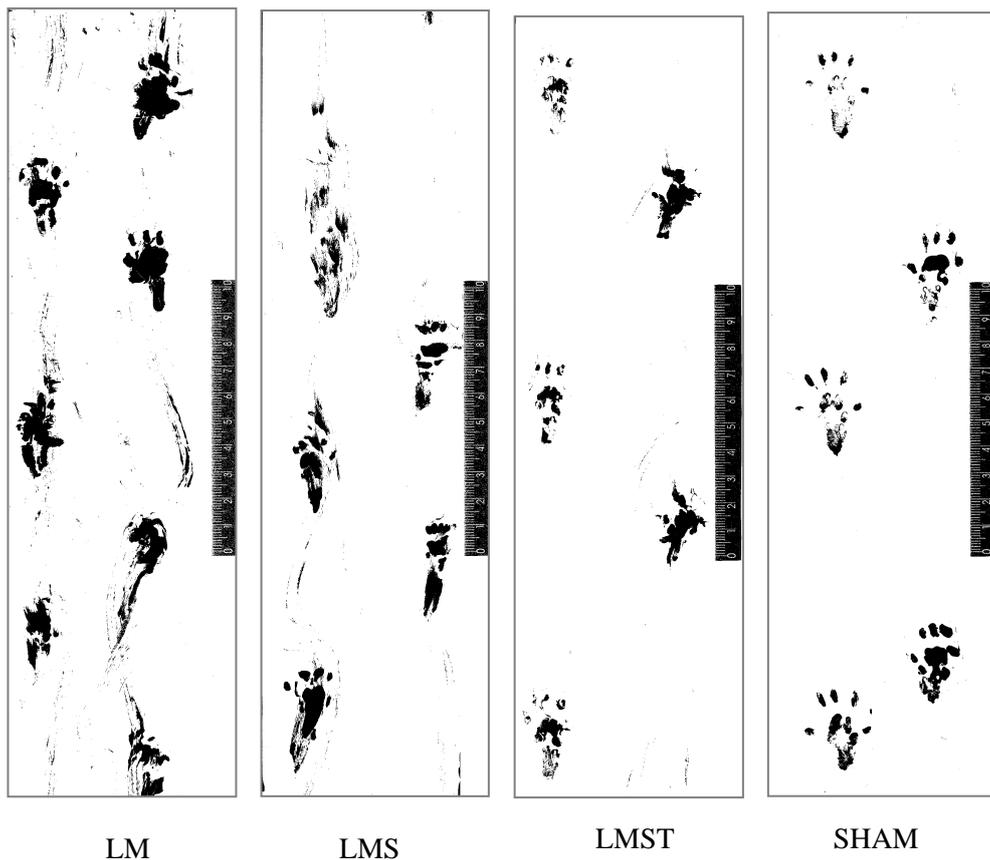


Figura 30: Imagens representativas das impressões das patas. Observamos que os grupos SHAM (não operado) e o LMST (lesionados medulares e colocados diariamente na esteira desligada utilizando o suporte de peso corporal) apresentaram maiores comprimentos da passada em relação ao grupo LM (lesionados medulares e não-manipulados). Já com relação á base de apoio, observamos que os grupos submetidos à SCI (grupos LMST, LMS e LM) apresentaram uma largura da base de apoio significativamente maior que o grupo SHAM (falso-operado), embora esta diferença não seja tão acentuada no grupo LM, uma vez que estes animais pertencentes a este grupo fazem passada plantar, mas não há suporte de peso consistente (avaliado pelo Teste BBB), e, uma vez em que o animal não sustenta seu peso de maneira consistente, não há razão para o aumento da base de apoio. Finalmente, observamos que os animais não apresentam um padrão rotacional na posição das patas traseiras, que podem se colocar rodadas interna ou externamente, ou ainda paralelas ao corpo, indicando que interpretação dos resultados do ângulo de rotação das patas do teste footprint é limitada. Todas as impressões de pegadas observadas nestas imagens foram obtidas ao final da quinta semana após a SCI.

5.5. Efeito do BWSTT na severidade do trauma da medula espinal de ratos submetidos à lesão medular por compressão

Ao analisarmos a destruição e desorganização tecidual do parênquima do sitio de lesão avaliamos quantitativamente a área de tecido afetada e o estrangulamento da medula causado pela lesão. Além disso, analisamos qualitativamente a distribuição da área de tecido afetada pela lesão.

Não observamos diferenças significativas entre os grupos na análise da área de lesão (porcentagem da área de lesão em relação ao tecido sadio em cada corte), apesar dos animais do grupo LMST apresentarem áreas de lesão menores que os demais grupos (Figura 31).

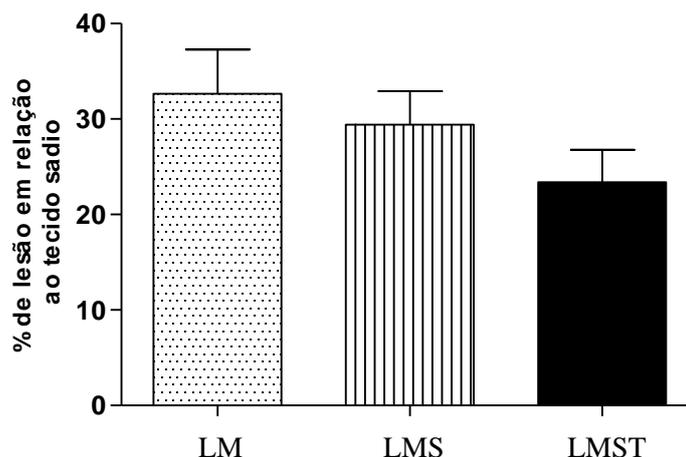


Figura 31: Efeito do BWSTT na porcentagem da área de lesão em relação ao tecido sadio de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Após serem submetidos à lesão medular por compressão, ratos Wistar foram submetidos durante cinco semanas a uma destas condições: Treino de marcha de esteira com suporte de peso corporal, grupo LMST (n=3); colocados diariamente na esteira desligada utilizando o suporte de peso corporal, grupo LMS (n=3); ou não foram manipulados, grupo LM (n=3). Valores são apresentados como média \pm erro padrão porcentagem da área de lesão em relação ao tecido sadio. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$.

Na análise da porcentagem de estrangulamento de tecido, a ANOVA de uma via detectou diferença significativa ($P=0,048$), no entanto o teste Student-Newman-Keuls não detectou diferença na comparação entre os pares de grupos (Figura 32).

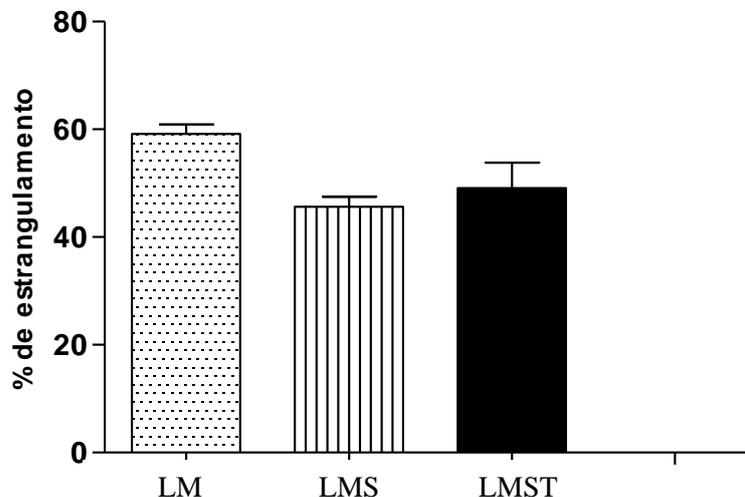


Figura 32: Efeito do BWSTT na porcentagem da área de estrangulamento em relação ao tecido sadio de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Após serem submetidos à lesão medular por compressão, ratos Wistar foram submetidos durante cinco semanas a uma destas condições: Treino de marcha de esteira com suporte de peso corporal, grupo LMST (n=3); colocados diariamente na esteira desligada utilizando o suporte de peso corporal, grupo LMS (n=3); ou não foram manipulados, grupo LM (n=3). Valores são apresentados como média \pm erro padrão porcentagem da área de lesão em relação ao tecido sadio. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$.

Na distribuição da área afetada, o padrão de segmentação desta área pela lesão difere entre os grupos. Nos animais do grupo LMST, a área de lesão está distribuída em uma área contínua, dentro do parênquima medular, que se estende tanto na substância

branca como na substância cinzenta. Apresenta ainda infiltrado celular, possivelmente células inflamatórias, no local da lesão. Os animais do grupo LMS demonstram uma distribuição da área afetada parecida com a do grupo LMST. No entanto, o infiltrado celular aparenta ser menor no grupo LMST. Estas medulas ainda apresentam um tecido contínuo, que difere do parênquima medular íntegro (que pode ser um tecido de deposição fibroso) na área de lesão. Já o grupo LM apresenta um perfil de área de lesão bastante diferenciado com áreas de destruição teciduais isoladas e sequenciais (Figuras 33 e 34).

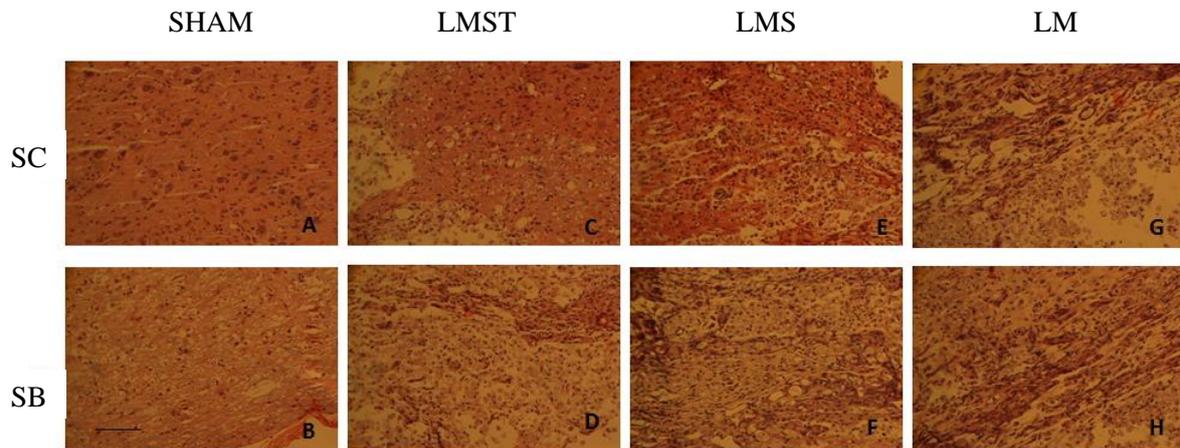


Figura 33: Severidade do trauma medular (substâncias branca e cinzenta). Corte longitudinal da medula representando os campos de substância cinzenta (SC) e de substância branca (SB) nas regiões de lesão. Grupo SHAM (A, B), grupo LMST (C,D), grupo LMS (E,F) e grupo LM (G, H), barra = 50 μ m.

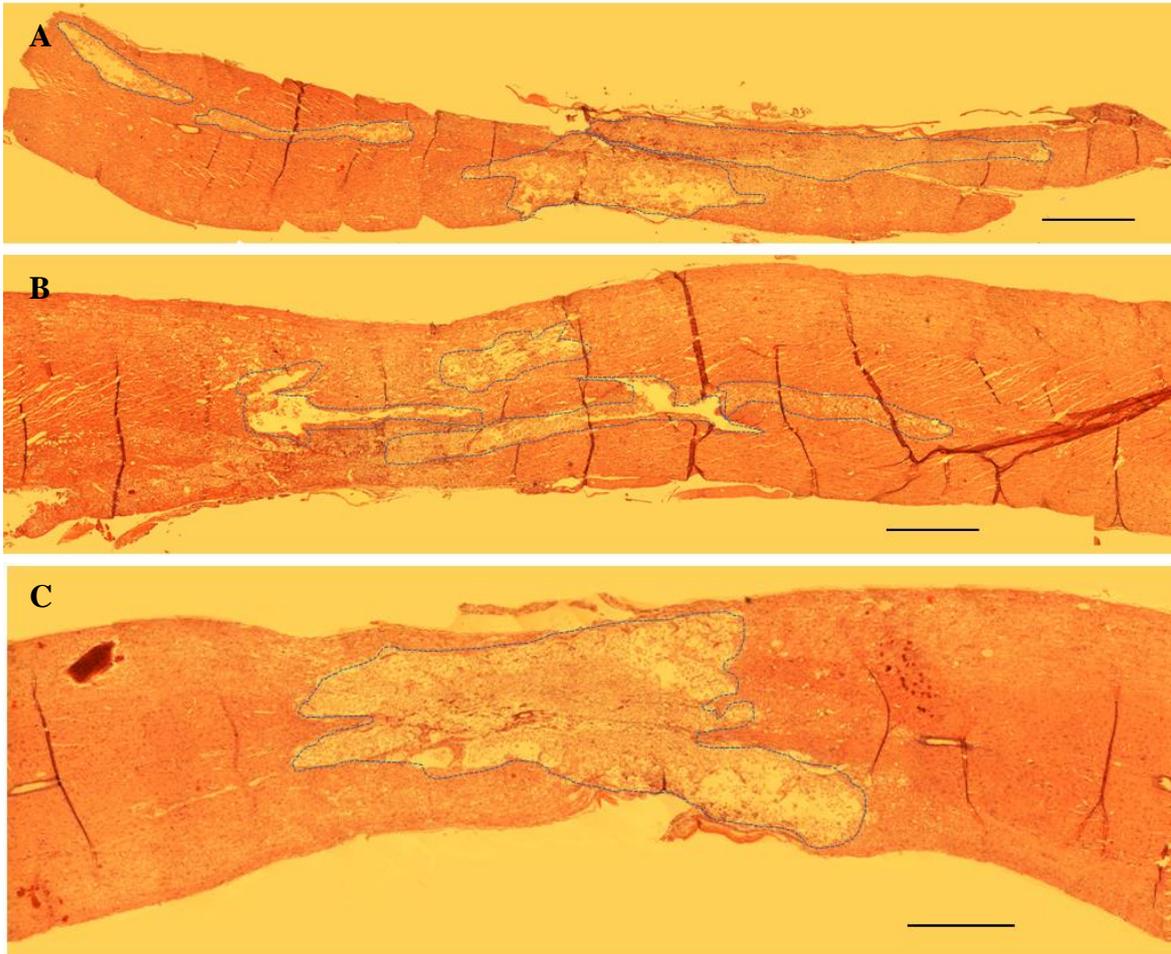


Figura 34: Severidade do trauma medular (área de lesão). Montagem de corte longitudinal de 5 μm de espessura da medula espinal do grupo LM (A), do grupo LMS (B) e do grupo LMST (C). O tracejado representa a área de lesão: cavitação e desorganização tecidual; Barra = 1000 μm ; n=3.

Observamos que percentual de destruição e desorganização tecidual e grau de estrangulamento da área afetada foi pequena. Sendo assim, a melhora funcional dos animais do grupo LMST em relação ao grupo LM pode não estar relacionada a esses parâmetros, podendo ser atribuída a uma reorganização das vias neurais poupadas e de redes neurais (CPGs) existentes abaixo do nível da lesão que irão se adaptar para gerar atividade locomotora, mesmo na ausência da chegada de comandos supra-espinais (HOULE e CÔTÉ, 2013).

6 CONCLUSÕES

O modelo de treino de marcha em esteira com suporte de peso corporal foi implantado com sucesso no Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e este modelo será utilizado em experimentos futuros.

O BWSTT produziu melhora locomotora, avaliada pelo teste de BBB, em ratos submetidos à lesão medular por compressão através da inflação de balão.

O BWSTT produziu uma melhora locomotora, avaliada pelo teste de impressão de pegadas, uma vez que aumentou o comprimento da passada e reduziu a rotação das patas em ratos submetidos à lesão medular por compressão através da inflação de balão.

O BWSTT não produziu significativa redução na severidade do trauma ou no estrangulamento da medula espinal produzido pela lesão em ratos submetidos à lesão medular por compressão através da inflação de balão.

7 REFERÊNCIAS

- Andersen M, Tufik S. Animal Models as tools in ethical biomedical research, 2010. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.
- Barbeau H, Rossignol S. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat, *Brain Res.* 412 (1987) 84–95.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats, 1995. *Journal of Neurotrauma* 12(1).
- Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. (1992) Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: Behavioral and histological analysis. *J. Neurotrauma* 9, 197–217.
- Behrman AL; Harkema SJ. (2000) A Series of Case Studies Locomotor Training After Human Spinal Cord Injury. *PHYS THER*; 80:688-700.
- Botelho, RV, Abgussen, CMB, Machado, GCFP, Elias, AJR, Benedito-Silva, AA, Bittencourt, LRA, Fontoura, EAF (2001). Epidemiologia do trauma raquimedular cervical na zona norte da cidade de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia.* 20: 64-76.
- Boyce, VS, Tumolo, M, Fischer I, Murray M, Lemay MA.(2007) Neurotrophic factors promote and enhance locomotor recovery in untrained spinalized cats. *J Neurophysiol.* 98:1988-1996.
- Cadotte DW, Singh A, Fehlings MG. (2010) The timing of surgical decompression for spinal cord injury. *F1000 Med Rep.* 8, 2-67.
- Cizkova D, Novotna I, Slovinska L, Vanicky I, Jergova S, Rosocha J, Radonak J. (2011) Repetitive intrathecal catheter delivery of bone marrow mesenchymal stromal cells improves functional recovery in a rat model of contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 28, 1951-1961.
- Cheng H, Cao Y. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function, 1996. *Science* 273 (5274): 510-513.
- Coelho JL, Abrahão F, Mattioli R. Aumento do torque muscular após tratamento em esteira com suporte parcial de peso em pacientes com hemiparesia crônica. *Rev Bras Fisioter* 2004;8:137-43.
- Cosenza, RM. Fundamentos de Neuroanatomia. 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012, p. 57.
- Cunha IT da, Lim PA, Qureshy H, Henson H, Monga T, Protas E. Gait outcomes after acute stroke rehabilitation with supported treadmill ambulation training: a randomized controlled pilot study. *Arch Phys Med Rehabi* 2002;83:1258-65.

D'Andrea Greve J. (1997) Traumatismos raquimedulares nos acidentes de trânsito e uso de equipamentos de segurança. *Diag & Tratam*; 2 (3):10-3.

Defino, HL (1999). Trauma Raquimedular. Simpósio Trauma II. Ribeirão Preto, Medicina. 32: 388-400.

Daly JJ, Roengk KL, Butler KM, Gansen JL, Fredrickson E, Marsolais EB, et al. Response of sagittal plane gait kinematics to weight-supported treadmill training and functional neuromuscular stimulation following stroke. *J Rehabil Res Dev* 2004;41:807-20.

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

Dietz V. (2009) Body weight supported gait training: From laboratory to clinical setting. *Brain Research Bulletin* 78 I–VI.

Dumont RJ; Okonkwo, DO; Verma, S; Hurlbert, RJ; Boulos, PT; Ellegala, DB e Dumont, AS. Acute spinal cord injury, part I: Pathophysiologic mechanisms. *Clin. Neuropharmacol.* (2001) 24: 254–264.

Edgerton VR., Duke J., Johnson LA. (1983). Effects of treadmill exercises on hind muscles of the spinal cat, in: *Spinal Cord Reconstruction*. C.C. Kao, R.P. Bunge, and P.J. Reier (eds), Raven Press: New York, p. 435–443.

V.R. Edgerton, R.D. De Leon, N. Tillakaratne, M.R. Recktenwald, J.A. Hodgson, R.R. Roy, Use-dependent plasticity in spinal stepping and standing., in: F.J. SEIL (Ed.), *Neuronal Regeneration, Reorganization and Repair: Advances in Neurology*, vol. 72, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, pp. 233–247.

Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Genovese T, Galuppo M, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. (2011) MK801 attenuates secondary injury in a mouse experimental compression model of spinal cord trauma. *BMC Neuroscience*. 14, 12-31.

Finch L, Barbeau H, Arsenault B. (1999) Influence of body weight support on normal human gait: development of a gait retraining strategy. *Phys Ther*; 71:842-55.

Foret A, Quertainmont R, Botman O, Bouhy D, Amabili P, Brook G, Schoenen J, Frazen R. (2010). Stem cells in the adult rat spinal cord: Plasticity after injury and treadmill training exercise. *Journal of Neurochemistry* 112; 762-772.

Fouad K, Metz GAS, Merkler D, Dietz V, Schwab ME. (2000) Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behavioural Brain Research* 115; 107–113

Gardner E, Gray DJ, Ronan O'R. *Anatomia: Estudo Regional do Corpo Humano*. 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p. 33-34.

Gazzani F, Fadda A, Torre M. (2000) Ward: a pneumatic system for body relief in gait rehabilitation. *IEEE Trans Rehabil Eng*; 8:506-13.

Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Muià C, Di Paola R, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. (2008) Evidence for the role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the development of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 325, 100-114.

Grant, G. *Rat Nervous System*. Elsevier, 2004.

Gray H. *Gray Anatomia*, 1988. 29 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Hagg T, Oudega M. (2006) Degenerative and Spontaneous Regenerative Processes after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 23, 264-280.

Hesse S, Helm M, Krajnik J, Gregoric M, and Mauritz KH. (1997) Treadmill training with partial body weight support: influence of body weight release on the gait of hemiparetic patients. *J Neurol Rehab* 11: 15–20

Hillen BK, Abbas JJ, Jung R (2013). Accelerating locomotor recovery after incomplete spinal injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1279 , 164–174.

Houle JD, Côté MP. (2013). Axon regeneration and exercise dependent plasticity after spinal cord injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1279, 154–163.

Houweling, D.A., Asseldonk, J.T.H., Lankhorst, A.J., et al. (1998). Local application of collagen containing brain-derived neurotrophic factor decreases the loss of function after spinal cord injury in the adult rat. *Neurosci. Lett.* 251, 193–196.

Ilha J , Centenaro LA , Cunha NB, Souza DF, Jaeger M, Nascimento OS, Kolling J, Ben J, Marcuzzo M, Wyse ATS, Gottfried C, Achaval M. The Beneficial Effects of Treadmill Step Training on Activity- Dependent Synaptic and Cellular Plasticity Markers After Complete Spinal Cord Injury. *Neurochem Res* (2011) 36:1046–1055

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell Tm. *Principios da Neurociência*. 4 ed., São Paulo, Manole, 2003.

Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. (1993). Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, 153-164.

Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. (2004) Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.* 4, 451-464.

Lana A; Paulino CA; Gonçalves ID. (2008) Efeitos dos Exercícios Físicos Sobre o Edema Inflamatório Agudo em Ratos Wistar. *Rev Bras Med Esporte - Vol.* 14, No 1

Lankhorst AJ, Laak MP, Laar TJV, Van Meeteren NLU, Groot JCMJ, Schrama LH, Hamers FPT, Gispen WH (2001). Effects of Enriched Housing on Functional Recovery After Spinal Cord Contusive Injury in the Adult Rat. *J*

Lianza S, Casalis MEP, Greve JMD, Eichberg R. (2001) Lesão medular. In: Lianza S. Medicina de Reabilitação. 3ª. ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 299-321.

Lent R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais da neurociência. 1ed., São Paulo. Editora Atheneu, 2004.

Machado AM. Efeito da administração direta do Fator de Crescimento de Hepatócito em Lesão Raquimedular Compressiva e em Cultura de Neurônios Corticais. 92 p. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

Masini M. Tratamento da fraturas e luxações da coluna toracolombar por descompressão postero-lateral e fixação posterior com retângulo e fios segmentares sublaminares associados a enxerto ósseo. Tese. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2000.

Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. (1982) An Index of the Functional Condition of Rat Sciatic Nerve Based on Measurements Made from Walking Tracks. *Experimental Neurology* 77,634-643

Ministério da saúde. Brasil MEC/MS; Atividade Física e saúde: orientações básicas sobre atividade física e saúde para usuários; Brasília; MS, 1 ed.; 1995.

Molander C, Grant G. Spinal cord cytoarchitecture In: The rat Nervous System, 2004. 3ed. Paxinos, G (Ed), Elsevier Academic Press, San Diego.

Molina, AELS. (2006) Análise da sensibilidade e reprodutividade da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar. Dissertação de mestrado. USP. São Paulo.

Moore, KL, Dalley AF, Agur AMR. Anatomia Orientada para a Clínica. 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p. 492-500.

Multon S, Franzen R, Poirrier A, Scholtes F, Schoenen J. (2003) The effect of treadmill training on motor recovery after a partial spinal cord compression-injury in the adult rat. *Journal of Neurotrauma* vol 20, num 8.

Netter FH. Atlas de Anatomia Humana. 5 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, pranchas 157, 158, 162.

Neves MAO, Mello MP, Antonioli RS, Freitas MRG (2007). Escalas clínicas e funcionais no gerenciamento de indivíduos com Lesões Traumáticas da Medula Espinhal. *Rev Neurocienc*; 15/3:234-239

Rabchevsky, A.G., fugaccia, I., fletcherturner, A., et al. (1999). Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances tissue sparing and functional recovery following moderate spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 16, 817-830.

Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in cat, 1954. *J Comp Neurol* 100: 297-379.

Sekhon, LH e Fehlings, MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* (2001) 26 (24 S): S2–12.

Shimamura M, Sato N, Sata M, Wakayama K, Ogihara T, Morishita R. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met after spinal cord injury in rats. (2007) *Brain Research* 151: 188 - 194.

Schmitz, TJ (2004). Lesão Traumática da Medula Espinhal. In: S, O'Sullivan S, Schmitz TJ. *Fisioterapia Avaliação e Tratamento*. (pp. 621-663). Manole, São Paulo. 775p.

Schoenen J. Dendritic organization of the human spinal cord: The motoneurons, 1982. *J Comp Neurol* 211: 226-247.

Standring, S. *Gray's Anatomia*. 40 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2010, p. 257 – 273.

Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, Ramer MS, Tetzlaff W. (2004) Minocycline Treatment Reduces Delayed Oligodendrocyte Death, Attenuates Axonal Dieback, and Improves Functional Outcome after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, March 3, 24 (9):2182–2190

Stripling TE. The cost economic consequences of traumatic spinal cord injury. *Paraplegia News*. 1990;8:50-4.

Sullivan KJ, Knowlton BJ, Dobkin BH. (2002) Step Training With Body Weight Support: Effect of Treadmill Speed and Practice Paradigms on Poststroke Locomotor Recovery. *Arch Phys Med Rehabil Vol* 83.

Sun W, Funakoshi H, Nakamura T. Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-met in the rat developing cerebral cortex, 2002a. *Brain Res Mol Brain Res* 103; 36–48

Threlkeld AJ, Cooper LD, Monger BP, Craven AN, Haupt HG. Temporospatial and kinematic gait alterations during treadmill walking with body weight suspension. *Gait and Posture* 2003;17:235-45.

Thomson A.; Skinner A.; Piercy J., *Fisioterapia de Tidy*. São Paulo, Editora Santos, 12 ed, 2002.

Umphred, DA. *Fisioterapia neurological*. 2 ed. São Paulo, Manole, 1994, 876p.

Van de Crommert H; Mulder T, Duysens, J. (1998). Neural control of locomotion: sensory control of the central pattern generator and its relation to treadmill training. *Gait Posture* 7, 251–263.

Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Cízková D, Gálik J. (2001) A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma*. 18, 1399-140

Visintin M, Barbeau H. The effects of body weight support on the locomotor pattern of spastic paretic patients. (1989) *Can J Neurol Sci*; 16: 315-25.

Visintin M, Barbeau H, Korner-Bitenski N, Mayo N. (1998) A new approach to retrain gait in stroke patients through body weight support and treadmill stimulation. *Am Heart J*; 29:1122-8.

Vieira RT, Oliveira RMG, Barros CAN, Caixeta L. (2011) Treino Locomotor com Suporte de Peso Corporal na Lesão Medular Incompleta. *Rev Neurocienc*, 1 -9.

Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G. *The Spinal Cord - A Christopher and Dana Reeve Foundation. Text and Atlas. Elsevier, 2010a.*

Watson C, Kirkcaldie M, Paxinos G. *The brain - an introduction to functional neuroanatomy. Elsevier, 2010b.*

Wernig, A., Müller, S., Nanassy, A., et al. (1995). Laufband therapy based on rules of spinal locomotion is effective in spinal cord injured persons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 823–829.

Wilson MS, Qureshy H, Protas E, Holmes A, Krouskop TA, Sherwood AM. (2001) Equipment specifications for supported treadmill ambulation training: A technical note. *J Rehabil Res Dev*; 37:415-22.

<http://www.asia-spinalinjury.org>, consultado em 19 de julho de 2013.

<http://biosphera.com.br>, consultado em 10 de agosto de 2013.

<http://bvsmms.saude.gov.br>, consultado em 17 de abril de 2013.

<https://www.nscisc.uab.edu/>, consultado em 14 de abril de 2013.

<http://www.pialaw.ca/areas-of-practice/spinal-cord-injuries>, consultado em 23 de junho de 2013.

<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>.

<http://www.sarah.br>, consultado em 14 de abril de 2013.

<http://www.who.int/en/>, consultado em 17 de abril de 2013.