



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS DO TREINO LOCOMOTOR EM ESTEIRA INICIADO EM DIFERENTES
PERÍODOS APÓS LESÃO MEDULAR EM RATOS

Tese de Doutorado

Marília Rossato Marques

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS DO TREINO LOCOMOTOR EM ESTEIRA INICIADO EM DIFERENTES
PERÍODOS APÓS LESÃO MEDULAR EM RATOS

Marília Rossato Marques

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Carlos Alexandre Netto, pelo acolhimento, orientação e conhecimento que permitiram a concretização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências pela oportunidade de realizar este doutorado e aos professores pelo conhecimento.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq pela oportunidade de estudo e bolsa concedida durante o período.

Aos colegas de laboratório, em especial Fabrício Nicola, Eduardo Sanches, Luz Elena Duran, Dirceu Aristimunha, Danusa Arcego e Felipe Odorcyk pelo companheirismo, auxílio e incansáveis risadas que tornaram este período mais leve e repleto de histórias.

Às amigas Bianca Piccolli, Viviane Forgiarini e Aline Dill Winck que acompanharam e muito incentivaram a concretização deste estudo.

Aos amigos Luz Elena Duran e Oscar Ortegon que se tornaram meus irmãos de coração, obrigada pela amizade e por me presentarem com uma sobrinha linda, a pequena Emma.

Aos pacientes e demais pessoas que de alguma forma participaram e motivaram este estudo e esta trajetória, obrigada.

Aos meus pais, pessoas que eu mais amo e admiro, agradeço pelo incentivo, dedicação, compreensão e amor.

“Quando você partir em direção à Ítaca,
Que a sua jornada seja longa,
Repleta de aventuras, plena de conhecimento.
(...) Não perca Ítaca de vista,
Pois chegar lá é o seu destino.”

Konstantinos Kavafis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Medula Espinal.....	3
1.2 Lesão na medula espinal.....	5
1.2.1 Resposta imunológica e morte celular.....	9
1.2.2 Comprometimentos musculoesqueléticos decorrentes da lesão medular.....	12
1.2.3 Modelos experimentais de lesão medular em ratos	13
1.2.4 Tratamento da LME.....	15
1.3 Treinamento locomotor em esteira	17
1.4 Justificativa.....	19
1.5 Hipótese de trabalho	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Experimentos.....	22
3.2. Modelo de lesão medular traumática	24
3.3. Programa de Treinamento Locomotor	25
3.4. Avaliações comportamentais.....	26
3.5. Perfusão Transcardíaca	27
3.6. Análises histológicas e morfométricas	28
3.7. Análise de Western Blot.....	28
3.8. Análise por Citometria de Fluxo	29
3.9. Análise Estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Capítulo I – Artigo: <i>Locomotor training promotes time-dependent functional recovery after experimental spinal cord contusion:</i>	31
4.2 Capítulo II – Artigo: <i>Early locomotor training promotes functional impairment and exacerbates neuronal death after spinal cord contusion in rats</i>	44

5. DISCUSSÃO GERAL	64
5.1. Recuperação funcional	64
5.2. Neuroproteção	68
5.3. Resposta imunológica.....	69
5.4. Musculatura esquelética.....	71
6. CONCLUSÃO	74
7. PERSPECTIVAS	75
8. REFERÊNCIAS	76
9. Anexo	94

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
BBB	Escala de Basso, Beattie e Bresnahan
GPC	Gerador de Padrão Central
LME	Lesão da Medula Espinal
ME	Medula Espinal
nNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TLE	Treino Locomotor em Esteira

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da medula espinal. Imagem representativa da medula espinal, sua segmentação e a distribuição dos pares de nervos espinais. Fonte: adaptação de Cho (2015). .5

Figura 2. Esquema ilustrativo das lesões primária e secundária após um impacto sobre a medula espinal. A LME provoca um dano primário, no qual ocorrem lesões axonais que resultam na interrupção parcial ou total da condução dos potenciais de ação. Este dano inicial desencadeia a lesão secundária, caracterizada por morte celular acima e abaixo do local de lesão inicial. Os complexos processos que ocorrem na lesão secundária podem ser divididos em fase aguda, subaguda e crônica, que conduzem à formação de cavidade cística e cicatriz glial. Fonte: adaptação de Quadri et al (2018).....6

Figura 3. Esquema ilustrativo das fases da lesão secundária na medula espinal após um trauma. O dano inicial desencadeia uma série de respostas fisiopatológicas do organismo. Conforme o período pós-lesão e as características fisiopatológicas, a lesão secundária pode ser subdividida em fase aguda, subaguda e crônica, ocorrendo em alguns momentos uma sobreposição de fases. Em seres humanos a fase aguda é considerada o período até aproximadamente 48 horas pós-lesão, a fase subaguda inicia com dias ou semanas de lesão e a fase crônica inicia após semanas ou meses. Em modelos experimentais de lesão medular por contusão em ratos, a fase aguda é considerada as primeiras horas pós-lesão, a fase subaguda ocorre entre horas e semanas pós-trauma e a fase crônica inicia semanas depois da lesão. Fonte: do autor.....9

Figura 4. Esquema ilustrativo da resposta imunológica à LME. A representação das respostas nas imagens progride conforme o tempo depois da lesão em modelo experimental em ratos. **A.** Em uma situação não patológica, leucócitos são observados nos vasos sanguíneos e a ME apresenta em seu parênquima axônios mielinizados e microglia. Nas imagens foram omitidas algumas células presentes nos tecidos a fim de facilitar a esquematização. **B.** Com poucos minutos de lesão já são recrutados neutrófilos para o local. (I) Horas depois, observa-se um aumento no número de neutrófilos circulantes e na região da lesão, assim como microglia. (II) Neutrófilos se deslocam pelo endotélio e (III) extravasam para o epicentro da lesão. **C.** Com 24h de lesão, (I) aumenta a quantidade de monócitos circulantes que se deslocam e extravasam para a ME. **D.** 48h pós-lesão, monócitos pró-inflamatórios, microglia fagocítica e macrófagos M1 e M2 estão em grande quantidade no local de lesão na ME. **E.** (I) 7 dias após a lesão ainda existe grande quantidade de macrófagos M1 e M2, linfócitos e microglia fagocítica no epicentro da lesão. (II) Monócitos circulantes, monócitos residentes e linfócitos são recrutados para o epicentro da lesão. (IV) Microglia fagocítica continua atuando na limpeza de fragmentos de axônios e mielina em áreas de degeneração Walleriana e (V) morte axonal. Fonte: adaptação de Plemel et al (2014)..... 11

Figura 5. Esquema representativo dos eventos relacionados à apoptose celular após a LME evidenciados a partir de modelos experimentais com animais. A morte celular programada (apoptose) pode ocorrer por alguns fatores como a presença de citocinas pró-inflamatórias ou o dano mitocondrial. Estes fatores levam à ativação da caspase-3 que desencadeia uma série de eventos patológicos (entre eles a fragmentação do DNA e a degradação do citoesqueleto e núcleo). Conseqüentemente, corpos apoptóticos são formados e são expressos ligantes para as células fagocíticas a fim de atrair estas células de defesa que atuem na remoção dos corpos apoptóticos por meio da fagocitose. Fonte: Nicola (2017). 12

Figura 6. Esquema ilustrativo do GPC situado na medula espinal. Depois de uma lesão medular, a informação proveniente do encéfalo para a medula fica parcial ou totalmente interrompida (linhas descontínuas). Na medula espinal, existem centros de neurônios responsáveis por movimentos de flexão (F) e outros responsáveis pela extensão (E). A presença de interneurônios inibitórios (IN) permite que enquanto um centro estiver ativado, o outro estará inibido. A ação conjunta dos centros de flexão, de extensão e neurônios inibitórios constitui o gerador de padrão central (GPC), que permite que o movimento ocorra (linhas contínuas azuis) sem necessidade uma informação proveniente do encéfalo. Ainda existem informações aferentes que são enviadas para a medula espinal a fim de retroalimentar o gerador rítmico (linhas contínuas vermelha e verde). Fonte: adaptação de Rossignol (2006). 19

Figura 7. Esquema representativo dos procedimentos do experimento I. **A.** Separação dos animais nos grupos experimentais: grupo Controle (constituído de animais do grupo Naive e grupo Sham), grupo lesão (subdividido em três grupos comparativos ao grupo esteira) e grupo Lesão-Treino Locomotor (subdividido em três grupos conforme o tempo pós-lesão no qual foi iniciado o treino: 7, 14 ou 28 dias). **B.** Os animais que realizaram o Treino Locomotor em Esteira iniciaram com 7, 14 ou 28 dias depois da lesão da medula espinal. Ao final do protocolo de 10 semanas de treino, os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca ou decapitação e amostras da medula espinal e músculos tibial anterior e sóleo foram dissecados. Técnicas histológicas foram utilizadas para a quantificação do volume de lesão e o número de motoneurônios na medula espinal e mensuração da área média das fibras musculares. A técnica de Western Blot foi realizada para avaliação da expressão de BDNF na medula espinal e músculo tibial anterior. 23

Figura 8. Esquema representativo dos procedimentos do experimento II. **A.** Separação dos animais nos grupos experimentais: grupo Controle (constituído de animais do grupo Naive e grupo Sham), grupo de animais submetidos à lesão por contusão (SCI-7) e grupo de animais com lesão e expostos ao treino locomotor 7 dias após a contusão (SCI-T7). **B.** Parte dos animais que iniciaram o treino locomotor 7 dias pós-lesão foram submetidos à eutanásia por decapitação 6h depois do primeiro dia de treino; os demais animais continuaram o protocolo de treinamento de 10 semanas e, ao final, foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca. Em seqüência à eutanásia por decapitação, foram dissecadas as medulas espinais e foi realizada a

técnica de Citometria de Fluxo para quantificação do número de neurônios, neurônios em apoptose e células de defesa no local de lesão. As técnicas histológicas foram realizadas à partir da retirada da medula espinal pós-perfusão transcárdica e foi quantificado o volume de lesão.24

Figura 9. Fotos ilustrativas do equipamento *New York University Impactor*. A. Visão frontal do equipamento. **B.** Visão lateral com destaque às diferentes alturas para o posicionamento da haste. Fonte: Nicola (2017).25

Figura 10. Foto ilustrativa da esteira ergométrica adaptada para ratos INSIGHT®. Visão superior do equipamento subdividido em 6 ambientes, permitindo a realização do treinamento de no máximo 6 animais simultaneamente. Fonte: Nicola (2017).26

CAPÍTULO I:

Fig 1. Experimental design..... 34

Fig 2. BBB and Horizontal Ladder walking behavioral assessment. A. BBB locomotion scale scores. B. Assessment of the ability of the hindlimbs to cross the horizontal ladder by the ratio of errors to the number of steps. * Difference compared to the control group. # Difference compared to the SCI group. § Difference from SCI group. Data expressed as mean ± SE. 34

Fig 3. Spinal cord histological evaluation. A. Representative photomicrographs of control, SCI (injured animals) and SCI-T (injured trained animals) groups corresponding to the different starting times of treadmill training: 7, 14 or 28 days after injury. B. Quantification of injury volume in all injured groups. # Difference between SCI-T7 and the other SCI groups. £ Difference of SCI-T14 and SCI-T28 when compared with the SCI-T7 group. 35

Fig 4. Motoneuron analysis in the ventral horn of the spinal cord at 20µm cephalic and 20µm caudal to injury (captured at 5x and amplified 200%). A. Representative photomicrographs of motoneurons in ventral horn of spinal cord at 20µm cephalic to injury in all experimental groups. B. Quantification of the number of motoneurons in the cephalic-region of injury. C. Quantification of the number of motoneurons in the caudal-region of injury. * Difference from control group. £ Difference from SCI-T7 group. 36

Fig 5. Western Blot analysis of brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the spinal cord and representative images of BDNF and β-Actin.. No differences were found between groups. 37

Fig 6. Tibialis anterior muscle analysis. A. Representative photomicrographs of tibialis anterior muscle in all experimental groups. B. Quantification of the mean CSA of the tibialis anterior fibers. C. Frequency histograms of tibialis anterior fiber CSA. * Different from control group. § Difference of SCI-T14 in comparison with the SCI-T7 and control groups. € Difference of SCI-T28 when compared with control, SCI and SCI-T7. £ SCI-T28 significantly different from other injured animals. 38

Fig 7. Soleus muscle histological analysis. A. Representative photomicrographs of soleus muscle in all experimental groups. B. Quantification of the mean soleus fibers CSA. C. Frequency histograms of soleus fiber CSA. * Difference vs. control group. £ Difference between SCI-T28 and SCI-T7 groups. 39

Fig 8. Western Blotting analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the tibialis anterior muscle and representative images of BDNF and GAPDH. * Difference compared to the control. £ Difference between SCI-T28 and the other injured groups. 40

CAPÍTULO II:

Figure 1. Experimental design. 61

Figure 2. BBB locomotion scale scores. * Difference compared to the control group. # Difference compared to the SCI group. Data expressed as mean ± SE. 61

Figure 3. Spinal cord cell quantification by flow cytometry. A. Quantification of the number of neurons in the spinal cord injury region. B. Quantification of the number of neurons in apoptosis in the spinal cord injury region. C. Quantification of the number of microglia/macrophages in the spinal cord injury region.* Difference from control group. # Difference from SCI group. Data expressed as mean ± SE. 62

Figure 4. Significant positive correlation between NeuN and CD11b quantification ($p < 0.01$). 62

Figure 5. Spinal cord histological evaluation. A. Representative photomicrographs of control, SCI (injured animals) and SCI-T7 (injured trained animals) groups. B. Quantification of injury volume in all injured groups. # Difference between SCI. Data expressed as mean ± SE. 63

RESUMO

A lesão da medula espinhal (LME) é uma patologia que resulta em uma deficiência motora e/ou sensorial, temporária ou permanente. Os primeiros comprometimentos decorrentes da lesão, denominados como lesão primária, geram danos no parênquima da medula espinhal (ME) e desencadeiam uma complexa sequência de modificações metabólicas que aumenta a morte celular nesta região. Uma possível intervenção para a reabilitação da marcha é o treino locomotor em esteira (TLE) a partir de estímulos motores que desencadeiam a plasticidade dependente de atividade e favorecem a recuperação funcional após a LME. Entretanto, os resultados observados sobre os efeitos do TLE após a LME, são controversos, assim como os mecanismos biológicos envolvidos não são totalmente conhecidos. Com isto, esta tese teve como objetivo avaliar os efeitos do TLE iniciado em um período precoce, intermediário e tardio após a lesão medular por contusão em ratos. O protocolo de treino locomotor teve início 7, 14 ou 28 dias após a lesão medular (20 minutos cada sessão, uma sessão por dia, 5 dias por semana, durante 10 semanas). Observou-se que os animais que iniciaram o TLE 7 dias após a lesão apresentaram uma piora na recuperação funcional, sendo quantificado um menor número de neurônios na ME e uma maior morte neuronal por apoptose 6 horas depois de iniciado o primeiro dia de treino. Além disso, os animais que realizaram o treino precoce tiveram um maior volume de lesão ao finalizar o protocolo de treino. Em contrapartida, os animais que iniciaram o TLE com 14 ou 28 dias apresentaram uma melhor recuperação funcional, que pode ter sido decorrente de uma preservação de motoneurônios na ME, uma menor atrofia muscular e maior expressão de BDNF no músculo tibial anterior. Estes resultados obtidos permitem concluir que o TLE promove uma recuperação funcional dependente do período no qual o estímulo foi iniciado após a lesão medular. Estas evidências reportam a importância de existir uma maior compreensão sobre os mecanismos envolvidos no treino locomotor, visando proporcionar aos indivíduos com lesão medular a melhor recuperação funcional possível.

Palavras-chave: traumatismo da medula espinhal; treinamento locomotor; exercício físico; treino precoce; recuperação funcional; reabilitação.

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) is a disorder that results in motor and/or sensorial deficits, temporarily or permanently. The primary impairments of the lesion, called as primary injury, cause damage to the spinal cord parenchyma and lead to a complex sequence of metabolic changes increasing cell death. A possible intervention to locomotor function recovery is the locomotor training (LT) on a treadmill using motor stimuli to trigger activity-dependent plasticity. However, the literature reports controversial results over the LT effects as well as the biological mechanisms involved are not totally known. Thus, this thesis aimed to evaluate the LT effects when initiated in an early, intermediate and late period after SCI in rats. The LT protocol started 7, 14 or 28 days after the SCI (20 minutes each session, one session a day, 5 days a week for 10 weeks). Animals that started LT 7 days after the injury showed a worsening in the functional performance, a significant neuronal reduction in the spinal cord and an increase of neuronal cells in apoptosis 6 hours after the first day of LT. Also, animals with early LT had higher lesion volume after the training protocol. Late training groups (14 and 28 days) showed an improvement in the functional recovery probably related to preserved motoneurons in the spinal cord, larger muscle fibers area and higher BDNF expression in tibialis anterior muscle. In conclusion, treadmill training promoted time-dependent functional recovery after experimental spinal cord contusion. These results demonstrate the importance of better understanding of the mechanisms related to LT in order to provide functional recovery to the individuals with SCI.

Keywords: Spinal cord contusion, locomotor training, physical exercise, early training, rehabilitation.

1. INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinhal (LME) é definida como a ocorrência de um dano a elementos neurais do canal medular, resultando em uma deficiência motora e/ou sensorial, temporária ou permanente (Jackson et al, 2004). As lesões medulares acometem anualmente milhares de indivíduos de todas as faixas etárias e apresentam elevadas taxas de mortalidade e morbidade crônica (Sumida, 2001). No Brasil, estima-se que a cada ano ocorram entre 10 e 29 novos casos de LME a cada milhão de habitantes (Lee et al, 2014) e, no mundo, mais de 130 mil novos casos por ano (Sobani, Quadri, Enam, 2010).

A LME pode ter etiologia traumática e não traumática (Jia et al, 2013). Cerca de 80% dos casos envolvem causas traumáticas, como acidentes automobilísticos, quedas, lesões relacionadas a prática de esportes ou violência (Falavigna et al, 2018; Ho et al, 2007; Shin et al, 2013). As lesões não traumáticas podem ser decorrentes do desenvolvimento de patologias como tumores, infecções ou processos degenerativos que comprometam a medula espinhal (ME) (Ahuja et al, 2017).

Modelos experimentais com animais permitiram demonstrar que os primeiros comprometimentos decorrentes da LME, denominados como lesão primária, geram danos no parênquima da ME e desencadeiam a lesão secundária. Esta segunda etapa da lesão é caracterizada por uma complexa sequência de modificações metabólicas, aumentando a morte neuronal e de células gliais, assim como leva a isquemia e desencadeia o processo inflamatório (Casella et al, 2006; Nicola et al, 2017). De forma associada, formam-se cavidades císticas e cicatriz glial, que contribuem para dificultar o crescimento axonal e a remielinização no local da lesão. Todos estes fatores reduzem as possibilidades de recuperação da ME, assim como aumentam os déficits neurológicos (Obermair et al, 2008; Oyinbo, 2011).

Diante da complexa fisiopatologia envolvida na LME e do grande impacto na funcionalidade e qualidade de vida dos indivíduos acometidos, diversas propostas terapêuticas estão sendo estudadas com o objetivo de atuar de forma neuroprotetora ou neuroregenerativa. Enquanto as terapias neuroprotetoras buscam reduzir a lesão secundária, as neuroregenerativas têm como objetivo superar a perda da estrutura da ME, a sinalização molecular inibitória e a presença de cavidade cística e cicatriz glial, recuperando o déficit instalado (Rouanet et al,

2017). Cabe ressaltar que grande parte destas propostas terapêuticas ainda está apenas sob estudo em modelos experimentais com animais, não tendo sido avaliadas ainda em estudos clínicos com humanos.

Entre as terapias neuroprotetoras estão os bloqueadores de canais, os fármacos anti-inflamatórios e o transplante de células-tronco. Como propostas terapêuticas neuroregenerativas existe a terapia com o uso do anticorpo monoclonal contra Nogo-A (Anti-Nogo-A), o transplante de células tronco, o uso de biomateriais, a estimulação elétrica da ME e as terapias baseadas em atividade (Behrman et al, 2017; Rouanet et al, 2017). No entanto, infelizmente até o presente momento nenhuma proposta terapêutica conseguiu impedir totalmente o estabelecimento de déficits decorrentes da lesão. Da mesma forma, os tratamentos disponíveis até o momento não são capazes de restaurar completamente a função após a LME.

Uma possível intervenção não farmacológica para a reabilitação da marcha, que geralmente encontra-se comprometida devido à lesão, é o treino locomotor em esteira (TLE). Os estímulos motores desencadeiam a plasticidade dependente de atividade na ME e, por isso, esse estímulo tem sido proposto a fim de favorecer a recuperação funcional após a LME, melhorando a habilidade de deambulação (Chen et al, 2006; Hicks et al, 2005). Entretanto, os resultados observados, principalmente em estudos experimentais envolvendo o TLE, são controversos, assim como os mecanismos biológicos envolvidos não são totalmente conhecidos (Battistuzzo et al, 2012).

A fim de buscar uma maior compreensão sobre os efeitos do TLE após a LME em um modelo experimental em ratos, este trabalho foi realizado e seus resultados foram divididos em dois capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo comparar os efeitos do TLE em um modelo de LME em ratos quando iniciado em diferentes períodos após a lesão (7, 14 ou 28 dias) em relação ao volume de lesão, número de motoneurônios no corno ventral da ME, expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) na ME, assim como os efeitos sob a atrofia muscular nos membros posteriores e a expressão de BDNF também nesta musculatura. O segundo capítulo teve como objetivo reafirmar os achados prévios expostos no primeiro capítulo quanto aos efeitos do TLE precocemente aplicado após a LME em um modelo experimental em ratos e verificar os efeitos do estímulo sobre a funcionalidade e o volume de lesão, assim como a proporção de neurônios em processo de apoptose e a presença de células do sistema imunológico (microglia e macrófagos) na ME.

1.1 Medula Espinal

A ME constitui juntamente com o encéfalo o sistema nervoso central (SNC). O suprimento sanguíneo para a ME se dá principalmente pela artéria espinal anterior. As artérias espinais posteriores também provêm aporte sanguíneo para a ME, porém contribuem em menor proporção, perfundindo zonas periféricas da medula (Ahuja et al, 2017). A proteção da ME ocorre por meio da barreira óssea formada pela coluna vertebral, assim como pela presença dos ligamentos e das meninges dura-máter, aracnoide e pia-máter. A coluna vertebral em seres humanos está dividida em 29 vértebras, sendo sete vértebras cervicais, doze torácicas, cinco lombares e cinco sacrais. A ME acompanha a dimensão longitudinal da coluna vertebral apenas até a décima segunda semana de vida intrauterina e, após este período, torna-se perceptível uma discrepância devido ao rápido crescimento longitudinal da coluna vertebral em relação ao crescimento da ME. Conseqüentemente, em indivíduos adultos observa-se o término do cone medular aproximadamente na região entre a primeira e segunda vértebra lombar (Diaz, Morales, 2016) (Figura 1).

A organização da ME em substância cinzenta e branca é caracterizada pela presença dos corpos das células neuronais na substância cinzenta, enquanto os axônios localizam-se na substância branca. Os axônios, que percorrem a substância branca da ME e que se projetam para áreas específicas do encéfalo ou da periferia, estão organizados em tratos nervosos descendentes, ascendentes ou propioespinais. Os tratos nervosos descendentes transmitem as informações motoras e partem da ME para o sistema nervoso periférico (SNP) por meio da raiz motora; a principal via neural descendente é o trato corticoespinal. Os tratos nervosos ascendentes transmitem as informações sensoriais de origem periférica por meio da raiz sensorial. Os tratos propioespinais são constituídos por axônios provenientes de interneurônios da substância cinzenta que transmitem informações para outros neurônios localizados nesta mesma região (Ahuja et al, 2017; Mai, Paxinos, 2012).

A substância cinzenta é subdividida em corno anterior e posterior, existindo ainda o corno lateral entre o primeiro segmento torácico e o segundo segmento lombar da ME. De forma geral, o corno anterior origina a raiz nervosa anterior que transmite a informação motora, enquanto o corno posterior origina a raiz nervosa dorsal que transmite a informação sensorial.

Regiões centrais da substância cinzenta estão associadas a funções autonômicas simpáticas e parassimpáticas. Os cornos anterior e posterior podem também ser subdivididos em camadas denominadas lâminas. No corno posterior estão as lâminas de 1 a 6 que estão envolvidas no processamento dos estímulos de dor, temperatura, vibração e pressão, assim como informações nociceptivas provenientes da pele, músculos, articulações e vísceras (Cramer et al, 2014). No corno anterior estão as lâminas de 7 a 9 que contém interneurônios, neurônios proprioceptivos e motoneurônios que estão envolvidos no envio de informações motoras. Regiões mais mediais da substância cinzenta contêm muitos interneurônios e neurônios proprioespinais que estão envolvidos nos movimentos, reflexos e funções autonômicas (Cramer et al, 2014; Mai, Paxinos, 2012).

A partir da ME são projetados externamente 31 pares de nervos espinais, que correspondem aos 31 segmentos espinais (oito cervicais, doze torácicos, cinco lombares, cinco sacrais e um coccígeo). Diferentemente do primeiro segmento da ME que tem seu nervo saindo entre o osso occipital e a primeira vértebra cervical em direção à periferia, todos os demais segmentos espinais têm os seus nervos saindo da coluna vertebral pelos forames intervertebrais. Estes nervos espinais direcionam-se para regiões específicas como a pele, músculos ou órgãos (Bican, Minagar, Pruitt, 2013).

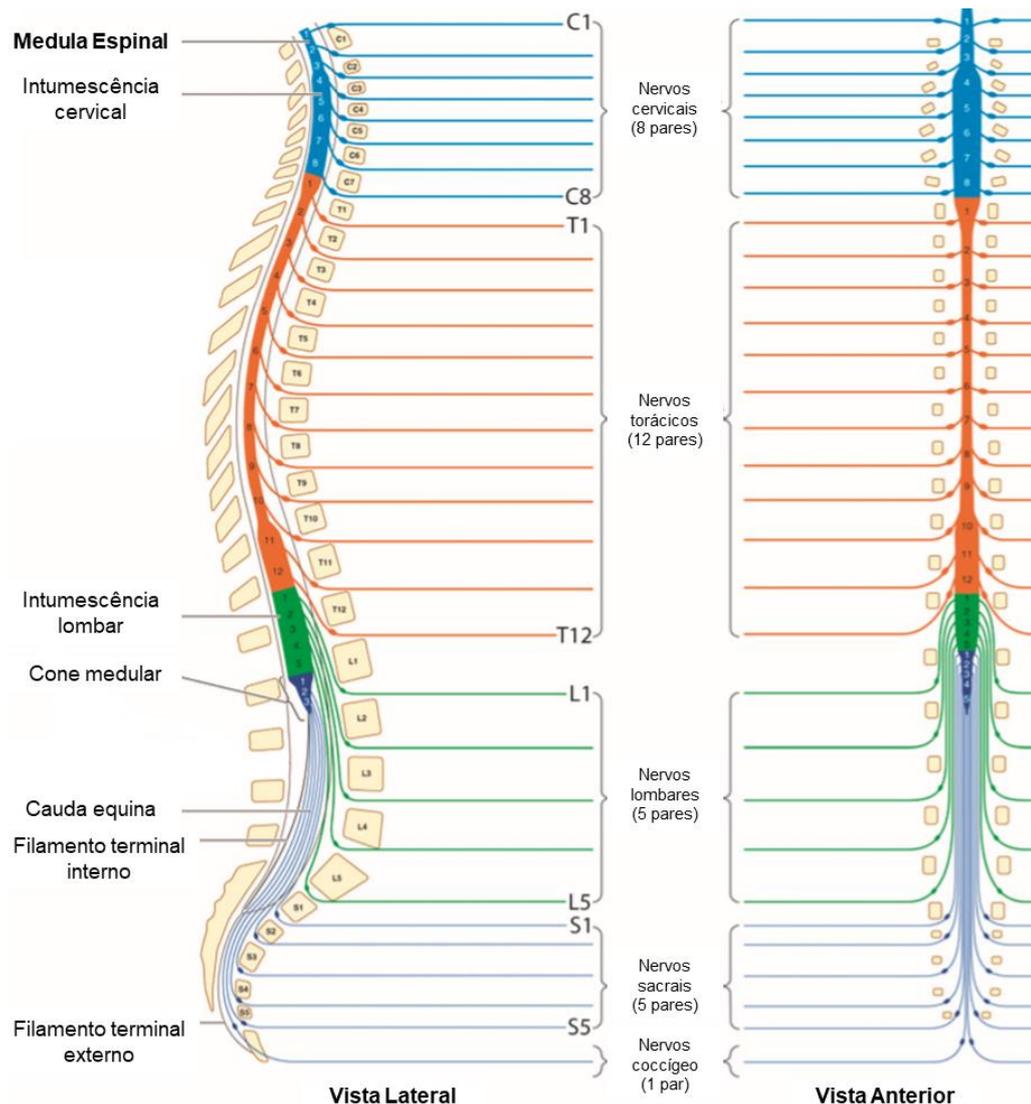


Figura 1. Anatomia da medula espinal. Imagem representativa da medula espinal, sua segmentação e a distribuição dos pares de nervos espinais. Fonte: adaptação de Cho (2015).

1.2 Lesão na medula espinal

A lesão da medula espinal (LME) é considerada uma grave afecção neurológica, que resulta em uma perda parcial ou total de movimentos e sensibilidade (Jackson et al, 2004). Anualmente milhares de indivíduos são acometidos por LME, apresentando elevadas taxas de mortalidade e morbidade crônica (Lee et al, 2014; Sobani, Quadri, Enam, 2010; Sumida, 2001).

Conforme o nível da ME acometida pela lesão, os déficits neurológicos podem envolver os membros superiores, tronco e membros inferiores (quadro de tetraplegia) ou envolver

parcialmente o tronco e membros inferiores (paraplegia). A LME ainda pode ser classificada conforme o grau de extensão da lesão, podendo ser considerada como completa quando há ausência de função motora e sensorial caudal ao nível da lesão e incompleta quando há preservação parcial das funções motoras e/ou sensoriais abaixo do nível lesionado (Burns et al, 2012; Maynard et al, 1997). Estes comprometimentos motores e/ou sensoriais se dão pela perda de tecido muscular que ocorre nas lesões que acometem a ME, lesionando tratos de fibras responsáveis pela condução de informações entre o encéfalo e a periferia (Ahuja et al, 2017; Bracken et al, 1990; Lee, Thumbikat, 2015) (Figura 2).

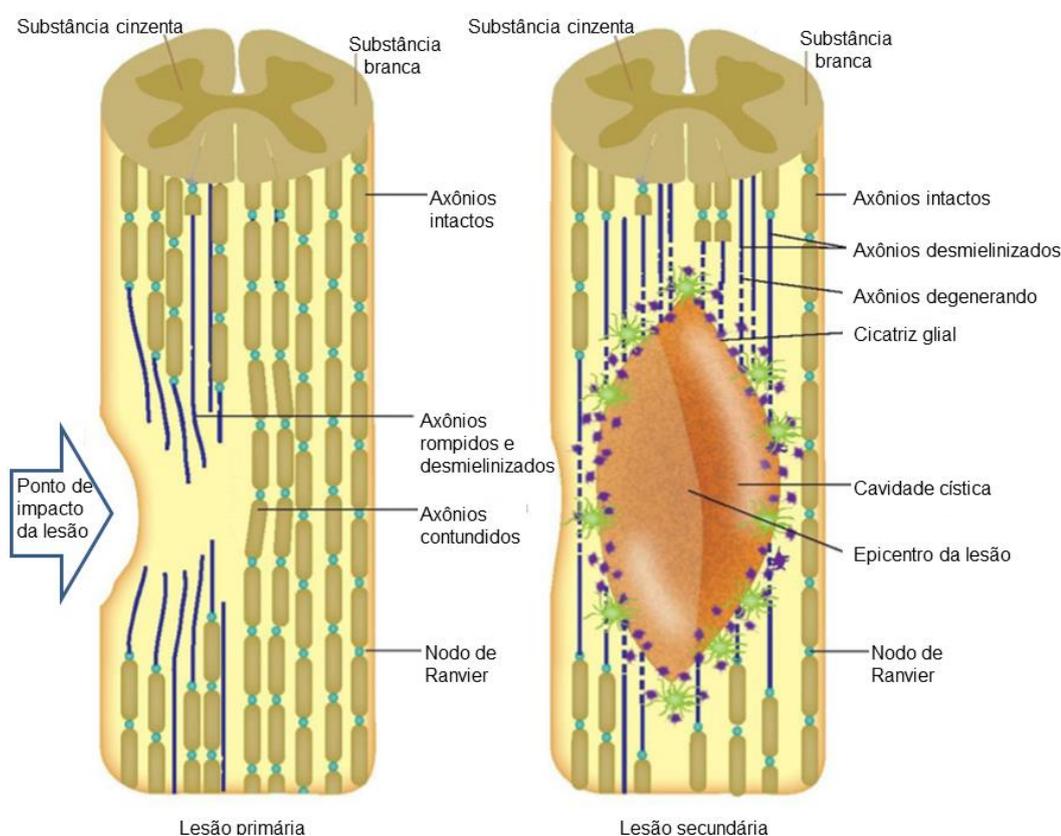


Figura 2. Esquema ilustrativo das lesões primária e secundária após um impacto sobre a medula espinal. A LME provoca um dano primário, no qual ocorrem lesões axonais que resultam na interrupção parcial ou total da condução dos potenciais de ação. Este dano inicial desencadeia a lesão secundária, caracterizada por morte celular acima e abaixo do local de lesão inicial. Os complexos processos que ocorrem na lesão secundária podem ser divididos em fase aguda, subaguda e crônica, que conduzem à formação de cavidade cística e cicatriz glial. Fonte: adaptação de Quadri et al (2018).

Os déficits neurológicos causados pela LME envolvem dois mecanismos principais que podem ser observados tanto em humanos como em modelos experimentais com animais. Estes modelos de lesão com animais possibilitaram a aquisição de grande parte dos conhecimentos fisiopatológicos envolvidos na LME. O primeiro mecanismo da lesão é chamado choque medular, sendo causado diretamente pelo trauma e responsável por desencadear a lesão primária. Em humanos, o choque medular pode ser definido de um ponto de vista fisiopatológico como o período até duas horas depois do trauma inicial (Kim et al, 2017; Norenberg et al, 2004). Em modelos experimentais com ratos este período ocorre entre a lesão e segundos ou minutos após a mesma (Oyinbo, 2011). Nesta fase, o trauma provoca uma lesão dos axônios, resultando no bloqueio parcial ou total da condução dos potenciais de ação. Associada ao dano neuronal, a glia e a circulação local também são danificadas (Huang et al, 2007; Mcdonald, Howard, 2002). Esta lesão primária desencadeia processos complexos que conduzem à lesão secundária na ME, contribuindo para exacerbar o estabelecimento dos comprometimentos patológicos (Fleming et al, 2006; Hyun, Kim, 2010; Norenberg, Smith, Marcillo, 2004; Profyris et al, 2004).

A lesão secundária é marcada por diversos eventos fisiopatológicos. De uma forma geral, estudos experimentais com animais demonstraram que a lesão secundária é caracterizada pela presença de edema, isquemia, hemorragia, inflamação e hipertermia, assim como danos celulares mediados por cálcio, radicais livres, óxido nítrico e glutamato que levam a morte de células acima e abaixo do local de lesão (Lipton, Rosenberg, 1994). Grande parte dos danos aos neurônios e à glia está completa em 24 horas após a lesão em modelos experimentais com ratos, mas a morte celular pode continuar por várias semanas (Casella et al, 2006; Oyibo, 2011), aumentando a lesão e degenerando os tratos nervosos de substância branca (Huang et al, 2007; Mcdonald, Howard, 2002).

Esta diversidade de eventos patológicos permite que a lesão secundária seja subdividida em três fases conforme o momento no qual ocorrem e suas características: fase aguda, subaguda e crônica (Kwon, 2004). A caracterização temporal destes períodos ainda não está totalmente estabelecida na literatura, pois é algo influenciável pelo tipo e grau de lesão, particularidades dos indivíduos e necessidade informações mais precisas sobre os eventos fisiopatológicos da lesão em humanos (Fawcett et al, 2007). Nesta tese são conferidas indicações temporais envolvendo as fases da lesão secundária a partir de informações obtidas na literatura científica

(Fawcett et al, 2007; Kim et al, 2017; Norenberg et al, 2004; Oyinbo, 2011), porém deve-se atentar que esta periodização não é rígida e existe, inclusive, uma sobreposição de características entre as fases pós-lesão.

A fase aguda em humanos pode ser reconhecida como o período de aproximadamente 48 horas após lesão primária (Kim et al, 2017; Norenberg et al, 2004), enquanto em modelos experimentais com ratos pode ser considerada como o período que ocorre nas primeiras horas após a lesão (Oyinbo, 2011). Estudos com roedores demonstraram que esta fase é caracterizada pela alteração da homeostase iônica em função da ruptura de vasos sanguíneos, aumentando o cálcio intracelular e potássio no meio extracelular. Ainda ocorre um aumento da disponibilidade e acúmulo de glutamato que conduz à excitotoxicidade glutamatérgica. Com isso, a excessiva produção de radicais livres seguida do processo inflamatório instalado, promovem danos aos neurônios e células gliais que culminam com a morte celular em poucos minutos (Ahuja et al, 2017; Bareyre, Schwab, 2003; Hulsebosch, 2002).

A fase subaguda tem maior duração que a fase aguda, iniciando dias após a lesão em humanos e durando algumas semanas (Kim et al, 2017; Norenberg et al, 2004). Em modelos de LME em ratos este período ocorre entre horas e semanas depois da lesão (Oyinbo, 2011). Modelos experimentais com animais permitiram observar que a ruptura da barreira hematoencefálica pela perda de células endoteliais do tecido vascular e perda de astrócitos permite que células de defesa do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos e outras células inflamatórias, além da microglia, entrem no parênquima da ME (Bethea, Dietrich, 2002). O aumento da produção de radicais livres, influxo de cálcio, resposta inflamatória e imunológica favorecem à morte neuronal e glial. Ainda nesta fase, os astrócitos aumentam a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), tornam-se reativos e proliferam-se, iniciando a formação da cicatriz glial (Assinck et al, 2017; Casella et al, 2006; Kim et al, 2017; Oyinbo, 2011).

A fase crônica em humanos pode ter início alguns meses após a lesão (Kim et al, 2017; Norenberg et al, 2004), quando os 6 meses anteriores não apresentem nenhuma mudança na capacidade funcional indicando um platô de recuperação (Fawcett et al, 2007). Nos modelos experimentais com ratos, esta fase é considerada como tendo início após semanas de lesão (Oyinbo, 2011). Este período conduz a uma maior estabilidade na progressão da lesão em relação às outras fases. Modelos de LME com animais caracterizaram esta fase pela presença

de cavidade cística no local de lesão e aumento da cicatriz glial, que cerca a cavidade cística e é composta principalmente pelos astrócitos reativos (Assinck et al, 2017; Fawcett, Asher, 1999; Obermair et al, 2008). A desmielinização dos axônios tem continuidade e é acompanhada de degeneração Walleriana. Além disso, observa-se a diferenciação de células em oligodendrócitos e a presença de células de Schwann (Assinck et al, 2017).

Tanto a lesão primária quanto a secundária leva a perda de função e desencadeiam uma sequência de reações que conduzem à morte celular tecidual e a produção de moléculas inibidoras, criando um ambiente que dificulta a regeneração e a remielinização (Ramer, Harper, Bradbury, 2000; Busch, Silver, 2007; McGee, Strittmatter, 2003). Estudos experimentais de LME em animais demonstraram a ocorrência de morte celular após a indução do modelo (Chen et al., 2013a; Lee et al, 2010; Popovich et al, 2012;), estimulando a degeneração secundária progressiva e resultando em disfunções na ME (Lewen, Matz, Chan, 2000; Yune et al, 2003).

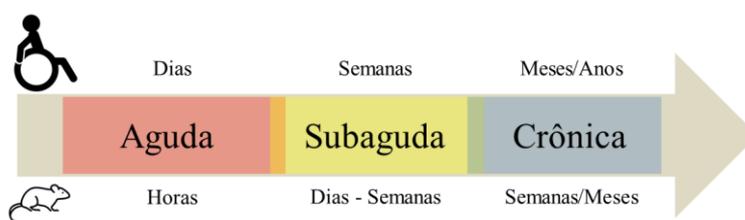


Figura 3. Esquema ilustrativo das fases da lesão secundária na medula espinal após um trauma. O dano inicial desencadeia uma série de respostas fisiopatológicas do organismo. Conforme o período pós-lesão e as características fisiopatológicas, a lesão secundária pode ser subdividida em fase aguda, subaguda e crônica, ocorrendo em alguns momentos uma sobreposição de fases. Em seres humanos a fase aguda é considerada o período até aproximadamente 48 horas pós-lesão, a fase subaguda inicia com dias ou semanas de lesão e a fase crônica inicia após semanas ou meses. Em modelos experimentais de lesão medular por contusão em ratos, a fase aguda é considerada as primeiras horas pós-lesão, a fase subaguda ocorre entre horas e semanas pós-trauma e a fase crônica inicia semanas depois da lesão. Fonte: do autor.

1.2.1 Resposta imunológica e morte celular

A partir de modelos experimentais de LME em animais, principalmente roedores, vem sendo possível compreender os processos fisiopatológicos envolvidos nesta lesão. Estes estudos demonstraram que em seguida ao trauma na ME, o local de lesão é rapidamente infiltrado por

neutrófilos provenientes do sangue em resposta à liberação de moléculas pró-inflamatórias e quimiotáticas por microglias, astrócitos e outras células (Plemel et al, 2014) (Figura 3). Enzimas líticas e citocinas secretadas pelos neutrófilos podem recrutar outras células de defesa para o local (Pineau et al, 2010; Popovich, Wei, Stokes; 1997). Ainda são expressas moléculas de adesão celular pelas células endoteliais, permitindo que neutrófilos se desloquem pelo endotélio vascular aderidos firmemente e, depois, extravasem para o parênquima medular (Plemel et al, 2014).

Depois de 24 horas da lesão no modelo experimental com ratos, é possível observar que o número de neutrófilos circulantes diminui, enquanto o número de neutrófilos no local de lesão tem o seu aumento máximo. Os monócitos circulantes que se deslocam com moléculas de adesão endotelial, extravasam para a ME e, com 48 horas de lesão, existe uma grande proporção de monócitos pró-inflamatórios, microglia fagocítica e macrófagos na região da lesão. Aproximadamente sete dias após a lesão ocorre o pico de macrófagos, linfócitos e monócitos no epicentro da lesão. Em conjunto com a microglia residente no tecido local, estas células executam a fagocitose do tecido lesionado (Dusart, Schwab, 1994; Loane, Byrnes, 2010).

Apesar do processo de recrutamento de células de defesa para o local de lesão na ME ter propriedades neuroprotetoras, este processo pode também demonstrar propriedades neurotóxicas, contribuindo para um aumento na lesão (Bethea, 2000). As células de defesa produzem citocinas que podem propagar a resposta inflamatória ou ter propriedades anti-inflamatórias. No entanto, citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas e interferons, participam da resposta inflamatória e induzem a expressão de cicloxigenases. A produção de prostaciclina 2 pelas cicloxigenases, promove a permeabilidade e o edema no local da inflamação devido as suas propriedades de vasodilatação, contribuindo para danos ao tecido (Bartholdi, Schwab, 1997; Hurley, Olschowka, Kerry O'Banion, 2002; Klusman, Schwab, 1997; Smith et al, 2012).

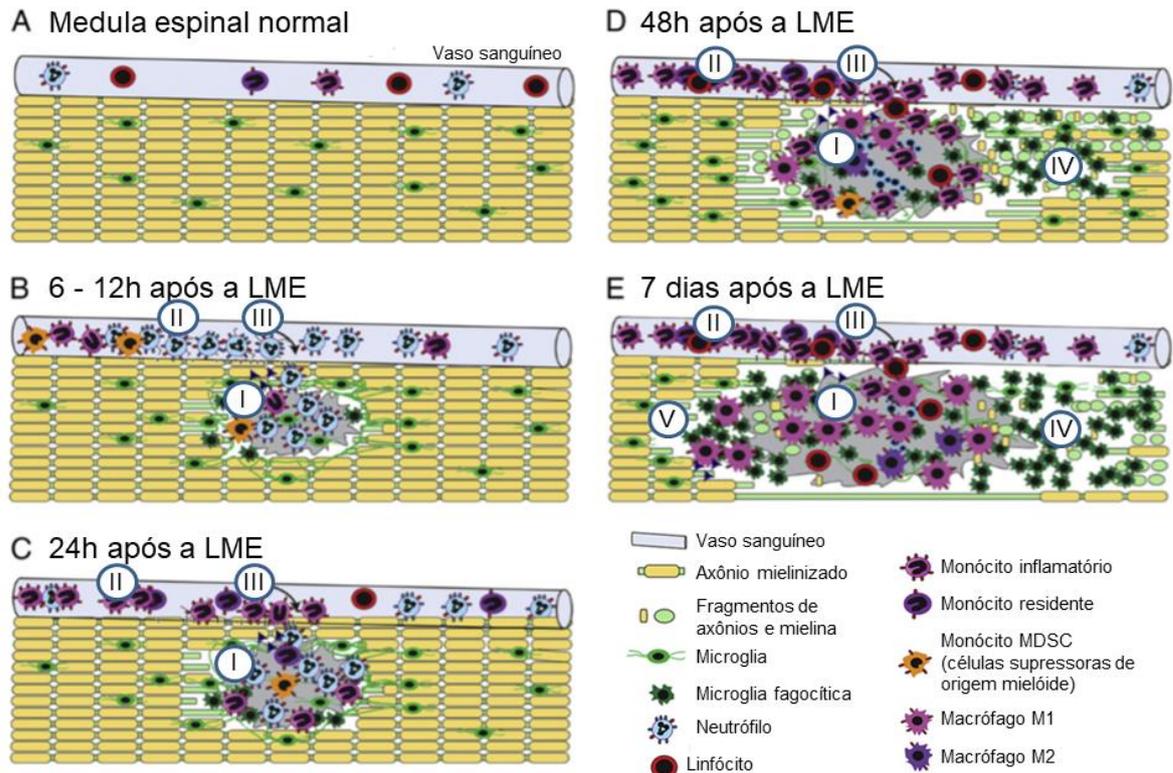


Figura 4. Esquema ilustrativo da resposta imunológica à LME. A representação das respostas nas imagens progride conforme o tempo depois da lesão em modelo experimental em ratos. **A.** Em uma situação não patológica, leucócitos são observados nos vasos sanguíneos e a ME apresenta em seu parênquima axônios mielinizados e microglia. Nas imagens foram omitidas algumas células presentes nos tecidos a fim de facilitar a esquematização. **B.** Com poucos minutos de lesão já são recrutados neutrófilos para o local. (I) Horas depois, observa-se um aumento no número de neutrófilos circulantes e na região da lesão, assim como microglia. (II) Neutrófilos se deslocam pelo endotélio e (III) extravasam para o epicentro da lesão. **C.** Com 24h de lesão, (I) aumenta a quantidade de monócitos circulantes que se deslocam e extravasam para a ME. **D.** 48h pós-lesão, monócitos pró-inflamatórios, microglia fagocítica e macrófagos M1 e M2 estão em grande quantidade no local de lesão na ME. **E.** (I) 7 dias após a lesão ainda existe grande quantidade de macrófagos M1 e M2, linfócitos e microglia fagocítica no epicentro da lesão. (II) Monócitos circulantes, monócitos residentes e linfócitos são recrutados para o epicentro da lesão. (IV) Microglia fagocítica continua atuando na limpeza de fragmentos de axônios e mielina em áreas de degeneração Walleriana e (V) morte axonal. Fonte: adaptação de Plemel et al (2014).

A liberação das citocinas pró-inflamatórias associada à excitotoxicidade glutamatérgica contribuem para a morte celular após a LME, em especial a morte celular programa (apoptose) (Casella et al, 2006; Elmore et al, 2007). Estes eventos ativam a enzima Oxido Nítrico Sintase (nNOS) que gera danos às membranas, inclusive das mitocôndrias, prejudicando a fosforilação oxidativa e levando a liberação de enzimas como a citocromo C oxidase. Estes processos podem ativar mecanismos de morte celular por apoptose pela ativação da via da caspase-3, que promove a fragmentação do DNA, degradação das proteínas do citoesqueleto e do núcleo e

formação de corpos apoptóticos que são removidos por meio de fagocitose pelas células do sistema imunológico (Blomgren et al, 2007; Elmore et al, 2007; Zhu et al, 2004).

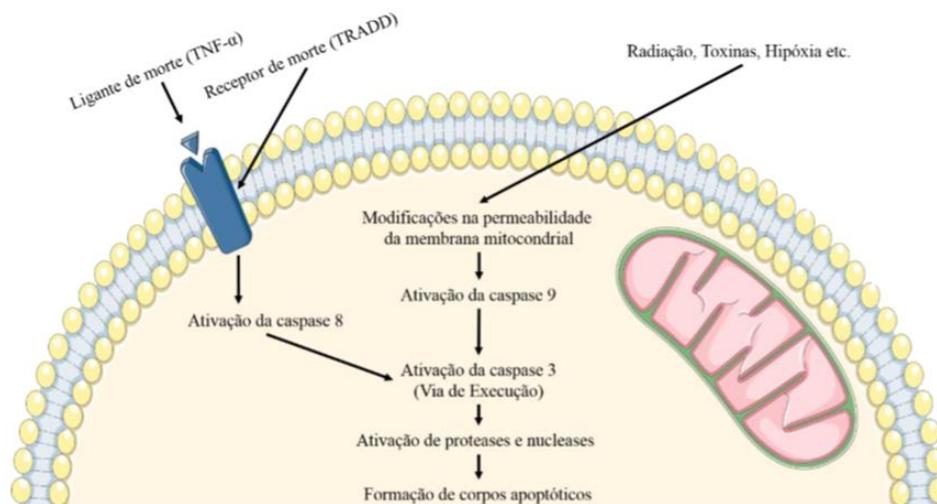


Figura 5. Esquema representativo dos eventos relacionados à apoptose celular após a LME evidenciados a partir de modelos experimentais com animais. A morte celular programada (apoptose) pode ocorrer por alguns fatores como a presença de citocinas pró-inflamatórias ou o dano mitocondrial. Estes fatores levam à ativação da caspase-3 que desencadeia uma série de eventos patológicos (entre eles a fragmentação do DNA e a degradação do citoesqueleto e núcleo). Consequentemente, corpos apoptóticos são formados e são expressos ligantes para as células fagocíticas a fim de atrair estas células de defesa que atuam na remoção dos corpos apoptóticos por meio da fagocitose. Fonte: Nicola (2017).

1.2.2 Comprometimentos musculoesqueléticos decorrentes da lesão medular

A morte de células na ME, decorrente tanto do trauma inicial quanto da lesão secundária após uma LME, leva a interrupção parcial ou total do envio de informações motoras e sensoriais. A diminuição ou interrupção do controle muscular compromete de forma significativa a musculatura esquelética distal à lesão e, em consequência ao desuso, ocorre uma diminuição na força muscular e capacidade metabólica dos músculos, evidenciadas tanto em estudos com humanos com LME (Gregory et al, 2003; Jayaraman et al, 2005) quanto estudos experimentais com ratos (Gregory et al, 2003; Hutchinson et al, 2001; Liu et al, 2006; Otis et al, 2004). Além do desuso, alterações nas propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos

motoneurônios na ME contribuem para a disfunção muscular possivelmente por estarem envolvidos no estabelecimento da espasticidade após a lesão (Cote et al, 2003).

As modificações observadas nos músculos esqueléticos de indivíduos após uma LME estão diretamente relacionadas à severidade de lesão (Biering-Sorensen et al, 2009; Voytik et al, 1993). Estas alterações musculares envolvem uma redução no tamanho das fibras musculares, perda de força contrátil e mudanças no tipo de fibras musculares (redução na proporção de fibras lentas e aumento na proporção de fibras rápidas), resultados observados tanto em estudos com modelos experimentais de LME em ratos (Hutchinson et al, 2001; Liu et al, 2006) quanto avaliações envolvendo seres humanos com lesão (Qin, Bauman, Cardozo, 2010).

Em consequência às alterações musculares observadas após a LME, as atividades físicas ficam bastante limitadas nestes indivíduos, contribuindo para o estabelecimento de limitações funcionais (Edwards et al, 2013; Morse et al, 2008). Estas limitações favorecem ainda mais a atrofia muscular, levando entre 30 à 60% de redução na massa muscular (Biering-Sorensen et al, 2009; Qin, Bauman, Cardozo, 2010). Consequentemente à perda muscular, ocorre uma interferência na massa óssea, levando à perda óssea, osteoporose e aumento do risco de fraturas (Edwards et al, 2013; Morse et al, 2008, Reilly, Frankin, 2016).

1.2.3 Modelos experimentais de lesão medular em ratos

Diante das graves consequências da LME é indispensável a utilização de modelos experimentais com animais a fim de compreender a fisiopatologia da lesão. Estes modelos utilizando animais são um pré-requisito necessário para a avaliação de possíveis propostas terapêuticas que buscam interromper ou atenuar os mecanismos patológicos da lesão, aumentando a recuperação funcional. Para tal, diversos modelos animais foram criados com o intuito de mimetizar os diferentes tipos de LME e comprometimentos decorrentes da lesão que ocorre nos seres humanos (Nardone et al, 2017). Apesar dos roedores apresentarem grande recuperação espontânea após lesões, os modelos experimentais com roedores são frequentemente utilizados em pesquisas devido à disponibilidade e fácil manutenção dos

animais (Nardone et al, 2017). Para a LME existem diversos modelos animais envolvendo ratos e camundongos, incluindo transecção, hemiseção e contusão (Young, 2002).

Os modelos de transecção podem comprometer toda ou parte da ME. Quando a secção é parcial, a mesma normalmente envolve uma hemiseção ou secção da região ventral ou dorsal. Estes são modelos pouco comparáveis aos tipos de LME em humanos, porém permitem estudar de forma mais específica os mecanismos envolvidos na regeneração axonal no local de lesão e próximo à ele (Fouad et al, 2005). Neste modelo, a severidade da lesão e o nível determinam de forma drástica o comprometimento motor, sensorial e/ou autonômico, visto que é uma lesão bastante agressiva (Nardone et al, 2017).

Um modelo alternativo que se assemelha com a lesão por contusão em humanos é o modelo de compressão da ME por um clip de aneurisma (Nardone et al, 2017). Desenvolvido para experimentos com animais pequenos (Wells et al, 2003), este modelo é induzido pela colocação temporária de um clip de aneurisma em determinado ponto da ME exposta (Rivlin, Tator, 1978). O modelo gera uma lesão tanto na região ventral quanto dorsal da ME devido a uma das superfícies do clip ser colocada abaixo da região ventral e a outra acima da região dorsal, permitindo reproduzir diferentes graus de lesão por meio do tempo de aplicação do clip (Blight, 1991).

O modelo experimental de LME mais popular por ser um dos mais próximos em mimetizar a clínica é o de contusão de um peso na ME (Young, 2002). Este foi o primeiro modelo desta patologia descrito e realizado por Allen em 1911 utilizando cães, sendo adaptado para ratos em 1985 (Panjabi e Wrathall, 1988; Wrathall et al, 1985). Com o passar dos anos, o modelo foi adaptado e novos modelos foram criados, envolvendo lesão na região cervical ou torácica da ME e diferentes níveis de comprometimento (leve, moderado ou grave) (Nardone et al, 2017). Entre os modelos de contusão, o mais conhecido é o que utiliza o equipamento *NYU/MASCIS Impactor* desenvolvido por Gruner (1992) e no qual um peso de 10 gramas é deixado cair de uma distância de 6,25mm, 12,5mm, 25mm ou 50mm sobre a ME exposta. Um padrão de resposta observado nos animais submetidos à este modelo é a recuperação espontânea em média até a quarta semana pós-lesão, seguida de um platô de recuperação após este período (Basso, Beattie, Bresnahan, 1995).

1.2.4 Tratamento da LME

Os déficits funcionais e o comprometimento da qualidade de vida dos sujeitos acometidos por uma LME tem motivado a busca por intervenções terapêuticas que atenuem os processos envolvidos na lesão secundária, inativem fatores que inibam o crescimento axonal e a estimulem a neurogênese na ME. Durante a fase aguda os tratamentos focam na neuroproteção com o objetivo de reduzir a lesão secundária. Na fase subaguda e crônica prevalecem os tratamentos voltados para a neuroregeneração, que se propõem a recuperar os déficits instalados pela perda tecidual, sinalização molecular inibitória e presença de cavidade cística e cicatriz glial na ME (Hyun, Kim, 2010; Rouanet et al, 2017).

Entre as estratégias neuroprotetoras estão os bloqueadores de canais. Estudos experimentais revelaram que a nimodipina, é um bloqueador de cálcio do tipo L que pode ser utilizado para prevenir as enzimas apoptóticas dependentes de cálcio e bloquear a liberação de glutamato (Jia et al, 2015). De forma semelhante, a liberação de glutamato também pode ser reduzida por outro fármaco nomeado riluzol, um medicamento que atua como bloqueador de canais de sódio, reduzindo a lesão secundária por bloquear a ativação patológica destes canais (Grossman et al, 2014). Estudos clínicos com humanos apresentam resultados inconsistentes sobre estes fármacos, porém o riluzol tem demonstrado maior potencial de recuperação funcional (Grossman et al, 2014) do que a nimodipina (Petitjean et al, 1998).

A interrupção do processo inflamatório pela utilização de fármacos ou pela diminuição do metabolismo é outra proposta neuroprotetora. Estudos experimentais com roedores demonstraram que fármacos como a minociclina, um antibiótico, e a metilprednisolona, um corticoesteróide, possuem propriedades anti-inflamatórias pela diminuição da ativação de macrófagos (Aras et al, 2015; Hassanzadeh et al, 2018; Li et al, 2018; Papa et al, 2016). Benefícios funcionais também foram observados em estudos clínicos que utilizaram a minociclina (Casha et al, 2012) e a metilprednisolona em seres humanos com LME (Bracken et al, 1990; Karsy e Hawryluk, 2017; Sunshine et al, 2017).

Outras terapias neuroprotetoras buscam ativar a ação de células de defesa, como a utilização de células-tronco. O uso de células-tronco, como as células-tronco neurais, células embainhantes olfatórias e células-tronco mesenquimais, tem sido proposto em estudos experimentais, demonstrando-se o potencial destas células em aumentar a liberação de citocinas

anti-inflamatórias pela ativação de macrófagos e microglia (Cheng et al, 2016; Falavigna, da Costa, 2015; Gensel et al, 2011; Kong e Gao, 2017; Nicola et al, 2016, Nicola et al, 2017). Estudos clínicos com células-tronco ainda são reduzidos, porém também apresentaram benefícios funcionais pelo uso destas células em indivíduos após LME (Dai et al, 2013; El-Kheir et al, 2014; Mendonça et al, 2014; Sykova et al, 2006).

Por outro lado, as propostas terapêuticas neuroregenerativas visam recuperar os danos ocorridos no início da lesão utilizando mecanismos de reparo endógenos e exógenos. Um exemplo é a utilização injetável do anticorpo monoclonal contra Nogo-A (Anti-Nogo-A), um componente inibidor da mielinização no SNC. Este anticorpo tem demonstrado ser uma opção farmacológica neuroregeneradora capaz de promover crescimento axonal e recuperação funcional em modelos experimentais animais (Bregman et al, 1995) e ampliando os seus benefícios quando associado ao treino físico (Chen et al, 2017). A verificação destes efeitos em estudos com seres humanos ainda é limitada, devido ao número restrito de estudos, porém os resultados atuais demonstram potencial terapêutico do Anti-Nogo-A (Kucher et al, 2018).

O uso de células-tronco também é uma possibilidade terapêutica regeneradora promissora que tem levado a um grande número de tipos celulares serem estudados, como as células-tronco embrionárias, células-tronco pluripotentes, células embainhantes olfatórias, células mesenquimais, entre outras. Experimentos utilizando animais tem demonstrado que as células-tronco tem potencial para remielinizar axônios, regenerar circuitarias neurais perdidas e modificar o microambiente, aumentando os níveis de fatores tróficos e reduzindo a cavidade cística (Ahuja et al, 2016; Centenaro et al, 2013; Falavigna, da Costa, 2015; Wilson et al, 2013). Estudos com humanos também tem demonstrado efeitos benéficos das células-tronco para a neuroregeneração, inclusive quando aplicadas em uma fase crônica pós-LME (Levi et al, 2018). Associado ou não ao uso de células-tronco, também podem ser utilizados biomateriais a fim de fornecer um ambiente favorável para a regeneração. Esta estratégia para reproduzir a arquitetura estrutural complexa da matriz extracelular (Ansorena et al, 2013; Caicco et al, 2013), podendo ainda estar associado ou não (Hamid et al, 2008; Itosaka et al, 2009; Mothe et al, 2013).

Por fim, a estimulação da ME também vem sendo alvo de diversos estudos. A estimulação elétrica (de forma epidural, transcutânea ou intraespinhal) também é uma alternativa que em modelos animais demonstrou potencial regenerador (Hamid e Hayek, 2008) e em estudos com humanos promoveu recuperação parcial de movimento voluntário após anos de

lesão (Angeli et al, 2014; Long et al, 2017). Outra estimulação indireta sobre a ME que vem sendo bastante utilizado como terapia é a terapia baseada em atividade (do inglês *activity-based therapy* – ABT), como, por exemplo, o treino locomotor. Por meio do treinamento de atividades específicas, são fornecidas informações sensoriais de forma associada à função motora repetitiva (Behrman et al, 2017), a fim de modificar o estado fisiológico da ME (Edgerton et al, 2004).

Apesar da existência de diversas possibilidades de tratamento para a LME, a grande maioria destas terapias estão ainda sendo investigadas em modelos experimentais, não tendo os seus efeitos totalmente reconhecidos em humanos. Além disso, mesmo diante do grande potencial terapêutico que estes estudos têm demonstrado, nenhum até o momento foi eficaz para impedir totalmente o estabelecimento de déficits ou restaurar a função perdida após a lesão. Uma das possíveis justificativas destes limitados benefícios pode estar relacionada aos possíveis efeitos negativos que estes tratamentos possam gerar, assim como a dificuldade de definir uma janela terapêutica para o uso dos mesmos (Bracken et al, 1990).

1.3 Treinamento locomotor em esteira

O treinamento locomotor em esteira (TLE) tem sido proposto e utilizado como uma intervenção terapêutica na LME e tem demonstrado melhora na capacidade locomotora (Werning et al, 1995). Esse estímulo fornece aferências sensoriais associadas à prática motora (Pearson, Rossignol, 1991) e tem como objetivo estimular o gerador de padrão central (GPC) que consiste de uma rede de neurônios localizados na ME responsáveis por gerar potenciais rítmicos e padronizados como o ato de caminhar (Duysens, Van de Crommert, 1998) (Figura 3). De forma mais específica, o GPC contém centros flexores e centros extensores, que geram movimentos com padrão flexor e extensor, respectivamente. Por meio de interneurônios inibitórios que se comunicam com os centros flexores e extensores, quando um dos centros está ativado o outro está inibido. Além disso, informações aferentes de variadas fontes, como os sistemas visual, vestibular e proprioceptivo, permitem fornecer ao corno dorsal da medula espinal informações que retroalimentam o gerador rítmico (Dietz, 2002).

A existência do GPC na ME foi confirmada em pesquisas experimentais com gatos, demonstrando ser capaz de gerar atividade locomotora rítmica independente das vias descendentes (De Leon et al, 1998). Resultados semelhantes foram observados em roedores com lesão completa, havendo melhora na função coordenada da marcha após realizarem o treino com esteira, mesmo que não tenha sido observada regeneração axonal (Kubasak et al, 2005). Estudos clínicos com humanos também indicam benefícios do TLE podendo estar relacionadas ao estímulo do GPC. Indivíduos que praticaram o TLE demonstraram aumento na contração muscular, aumento na velocidade e duração do exercício, maior coordenação dos movimentos e, inclusive, melhora na habilidade de deambulação (Hicks et al, 2005; Werning et al, 1995; Wirz, Colombo, Dietz, 2001).

Embora efeitos benéficos do TLE após a LME venham sendo relatados na literatura especializada, alguns estudos envolvendo modelos experimentais demonstraram resultados controversos (Battistuzzo et al, 2012). Enquanto alguns estudos demonstraram que a intervenção locomotora proporcionava benefícios limitados para a recuperação funcional (Battistuzzo et al, 2016; Fouad et al, 2000; De Leon et al, 2006; Lee et al, 2010; Timoszyk et al, 2005), outros encontraram efeitos negativos em características cinemáticas após o TLE (De Leon et al, 2006; Lee et al, 2010; Timoszyk et al, 2005). Esta discrepância de resultados parece estar relacionada às diferentes lesões realizadas nos modelos experimentais, os distintos protocolos de treinamento e o variável período de início do treino.

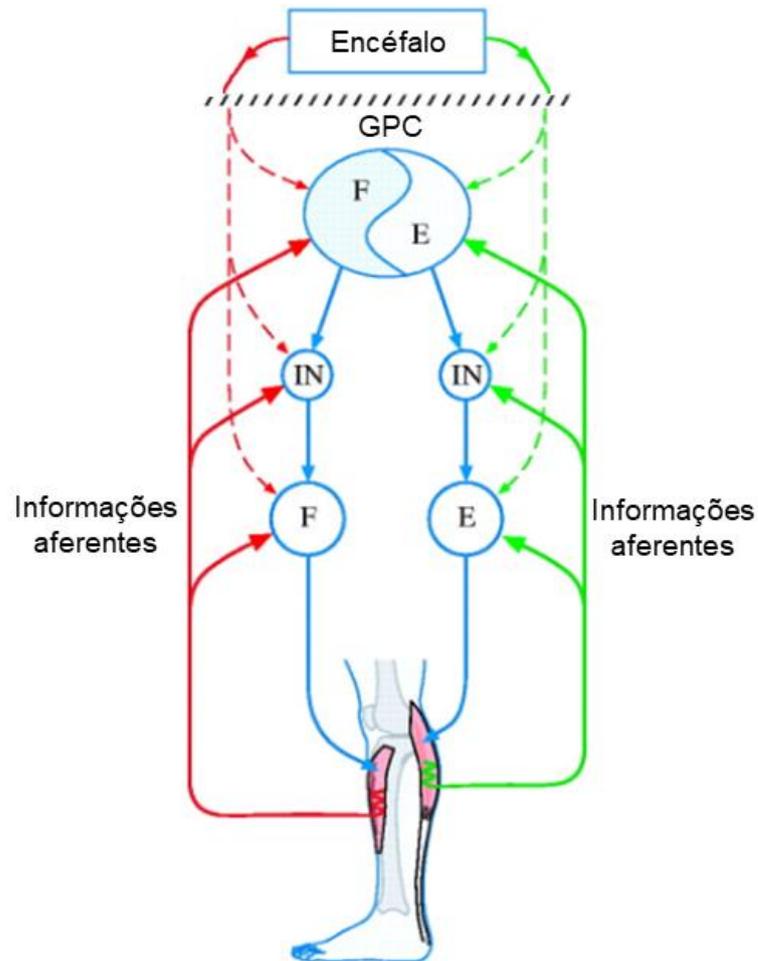


Figura 6. Esquema ilustrativo do GPC situado na medula espinal. Depois de uma lesão medular, a informação proveniente do encéfalo para a medula fica parcial ou totalmente interrompida (linhas descontínuas). Na medula espinal, existem centros de neurônios responsáveis por movimentos de flexão (F) e outros responsáveis pela extensão (E). A presença de interneurônios inibitórios (IN) permite que enquanto um centro estiver ativado, o outro estará inibido. A ação conjunta dos centros de flexão, de extensão e neurônios inibitórios constitui o gerador de padrão central (GPC), que permite que o movimento ocorra (linhas contínuas azuis) sem necessidade uma informação proveniente do encéfalo. Ainda existem informações aferentes que são enviadas para a medula espinal a fim de retroalimentar o gerador rítmico (linhas contínuas vermelha e verde). Fonte: adaptação de Rossignol (2006).

1.4 Justificativa

Diante da relevância clínica de um tratamento não farmacológico efetivo para a LME, existe a necessidade de estabelecimento de um protocolo de treinamento que proporcione o máximo de recuperação após ocorrida a lesão. Ainda, diante da discrepância de resultados e da presença de efeitos negativos em estudos experimentais com animais submetidos a modelos de

LME seguido de TLE, é imprescindível o aprofundamento do estudo sobre esta proposta terapêutica, a fim de não gerar prejuízos para indivíduos após uma LME.

Considerando-se que existe uma grande variabilidade de protocolos de TLE, dificultando a comparação dos resultados dos diferentes estudos, a proposta do presente trabalho é comparar os efeitos de um mesmo protocolo de treino iniciando em três períodos após a LME por contusão em ratos (7, 14 e 28 dias). A definição destes períodos de início do treino locomotor é baseada nas fases da LME e na recuperação espontânea demonstrada previamente no modelo animal de lesão medular por contusão moderada. Enquanto 7 e 14 dias após esta lesão em ratos corresponde, respectivamente, à um momento precoce da fase subaguda e um período intermediário também da fase subaguda, 28 dias após a lesão corresponde à um período de transição entre a fase subaguda e crônica neste modelo experimental. Neste modelo experimental, a recuperação dos movimentos dos membros posteriores torna-se perceptível a partir do segundo dia de lesão, permitindo que já no sétimo dia os animais apresentem movimento suficiente para realizar o treino em esteira.

Assim, o objetivo do estudo foi verificar os efeitos do TLE na funcionalidade, assim como na medula espinal e na musculatura esquelética de ratos submetidos ao modelo experimental de LME.

1.5 Hipótese de trabalho

As hipóteses testadas neste estudo foram: (a) o TLE iniciado em um período tardio após a LME promove uma maior recuperação funcional, proteção tecidual, redução do volume de lesão, neuroproteção e menor atrofia muscular nos membros posteriores; (b) o TLE iniciado precocemente após a LME promove uma menor recuperação funcional e aumenta a morte neuronal na ME.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do treinamento locomotor em esteira iniciado em um período precoce, intermediário e tardio após a lesão medular por contusão em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar os efeitos do treino locomotor em esteira iniciado em diferentes períodos após a lesão medular sobre a recuperação funcional e sobre o volume de lesão, número de motoneurônios no corno ventral da medula espinal, atrofia muscular nos músculos tibial anterior e sóleo, expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) na medula espinal e músculos esqueléticos.

- Quantificar o número de neurônios e macrófagos/microglia e a apoptose neuronal na medula espinal 6 horas após o primeiro treino locomotor em esteira iniciado em um período precoce em ratos submetidos ao modelo de lesão medular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Experimentos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, n.28088, Anexo). A fim de estudar os dois objetivos propostos, dividiu-se este trabalho em dois experimentos: o experimento I foi delineado a fim de investigar o primeiro objetivo específico (Figura 7) e o experimento II relacionado ao segundo objetivo específico deste estudo (Figura 8).

Foram utilizados ratos Wistar machos com 60 dias de vida (peso entre 278 e 315 gramas), provenientes do Biotério setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, totalizando um número amostral de 158 animais (96 animais do experimento I e 62 no experimento II). Durante a execução dos experimentos, os animais permaneceram em grupos de quatro ratos por caixa (42cm x 34cm x 18cm) e mantidos no biotério do departamento de Bioquímica da referida instituição sob condições padrão (ciclo de 12 horas claro/escuro), controle da temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$), água e comida fornecidas à vontade. Em ambos os experimentos os animais foram distribuídos de forma randomizada e aleatória nos grupos experimentais.

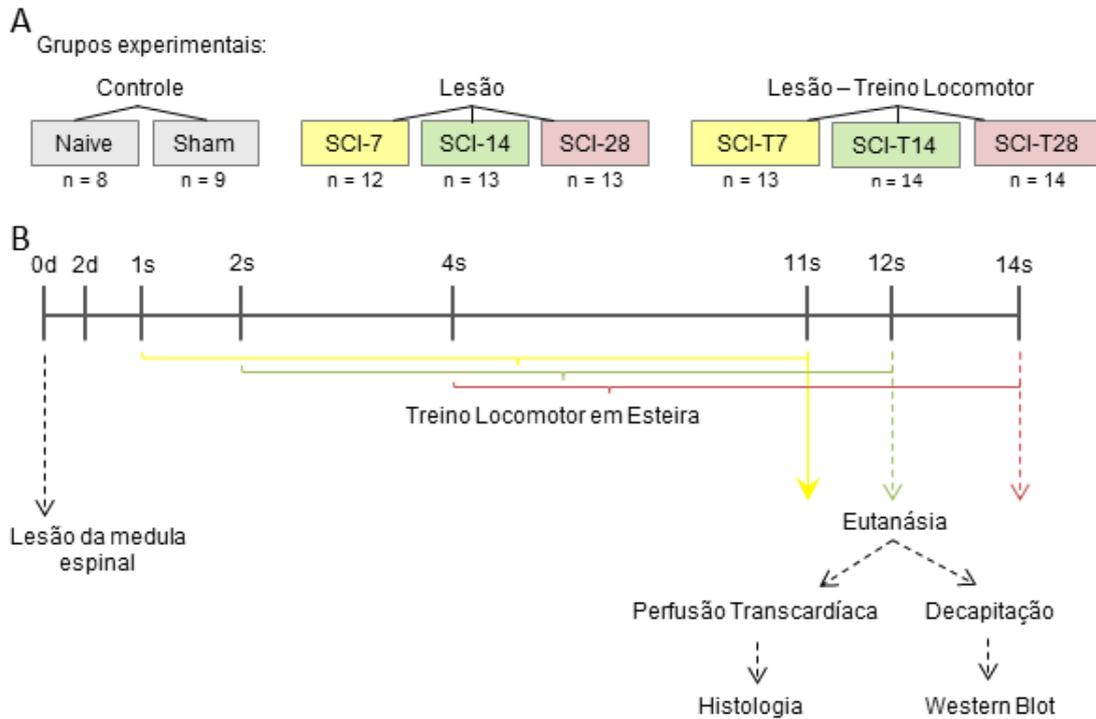


Figura 7. Esquema representativo dos procedimentos do experimento I. **A.** Separação dos animais nos grupos experimentais: grupo Controle (constituído de animais do grupo Naive e grupo Sham), grupo lesão (subdividido em três grupos comparativos ao grupo esteira) e grupo Lesão-Treino Locomotor (subdividido em três grupos conforme o tempo pós-lesão no qual foi iniciado o treino: 7, 14 ou 28 dias). **B.** Os animais que realizaram o Treino Locomotor em Esteira iniciaram com 7, 14 ou 28 dias depois da lesão da medula espinal. Ao final do protocolo de 10 semanas de treino, os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca ou decapitação e amostras da medula espinal e músculos tibial anterior e sóleo foram dissecados. Técnicas histológicas foram utilizadas para a quantificação do volume de lesão e o número de motoneurônios na medula espinal e mensuração da área média das fibras musculares. A técnica de Western Blot foi realizada para avaliação da expressão de BDNF na medula espinal e músculo tibial anterior.

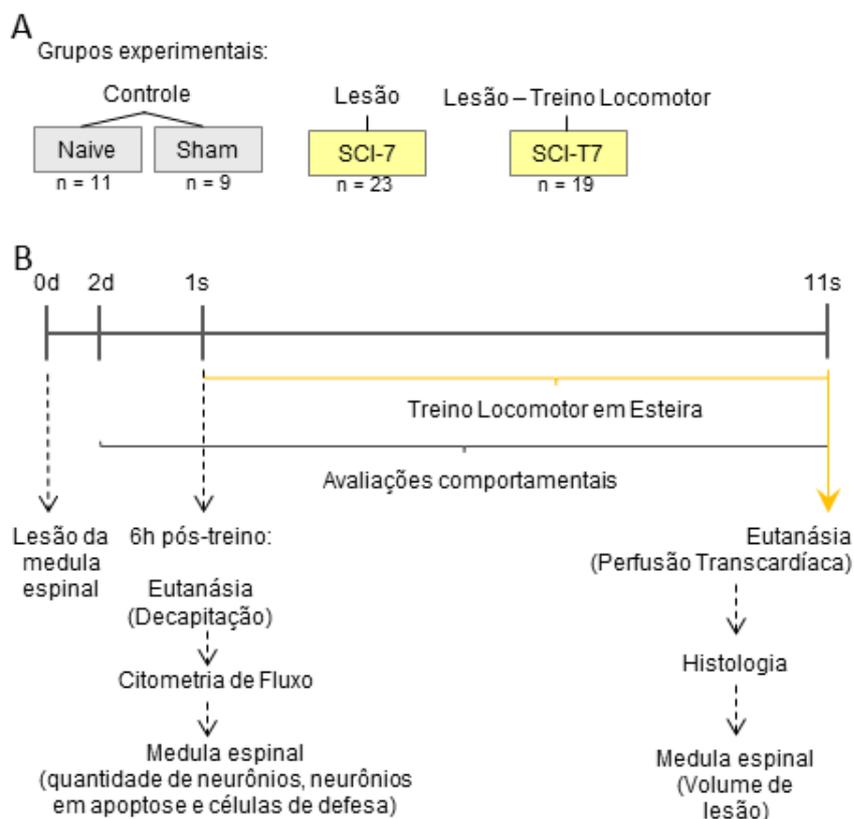


Figura 8. Esquema representativo dos procedimentos do experimento II. **A.** Separação dos animais nos grupos experimentais: grupo Controle (constituído de animais do grupo Naive e grupo Sham), grupo de animais submetidos à lesão por contusão (SCI-7) e grupo de animais com lesão e expostos ao treino locomotor 7 dias após a contusão (SCI-T7). **B.** Parte dos animais que iniciaram o treino locomotor 7 dias pós-lesão foram submetidos à eutanásia por decapitação 6h depois do primeiro dia de treino; os demais animais continuaram o protocolo de treinamento de 10 semanas e, ao final, foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca. Em sequência à eutanásia por decapitação, foram dissecadas as medulas espinais e foi realizada a técnica de Citometria de Fluxo para quantificação do número de neurônios, neurônios em apoptose e células de defesa no local de lesão. As técnicas histológicas foram realizadas a partir da retirada da medula espinal pós-perfusão transcardíaca e foi quantificado o volume de lesão.

3.2. Modelo de lesão medular traumática

Para indução do modelo experimental de lesão medular, todos os animais foram anestesiados com halotano (2-4%, Cristália, Brasil) e, então, submetidos à tricotomia e analgesia com tramadol (5mg/Kg, i.p., Grunenthal, Alemanha). Após, o animal foi posicionado em decúbito ventral e foi realizada uma incisão de 5 cm sob a linha média da região dorsal, deixando exposta a região da coluna vertebral entre a oitava e décima segunda vértebra torácica

(T8 e T12). Os músculos paravertebrais inseridos entre T9 e T11 foram dissecados e, em seguida, foi removida a lâmina da vértebra T10 e o processo espinhoso de T9, fazendo uso de um microssaca-bocados. A lesão medular foi realizada por contusão de grau moderado ao nível de T10 por meio da queda de um peso de 10 gramas a uma distância de 25 milímetros da medula espinal exposta, utilizando o equipamento *New York University impactor (NYU impactor)*, descrito por Gruner (1992) (Figura 9).

Depois da lesão medular, foi realizada a sutura dos animais e os mesmos foram acondicionados isoladamente nas caixas moradia nas mesmas condições de temperatura e controle de luz. Para a prevenção de infecções do trato urinário, todos os animais receberam 0,1 mL de Enrofloxacino (Bayer, Brasil) e para analgesia foi utilizado o tramadol (5mg/kg, i.p., Grunenthal, Alemanha) por 5 dias após a lesão. A manobra vesical manual pelo método de Crede foi realizada duas vezes ao dia por 5 dias ou até os animais adquirirem o controle voluntário da função. A partir do terceiro dia pós-lesão os animais foram agrupados em caixas com no máximo 4 animais por caixa.

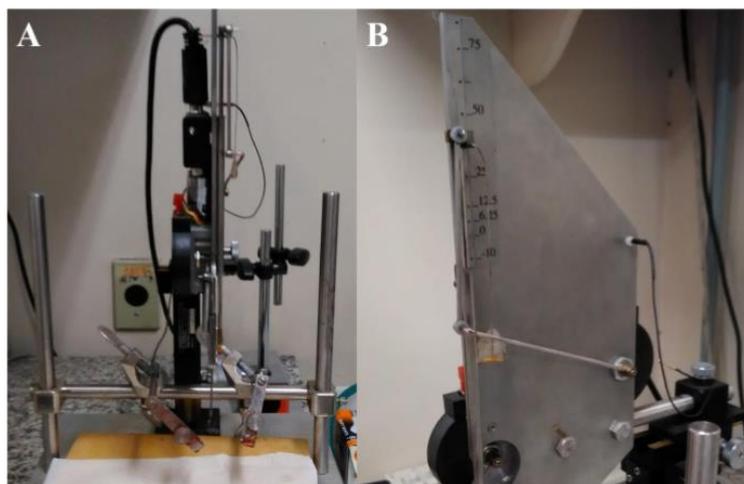


Figura 9. Fotos ilustrativas do equipamento *New York University Impactor*. **A.** Visão frontal do equipamento. **B.** Visão lateral com destaque às diferentes alturas para o posicionamento da haste. Fonte: Nicola (2017).

3.3. Programa de Treinamento Locomotor

Para o treinamento locomotor foi utilizada uma esteira ergométrica adaptada para ratos INSIGHT® (Figura 10).

Uma semana antes da cirurgia, todos os animais realizaram um período de adaptação à esteira ergométrica. Durante esta adaptação, a velocidade utilizada foi de 10 m/min durante 5 minutos.

Depois do procedimento cirúrgico, alguns animais foram novamente expostos à esteira em períodos determinados conforme os grupos experimentais: ratos do grupo SCI-T7 iniciaram o estímulo 7 dias após a lesão, SCI-T14 iniciaram 14 dias e SCI-T28 iniciaram 28 dias depois da lesão.

O programa de treinamento utilizado para os diferentes grupos experimentais foi o mesmo, realizado durante 20 minutos, 5 dias por semana, totalizando 10 semanas de treinamento. A velocidade da esteira iniciou com 6 m/min, progredindo semanalmente, conforme as condições locomotoras dos animais, até atingir 11,5 m/min (Fouad et al, 2000). A progressão da velocidade nas quatro primeiras semanas de treinamento foi 0,5 m/min. Da quarta à décima semana do treinamento, a velocidade progrediu semanalmente 0,75 m/min.



Figura 10. Foto ilustrativa da esteira ergométrica adaptada para ratos INSIGHT®. Visão superior do equipamento subdividido em 6 ambientes, permitindo a realização do treinamento de no máximo 6 animais simultaneamente. Fonte: Nicola (2017).

3.4. Avaliações comportamentais

Todos os animais foram submetidos às avaliações funcionais dois dias antes da data de lesão da medula espinal a fim de verificar que todos eram capazes de realizar os testes. Depois da lesão, todos os ratos foram novamente submetidos às avaliações à partir do segundo dia pós-lesão, dando continuidade aos testes semanalmente.

Os déficits funcionais e a recuperação da função motora dos membros posteriores foram avaliados por meio da atividade locomotora livre em campo aberto durante 5 minutos, juntamente com a escala de Basso, Beatie e Bresnahan (BBB). Esta escala foi descrita por

Basso, Beattie e Bresnahan (1995) e tem 22 valores que vão de 0 (paralisia total) ao 21 (locomoção normal).

A avaliação da habilidade e coordenação dos membros posteriores foi avaliada com o teste da Escada Horizontal. O aparato contou com uma escada posicionada horizontalmente, a 30cm de altura e com comprimento de 100cm. Os degraus de metal foram posicionados em distâncias variáveis e seus posicionamentos foram modificados ao longo das semanas. Para o teste os animais foram colocados em uma extremidade da escada e foram permitidos andar em direção à outra extremidade da escada (na qual tinha uma caixa preta) durante 3 vezes. A trajetória dos animais pelo aparato foi filmada utilizando uma câmera digital (Sony, DCR-SR47, USA) e o número de erros de posicionamento dos membros posteriores e o número de acertos foi quantificado. A porcentagem de erro foi calculada de acordo com a equação $[(\text{number of errors} / \text{number of steps}) \times 100]$. Foi considerado como escore final a média dos três trials (Metz e Whishaw, 2002).

3.5. Perfusão Transcardíaca

Para a realização das análises histológicas e morfométricas, metade dos animais do experimento 1 e 2 foram anestesiados com tiopental sódico (50mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil) e injetados com 1000 IU de heparina sódica (Cristália, Brazil) no ventrículo esquerdo. Foi inserida uma cânula no ventrículo esquerdo e ligada em uma bomba de perfusão (Control Company) inicialmente com solução salina (150mL), seguida de uma solução fixadora (300mL) com paraformaldeído 4% (Reagen, Brazil) diluído em tampão fosfato 0.1 M (pH 7.4). A medula espinal (porção entre C5 e L5) e os músculos tibial anterior e sóleo foram dissecados, pós-fixados na mesma solução fixadora utilizada na perfusão transcardíaca durante 4h em temperatura ambiente. Depois foram crioprotegidas por imersão em sacarose 15% diluída em tampão fosfato à 4°C até submergirem, seguida de solução sacarose 30% diluída em tampão fosfato 4°C até submergirem. Por fim, as amostras foram congeladas em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -70°C.

3.6. Análises histológicas e morfométricas

A medula espinal (porção entre T8 e T12) e os músculos esqueléticos (porção central, 2 x 1mm) foram cortados em criostato (CM1850, Leica, Alemanha) em secções transversais (20 μm), que foram posteriormente coradas com hematoxilina e eosina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) (Zaccagnini et al, 2007). As imagens foram capturadas e digitalizadas inicialmente em 20x e depois ampliadas em 100% para análise. A área da lesão nos cortes da medula espinal e a área das fibras musculares dos músculos tibial anterior e sóleo foram estimadas utilizando o Software Image Pro Plus. Na medula espinal foi medida a área da lesão e a área de tecido íntegro, sendo os valores multiplicados pela distância entre os cortes (100 μm) a fim de obter o volume da lesão e o volume de tecido íntegro. O volume da lesão foi calculado pela equação [(volume da lesão x 100) / volume de tecido íntegro]. O número de motoneurônios presentes 20 μm rostral e 20 μm caudal à lesão também foi quantificado no corno ventral da medula espinal. Nos músculos, a área da secção transversa das fibras musculares do músculo do lado direito e lado esquerdo foram quantificadas (μm^2) e, depois, a distribuição de frequência foi realizada. As fibras foram definidas como pequenas ou grandes se a área fosse menor ou maior que 3 desvios padrões do grupo controle (Phelan e Gonyea, 1997). Dessa forma, as fibras do músculo tibial anterior foram consideradas fibras pequenas quando com área até 1000 μm^2 , fibras médias com área entre 1000 e 2000 μm^2 e fibras grandes com área maior que 2000 μm^2 . No músculo sóleo, as fibras pequenas foram as com área média de até 750 μm^2 , fibras médias entre 750 e 1500 μm^2 e fibras grandes com área maior que 1500 μm^2 .

3.7. Análise de Western Blot

Para a realização da técnica de Western Blot, alguns animais foram submetidos a eutanásia por decapitação e, posteriormente, a medula espinal e o músculo tibial anterior foram obtidos para quantificação da expressão protéica do fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF).

As medulas espinais e o músculo tibial anterior foram dissecados, homogeneizados em solução tampão de lise. As amostras de medula espinal foram centrifugadas a 12000 rpm durante 30 minutos e as amostras de músculo a 3000 rpm por 10 minutos. Concentrações

proteicas iguais foram carregadas em NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gels e transferidas para membranas de nitrocelulose por 1h45min em tampão de transferência (Arcego et al, 2016). As membranas foram incubadas por 2h em solução bloqueio e depois incubadas durante a noite em uma solução bloqueio com o anticorpo primário anti-BDNF (Rabbit, Cell Signaling) para as amostras de medula espinal e músculo, β -actina (Rabbit, Cell Signaling) para as amostras de medula espinal e anti-GAPDH (Rabbit, Sigma) para as amostras de músculo. Posteriormente as amostras foram lavadas três vezes, incubadas por 2h em uma solução contendo o anticorpo secundário (anti-mouse, Millipore) e lavadas novamente. O sinal foi detectado com o Kit ECL de quimioluminescência (GE Life Sciences), os imunoblots foram quantificados por escaneamento das membranas no equipamento ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences – Reino Unido) e as densidades ópticas foram determinadas pelo software Image Studio Lite V5.0 (LI-COR Biosciences - EUA). Os resultados foram expressos como a razão entre a intensidade da proteína de interesse comparada com a β -actina no caso das amostras de medula espinal ou então comparadas com anti-GAPDH nas amostras de músculo de uma mesma membrana (Nicola et al, 2017).

3.8. Análise por Citometria de Fluxo

Para a realização da técnica de Citometria de Fluxo, alguns animais do experimento 2 foram submetidos a eutanásia por decapitação e, posteriormente, a medula espinal foi dissecada (Control n=8; SCI n=10; SCI-T7 n=8).

As medulas espinais foram dissociadas e as células permeabilizadas por 10 minutos. Em seguida foram bloqueadas por 15 minutos com soro de cabra 3% (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 1:100. As células foram incubadas por 1h com anticorpos primários a uma concentração de 1:100 para marcação de neurônios (NeuN, mouse, Sigma Aldrich), macrófagos/microglia (CD11b, mouse, Millipore) e neurônios em apoptose (dupla marcação com NeuN e caspase clivada-3 [rabbit, Cell Signalling]). Posteriormente as células foram lavadas e incubadas por 1h com anticorpo secundário. Controles negativos foram incluídos para configurar as voltagens da máquina e determinar a região negativa da plotagem de pontos. A emissão de fluorocromo foi registrada por meio de um filtro de fluorescência e a emissão de fluorescência foi coletada usando a amplificação logarítmica. Dados a partir de 10.000 eventos

(células intactas) foram adquiridos e o número de células foi determinado após a exclusão dos debris. O número de células em cada quadrante foi calculado e as células coradas separadamente foram expressas como a porcentagem de células marcadas positivamente (Nicola et al, 2017).

3.9. *Análise Estatística*

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no software IBM SPSS Statistics 21. A normalidade dos dados foi confirmada, assim como a igualdade das variâncias, e testes estatísticos paramétricos foram utilizados. A análise dos testes comportamentais ao longo do tempo foi realizada pelo teste de Análise de Variância de medidas repetidas (ANOVA). As demais avaliações foram analisadas por Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de *post hoc* de Duncan, ou pelo teste de T de Student. As correlações foram calculadas pelo teste de correlação de Pearson. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão e a significância estatística estabelecida foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Capítulo I – Artigo publicado na revista Neuroscience (ISSN: 0306-4522):

Locomotor training promotes time-dependent functional recovery after experimental spinal cord contusion

Locomotor Training Promotes Time-dependent Functional Recovery after Experimental Spinal Cord Contusion

M. R. Marques,^{a,b,d*} F. C. Nicola,^{a,d} E. F. Sanches,^d D. M. Arcego,^c L. E. Durán-Carabali,^{c,d} D. Aristimunha,^d C. Dalmaz^{a,c} and C. A. Netto^{a,c,d}

^a Post-Graduation Program of Neurosciences, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Área de Conhecimento de Ciências da Vida, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Post-Graduation Program of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Cerebral Ischemia and Neuroprotection Laboratory, Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract—Locomotor training (LT) has been exhaustively investigated as a treatment for the spinal cord injury (SCI), however the literature reports both positive and negative effects over the functional recovery. The initiation period of LT following SCI is one of the major variables that needs attention. To investigate the better period, three different starting times were investigated after SCI in rats. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into groups: control, SCI (rats with spinal cord contusion), and SCI groups exposed to LT starting 7, 14 or 28 days after the injury (SCI-T7, SCI-T14 and SCI-T28). LT was performed on a treadmill, five days a week, 20 minutes per day, for ten weeks. Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale and Horizontal Ladder walking test were used to evaluate the motor function; at the end, morphological and biochemical analyses of the spinal cords, tibialis anterior muscle. SCI-T7 group had higher lesion volume after LT in comparison with the SCI group. Late onset of LT promoted an increment of the hindlimb function, while early onset of training worsened the functional recovery of the SCI animals. These results demonstrate a critical LT starting time after the injury, contributing to define the best therapeutic window for rehabilitation. © 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: spinal cord injury (SCI), treadmill training, therapeutic window, locomotor impairment, tissue protection, neuroprotection.

INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) is a central nervous system disorder that causes motor and sensory impairments and has a significant impact in the individual's functionality and quality of life. Unfortunately, the available treatments are not able to completely restore the function after SCI; however, the motor stimulation triggers the spinal cord activity-dependent plasticity,

leading to partial functional improvement (Chen et al., 2006).

The activity-based therapy (ABT) is a neural retraining mode, based on specific tasks, providing sensory cues and intense repetitive motor function (Behrman et al., 2017). Specific therapies, such as locomotor training (LT), shape the physiological state of the spinal cord (Edgerton et al., 2004). LT is used to activate locomotor circuits and to provide appropriate peripheral inputs, which contributes to the spinal cord plasticity and the locomotor function recovery after SCI (Edgerton et al., 2004; Rossignol et al., 2004; Goldshmit et al., 2008; Battistuzzo et al., 2012). Motor recovery promoted by repetitive training may be associated with the neuroplasticity- and angiogenesis-related genes that are down-regulated after SCI (Schin et al., 2014). Neurotrophic factors are released after LT and modulate spinal plasticity and angiogenesis, contributing to the

*Correspondence to: M. R. Marques, Ischemia and Neuroprotection Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, anexo. CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: marliam@yahoo.com.br (M. R. Marques).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; BBB, Basso, Beattie and Bresnahan scale; CSA, cross-sectional area; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; LT, locomotor training; SCI, spinal cord injury.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.033>

0306-4522/© 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

generation, survival, differentiation and regeneration of neural cells (Thoenen, 1991).

Secondary to the interruption of supraspinal inputs, the disuse of skeletal muscles distal to the injury leads to muscle fiber atrophy and a decrease in voluntary muscle strength and metabolic capacity (Hutchinson et al., 2001; Gregory et al., 2003; Otis et al., 2004; Jayaraman et al., 2005; Liu et al., 2006). Tibialis anterior and soleus are important muscles for a stable posture and gait that are usually impaired after SCI (Liu et al., 2010; Wang et al., 2015). The atrophy and the functionality of tibialis anterior and soleus muscles are dependent of injury severity (Voytik et al., 1993; Biering-Sorensen et al., 2009); however, even after a severe SCI, LT has shown positive results on walking (Wirz et al., 2001; Maegele et al., 2002; Edgerton et al., 2004). Stimulation of rhythmic patterns of leg muscles (Wirz et al., 2001; Maegele et al., 2002) reduces the muscles atrophy below the lesion level after treadmill training (Giangregorio et al., 2005; Gorassini et al., 2009).

Although experimental studies show positive effects after locomotor stimulation, some reports have shown that the early LT intervention presents limited benefits to the functional recovery of SCI rats (Fouad et al., 2000; Timoszyk et al., 2005; De Leon and Acosta, 2006; Lee et al., 2010; Battistuzzo et al., 2016), with negative effects in kinematic features (Timoszyk et al., 2005; De Leon and Acosta, 2006; Lee et al., 2010). Controversial LT results occur due to different injury severity among experimental models, distinct training protocols and different training start time after the lesion.

Given the clinical relevance of SCI treatment, it is important to establish an efficient training protocol to promote locomotor recovery after the SCI. In order to understand the factors that contribute to the LT positive and negative effects, the aim of the present study is to determine the best time window to start the LT after SCI. For this purpose, the locomotor function, injury volume, motoneuron density and neurotrophic factor expression in the spinal cord, atrophy and neurotrophic factor expression in hindlimb muscles were evaluated ten weeks after the SCI.

The working hypothesis is that 10 weeks of treadmill training could promote different effects in motor function if started at different periods after the injury. This would imply in altered lesion volumes, motoneuron density and neurotrophic factor expression in the spinal cord and affected muscles.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animal care and ethics committee approval

Animal care and handling procedures were in accordance with current international laws and policies (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication n° 85-23, 1985, revised 1996) and with the Arouca Brazilian Law for animal care and ethical use of animals. The study was approved by UFRGS Ethics Committee (28088). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals. Animals had free access to food and water and were

maintained in a controlled temperature (~22 °C) room with 12-h light/dark cycle. The experimental design is shown in Fig. 1.

Animals

Adult male Wistar rats (8 weeks old, 278–315 g) were used. Animals were randomly divided into four groups: control (constituted by naive animals, rats not exposed to any surgical procedure or treatment, $n = 8$); and sham rats, surgical control animals submitted to laminectomy surgery without SCI, ($n = 9$), SCI groups (animals that underwent laminectomy and SCI, $n = 38$) and SCI groups receiving LT. Animals exposed to treadmill were divided into three subgroups, according to the day of LT start: 7, 14 or 28 days after SCI (SCI-T7, SCI-T14 and SCI-T28, respectively with $n = 13$, $n = 14$ and $n = 14$). In order to match with LT groups, the SCI group was divided into three subgroups (SCI-7, SCI-14 and SCI-28, respectively with $n = 12$, $n = 13$ and $n = 13$). A total of 95 animals were used.

Surgical procedures

Rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) injected intraperitoneally. A 2.5-cm incision in the animal's back was made using a surgical blade. Spinous process and vertebral lamina were removed to expose the medulla region at T10 spinal level (Noble and Wrathall, 1985). Incomplete SCI was made using the New York University (NYU) Impactor System (Nicola et al., 2016). The lesion consists of dropping a device rod (10 g) from a distance of 25 mm onto the intact exposed dura mater (Basso et al., 1996; Hutchinson et al., 2001). Postoperative care included regular bladder emptying and antibiotic treatment (Trimethoprim, 0.85 mg/kg) (Wu et al., 2016).

Locomotor training (LT)

LT was made using a rat treadmill. One week before the surgery, all rats ran on the treadmill during five minutes at 10 m/min for adaptation. After the surgery, according to the experimental group, the rats were placed in the treadmill with the initial speed of 6 m/min and gradually it was increased to 11.5 m/min over the course of training (Fouad et al., 2000). Protocol consisted of five sessions a week, 20 min per day, with a total training time period of ten weeks.

Locomotor assessment

All animals were submitted to behavioral evaluation two days before the injury and all rats were able to perform the tests. After injury, rats were submitted to the same evaluations at the second postoperative day and weekly throughout the experiments. Evaluation assessments were run by an investigator blinded to the animals' group allocation.

Locomotor recovery was assessed by Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scale (BBB scale; Basso et al., 1995). Rats were placed individually in a circular open field (100 cm diameter), where they were allowed to freely

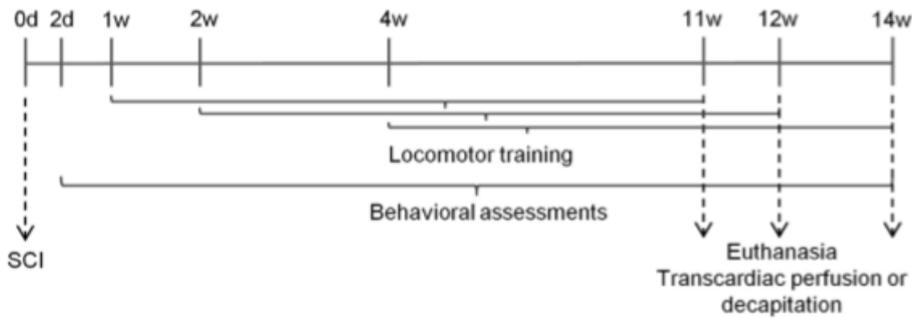


Fig. 1. Experimental design.

move for 5 min for locomotor activity evaluation. Rats were tested from the second postoperative day and then, weekly for 10 weeks.

Horizontal ladder apparatus was used to assess the hindlimb coordination and skills weekly. The ladder has 100 cm long. Metal rungs were positioned with variable distances and positions were modified along each training session. Apparatus remained 30 cm above the ground. Rats were placed in one extremity of the ladder and taught for walking three times until the opposite extremity, entering a dark cage. Animals were filmed using a digital camera (Sony; DCR-SR47, USA) and the number of hindlimb placement errors and steps were counted. Error percentage was calculated according to the equation [(number of errors/number of steps) × 100]. The final score was the mean of the three trials (Metz and Whishaw, 2002).

Histological and morphometric analysis

After behavioral evaluations, half of the rats were deeply anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil) and injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil). Euthanasia was made by transcardiac perfusion of saline solution, followed by 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) diluted in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Spinal cord, tibialis anterior and the soleus muscles were obtained for subsequent histological and morphometrical analysis.

Spinal cord (segment between T8 and T10 levels), tibialis anterior and soleus muscle were dissected out and post-fixed for 4 h with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Cryoprotection

was made by immersion in 15% and 30% sucrose (Synth, Brazil) in phosphate buffer at 4 °C. After, spinal cords and muscles were frozen in isopentane (Merck, Germany) cooled in liquid nitrogen and kept frozen (−70 °C) for further analysis. Transversal sections (20 μm) were cut using a cryostat (CM1850, Leica, Germany) and the sections were stained with hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Zaccagnini et al., 2007).

Images were captured and digitalized (initially 20× and further amplified 100% for analysis). The areas in the spinal cord and the mean fiber cross-sectional area (CSA) of tibialis anterior and soleus muscle were estimated using Image Pro Plus Software. In the spinal cord, the lesion area and the area of intact tissue were measured and multiplied by the distance between sections (100 μm) to obtain the volume of lesion and the intact tissue volumes. The lesion volume was calculated by the equation: [(lesion volume × 100)/intact vol-

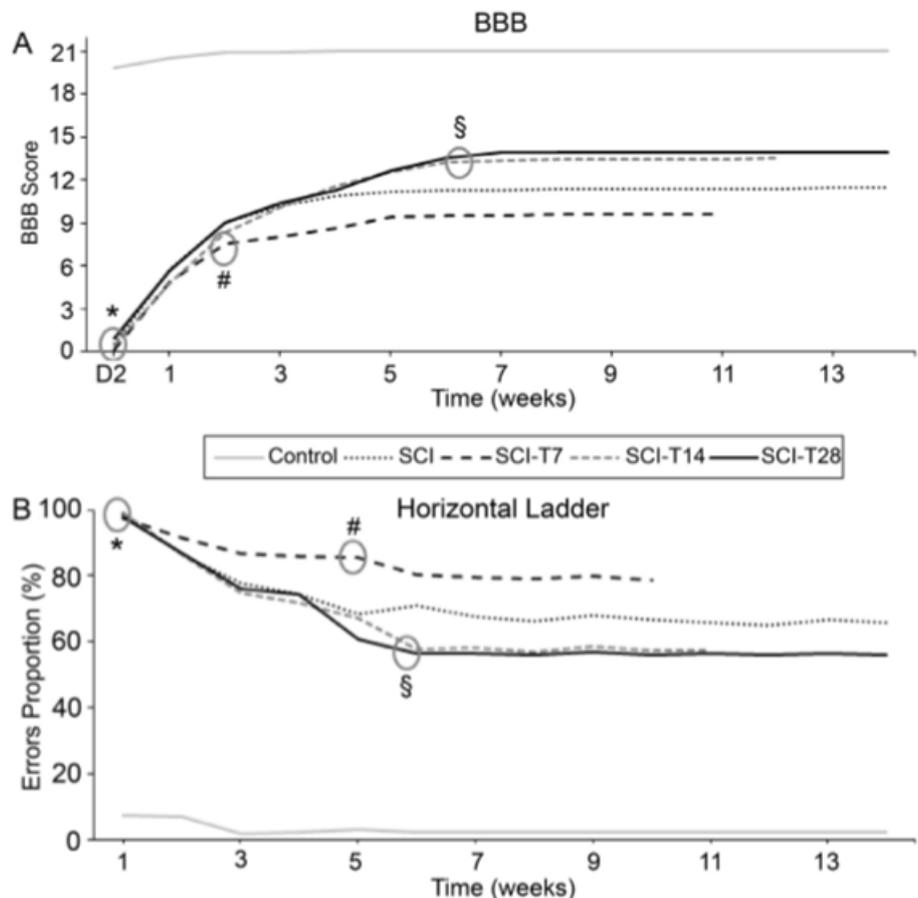


Fig. 2. BBB and horizontal ladder walking behavioral assessment. (A) BBB locomotion scale scores. (B) Assessment of the ability of the hindlimbs to cross the horizontal ladder by the ratio of errors to the number of steps. *Difference compared to the control group. #Difference compared to the SCI group. §Difference from SCI group. Data expressed as mean ± SE.

ume]. The number of motoneurons present 20 μm rostral and 20 μm caudal to injury were quantified separately. In the muscles, the mean CSA value of the right and left muscle areas were considered (μm^2) and, after, the frequency distribution was made. The fibers were defined as “small” or “large” if the CSA was greater than the three standard deviations range from the control group means (Phelan and Gonyea, 1997). Thus, the small fibers of the tibialis anterior were those fibers up to 1000 μm^2 , medium fibers with an area between 1000–2000 μm^2 and large fibers with an area bigger than 2000 μm^2 . In the soleus muscle, the small fibers were those fibers up to 750 μm^2 , medium fibers with an area between 750–1500 μm^2 , and large fibers with an area bigger than 1500 μm^2 . All analysis was made by an investigator blinded to the animals' group allocation.

Western Blot analysis

Forty-eight rats were euthanized by decapitation and the spinal cord and tibialis muscle were obtained for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression quantification. Since no difference was observed in histological analysis, the quantification of BDNF was not performed in the soleus muscles. All analyses were evaluated by an investigator blinded to groups.

Spinal cords and tibialis muscles were homogenized in ice-cold lysis buffer (10 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.6 mM EDTA, 1% NP 40, 150 mM NaCl, 1% Triton-X, sodium deoxycholate (1% for spinal cord and 0.5% for muscles), 1% glycerol and 1% protease inhibitor cocktail pH 7.9). Samples were centrifuged at 12,000 rpm during 30 min (spinal cord) and at 3000 rpm for 10 min (muscle). Equal protein concentration (40 $\mu\text{g}/\text{lane}$ of total protein, using a kit BCA Protein Assay [Thermo Scientific, USA]) were loaded onto NuPAGE® 4–12% Bis-Tris Gels, and transferred (XCell SureLock® Mini-Cell, Invitrogen) to nitrocellulose membranes for

1h45min in transfer buffer (48 mM Trizma, 20% methanol, 39 mM glycine and 0.25% SDS) (Arcego et al., 2016).

Membranes were incubated for 2 h in blocking solution (Tris-buffered saline [TBS; 0.14 M NaCl, 2.4 mM Trizma, pH 7.7] and 5% bovine serum albumin) and then incubated overnight (4 °C) in a blocking solution (dilution 1:1000) with primary antibodies anti-BDNF (Rabbit, Cell Signaling), β -actin (Rabbit, Cell Signaling) and anti-GAPDH (Rabbit, Sigma). Further, blots were washed three times (for 5 min) in Tween-TBS and incubated for 2 h in a solution containing peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Millipore – 402335) diluted 1:1000. Then the blots were washed three times for 5 min with Tween-TBS and once with TBS for 5 min. The chemiluminescence ECL Kit (GE Life Sciences – RPN2109) was used to detect the signal. Immunoblots were quantified by scanning the membranes in ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences – United Kingdom) and optical densities were determined using Image Studio Lite V5.0 (LI-COR Biosciences – US). Results were expressed as the ratio between the intensity of interest protein compared to anti- β -actin (for spinal cords) or anti-GAPDH (muscles) from the same membrane (Nicola et al., 2017).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 21. Data normality was confirmed, as well the equality of variances, thus, allowing for the use of parametric statistical tests. Statistical analysis of behavioral evaluation was performed using repeated-measures analysis of variance (ANOVA) for detecting LT effects over time. Differences among groups were determined using One-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test. Results are expressed as

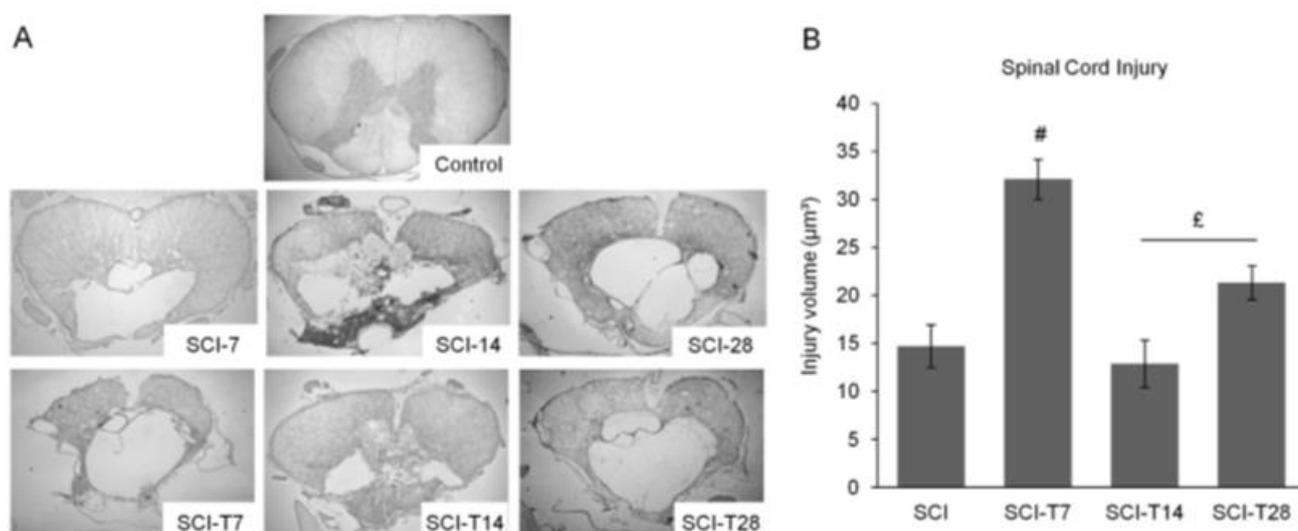


Fig. 3. Spinal cord histological evaluation. (A) Representative photomicrographs of control, SCI (injured animals) and SCI-T (injured trained animals) groups corresponding to the different starting times of treadmill training: 7, 14 or 28 days after injury. (B) Quantification of injury volume in all injured groups. [#]Difference between SCI-T7 and the other SCI groups. [£]Difference of SCI-T14 and SCI-T28 when compared with the SCI-T7 group.

mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Functional response

The functional evaluation (BBB Locomotor rating scale and the Horizontal Ladder) was performed two days before the injury, two days and weekly after injury, until the 11th, 12th or the 14th week. All rats showed normal motor function in BBB scale before the injury. Two days after the injury, all lesion animals presented no hindlimb movements, being different from controls [$F(4,86) = 930.65$, $P < 0.01$]. The difference between injured animals and control group remained throughout the experiment. SCI animals without treadmill training, as expected, demonstrated a spontaneous recovery until the fifth week after lesion [$F(4,86) = 75.10$, $P < 0.01$], reaching a plateau of recovery as from the fifth week (Fig. 2A).

Treadmill training promoted high scores on the BBB scale when started at late time points after contusion. Animals that started training 7 days after the injury, presented the worst result, being significantly lower than the SCI and the other groups from the second week [$F(4,86) = 224.95$, $P < 0.01$]. Animals exposed to the treadmill from the 14th or 28th day, had a score increase on the BBB, presenting significantly better locomotor results than the SCI group from the sixth week after contusion [$F(4,86) = 63.73$, $P < 0.01$].

The assessment of hindlimb ability presented in Fig. 2B shows the ratio between the number of errors and the number of steps given in the Horizontal Ladder. SCI group had higher proportion of errors in comparison to the control group as from the first evaluation after contusion [$F(4,86) = 849.10$, $P < 0.01$]. From the fifth week of evaluation, the SCI-T7 group presented higher proportion of errors and became different from the SCI group, SCI-T14 and SCI-T28 [$F(4,86) = 43.04$, $P < 0.01$]. SCI-T14 and SCI-T28 groups presented better results in the hindlimb ability when compared to others injured animals as from the sixth week [$F(4,86) = 55.15$, $P < 0.01$]. There was no difference between SCI-T14 and SCI-T28 ($P > 0.05$; Fig. 2B).

Lesion volume

The rats that received LT seven days after injury, SCI-T7 group, presented the highest lesion volume when compared to all other injured groups [$F(3,24) = 10.63$, $P < 0.01$]. Both SCI-T14 and SCI-T28 group presented an injury volume similar to the SCI group ($P > 0.05$) and different to SCI-T7. ($P < 0.05$; Fig. 3).

Motoneuron evaluation

Motoneuron quantification in the ventral horn of cephalic-region of the SCI group spinal cords showed a reduced number of neurons in comparison to the control animals [$F(4,28) = 6.01$, $P < 0.01$; Fig. 4B]. The SCI-T7 group presented the smallest number of motoneurons, presenting no difference in relation to the SCI group ($P > 0.05$). SCI-T14 and SCI-T28 groups presented a similar motoneuron number to the control group and more motoneurons when compared to SCI-T7 group

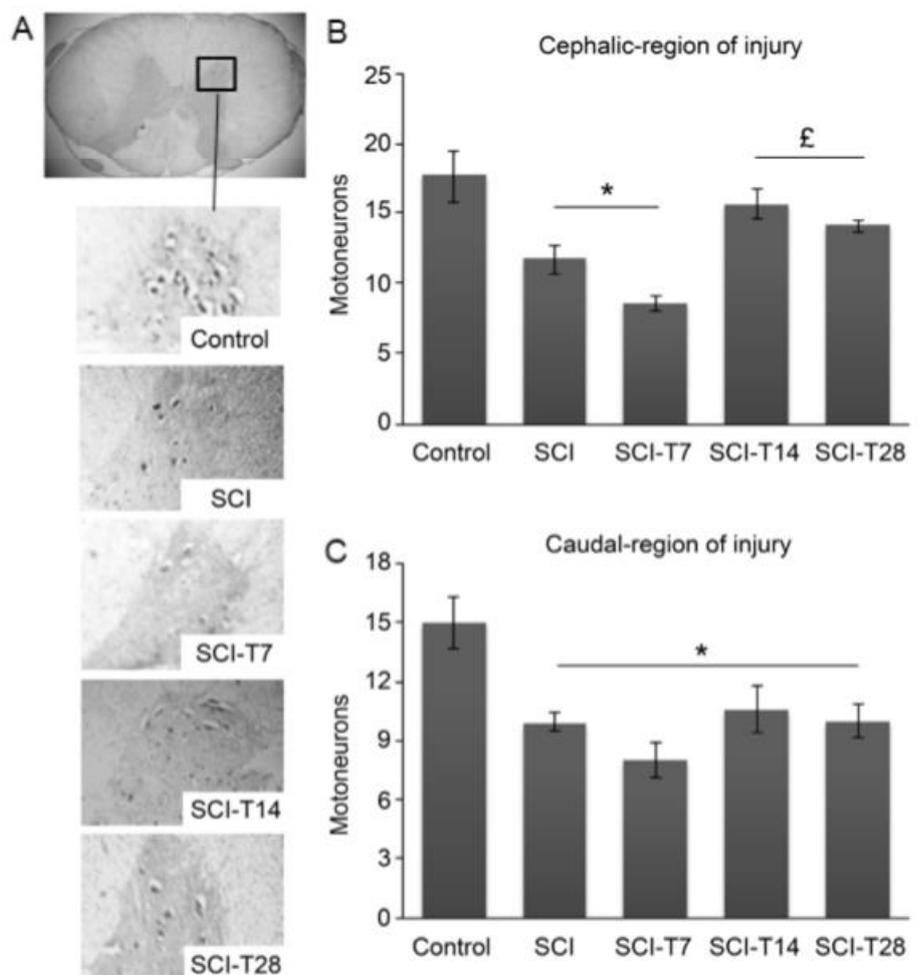


Fig. 4. Motoneuron analysis in the ventral horn of the spinal cord at 20 μ m cephalic and 20 μ m caudal to injury (captured at 5 \times and amplified 200%). (A) Representative photomicrographs of motoneurons in ventral horn of spinal cord at 20 μ m cephalic to injury in all experimental groups. (B) Quantification of the number of motoneurons in the cephalic-region of injury. (C) Quantification of the number of motoneurons in the caudal-region of injury. *Difference from control group. ϵ Difference from SCI-T7 group.

($P < 0.05$); however, no difference was observed in comparison to SCI group ($P > 0.05$). In the caudal-injury region, all injured animals showed significant difference in the number of motoneurons when compared to the control group [$F(4,28) = 5.45$, $P < 0.01$; Fig. 4C]; no difference was observed between injured animals with or without treadmill training ($P > 0.05$).

BDNF expression in the spinal cord

There was no difference in the expression of BDNF assessed by Western Blot in the spinal cord of the experimental groups ($P > 0.05$; Fig. 5).

Muscle atrophy of tibialis anterior and soleus muscles

The mean area analysis of the muscles fibers showed a decrease in the area of tibialis anterior fibers of SCI animals in relation to the control group [$F(4,38) = 16.61$, $P < 0.01$; Fig. 6B]. SCI-T14 remained similar to the SCI group; whereas the SCI-T28 animals presented larger fiber areas in comparison to the SCI. SCI-T14 and SCI-T28 had higher areas in tibialis anterior fibers when compared to the SCI-T7 group.

The ratio of muscle fiber number and the fiber size in the tibialis anterior revealed a higher percentage of small fibers, up to $1000 \mu\text{m}^2$, in the SCI, SCI-T7 and SCI-T14 groups when compared to the control [$F(4,36) = 9.58$, $P < 0.01$; Fig. 6C]. SCI-T28 group presented similar percentage of small fibers in relation to the control group ($P > 0.05$). For medium-sized fibers, between $1000 \mu\text{m}^2$ and $2000 \mu\text{m}^2$; SCI, SCI-T7 and SCI-T14 showed lower proportion of fibers when compared to the

control group [$F(4,36) = 7.31$, $P < 0.01$]. The SCI-T28 group had similar percentage to the control group ($P > 0.05$). In the larger fibers, between $2000 \mu\text{m}^2$ and $3000 \mu\text{m}^2$, all groups with injury had lower percentage of fibers in relation to the control group [$F(4,36) = 7.86$, $P < 0.01$].

No difference was found in the mean area of soleus muscle fibers between the groups [$F(4,37) = 0.78$, $P > 0.05$; Fig. 7B]. However, the ratio between the muscle fiber number and the size of the fibers showed an increase of small fibers (up to $750 \mu\text{m}^2$) in the SCI, SCI-T7 and SCI-T14 groups when compared to the control group [$F(4,37) = 2.95$, $P < 0.05$; Fig. 7C]. SCI-T28 had a similar percentage of small fibers in comparison to the control group ($P > 0.05$). The proportion of soleus medium-sized fibers (750 – $1500 \mu\text{m}^2$) and larger fibers (1500 – $2250 \mu\text{m}^2$) was similar among groups [$F(4,37) = 0.14$, $P > 0.05$ and $F(4,37) = 0.25$, $P > 0.05$, respectively].

BDNF expression in the tibialis anterior muscle

The BDNF expression evaluated in tibialis anterior muscles showed significant difference among groups [$F(4,35) = 3.15$, $P < 0.05$; Fig. 8]. SCI, SCI-T7 and SCI-T14 decreased the BDNF protein expression when compared to the control group ($P < 0.05$). The SCI-T28 group had higher BDNF expression in comparison to other injured groups ($P < 0.05$), having no statistical difference from control group ($P > 0.05$).

DISCUSSION

The present study showed that the benefits of LT on functional recovery following SCI may differ according to the time in which it starts. After the SCI, the early start training worsened the motor function and the lesion volume. Late training promoted functional recovery associated with preservation of motoneurons in the ventral horn of spinal cord, larger muscle fiber area and higher BDNF expression in tibialis anterior muscle. These findings indicate the ideal period to start the LT stimuli after the injury, since the effects are different and dependent on the injury stage.

After SCI, supraspinal control is impaired and the repetitive task practice may facilitate the locomotor recovery (Edgerton et al., 2004; Rossignol et al., 2004; Cha et al., 2007; Battistuzzo et al., 2012; Behrman et al., 2017). Here it was shown that different starting points result in different functional response after the injury. SCI animals exposed to early LT showed worse hindlimb ability, whereas the animals exposed to late-onset LT had better functional performance. Spontaneous recovery is observed in both clinical (Steeves et al., 2011) and experimental studies (Gensel et al., 2006; Hilton et al., 2013) as a consequence of an incomplete lesion. The influence of therapeutic stimuli on the spontaneous recovery is not clear. The SCI-T7 started the stimulus with less spontaneous functional recovery than the SCI-T14 and SCI-T28 groups, which may have impaired the beneficial effect of LT in this group. In addition, previous studies indicate that training periods should be longer, in some

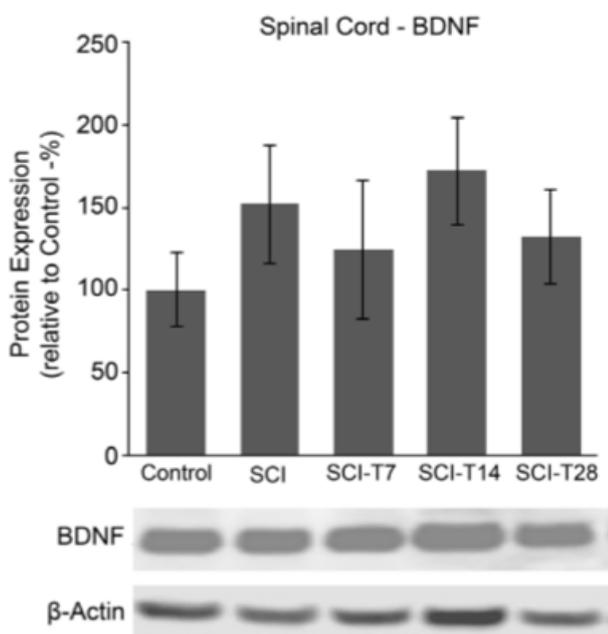


Fig. 5. Western Blot analysis of brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the spinal cord and representative images of BDNF and β -Actin. No differences were found between groups.

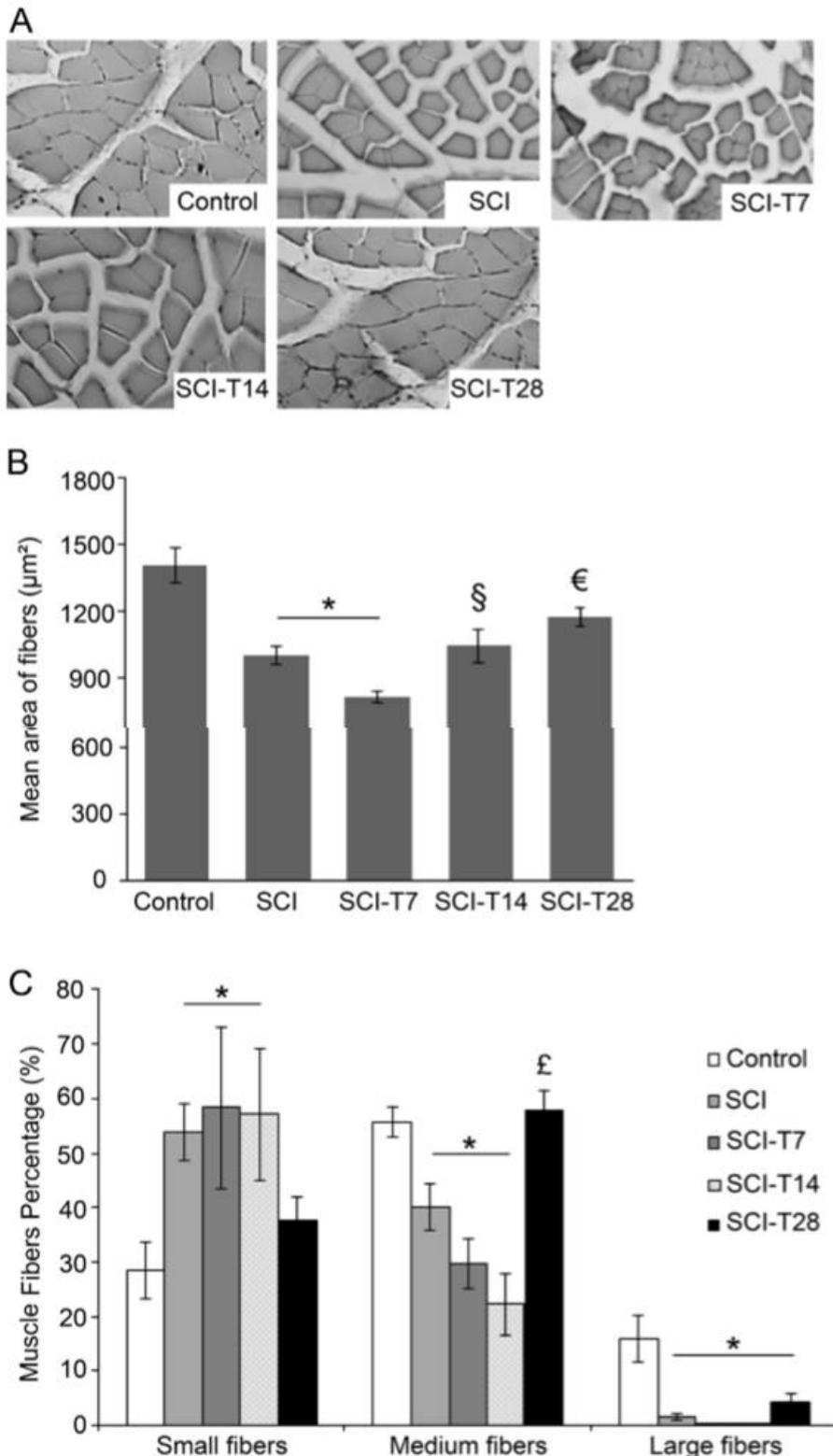


Fig. 6. Tibialis anterior muscle analysis. (A) Representative photomicrographs of tibialis anterior muscle in all experimental groups. (B) Quantification of the mean CSA of the tibialis anterior fibers. (C) Frequency histograms of tibialis anterior fiber CSA. *Different from control group. §Difference of SCI-T14 in comparison with the SCI-T7 and control groups. €Difference of SCI-T28 when compared with control, SCI and SCI-T7. £SCI-T28 significantly different from other injured animals.

cases more than 9 weeks, in order to enhance the behavioral recovery (Battistuzzo et al., 2016; Battistuzzo et al., 2017). Besides, the literature suggests that more than 12 weeks of training are necessary to regenerate some corticospinal synapses (Bareyre et al., 2004). In this way, the animals with early training might have had not enough time to show functional improvement and more weeks of treadmill treatment would be needed. However, all injured animals reached a plateau of results in the behavioral evaluations during the experiment, including the animals with early training. This indicates that more weeks of training would probably not increase the functional recovery.

Several studies have reported beneficial effects of LT after SCI, both in human (Brazg et al., 2017; Morrison et al., 2018) and in experimental subjects (Moshonkina et al., 2004; Boyce et al., 2007; Goldshmit et al., 2008). However, some experimental studies showed that LT could not influence (Li et al., 2013; Nicola et al., 2016; Battistuzzo et al., 2016) or may even impair recovery (Fouad et al., 2000; Lee et al., 2010; Kubasak et al., 2008), as observed in the functional results presented here. These controversial results suggest that factors such as the different training start time after the lesion, as well as the LT protocol may be influencing in the SCI individual's recovery.

The establishment of early therapeutic protocol of LT, within 7 days after injury, is a similar point in most studies reporting negative effects on locomotor function (Fouad et al., 2000; Nothias et al., 2005; Erschbamer et al., 2006; Smith et al., 2009; Ung et al., 2010). During the first days after lesion, the spinal cord tissue presents an intense immune response mediated by macrophage/microglia, triggering the phagocytosis and the release of cytokines (Ufuk et al., 2005; Rowland et al., 2008; Ankeny and Popovich, 2009; Ward et al., 2014; Ahuja et al., 2016; Sámano and

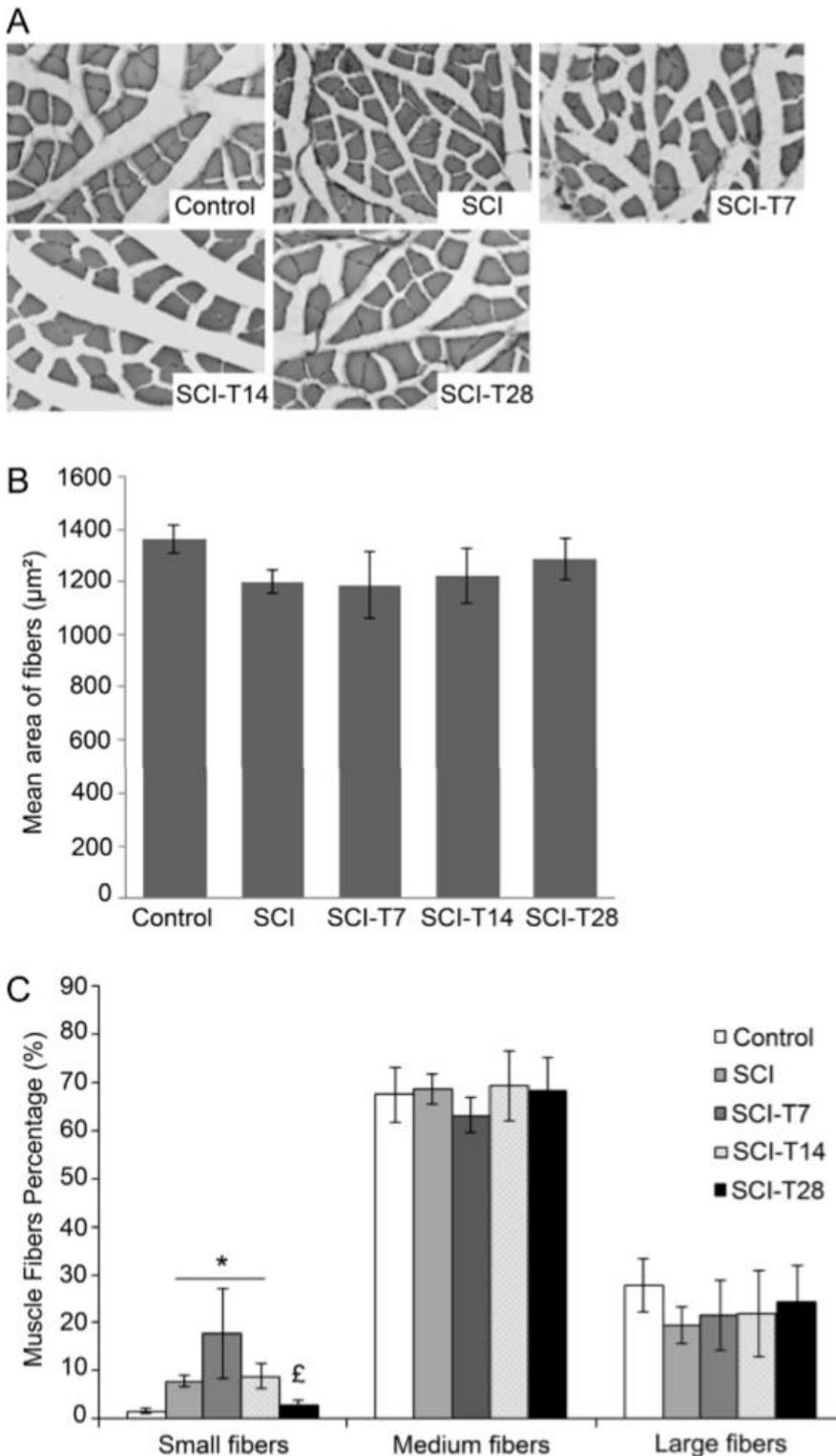


Fig. 7. Soleus muscle histological analysis. (A) Representative photomicrographs of soleus muscle in all experimental groups. (B) Quantification of the mean soleus fibers CSA. (C) Frequency histograms of soleus fiber CSA. *Difference vs. control group. [£]Difference between SCI-T28 and SCI-T7 groups.

Nistri, 2017). The exercise, a pro-inflammatory stimulus, combined with a period where there is a high release of excitatory and toxic substances in the injured tissue,

can increase the tissue damage process (Risedal et al., 1999). These previous reports are in agreement with the increased tissue damaged visualized in the spinal cord of animals trained early after injury, SCI-T7. As consequence, there was a worsening of the functional activity of these SCI-T7 animals.

The loss of specialized cells is associated with increased injury in the spinal cord, i.e., the tissue preservation in the spinal cord favors the cell survival (Casella et al., 2006; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Animals with early intervention had increased tissue damaged in spinal cord and presented smaller number of motoneurons when compared to the late training group. After SCI, cell death is expected (Collazos-Castro et al., 2005; Gensel et al., 2006; Grumbles and Thomas, 2017) and occurs by necrosis and apoptosis, especially in the first hours and days after injury (Beattie et al., 2000; Grossman et al., 2001; Nicola et al., 2017). The number of motoneurons in rats with early training was not significantly lower than in the SCI group; however the early starting time of LT coincided with the 7-day peak of inflammatory cells entry from the peripheral system (Beattie et al., 2000; Grossman et al., 2001; Casella et al., 2006). The early training may have potentiated the entry of these cells and contributed to increase the inflammatory reaction and to prevent the tissue recovery. Late LT groups showed similar number of motor neurons compared to the control group, indicating less cells loss, as observed by Wu et al. (2016). It is important to state that they found this protective effect in the injury caudal region, not evaluating the cephalic region that is the most affected. This motoneuron preservation at late stages, in which the apoptosis is still noticed (Hulsebosch, 2002), could be the LT contribution to the normalization of motoneuron electrophysiological properties after the SCI (Cote et al., 2003) and could be related

with better locomotor ability (Nicola et al., 2017). These results help to understand the effects of early and late

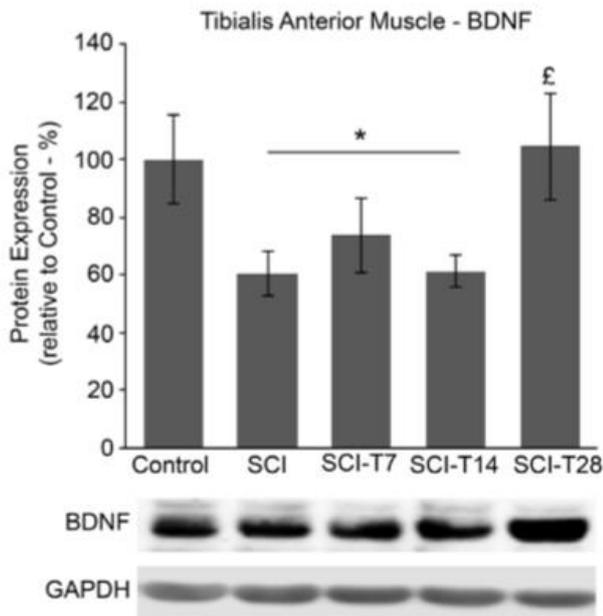


Fig. 8. Western Blotting analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the tibialis anterior muscle and representative images of BDNF and GAPDH. [†]Difference compared to the control. [‡]Difference between SCI-T28 and the other injured groups.

locomotor therapy over spinal cord tissue and neuronal protection.

Allied to the functional deficits and central nervous system impairments, secondary changes in skeletal muscles distally to injury, as morphological and metabolic adaptations, are expected in the injured animals (Hutchinson et al., 2001; Gregory et al., 2003). Treadmill training is one way of reducing muscle atrophy by exercising (Battistuzzo et al., 2017). Animals exposed to late locomotor stimulus had larger fiber areas in tibialis anterior muscle in comparison to those with early training; this finding confirms that LT can accelerate CSA muscle recovery (Giangregorio et al., 2005; Gorassini et al., 2009), except when the animals had an early start of treadmill training (Battistuzzo et al., 2017). Early training was not able to prevent muscle atrophy, an effect probably due to a lower number of motoneurons in the ventral horn of the spinal cord.

No difference was observed in the CSA soleus muscle (Fig. 7). This could be related to early recovery observed in this muscle. Studies show that, when early evaluated, the soleus muscle show marked atrophy (Zeman et al., 2009; Liu et al., 2010). This atrophy is more evident in plantiflexor than in dorsiflexor muscles (such as the tibialis anterior), probably due to its antigravity role in rats (Dupont-Versteegden et al., 1998). It is possible that the muscle atrophy in the soleus decreases around the fourth and fifth week after the injury, while spontaneous recovery occurs (Hutchinson et al., 2001). A greater neuromuscular activity observed in the direction of the plantiflexor compared to the dorsiflexor muscles, probably contributed to earlier recovery in this muscular group.

Skeletal muscles submitted to locomotor stimulus present higher expression of neurotrophic factors

(Gomez-Pinilla et al., 2001); more evident during the initial phase of training and less evident in later periods (Liu et al., 2006). In our study, BDNF showed significant increase when compared to controls in a late analysis, in the tibialis anterior muscle. Exercise can induce the potentiation of spontaneous myocytes twitching, increasing the muscle contraction and the maintenance of neuromuscular connectivity (Bamber et al., 2001). Besides, BDNF can be retrograde transported into the spinal cord, which may be influencing the activity-related neuronal regenerative response after the injury (Martinez et al., 2013; West et al., 2014). This protection may have contributed to the maintenance of motoneurons in the spinal cord of the injured animals with late training and, consequently, induced better function.

CONCLUSION

Treadmill training promotes time-dependent functional recovery after experimental spinal cord contusion. While late locomotor stimulus caused better results in the hindlimb function of SCI animals, early training produced worsening in relation to injured animals without treadmill training. The present study provides evidence that treadmill training presents a critical starting time phase after the injury, which should be respected in future studies. There are many other concerns around the LT that should be explained; therefore, further studies are needed to understand the mechanisms involved in the positive and negative effects of LT protocols, in the initial and late phases after lesion.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Márcia Rossato Marques and Fabrício de Couto Nicola contributed to the definition of the paper aims, experimental design, project writing and submission for the Ethics Committee approval; besides, animal handling, surgical procedures, behavioral tests, euthanasia, histological and biochemical analyses, intellectual production and article writing.

Eduardo Sanches participated in the stages of the work objective definition, project writing, animal handling, surgical procedures, behavioral tests, euthanasia, histological and biochemical analyses, intellectual production and article writing.

Luz Elena Durán-Carabali contributed with the stages that involved the animal handling and surgical procedures, behavioral tests, euthanasia, histological and biochemical analyses and article writing.

Dirceu Aristimunha participated in the stages that involved the animal handling and surgical procedures, behavioral tests, euthanasia, histological and article writing.

The authors Danusa Mar Arcego and Carla Dalmaz participated in the stages that involved the biochemical analyses, intellectual production and article writing.

Carlos Alexandre Netto contributed to all the previously mentioned stages, guiding and coordinating their execution.

REFERENCES

- Ahuja CS, Martin AR, Fehlings M (2016) Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000 Res* 5:1–13.
- Ankeny DP, Popovich PG (2009) B cells produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. *J Clin Invest* 119(10):2990–2999.
- Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Toniazzo AP, Berlitz C, Lazzaretti C, Schimitz F, Rodrigues AF, Wyse ATS, Dalmaz C (2016) Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: interplay of these factors changes these effects. *Int J Devl Neurosci* 50:16–25.
- Bamber NL, Li H, Lu X, OUdega M, Aebischer P, Xu XM (2001) Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded minichannels. *Eur J Neurosci* 13:257–268.
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME (2004) The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci* 7(3):269–277.
- Battistuzzo CR, Callister RJ, Callister R, Galea MP (2012) A systematic review of exercise training to promote locomotor recovery in animals models of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 29(8):1600–1613.
- Battistuzzo CR, Rank MM, Flynn JR, Morgan DL, Callister R, Callister RJ, Galea MP (2017) Effects of treadmill training on hindlimb muscles of spinal cord-injured mice. *Muscle Nerve* 55(2):232–242.
- Battistuzzo CR, Rank MM, Flynn JR, Morgan DL, Callister R, Callister RJ, Galea MP (2016) Gait recovery following spinal cord injury in mice: Limited effect of treadmill training. *J S Cord Med* 39(3):335–343.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1–21.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol* 139:244–256.
- Beattie MS, Li Q, Bresnahan JC (2000) Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury. *Prog Brain Res* 128:9–21.
- Behrman AL, Ardolino EM, Harkema SJ (2017) Activity-based therapy: from basic science to clinical application for recovery after spinal cord injury. *J Neurol Phys Ther* 41(3):S39–S45.
- Biering-Sorensen B, Kristensen IB, Kjaer M, Biering-Sorensen F (2009) Muscle after spinal cord injury. *Muscle Nerve* 40:499–519.
- 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.
- Brazg G, Fahey M, Holleran CL, Connolly M, Woodward J, Hennessy PW, Schmit BD, Homby TG (2017) Effects of training intensity on locomotor performance in individuals with chronic spinal cord injury: a randomized crossover study. *Neurorehabil Neural Repair* 31(10–11):944–954.
- Casella GTB, Bunge MB, Wood PM (2006) Endothelial cell loss is not a major cause of neuronal and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Exp Neurol* 201(1):8–20.
- Cha J, Heng C, Reinkensmeyer DJ, Roy RR, Edgerton VR, De Leon RD (2007) Locomotor ability in spinal rats is dependent on the amount of activity imposed on the hindlimbs during treadmill training. *J Neurotrauma* 24:1000–1012.
- Chen Y, Chen XY, Jakeman LB, Chen L, Stokes BT, Wolpaw JR (2006) Operant conditioning of H-Reflex can correct a locomotor abnormality after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 26(48):12537–12543.
- Collazos-Castro JE, Soto VM, Gutiérrez-Dávila M, Nieto-Sampedro M (2005) Motoneuron loss associated with chronic locomotion impairments after spinal cord contusion in the rat. *J Neurotrauma* 22(5):544–558.
- Cote MP, Menard A, Gossard JP (2003) Spinal cats on the treadmill: changes in load pathways. *J Neurosci* 23:2789–2796.
- De Leon RD, Acosta CN (2006) Effect of robotic-assisted treadmill training and chronic quipazine treatment on hindlimb stepping in spinally transected rats. *J Neurotrauma* 23:1147–1163.
- Dupont-Versteegden EE, Houle JD, Gurley CM, Peterson CA (1998) Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol* 275:C1124–C1133.
- Edgerton VR, Tillakaratne NJK, Bigbee AJ, de Leon RD, Roy RR (2004) Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annu Rev Neurosci* 27:145–167.
- Erschbamer MK, Pham TM, Zwart MC, Baumans V, Olson L (2006) Neither environmental enrichment nor voluntary wheel running enhances recovery from incomplete spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 201:154–164.
- Fouad K, Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME (2000) Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behav. Brain Res* 115:107–113.
- Gensel JC, Tovar A, Hamers FPT, Deibert RJ, Beattie MS, Bresnahan JC (2006) Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *J Neurotrauma* 23(1):36–54.
- Giangregorio LM, Hicks AL, Webber CE, Phillips SM, Craven BC, Bugaresti JM, McCartney N (2005) Body weight supported treadmill training in acute spinal cord injury: impact on muscle and bone. *Spinal Cord* 43:649–657.
- Goldshmit Y, Lythgo N, Galea MP, Tumley AM (2008) Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery. *J Neurotraum* 25(5):449–465.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR (2001) Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci* 13:1078–1084.
- Gorassini MA, Norton JA, Nevett-Duchcherer J, Roy FD, Yang JF (2009) Changes in locomotor muscle activity after treadmill training in subjects with incomplete spinal cord injury. *J Neurophysiol* 101:969–979.
- Gregory CM, Vandenborne K, Castro MJ, Dudley GA (2003) Human and rat skeletal muscle adaptations to spinal cord injury. *Can J Appl Physiol* 28:537–544.
- Grumbles RM, Thomas CK (2017) Motoneuron death after human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 34(3):581–590.
- Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR (2001) Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 168:273–282.
- Hilton BJ, Assinck P, Duncan GJ, Lu D, Lo S, Tetzlaff W (2013) Dorsolateral funiculus lesioning of the mouse cervical spinal cord at C4 but not at C6 results in sustained forelimb motor deficits. *J Neurotrauma* 30:1070–1083.
- Hutchinson KJ, Linderman JK, Basso DM (2001) Skeletal muscle adaptations following spinal cord contusion injury in rat and the

- relationship to locomotor function: a time course study. *J Neurotrauma* 18:1075–1089.
- Hulsebosch CE (2002) Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ* 26(4):238–255.
- Jayaraman A, Gregory CM, Bowden M, Stevens JE, Shah P, Behrman AL, Vandenbome K (2005) Lower extremity skeletal muscle function in persons with incomplete spinal cord injury. *Spinal Cord* 44(11):680–687.
- Kubasak MD, Jindrich DL, Zhong H, Takeoka A, McFarland KC, Munoz-Quiles C, Roy RR, Edgerton VR, Ramon-Cueto A, Phelps RE (2008) OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain* 131:264–276.
- Lee YS, Zduunowski S, Edgerton VR, Roy RR, Zhong H, Hsiao I, Lin VW (2010) Improvement of gait patterns in step-trained, complete spinal cord-transected rats treated with a peripheral nerve graft and acidic fibroblast growth factor. *Exp Neurol* 224:429–437.
- Li WT, Zhang XY, Xue H, Ni CP, Wang EG, An LB (2013) Comparison of three different time points of starting treadmill training in spinal cord injured rats. *Dev Neurorehabil* 16(6):382–390.
- Liu M, Bose P, Walter GA, Anderson DK, Thompson FJ, Vandenbome K (2006) Changes in muscle T2 relaxation properties following spinal cord injury and locomotor training. *Eur J Appl Physiol* 97:355–361.
- Liu M, Stevens-Lapsley JE, Jayaraman A, Ye F, Conover C, Walter GA, Bose P, Thompson FJ, Borst SE, Vandenbome K (2010). *Eur J Appl Physiol* 109:709–720.
- Maegele M, Muller S, Wernig A, Edgerton VR, Harkema SJ (2002) Recruitment of spinal motor pools during voluntary movements versus stepping after human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 19:1217–1229.
- Martinez M, Delivet-Mongrain H, Rossignol S (2013) Treadmill training promotes spinal changes leading to locomotor recovery after partial spinal cord injury in cats. *J Neurophysiol* 109:2909–2922.
- Metz GA, Whishaw IQ (2002) Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing and co-ordination. *J Neurosci Methods* 115(2):169–179.
- Moshonkina TR, Gilerovich EG, Fedorova EA, Avelov VD, Gerasimenko YP, Otellin VA (2004) Morphofunctional basis for recovery of locomotor movements in rats with completely crossed spinal cord. *Bull Exp Biol Med* 138(2):198–201.
- Morrison SA, Lorenz D, Eskay CP, Forrest GF, Basso DM (2018) Longitudinal Recovery and Reduced Costs after 120 Sessions of Locomotor Training for Motor Incomplete Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil* 99(3):555–562.
- Nicola FC, Rodrigues LP, Crestani T, Quintiliano K, Sanches EF, Willborn S, Aristimunha D, Boisserand L, Pranke P, Netto CA (2016) Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. *Braz J Med Biol Res* 115(2):169–179.
- Nicola FC, Marques MR, Odorczyk F, Arcego DM, Petenuzzo L, Aristimunha D, Vizuete A, Sanches EF, Pereira DP, Maurmann N, Dalmaz C, Pranke P, Netto CA (2017) Neuroprotective effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res* 1663:95–105.
- Nothias JM, Mitsui T, Shumsky JS, Fischer I, Antonacci MD, Murray M (2005) Combined effects of neurotrophin secreting transplants, exercise, and serotonergic drug challenge improve function in spinal rats. *Neurorehabil Neural Repair* 19:296–312.
- Noble LJ, Wrathall JR (1985) Spinal cord contusion in the rat: morphometric analysis of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol* 88(1):135–149.
- Otis JS, Roy RR, Edgerton VR, Talmadge RJ (2004) Adaptations in metabolic capacity of rat soleus after paralysis. *J Appl Physiol* 96:584–596.
- Phelan JN, Gonyea WJ (1997) Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247(2):179–188.
- Risedal A, Zeng J, Johansson BB (1999) Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:997–1003.
- Rossignol S, Brustein E, Bouyer L, Barthélemy D, Langlet C, Leblond H (2004) Adaptive changes of locomotion after central and peripheral lesions. *Can J Physiol Pharmacol* 82(8–9):617–627.
- Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG (2008) Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus* 25:1–17.
- Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, Tauchi R, et al. (2012) Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* 122:80–90.
- Sámano C, Nistri A (2017) Mechanism of neuroprotection against experimental spinal cord injury by riluzole or methylprednisolone. *Neurochem Res*:1–17.
- Schin HY, Kim H, Kwon DH, Lee K, Kim BG (2014) Molecular and cellular changes in the lumbar spinal cord following thoracic injury: regulation by treadmill locomotor training. *PLoS One* 9(2) e88215.
- Smith RR, Brown EH, Shum-Siu A, Whelan A, Burke DA, Benton RL, Magnusson DSK (2009) Swim training initiated acutely after spinal cord injury is ineffective and induces extravasation in and around the epicenter. *J Neurotrauma* 26:1017–1027.
- Steeves JD, Kramer JK, Fawcett JW, Cragg J, Lammertse DP, Blight AR, Marino RJ, Ditunno JF, Coleman WP, Geisler FH, Guest J, Jones L, Burns S, Schubert M, van Hedel HJ, Curt A (2011) Extent of spontaneous motor recovery after traumatic cervical sensorimotor complete spinal cord injury. *Spinal Cord* 49:257–265.
- Taghipour Z, Karbalaie K, Kiani A, Niapour A, Bahramian H, Nasr-Esfahani MH, et al. (2012) Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev* 21:1794–1802.
- Timoszyk WK, Nessler JA, Acosta C, Roy RR, Edgerton VR, Reinkensmeyer DJ, de Leon R (2005) Hindlimb loading determines stepping quantity and quality following spinal cord transection. *Brain Res* 1050:180–189.
- Thoenen H (1991) The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 14(5):165–170.
- Ufuk T, Ganesh S, Sigurd B (2005) Spine cord injury: an update. *Semin Spine Surg* 17:73–83.
- Ung RV, Lapointe NP, Rouleau P, Guertin PA (2010) Non-assisted treadmill training does not improve motor recovery and body composition in spinal cord-transected mice. *Spinal Cord* 48:750–755.
- Voytik SL, Przyborski M, Badyak SF, Konieczny SF (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev Dyn* 198:214–224.
- Wang H, Liu NK, Zhang YP, Deng L, Lu QB, Shields CB, Walker MJ, Li J, Xu XM (2015) Treadmill training induced lumbar motoneuron dendritic plasticity and behavior recovery in adult rats after a thoracic contusive spinal cord injury. *Exp Neurol* 271:368–378.
- Ward RE, Huang W, Kostusiak M, Pallier PN, Michael-Titus AT, Priestley JV (2014) A characterization of white matter pathology following spinal cord compression injury in the rat. *Neuroscience* 260:227–239.
- West CR, Taylor BJ, Campbell IG, Romer LM (2014) Effects of inspiratory muscle training on exercise responses in Paralympic athletes with cervical spinal cord injury. *Scand J Med Sci Sports* 24:764–772.
- Wirz M, Colombo G, Dietz V (2001) Longterm effects of locomotor training in spinal man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:93–96.

Wu Q, Cao Y, Dong C, Wang H, Wang Q, Tong W, Li X, Shan C, Wang T (2016) Neuromuscular interaction is required for neurotrophins-mediated locomotor recovery following treadmill training in rat spinal cord injury. *Peer J* 4 e2025.

Zaccagnini G, Martelli F, Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, Nicoletti C, Biblioli P, Pelicci PG, Capogrossi MC (2007) p66SHcA and oxidative stress modulate myogenic differentiation and

skeletal muscle regeneration after hind limb ischemia. *J Biol Chem* 282:31453–31459.

Zeman RJ, Zhao J, Zhang Y, Zhao W, Wen X, Wu Y, Pan J, Bauman WA, Cardozo C (2009) Differential skeletal muscle gene expression after upper or lower motor neuron transection. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 458:525–535.

(Received 22 January 2018, Accepted 29 August 2018)
(Available online xxxx)

4.2 *Capítulo II – Primeira versão do artigo a ser submetido para a revista Journal of Neurotrauma (ISSN: 0897-7151):*

Early locomotor training promotes functional impairment and exacerbates neuronal death after spinal cord contusion in rats

Early locomotor training promotes functional impairment and exacerbates neuronal death after spinal cord contusion in rats

Marques MR^{a,c}, Nicola FC^{a,c}, Sanches EF^c, Durán-Carabali LE^{b,c}, Aristimunha D^c, Odorcyk, F^{b,c}, Netto CA^{a,b,c}

^a Post-Graduation Program of Neurosciences, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Post-Graduation Program of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Cerebral Ischemia and Neuroprotection Laboratory, Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Marília Rossato Marques, MSc

Ischemia and Neuroprotection Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rua Ramiro Barcelos 2600, anexo. CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 33085568

E-mail address: mariliarm@yahoo.com.br

Abstract

Introduction: Locomotor training (LT) has been investigated as a treatment for the spinal cord injury (SCI) in order to activate spinal cord plasticity contributing to the locomotor function recovery. However the literature reports some negative effects over the functional recovery after early training. The initiation period of LT following SCI seems to be an important variable in this therapy. To investigate the functional effects of early LT after SCI, injured rats initiated the LT 7 days after injury and were evaluated early and late.

Methods: Wistar rats were randomly divided into groups: control, SCI (rats with spinal cord contusion), and SCI group exposed to LT starting 7 days after the injury (SCI-T7). LT was performed on a treadmill, five days a week, 20 minutes per day, for ten weeks. 6h after the first day of training, some rats were submitted to euthanasia and the neuronal survival, the neurons mitochondrial mass and the presence of macrophages in the spinal cord injury region were evaluated. The other animals were kept performing LT and the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale was used to evaluate the motor function. At the end of the training protocol, animals were submitted to euthanasia and morphological analysis of the spinal cords was performed. **Results:** SCI-T7 showed a significant neuronal reduction, while had an increase in the number of neurons in apoptosis and in the number of microglia/macrophages in the spinal cord. After the LT protocol, SCI-T7 had a higher lesion volume and a worse locomotor performance. These results demonstrate a critical LT starting time after the injury, contributing to a greater understanding of the effects of LT on rehabilitation after spinal cord injury.

Keywords: spinal cord injury (SCI); early therapy; treadmill training, therapeutic window, locomotor impairment, neuronal death.

INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) is a devastating disorder resulting in incapacitating impairments. The disconnection between axons and neuronal cells leads to functional deficits, such as the loss of voluntary movements and decreased sensibility (Hagen et al, 2012; Norton, 2010). The primary injury is characterized by immediate cell death, hemorrhage, membrane disruption and local circulation impairment (Fawcett, Asher, 1999; Hausmann, 2003; Yune et al, 2003). In a second moment, a variety of pathologic events are triggered: glial activation (Hausmann, 2003), leukocyte infiltration (Fleming et al, 2006; Hausmann, 2003; Popovich et al, 1997, Sroga et al, 2003), necrosis (Ducker et al., 1971), free radical formation (Anderson et al., 1985; Braughler and Hall, 1989), glutamate-mediated excitotoxicity (Dorsett et al., 2016), edema (Ge et al., 2013), apoptosis (Liu et al., 2015; Nicola et al, 2018) and formation of cystic cavities (Bresnahan et al, 1991). Consequently, prolonged cell death occurs and a large number of neurons are lost (Lee, Thumbikat, 2015; Nicola et al, 2018; Rowland et al., 2008; Sadowsky et al., 2002).

Non-pharmacological therapies such as locomotor training (LT) are used in order to activate spinal cord plasticity contributing to the locomotor function recovery after SCI even after severe lesions (Battistuzzo et al, 2012; Chen et al, 2006; Edgerton et al, 2004; Goldshmit et al, 2008; Maegele et al, 2002; Rossignol et al, 2004; Wirz et al, 2001). However, although studies show positive effects, some data using SCI in rats have shown that LT intervention may have limited functional benefits (Battistuzzo et al, 2016; De Leon et al, 2006; Fouad et al, 2000; Lee et al, 2010; Timoszyk et al, 2005) or even negative effects on injury recovery (De Leon et al, 2006; Lee et al, 2010; Marques et al, 2018; Timoszyk et al, 2005), depending on the different LT starting periods seem to be related to such detrimental results (Marques et al, 2018). Thus, early LT starting time in a critical period after SCI could lead to the functional worsening.

The clinical relevance of LT on SCI treatment and its controversial results highlight the importance of understanding the functional effects of early treadmill training and by which pathways these effects act following injury. In order to understand the early effects of LT, the present study aims to evaluate the locomotor function, the neuronal survival, the neurons mitochondrial mass and the presence of macrophages in the spinal cord injury region 6 hours after early LT following SCI.

The working hypothesis is that the early treadmill training after the SCI would facilitate neuronal death, tissue loss and cause functional recovery impairment, and that is related to the immune cells presence in the spinal cord tissue after the injury.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experimental design

Adult male Wistar rats (8 weeks old, 285-305g) were used. They had free access to food and water and were maintained in a controlled temperature ($22\pm 2^\circ$ C) room with 12h light/dark cycle. All procedures were in accordance with current international laws and policies (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication n° 85–23, 1985, revised 1996) and with the Arouca Brazilian Law for animal care and ethical use of animals. The study was approved by UFRGS Ethics Committee (28088). All efforts were made in order to reduce the number of animals and to minimize animal suffering. The Figure 1 shows the experimental design.

Animals were randomly divided into three groups: control (constituted by naive animals, rats not exposed to any surgical procedure or treatment, n=11; and sham rats, surgical control animals submitted to laminectomy surgery without spinal cord injury, n=9), spinal cord injury group (animals that underwent laminectomy and spinal cord injury, n=23) and spinal cord injury group receiving locomotor training (SCI-T7, n = 19). A total of 62 animals were used.

Animals

Surgical procedures

Rats were intraperitoneally anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After a 2.5cm incision in the animal's back, the spinous process and vertebral lamina were removed and the medulla region at T10 spinal level was exposed (Noble and Wrathall, 1985). The New York University (NYU) Impactor System was used to make an incomplete spinal cord injury (Nicola et al, 2016). A moderate injury was made with the device rod (10g)

dropped from a distance of 25 mm onto the intact exposed dura mater (Beattie and Bresnahan, 1995). Regular bladder emptying and antibiotic treatment (Trimethoprim, 0.85 mg/kg) were included in the postoperative care (Wu et al, 2016).

Locomotor training (LT)

For adaptation to the locomotor training, one week before the surgery all rats ran on the treadmill at 10m/min, for five minutes. According to the experimental group, after the surgery, the rats were placed in the treadmill for five sessions a week, during 20 minutes/day, with a total training period of ten weeks. The initial speed was 6m/min, and gradually it was increased to 11.5m/min over the course of training (Fouad et al, 2000).

Locomotor assessment

Two days before the injury all animals were submitted to locomotor evaluation using Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scale (BBB scale; Basso, Beattie and Bresnahan, 1995). Following injury, rats were submitted to the same evaluation at the second post-operative day and weekly throughout the experiments. The evaluation was assessed with the rats kept individually in a circular open field (100 cm diameter) and allowed to move freely for 5 minutes. Locomotor activity assessment was run by an investigator blind to the animals' group allocation.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry was run six hours after the first day of treadmill training in order to evaluate the number of neurons, caspase-3, and microglia in spinal cord tissue. For the analysis, some animals from each experimental group were euthanized by decapitation (Control n=8; SCI n=10; SCI-T7 n=8) and the spinal cord was obtained. Spinal cords were dissociated with Trypsin/PBS (0.006 g/mL) (Sigma-Aldrich – T2600000), and the cells were permeabilized with 0.1% PBS Triton X-100 (Tx) for 10min at room temperature and blocked for 15 min with 3% normal goat serum (Sigma-Aldrich – G9023), at a final concentration of 1:100, at room

temperature for 2h. The cells were incubated for 1h with primary antibodies, against neuron NeuN (Mouse, Sigma Aldrich - M4403) and macrophage/microglia (Mouse, Millipore - CBL1512). For assessing neuronal apoptosis, the cells were double labeled with NeuN (Mouse, Sigma Aldrich - M4403) and cleaved caspase 3 (Rabbit, Cell Signalling - #9661). The final concentration was 1:100. After, the cells were washed twice with PBS and incubated for 1hour with IgG antibody Alexa-fluor 488 anti-mouse and IgG antibody 633 anti-rabbit in a concentration of 1:200. Negative controls were included for set up the machine voltages and to determine the negative region of the dot plot. The emission of fluorochrome was recorded through a specific band-pass fluorescence filter: green (FL-1; 488 nm long pass). Fluorescence emission was collected using logarithmic amplification. Data from 10,000 events (intact cells) were acquired, and the number of cells was determined after exclusion of debris events from the dataset. The number of cells in each quadrant was computed, and cells stained separately were expressed as the percentage of positive immune labeled cells (Heimfarth et al, 2013). All flow cytometric acquisitions and analyses were performed using FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA) and Flow Jo Software v10.1 (Weis et al, 2012). An investigator blinded to groups evaluated all analysis.

Histological and morphometric analysis

At the end of the locomotor training, rats were deeply anesthetized with sodium thiopental (50mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil) and injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil). Rats were euthanized (Control n=12; SCI n=13; SCI-T7 n=11) by transcardiac perfusion with saline solution, followed by 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) diluted in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Spinal cords (segments between T8 and T10 levels) were dissected for histological and morphometrical analysis and post-fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. The segments were cryoprotected by immersion in 30% sucrose (Synth, Brazil) in phosphate buffer at 4°C and frozen in isopentane (Merck, Germany) cooled in liquid nitrogen. After, transversal sections (20 µm) were cut using a cryostat (CM1850, Leica, Germany) and stained with hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich. St Louis. MO. USA) (Zaccagnini et al, 2007). Images were captured and digitalized (initially 20x and amplified 100% for analysis). The lesion area and the area of intact tissue were measured by an

investigator blinded to the animals` group allocation using Image Pro Plus Software and multiplied by the distance between sections (100µm) to obtain the volume of the lesion and the intact tissue volumes. The lesion volume was calculated by the equation: [(lesion volume x 100) / intact volume].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 21. Data normality were confirmed, and parametric statistical tests were used. For detecting LT effects over time in the behavioral evaluation, statistical analysis was performed using repeated-measures analysis of variance (ANOVA). Differences among groups were determined using One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan`s *post hoc* test, except for analysis of the lesion volume, that the Student`s T-test was used. Correlation coefficients (r) were calculated by Pearson`s correlation. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) and the statistical significance was established with $p < 0.05$.

RESULTS

Functional response

The functional evaluation using BBB Locomotor rating scale is presented in Figure 2. The evaluation started two days before the injury and then, two days and weekly after injury, until the 11th week. All rats showed normal motor function in BBB scale before SCI. Two days after the injury, all lesion animals presented no hindlimbs movements, being different from controls [$F(2,62)=4214,56$, $P<0.01$]. This difference between injured animals and the control group remained throughout the experiment. The SCI animals, without treadmill training, as expected, demonstrated a spontaneous recovery until the fifth week after lesion, reaching a plateau of recovery as from the fifth week. From the third week, all animals that started training 7 days after injury presented functional impairment, when compared with SCI group [$F(2,36)=206.53$, $P<0.01$].

Spinal cord cell quantification by flow cytometry

Seven days after the SCI and six hours after the first LT day, flow cytometry was run (Figure 3). There was a significant reduction in the number of neurons in the spinal cord of injured animals compared to the control group [$F(2,22)=22.75$, $P<0.01$]. While the SCI group reduced the proportion of neurons, SCI-T7 rats showed lower proportion of neurons in the spinal cord compared to the control group and the SCI group. The neuronal apoptosis measured by flow cytometry showed that the SCI animals had no difference in comparison with the control group seven days after the injury; however SCI-T7 rats presented a high proportion of neuronal cells in apoptosis [$F(2,22)=8.63$, $P<0.01$]. Measurements of microglia/macrophages by CD11b in the spinal cord revealed a higher percentage of these cells in the SCI and the SCI-T7 groups compared to the control group [$F(2,22)=5.74$, $P<0.01$].

Correlation between neuronal loss, neuronal apoptosis and presence of macrophage/microglia

Pearson's correlation was run in order to verify the possible association between neuronal apoptosis and the presence of macrophage/microglia in the spinal cord injury region (Figure 4). The neuronal apoptosis was correlated positively with the macrophage/microglia presence ($r = 0.661$, $P<0.01$), i.e., the increase in the neuronal apoptosis is associated with the increase in macrophage/microglia proportion in the injured region.

Lesion volume

Histology analysis was performed to measure the lesion volume in the spinal cord of all experimental groups (Figure 5). As expected, the SCI animals presented an injury in the spinal cord (8.80 ± 3.21). Rats treated with LT seven days after injury (SCI-T7 group) presented higher lesion extension (32.12 ± 1.70) when compared to injured animals without treadmill training ($t_{(9)} = 6.75$; $p < 0.01$).

DISCUSSION

The present study showed that the early locomotor training worsened the functional recovery following the SCI. Seven days after the early start treadmill training in the injured animals, the neuronal loss was increased in the spinal cord. It could be related with the highest lesion volume in the spinal cord, neuronal apoptosis as well as the macrophage/microglia increment in the spinal cord of trained animals. These findings indicate that the first days after injury constitute a critical period for the recovery process and the locomotor training stimuli could worsen the function.

Clinical (Steeves et al, 2011) and experimental studies (Gensel et al, 2006; Hilton et al, 2013) demonstrated spontaneous recovery after an incomplete lesion to the spinal cord. Therapeutic stimuli could interfere in the spontaneous recovery resulting in different functional responses after injury. Repetitive task practice, such as treadmill training may facilitate locomotor recovery (Battistuzzo et al, 2012; Behrman et al, 2017; Cha et al, 2007; Edgerton et al, 2004; Rossignol et al, 2004) and some studies have reported beneficial effects of LT following SCI (Boyce et al, 2007; Brazg et al, 2017; Goldshmit et al, 2008; Morrison et al, 2017; Moshonkina et al, 2004). However, treadmill training seems to present a critical starting time phase after injury (Marques et al, 2018). Here it was shown novel evidence that early LT worsened hindlimb ability in SCI animals compared to injured rats with no training. As suggested for pathologies such as stroke, possibly intensive treatments in the early phases may exacerbate injury (Risedal, Zeng, Johansson, 1999). These findings confirm previous reports showing that early therapeutic protocol of LT could negatively interfere in the locomotor recovery (Battistuzzo et al, 2016; Erschbamer et al, 2006; Fouad et al, 2000; Kubasak et al, 2008; Lee et al, 2010; Marques et al, 2018; Nothias et al, 2005; Nicola et al, 2016; Smith et al, 2009; Ung et al, 2010).

This critical period after SCI is characterized by a cascade of events leading to cell death (Collazos-Castro et al, 2005; Gensel et al, 2006; Grumbles and Thomas, 2017), especially in the first hours and days after injury (Beattie et al, 2000; Grossman et al, 2001; Nicola et al, 2017). Flow cytometry analysis showed that early intervention using LT increased the neuronal loss in the spinal cord of injured animals six hours after the start of the training. Similar result was observed in a previous study comparing the effects of early and late LT and assessing the number of motoneurons in the injured spinal cord (Marques et al, 2018). Late training also contributes to preservation of cells in the spinal cord (Marques et al, 2018; Wu et al, 2016)

probably due to the contribution of the normalization of motoneurons properties after injury (Cote et al, 2003). Early training seems to act in the opposite way, increasing the neuronal loss and, consequently, worsening the locomotor ability (Marques et al, 2018; Nicola et al, 2017).

One of the main mechanisms of cell death after SCI is apoptosis (Beattie et al, 2000; Grossman et al, 2001; Nicola et al, 2017; Ríos et al, 2015). This pathway is activated mainly by the cleavage of caspase 3 molecule (Elmore, 2007; Qiu et al, 2001). SCI animals treated with treadmill training increased the number of apoptotic neurons measured by flow cytometry, while injured rats with no LT had similar results compared to the control group. It is expected that around 7 days after injury, a normalization in cleaved caspase 3 levels occurs. Early treadmill could stimulate a new response triggering apoptosis. Moreover, the number of apoptotic neurons showed a negative correlation with the number of neurons in the injured spinal cord, indicating that the neuronal loss is influenced by the increase in neuronal apoptosis.

Cell death occurring due to the secondary spinal cord damage is directly related to the immune response mediated by the recruitment of microglia and macrophages to the site of injury (David and Kroner, 2011; Fathali et al, 2013). This intense immune response triggers the phagocytosis and the release of cytokines (Ahuja, Martin, Fehlings, 2016; Ankeny, Popovich, 2009; Rowland et al, 2008; Sámano, Nistri, 2017; Ufuk et al, 2005; Ward et al, 2014). Flow cytometry showed an increase in macrophages/microglia number in the spinal cord seven days after injury. It is expected that in this period a peak of inflammatory cells entry from the peripheral system to the CNS (Beattie et al, 2000; Casella et al, 2006; Grossman et al, 2001), however the early starting time of LT may have contributed to the increase in macrophages/microglia response and, in consequence, contributed to cell death. Also, the number of macrophages/microglia in the spinal cord lesion showed a positive correlation with the number of apoptotic neurons and a negative correlation with the number of neurons, suggesting that the increase in the immune response mediated by these cells interferes in the apoptosis and neuronal loss.

The high concentration of macrophages/microglia in the spinal cord within (and near) the lesion site may contribute to the tissue damage (Carlson et al, 1998). The combination of this critical period after SCI with the exercise, a pro-inflammatory stimulus, can increase the tissue damage process and prevent the tissue recovery (Risedal, Zeng, Johansson, 1999), mainly when the treatment is intensive (Risedal, Zeng, Johansson, 1999). The increase in the lesion volume in the spinal cord was evidenced 11 weeks after the beginning of the early LT compared

to the injured animals with no training. This increase in the lesion was expected, since the loss of specialized cells is associated with tissue damage (Casella et al, 2006; Sakai et al, 2012; Taghipour et al, 2012) and the functional deficits are proportional to the lesion severity (Basso, Beattie, Bresnahan, 1996) as evidenced in this study.

In conclusion, early treadmill training worsened the recovery after experimental spinal cord contusion. Additionally, the neuronal loss, the increased apoptosis and the presence of macrophages/microglia was observed in the spinal cord six hours after early treadmill. Furthermore, the late evaluation of injury evidenced an increase in the lesion volume. The present study provides evidence that early locomotor training has a critical starting time phase after the injury, improving cell loss and tissue damage in which must be avoided. Many other processes involved in locomotor training response should be explored in further studies.

REFERENCES

- Ahuja, C.S.; Martin, A.R.; Fehlings, M.; 2016. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000 Research* 5:1–13.
- Ankeny, D.P.; Popovich, P.G.; 2009. B cells produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. *J Clin Invest* 119(10):2990-2999.
- Basso, D.M.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C.; 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12, 1-21.
- Battistuzzo, C.; Callister, R.; Callister, R.; Galea, M.; 2012. A systematic review of exercise training to promote locomotor recovery in animal models of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 29, 1600-1613.
- Battistuzzo, C.R.; Rank, M.M.; Flynn, J.R.; Morgan, D.L.; Callister, R.; Callister, R.J.; Galea, M.P.; 2016. Gait recovery following spinal cord injury in mice: Limited effect of treadmill training. *J S Cord Med* 39 (3), 335-343.
- Beattie, M.S.; Li, Q.; Bresnahan, J.C.; 2000. Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury. *Prog Brain Res* 128:9-21.
- Behrman, A.L.; Ardolino, E.M.; Harkema, S.J.; 2017. Activity-Based Therapy: From basic science to clinical application for recovery after spinal cord injury. *J Neurol Phys Ther*, 41, S39-S45.

Boyce, V.S.; Tumolo, M.; Fischer, I.; Murray, M.; Lemay, M.A.; 2007. Neurotrophic factors promote and enhance locomotor recovery in untrained spinalized cats. *J Neurophysiol* 98:1988-1996.

Brazg, G.; Fahey, M.; Holleran, C.L.; Connolly, M.; Woodward, J.; Hennessy, P.W.; Schmit, B.D.; Hornby, T.G.; 2017. Effects of training intensity on locomotor performance in individuals with chronic spinal cord injury: A randomized crossover study. *Neurorehabil Neural Repair* 31 (10-11), 944-954.

Carlson, S.L.; Parrish, M.E.; Springer, J.E.; Doty, K.; Dossett, L.; 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 151 (1), 77-88.

Casella, G.T.B.; Bunge, M.B.; Wood, P.M.; 2006. Endothelial cell loss is not a major cause of neuronal and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Exp Neurol* 201 (1), 8-20.

Cha, J.; Heng, C.; Reinkensmeyer, D.J.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; De Leon, R.D.; 2007. Locomotor ability in spinal rats is dependent on the amount of activity imposed on the hindlimbs during treadmill training. *J Neurotrauma*, 24 (6), 1000-1012.

Chen, Y.; Chen, X.Y.; Jakeman, L.B.; Chen, L.; Stokes, B.T.; Wolpaw, J.R.; 2006. Operant conditioning of H-Reflex can correct a locomotor abnormality after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 26 (48), 12537-12543.

Collazos-Castro, J.E.; Soto, V.M.; Gutiérrez-Dávila, M.; Nieto-Sampedro, M.; 2005. Motoneuron loss associated with chronic locomotion impairments after spinal cord contusion in the rat. *J Neurotrauma* 22(5):544-558.

Cote, M.P.; Menard, A.; Gossard, J.P.; 2003. Spinal cats on the treadmill: changes in load pathways. *J Neurosci* 23, 2789-2796.

David, S.; Kroner, A.; 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12 (7), 388.

De Leon, R.D.; Acosta, C.N.; 2006. Effect of robotic-assisted treadmill training and chronic quipazine treatment on hindlimb stepping in spinally transected rats. *J. Neurotrauma* 23, 1147-1163.

Edgerton, V.R.; Tillakaratne, N.J.K.; Bigbee, A.J.; de Leon, R.D.; Roy, R.R.; 2004. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annu Rev Neurosci* 27, 145-167.

Elmore, S.; 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.

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

Fawcett, J.W.; Asher, R.A.; 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49, 377-391.

Fleming, J.C.; Norenberg, M.D.; Ramsay, D.A.; Dekaban, G.A.; Marcillo, A.E.; Saenz, A.D.; Pasquale-Styles, M.; Dietrich, W.D.; Weaver, L.C.; 2006. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 129, 3249-3269.

Fouad, K.; Metz, G.A.; Merkler, D.; Dietz, V.; Schwab, M.E.; 2000. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behav. Brain Res* 115, 107-113.

Gensel, J.C.; Tovar, A.; Hamers, F.P.T.; Deibert, R.J.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C.; 2006. Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *J Neurotrauma* 23 (1), 36-54.

Goldshmit, Y.; Lythgo, N.; Galea, M.P.; Turnley, A.M.; 2008. Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery. *J Neurotraum* 25 (5), 449-465.

Grossman, S.D.; Rosenberg, L.J.; Wrathall, J.R.; 2001. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 168, 273-282.

Grumbles, R.M.; Thomas, C.K.; 2017. Motoneuron death after human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 34(3): 581-590.

Hagen, E.M.; Rekan, T.; Gilhus, N.E.; Grønning, M.; 2012. Traumatic spinal cord injuries- incidence, mechanisms and course. *Tidsskr Nor Laegeforen* 132 (7), 831-837.

Hausmann, O.N.; 2003. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord*, 41 (7), 369.

Hilton, B.J.; Assinck, P.; Duncan, G.J.; Lu, D.; Lo, S.; Tetzlaff, W.; 2013. Dorsolateral funiculus lesioning of the mouse cervical spinal cord at C4 but not at C6 results in sustained forelimb motor deficits. *J Neurotraum* 30 (12), 1070-1083.

Kubasak, M.D.; Jindrich, D.L.; Zhong, H.; Takeoka, A.; McFarland, K.C.; Muñoz-Quiles, C.; Roy R.R.; Edgerton, V.R.; Ramón-Cueto, A.; Phelps, P.E.; 2007. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain*, 131 (1), 264-276.

Lee, J.; Thumbikat, P.; 2015. Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surg* 1-10.

Lee, Y.S.; Zdunowski, S.; Edgerton, V.R.; Roy, R.R.; Zhong, H.; Hsiao, I.; Lin, V.W.; 2010. Improvement of gait patterns in step-trained, complete spinal cord-transected rats treated with a peripheral nerve graft and acidic fibroblast growth factor. *Exp Neurol* 224, 429-437.

Liu, M.; Wu, W.; Li, H.; Li, S.; Huang, L.T.; Yang, Y.Q.; Sun, Q.; Wang, C.X.; Yu, Z.; Hang, C.H.; 2015. Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice. *J Spinal Cord Med* 38 (6), 745-753

Maegele, M.; Muller, S.; Wernig, A.; Edgerton, V.R.; Harkema, S.J.; 2002. Recruitment of spinal motor pools during voluntary movements versus stepping after human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 19, 1217-1229.

Marques, M.R.; Nicola, F.C.; Sanches, E.F.; Arcego, D.M.; Durán-Carabali, L.E.; Aristimunha, D.; Dalmaz C.; Netto, C.A.; 2018. Locomotor training promotes time-dependente functional recovery after experimental spinal cord contusion. *Neuroscience* (in press).

Morrison, S.A.; Lorenz, D.; Eskay, C.P.; Forrest, G.F.; Basso, D.M.; 2018. Longitudinal recovery and reduced costs after 120 sessions of locomotor training for motor incomplete spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 99(3), 555-562.

Moshonkina, T.R.; Gilerovich, E.G.; Fedorova, E.A.; Avelev, V.D.; Gerasimenko, Y.P.; Otellin, V.A.; 2004. Morphofunctional basis for recovery of locomotor movements in rats with completely crossed spinal cord. *Bull Exp Biol Med* 138 (2), 198-201

Nicola, F.; Marques, M.R.; Odorcyk, F.; Petenuzzo, L.; Aristimunha, D.; Vizuete, A.; Sanches, E.F.; Pereira, D.P.; Maurmann, N.; Gonçalves, C.A.; Pranke, P.; 2018. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Modulate Early Astrocyte Response after Spinal Cord Contusion. *Mol Neurobiol* (in press).

Nicola, F.D.C; Marques, M.R.; Odorcyk, F.; Arcego, D.M.; Petenuzzo, L.; Aristimunha, D.; Vizuete, A.; Sanches, E.F.; Pereira, D.P.; Maurmann, N.; Dalmaz, C.; Pranke, P.; Netto, C.A.; 2017. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res* 1663, 95-105.

Nicola, F.D.C.; Rodrigues, L.P.; Crestani, T.; Quintiliano, K.; Sanches, E.F.; Willborn, S.; Aristimunha, D.; Boisserand, L.; Pranke, P.; Netto, C.A.; 2016. Human dental pulp stem cells

transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. *Braz J Med Biol Res* 49 (9), e5319.

Noble, L.J.; Wrathall, J.R.; 1985. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analysis of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol* 88(1):135-149.

Nothias, J.M.; Mitsui, T.; Shumsky, J.S.; Fischer, I.; Antonacci, M.D.; Murray, M.; 2005. Combined effects of neurotrophin secreting transplants, exercise, and serotonergic drug challenge improve function in spinal rats. *Neurorehabil Neural Repair* 19: 296-312.

Popovich, P.G.; Wei, P.; Stokes, B.T.; 1997. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377 (3), 443-464.

Risedal, A.; Zeng, R.; Johansson, B.B.; 1999. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19 (9), 997-1003.

Rowland, J.W.; Hawryluk, G.W.; Kwon, B.; Fehlings, M.G.; 2008. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus* 25, 1-17.

Rossignol, S.; Brustein, E.; Bouyer, L.; Barthélemy, D.; Langlet, C.; Leblond, H.; 2004. Adaptive changes of locomotion after central and peripheral lesions. *Can J Physiol Pharmacol* 82 (8-9), 617-627.

Sadowsky, C.; Volshteyn, O.; Schultz, L.; McDonald, J.W.; 2002. Spinal cord injury. *Disabil Rehabil* 24 (13), 680-687.

Sakai, K.; Yamamoto, A.; Matsubara, K.; Nakamura, S.; Naruse, M.; Yamagata, M.; Sakamoto, K.; Tauchi, R.; Wakao, N.; Imagama, S.; Hibi, H.; Kadomatsu, K.; Ishiguro, N.; Ueda, M.; 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*; 122: 80-90.

Sámano, C.; Nistri, A.; 2017. Mechanism of neuroprotection against experimental spinal cord injury by riluzole or methylprednisolone. *Neurochem Res* 1-17.

Smith, R.R.; Brown, E.H.; Shum-Siu, A.; Whelan, A.; Burke, D.A.; Benton, R.L.; Magnusson, D.S.K.; 2009. Swim training initiated acutely after spinal cord injury is ineffective and induces extravasation in and around the epicenter. *J Neurotrauma* 26:1017-1027.

Sroga, J.M.; Jones, T.B.; Kigerl, K.A.; McGaughy, V.M.; Popovich, P.G.; 2003. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol*, 462 (2), 223-240.

Steeves, J.D.; Kramer, J.K.; Fawcett, J.W.; Cragg, J.; Lammertse, D.P.; Blight, A.R.; Marino, R.J.; Ditunno, J.F.; Coleman, W.P.; Geisler, F.H.; Guest, J.; Jones, L.; Burns, S.; Schubert, M.; van Hedel, H.J.; Curt, A.; 2011. Extent of spontaneous motor recovery after traumatic cervical sensorimotor complete spinal cord injury. *Spinal Cord* 49, 257-265.

Taghipour, Z.; Karbalaie, K.; Kiani, A.; Niapour, A.; Bahramian, H.; Nasr-Esfahani, M.H.; Baharvand, H.; 2012. Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev* 21, 1794-1802.

Timoszyk, W.K.; Nessler, J.A.; Acosta, C.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; Reinkensmeyer, D.J.; de Leon, R.; 2005. Hindlimb loading determines stepping quantity and quality following spinal cord transection. *Brain Res* 1050, 180-189.

Ufuk, T.; Ganesh, S.; Sigurd, B.; 2005. Spine cord injury: an update. *Semin Spine Surg* 17, 73-83.

Ung RV, Lapointe NP, Rouleau P, Guertin PA (2010), Non-assisted treadmill training does not improve motor recovery and body composition in spinal cord-transected mice. *Spinal Cord* 48, 750-755.

Ward, R.E.; Huang, W.; Kostusiak, M.; Pallier, P.N.; Michael-Titus, A.T.; Priestley, J.V.; 2014. A characterization of white matter pathology following spinal cord compression injury in the rat. *Neuroscience* 260:227-239.

Wirz, M.; Colombo, G.; Dietz, V.; 2001. Long term effects of locomotor training in spinal humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71 (1), 93-96.

Wu, Q.; Cao, Y.; Dong, C.; Wang, H.; Wang, Q.; Tong, W.; Li, X.; Shan, C.; Wang, T.; 2016. Neuromuscular interaction is required for neurotrophins-mediated locomotor recovery following treadmill training in rat spinal cord injury. *Peer J* 4:e2025.

Yune, T.Y.; Chang, M.J.; Kim, S.J.; Lee, Y.B.; Shin, S.W.; Rhim, H.; Kim, Y.C.; Shin, M.L.; Oh, Y.J.; Han, C.T.; Markelonis, G.J.; Oh, T.H.; 2003. Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 20, 207-219.

Zaccagnini, G.; Martelli, F.; Magenta, A.; Cencioni, C.; Fasanaro, P.; Nicoletti, C.; Biblioli, P.; Pelicci, P.G.; Capogrossi, M.C.; 2007. p66ShcA and oxidative stress modulate myogenic differentiation and skeletal muscle regeneration after hind limb ischemia. *J Biol Chem* 282, 31453-31459.

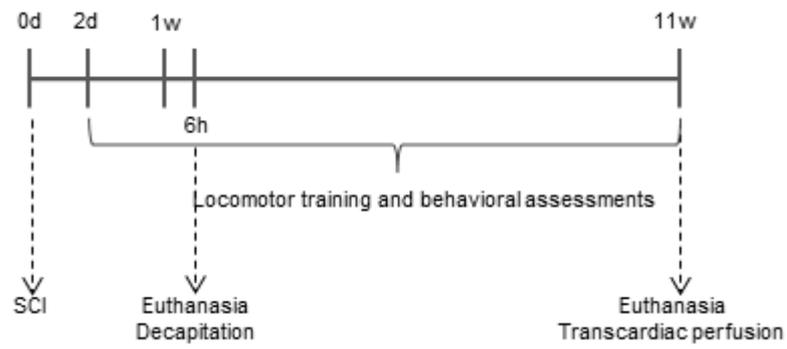


Figure 1. Experimental design.

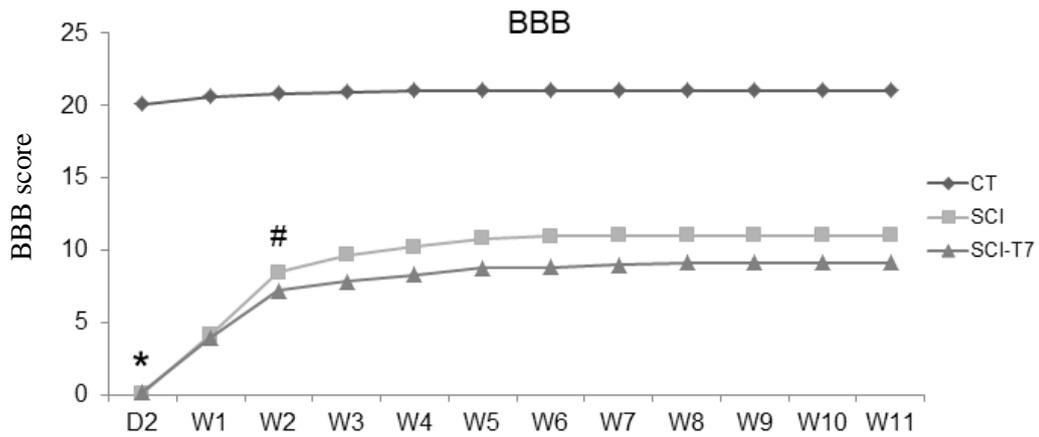


Figure 2. BBB locomotion scale scores. * Difference compared to the control group. # Difference between the SCI and SCI-T7 groups. Data expressed as mean.

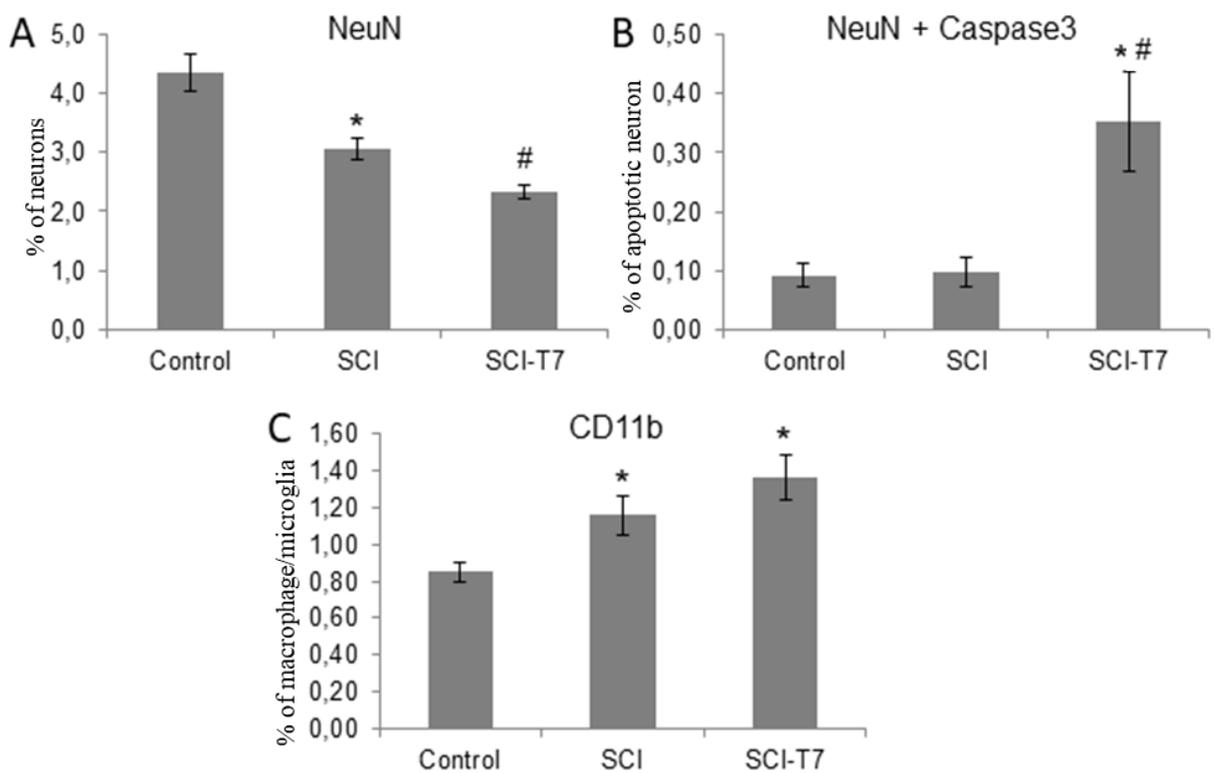


Figure 3. Spinal cord cell quantification by flow cytometry six hours after the LT (seven days after SCI). **A.** Quantification of the number of neurons in the spinal cord injury region. **B.** Quantification of the number of neurons in apoptosis in the spinal cord injury region. **C.** Quantification of the number of microglia/macrophages in the spinal cord injury region.* Difference from control group. # Difference from SCI group. Data expressed as mean \pm SE.

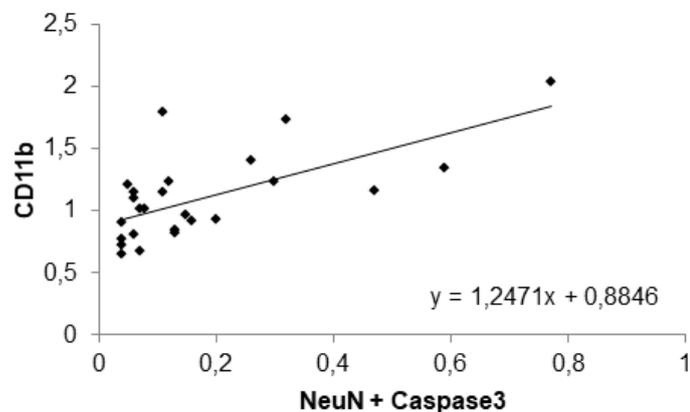


Figure 4. Significant positive correlation between NeuN and CD11b quantification ($p < 0.01$).

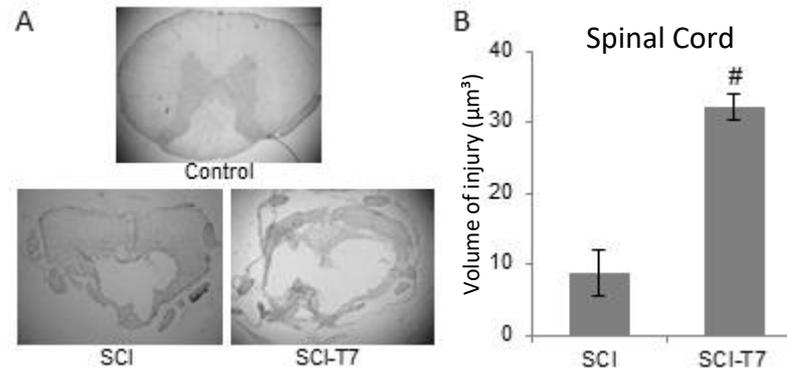


Figure 5. Spinal cord histological evaluation. **A.** Representative photomicrographs of control, SCI (injured animals) and SCI-T7 (injured trained animals) groups. **B.** Quantification of injury volume in all injured groups. # Difference between SCI. Data expressed as mean \pm SE.

5. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados apresentados nesta tese confirmam as hipóteses do trabalho em que o TLE tardio promoveu melhora funcional enquanto o treino precoce produziu efeitos negativos sobre a recuperação funcional de ratos submetidos ao modelo experimental de lesão medular por contusão. O estímulo locomotor, quando iniciado em períodos mais tardios, contribuiu para a menor perda de motoneurônios no corno ventral da ME, redução da atrofia muscular e maior expressão de BDNF no músculo tibial anterior, porém não interferiu no volume de lesão na ME. Em contrapartida, o TLE precoce aumentou o volume de lesão na ME e, 6 horas após o primeiro dia de treino, reduziu o número de neurônios, assim como aumentou a morte de neurônios por apoptose na ME. Estes achados indicam que existe um período ideal para iniciar o TLE após a LME, a fim de promover melhor recuperação funcional.

5.1. Recuperação funcional

Neste trabalho, o início do TLE em diferentes momentos após a LME proporcionou respostas funcionais variadas nos animais. Ainda, como esperado neste modelo experimental, os animais com lesão que não receberam estímulo terapêutico também apresentaram recuperação funcional (Basso, Beattie, Bresnahan, 1995). Esta recuperação espontânea é observada não apenas em modelos experimentais de LME (Gensel et al, 2006; Hilton et al, 2013), mas também em estudos clínicos que demonstraram que grande parte dos indivíduos que tiveram perda sensoriomotora após uma lesão medular incompleta possuem uma recuperação parcial (Fawcett et al, 2007; Steeves et al, 2011). Sugere-se que esta recuperação ocorra no nível motor da lesão na ME, evoluindo para um ou até dois níveis caudais à lesão (Steeves et al, 2011). A melhora espontânea ocorre principalmente quando existe alguma função neurológica preservada abaixo do nível da lesão, porém também pode ser observada em indivíduos com diagnóstico clínico de lesão medular completa (Fawcett et al, 2007), assim como modelos experimentais com animais submetidos à lesão total por transecção da ME (Tillakaratne et al, 2010).

Estudos experimentais demonstraram que em ratos a recuperação espontânea está relacionada a várias formas de neuroplasticidade envolvendo o GPC, vias descendentes íntegras, aferências sensoriais e plasticidade das vias espinais comprometidas, podendo este processo ser chamado de aprendizagem espinal (de Leon et al., 2001; Edgerton et al, 2004; Raineteau, Schwab, 2001; Wolpaw, Tennissen, 2001). Um importante mecanismo para esta recuperação é o remodelamento da estrutura e trajeto das fibras do tracto corticoespinal, permitindo um contato com neurônios proprioespinais ao desviarem da lesão (Pierrot-Deseilligny, 2002; Rosenzweig et al, 2010). As fibras preservadas do tracto reticuloespinal também contribuem pelo processo de brotamento e aumento de densidade, aumentando o acesso indireto aos comandos reticuloespinais (Ballermann, Fouad, 2006; Zorner et al, 2014). As evidências destas melhoras funcionais, mesmo sem estímulos externos como exercício físico ou tratamentos farmacológicos, demonstra o potencial de plasticidade da circuitaria da ME (Gulino et al, 2007).

A prática de tarefas repetitivas como o TLE após a lesão medular tem sido utilizada com o objetivo de reabilitar a função locomotora (Battistuzzo et al, 2012; Behrman et al, 2017; Cha et al, 2007; Edgerton et al, 2004; Rossignol et al, 2004). Os efeitos benéficos do TLE após a LME são relatados tanto em estudos clínicos quanto em experimentais com animais (Boyce et al, 2007; Brazg et al, 2017; Goldshmit et al, 2008; Ilha et al, 2011; Morrison et al, 2018; Moshonkina et al, 2004). Uma justificativa para o uso do TLE em indivíduos com LME é fornecer aferências sensoriais pela prática motora, estimulando o GPC (Pearson, Rossignol, 1991). Em consequência, os efeitos benéficos reportados estão relacionados ao aumento da contração muscular, melhor coordenação motora e melhor habilidade de deambulação nestes indivíduos (Hicks et al, 2005; Wirz, Colombo, Dietz, 2001), principalmente quando a lesão medular é incompleta (Harkema, 2001; Van de Crommert, Mulder e Duysens, 1998).

Estes estímulos terapêuticos são propostos a fim de contribuir e facilitar a recuperação funcional após uma LME. Estudos observacionais e retrospectivos demonstraram que quanto maior o tempo decorrido após uma LME e o início da reabilitação, menor o desempenho funcional e a qualidade de vida dos indivíduos (DeJong et al, 2013; Scivoletto et al 2005; Sumida et al, 2001; Teeter et al, 2012; Whiteneck et al, 2012). Por isso atualmente sugere-se que a reabilitação seja iniciada em um período precoce após a LME. No entanto não existem estudos clínicos que avaliem diretamente o efeito do tempo na eficácia da reabilitação (Burns

et al, 2017), sendo ela com o TLE ou outras formas de reabilitação motora. Soma-se ainda a dificuldade em pesquisas envolvendo seres humanos em diferenciar quais efeitos são decorrentes da reabilitação e quais estão relacionados à recuperação natural da função motora (Burns et al, 2017; Sumida et al, 2001).

No presente estudo foi observado que animais submetidos ao TLE não iniciado precocemente proporcionou uma maior recuperação motora. Estes benefícios também foram demonstrados em outros estudos experimentais de LME com modelos com ratos evidenciando maior qualidade na locomoção avaliada pela escala BBB (Liu et al, 2008; Jung et al, 2016; Oh et al, 2009; Shin et al, 2014; Stevens et al, 2006) e maior habilidade motora dos membros posteriores no teste da Escada Horizontal (Jung et al, 2014). No entanto, alguns trabalhos reportaram que o TLE pode não influenciar na recuperação funcional (Battistuzzo et al, 2016; Fouad et al, 2000; Li et al, 2013; Nicola et al, 2016) ou pode ter efeitos negativos, prejudicando a marcha (Lee et al, 2010; Kubasak et al, 2008). Um fator que parece ter influenciado para esta discrepância de resultados é o período de início do TLE. Os resultados observados na literatura prévia, bem como os resultados desta tese, indicam que o estímulo locomotor iniciado em uma fase subaguda parece contribuir para uma maior recuperação funcional, enquanto o início em um período mais precoce pode diminuir a recuperação (Battistuzzo et al, 2012).

Os piores resultados na performance quando o estímulo motor é precoce em relação ao início mais tardio também foram observados em estudos com outras patologias envolvendo o SNC. No estudo clínico realizado por Sundseth et al (2012) com indivíduos após acidente vascular encefálico, foram observados piores resultados funcionais naqueles que receberam o estímulo antes de 24 horas pós-lesão quando comparados à aqueles com início entre 24 e 48 horas. Estudos experimentais com outros modelos animais, como modelos de lesões encefálicas por trauma, também demonstraram que o treino locomotor voluntário iniciado em um período precoce de até 7 dias pós-lesão piorou a função cognitiva aumentando os déficits neurológicos em comparação aos animais que iniciaram a terapia em períodos mais tardios ou ainda em comparação à aqueles que não receberam o estímulo (Chen et al, 2013b; Crane et al, 2012; Griesbach et al, 2004; Piao et al, 2013). Estes efeitos adversos dos estímulos iniciados em diferentes períodos após lesões do SNC ressaltam a necessidade de uma maior compreensão sobre estes diferentes efeitos a fim de reduzir o risco de piora da condição patológica.

5.1.1 Intensidade do treino locomotor e recuperação funcional

O período de início do TLE após a LME pode não ter sido a única variável que influenciou os diferentes resultados deste estudo. A intensidade do exercício realizado pode ter contribuído para os benefícios e prejuízos observados na recuperação funcional, considerando-se que a intensidade do exercício locomotor em esteira está relacionada à quantidade de trabalho por unidade de tempo e não à duração ou frequência das sessões do treinamento (George et al, 2011).

O exercício físico produz muitas adaptações fisiológicas no organismo que permitem a ele realizar as atividades com maior eficácia (George et al, 2011, Gray et al 1990). No entanto, o estresse físico como o treino locomotor em esteira com intensidade moderada e alta pode também levar a adaptações prejudiciais ao organismo, conforme observado em estudos experimentais com ratos saudáveis (Kiecolt-Glaser et al, 1991; Moraska et al, 2000; Plotnikoff et al, 1991).

O tipo de estímulo terapêutico e, no caso do treino locomotor em esteira, a velocidade a qual os animais serão submetidos são fatores relevantes considerando-se a dificuldade de locomoção após a LME, que ocorre principalmente nos primeiros dias pós-lesão. A velocidade da esteira deve ser adaptada às condições dos animais. Em geral, estudos com modelos de LME em ratos utilizam uma velocidade média da esteira de 6m/min (Battistuzzo et al, 2017; Fouad et al, 2000; Wang et al, 2015), assim como realizado neste estudo. Mesmo com a adaptação da velocidade a fase aguda e início da fase subaguda é um período crítico após a LME e a associação deste período com o estresse gerado pelo exercício físico precoce pode gerar prejuízos (Battistuzzo et al, 2012) diante de diferentes intensidades de exercício.

São limitadas as informações na literatura atual a cerca dos efeitos de diferentes intensidades de TLE em modelos experimentais de lesão medular em ratos, no entanto estudos com modelos de lesões encefálicas demonstraram que a intensidade do exercício físico é uma variável importante na recuperação da função cognitiva, principalmente quando a exposição ocorre nos primeiros dias pós-lesão (Griesbach et al, 2004; Hicks et al, 1998; Shen et al, 2013). Enquanto o exercício de baixa intensidade em esteira demonstrou em um modelo de lesão encefálica por trauma uma melhora na performance cognitiva, o mesmo estímulo com grande intensidade não reduziu os déficits cognitivos (Shen et al, 2013). Estes resultados sugerem que

a intensidade do exercício em um período crítico pós-lesão encefálica não é benéfico para a recuperação cognitiva e, possivelmente, esta associação possa também promover déficits neurológicos semelhantes na ME após uma lesão medular.

5.2. Neuroproteção

A combinação do estímulo locomotor e o período precoce após a LME, no qual existe uma grande liberação de substâncias excitatórias e tóxicas no tecido lesado, pode ter contribuído para o aumento do processo de lesão nos animais que iniciaram o treino locomotor precocemente (Risedal, Zeng, Johansson, 1999). Ainda, o somatório destes fatores pode ter contribuído para diminuir o processo de recuperação tecidual na medula destes animais (Carlson et al, 1998; Risedal, Zeng, Johansson, 1999). Em consequência, quando avaliados 11 semanas após a lesão, os animais que foram submetidos ao TLE precoce, apresentaram um maior volume de lesão em relação aos animais que não fizeram o exercício. Este aumento na lesão tecidual era esperado, visto que os déficits funcionais são proporcionais à severidade da lesão (Basso, Beattie, Bresnahan, 1995) e estes animais apresentaram um maior déficit funcional em relação aos demais grupos experimentais.

O aumento do volume de lesão e os déficits funcionais normalmente estão associados à redução de células especializadas na ME (Casella et al, 2006; Sakai et al, 2012; Taghipour et al, 2012), assim como observado no grupo experimental que iniciou o TLE precocemente. Os resultados da citometria de fluxo demonstraram que estes animais apresentaram uma redução no número de neurônios na ME 6 horas após o primeiro dia de treino e um aumento do número de células neuronais em processo de morte por apoptose. Ainda, na análise histológica da região cefálica à lesão foi observada uma menor quantidade de motoneurônios após as 11 semanas de treino locomotor nos animais que realizaram o exercício precoce. Apesar de grande parte dos danos neuronais e gliais ocorrerem nas primeiras 24 horas pós-lesão neste modelo experimental, a morte celular continua ocorrendo principalmente ao longo dos primeiros dias pós-lesão (Casella et al, 2006; Oyibo, 2011). Provavelmente o somatório do período crítico com o início precoce do TLE contribuiu para uma agudização da lesão, aumentando a proporção da perda neuronal neste grupo, observada logo após o primeiro dia de treino e no final do protocolo de exercício.

Por outro lado, neste estudo os animais que iniciaram o TLE com 14 e 28 dias pós-lesão apresentaram uma maior número de motoneurônios na região cefálica à lesão na ME em relação aos que iniciaram precocemente. Estes resultados indicam um papel neuroprotetor do TLE iniciado em um período tardio, possivelmente relacionado a uma combinação de efeitos celulares, moleculares e tróficos induzidos pelo exercício na ME (Foret et al, 2010; Houle e Cote, 2013; Kao et al, 2009; Ying et al, 2005).

Estudos prévios com modelos animais demonstraram que o exercício físico estimula a produção e secreção de neurotrofinas como o BDNF (Chou et al, 2018; Cote et al, 2011; Himi et al, 2017; Song et al, 2018). A quantificação da expressão de BDNF na ME após o protocolo de TLE no presente estudo não demonstrou diferença entre os grupos experimentais, no entanto deve-se considerar que esta avaliação foi tardia. Possivelmente 10 semanas após o início do treino locomotor já não seja mais possível observar diferenças na expressão deste fator neurotrófico, diferentemente de outros estudos que verificaram que animais submetidos a modelos experimentais de LME e TLE apresentaram aumento na expressão de BDNF ao realizarem o exercício (Wang, Pearse, 2015). Este fator neurotrófico é expresso por motoneurônios do SNC e tem sido relacionado à proteção e crescimento de axônios e dendritos (Carty et al, 2013; Cortes et al, 2013; Cristante et al, 2013). A sua expressão pode ter contribuído para a neuroproteção dos motoneurônios que em um primeiro momento sobreviveram à lesão na ME, porém que secundariamente poderiam atrofiar e entrarem em processo de morte (Byers et al, 2012; Liu et al, 2015). Em consequência, estes animais com TLE tardio demonstraram um maior número de motoneurônios em relação aos que iniciaram em um período precoce, contribuindo para a melhor habilidade funcional nestes animais (Nicola et al, 2017).

5.3. Resposta imunológica

Sabe-se que a morte celular que ocorre na ME devido à lesão secundária está diretamente relacionada à resposta imunológica mediada pelo recrutamento de microglia e macrófagos para o local da lesão (David, Kroner, 2011). Estudos experimentais permitiram observar que a partir do trauma inicial na ME, astrócitos, microglias e outras células liberam moléculas pró-inflamatórias e quimiotáticas que rapidamente atraem para o local de lesão neutrófilos provenientes do sangue (Plemel et al, 2014). O processo de chegada de novas células

de defesa ao local de lesão continua pela ação de enzimas líticas e citocinas liberadas pelos neutrófilos, assim como pelas moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais (Pineau et al, 2010; Plemel et al, 2014; Popovich, Wei, Stokes; Stokes, 1997). Com isto, em modelos animais as primeiras horas e em estudos clínicos os primeiros dias depois da lesão medular são marcados por uma intensa resposta imunológica mediada por células de defesa que promovem a fagocitose e a liberação de citocinas (Ahuja, Martin, Fehlings, 2016; Ankeny and Popovich, 2009; Rowland et al, 2008; Sámano, Nistri, 2017; Ufuk et al, 2005; Ward et al, 2014).

Em modelos experimentais de LME em ratos foi observado que aproximadamente no sétimo dia após a lesão ocorre o pico de macrófagos, linfócitos e monócitos no epicentro da lesão. Estas células atuam em conjunto com a microglia residente no tecido local a fim de executar a fagocitose do tecido lesionado (Dusart, Schwab, 1994; Loane, Byrnes, 2010). A citometria de fluxo realizada neste estudo confirma a maior proporção de células de defesa presentes na ME dos animais com lesão medular em relação aos animais controle no sétimo dia pós-lesão. No entanto, não houve diferença entre os animais com lesão que iniciaram o treino precoce em relação aos que não realizaram o treino quando avaliados 6 horas depois do estímulo locomotor. Neste período é esperado um aumento na entrada de células inflamatórias do sistema nervoso periférico para o SNC, independente de ocorrer ou não um estímulo terapêutico (Beattie et al, 2000; Casella et al, 2006; Grossman et al, 2001). Apesar do TLE não ter aumentado a entrada de células de defesa neste período, pode ter aumentado a resposta inflamatória, contribuindo para a morte celular. Esta suposição pode ser reforçada pela correlação positiva entre o número de microglia/macrófagos na ME e o número de neurônios em apoptose.

A intensa resposta inflamatória e imunológica após a LME é observada tanto em estudos clínicos com humanos quanto em modelos animais (Assinck et al, 2017; Casella et al, 2006; Kim et al, 2017; Oyinbo, 2011; Petersen, Pederesen, 2005). Estudos experimentais com ratos permitiram verificar que, apesar do processo de recrutamento de células de defesa para o local da LME ter objetivos neuroprotetores, este processo pode favorecer a neurotoxicidade pela grande liberação de citocinas pró-inflamatórias, assim como pela excitotoxicidade glutamatérgica (Casella et al, 2006; Elmore et al, 2007; Hoffman-Goetz et al, 2008). Estes fatores contribuem para a morte neuronal e glial, em especial a morte celular programa

(apoptose) e promove um aumento na lesão (Bethea, 2000; Casella, Bunge e Wood, 2006; Elmore et al, 2007; Hoffman-Goetz et al, 2008).

Por outro lado, o exercício físico aumenta a demanda energética do organismo, podendo se tornar um estressor nessa fase crítica da LME (Shen et al, 2013). Um estresse neste período já crítico pós-lesão pode contribuir para um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e danos às membranas, inclusive das mitocôndrias (Shen et al, 2013; Casella et al, 2006; Elmore et al, 2007). Estes eventos podem culminar com a morte celular por apoptose pela ativação da via da caspase-3 (Blomgren et al, 2007; Elmore et al, 2007; Zhu et al, 2004) como observado neste estudo em que os animais com LME que iniciaram o TLE precocemente apresentaram um aumento da quantidade de células neuronais expressando caspase-3 após o primeiro dia de treino. Assim, o TLE pode ter ampliado a severidade da lesão e gerado maiores danos celulares e comprometimentos funcionais (Griesbach et al, 2007).

Estudos experimentais com ratos demonstraram recentemente que o treinamento em esteira logo após a LME pode ser prejudicial às propriedades musculares (Battistuzzo et al, 2017), assim como a piora do volume de lesão e menor recuperação locomotora observada nos animais que iniciaram precocemente o TLE na presente tese.

5.4. Musculatura esquelética

Aliado aos déficits funcionais e comprometimentos no SNC, mudanças na musculatura esquelética distal à lesão, como adaptações morfológicas e metabólicas, são esperadas em animais que são submetidos a modelos de LME (Gregory et al, 2003; Hutchinson et al, 2001). A morte de células na ME durante o processo inicial de trauma, assim como na lesão secundária, levam a interrupção parcial ou total do envio de informações motoras e sensoriais, diminuindo o controle muscular (Gregory et al, 2003; Hutchinson et al, 2001; Liu et al, 2006; Otis et al, 2004). Estudos clínicos e experimentais demonstraram que a diminuição do controle da musculatura ou até mesmo o desuso muscular conduzem a uma redução na força e capacidade metabólica dos músculos (Gregory et al, 2003; Hutchinson et al, 2001; Jayaraman et al, 2005; Liu et al, 2006; Otis et al, 2004).

Neste estudo foi observada redução na área média das fibras musculares do músculo tibial anterior dos animais submetidos ao modelo LME. Esta atrofia não apenas é esperada como também está diretamente relacionada à severidade da lesão (Biering-Sorensen et al, 2009; Voytik et al, 1993). Em paralelo à atrofia muscular, outros estudos clínicos (Qin, Bauman, Cardozo, 2010) e experimentais com ratos (Hutchinson et al, 2001; Liu et al, 2006) demonstraram que ocorre perda de força contrátil e mudanças no tipo de fibras musculares, reduzindo a proporção de fibras lentas e aumentando a proporção de fibras rápidas. Em consequência às diversas alterações musculares observadas após a LME, a prática de atividades físicas fica limitada nos indivíduos com LME, contribuindo para que limitações funcionais sejam estabelecidas (Edwards et al, 2013; Morse et al, 2008).

O treino locomotor é utilizado como uma forma de redução da atrofia muscular, inclusive em sujeitos com LME (Battistuzzo et al, 2017). Neste estudo observou-se uma recuperação da atrofia no músculo tibial anterior de animais que iniciaram o TLE tardiamente, demonstrando um efeito benéfico do treino em esteira para acelerar a restauração da área média das fibras musculares (Giangregorio et al, 2005; Gorassini et al, 2009). Esta recuperação favorece a melhoria na função coordenada da marcha e, conseqüentemente, na função locomotora (Kubasak et al, 2005). Estudos clínicos demonstraram que indivíduos com LME que praticaram o TLE apresentaram aumento na contração muscular, velocidade e duração do exercício, assim como maior coordenação dos movimentos e melhora na deambulação (Hicks et al, 2005; Werning et al, 1995; Wirz, Colombo, Dietz, 2001). No entanto, estes ganhos parecem ser dependentes da severidade da lesão medular, visto que indivíduos com paraplegia por lesão incompleta apresentaram maiores benefícios que indivíduos com lesão completa (Harkema, 2001; Van de Crommert, Mulder e Duyssens, 1998). Possivelmente por este motivo os animais com LME que iniciaram o TLE precocemente não reverteram a atrofia muscular até o final do protocolo de treinamento do presente estudo, visto que apresentaram um maior volume de lesão e do menor número de neurônios na ME.

Estudos experimentais prévios relataram atrofia muscular no músculo sóleo em animais submetidos a modelos de LME (do Espírito Santo et al, 2018; Liu et al, 2010; Zeman et al, 2009), inclusive sendo observada uma atrofia mais evidente nesta musculatura em relação ao músculo tibial anterior (Liu et al, 2010; Zeman et al, 2009). Provavelmente este maior comprometimento esteja relacionado ao seu papel antigravitacional em ratos (Dupont-

Versteegden et al, 1998). No entanto a análise do músculo sóleo neste estudo não evidenciou modificações decorrentes tanto da LME quanto do TLE quando avaliado 10 semanas depois da lesão. É possível que, pela maior atividade neuromuscular observada nos músculos plantiflexores devido ao papel antigravitacional, o esta musculatura tenha uma recuperação espontânea precoce mais rápida do que a musculatura dorsiflexora (Hutchinson et al, 2001).

O treino locomotor é reconhecido como um estímulo que proporciona uma maior expressão de fatores neurotróficos na musculatura esquelética (Gomez-Pinilla et al, 2001), sendo mais perceptível durante a fase inicial do treinamento do que em períodos tardios (Liu et al, 2006). O aumento da expressão de BDNF no músculo tibial anterior em animais que iniciaram o TLE mais tardiamente pode estar relacionado ao efeito benéfico do exercício por induzir a potencialização dos espasmos dos miócitos, aumentando a contração muscular e a manutenção da conectividade neuromuscular (Bamber et al, 2001). Além disso, o BDNF pode ser transportado retrogradamente para a ME, podendo influenciar a resposta regenerativa neuronal após uma lesão (Martinez et al, 2013; West et al, 2014). Este fator neuroprotetor do BDNF pode ter contribuído para a manutenção dos motoneurônios na ME dos animais que iniciaram o treino em um período tardio, induzindo uma melhor função motora.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o treino locomotor em esteira promove uma recuperação funcional dependente do período no qual o estímulo foi iniciado após uma lesão medular por contusão em ratos.

- O treino locomotor precoce promoveu uma pior recuperação funcional que pode estar relacionada a uma maior perda neuronal e a um maior volume de lesão na medula espinal.

- O treino iniciado mais tardiamente gerou uma melhor recuperação funcional associada a uma preservação de motoneurônios na medula espinal e menor atrofia muscular, assim como maior expressão de BDNF, no músculo tibial anterior.

7. PERSPECTIVAS

- I. Verificar as vias moleculares de ativação do processo apoptótico desencadeado pelo treino locomotor precoce após a lesão medular.

- II. Estudar os efeitos do treino locomotor precoce ao longo do período pós-lesão medular.

8. REFERÊNCIAS

- Ahuja, C.S.; Wilson, J.R.; Nori, S.; Kotter, M.R.N.; Druschel, C.; Curt, A.; Fehlings, M.G.; 2017. Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17018.
- Ahuja, C.S.; Martin, A.R.; Fehlings, M.; 2016. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000Res* 5, F1000 Faculty Rev-1017.
- Angeli, C.A.; Edgerton, V.R.; Gerasimenko, Y.P.; Harkema, S.J.; 2014. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain* 137, 1394-1409.
- Ankeny, D.P.; Popovich, P.G.; 2009. B cells produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. *J Clin Invest* 119 (10), 2990-2999.
- Ansorena, E.; De Berdt, P.; Ucakar, B.; Simón-Yarza, T.; Jacobs, D.; Schakman, O.; Jankovski, A.; Deumens, R.; Blanco-Prieto, M.J.; Pr at, V.; des Rieux, A.; 2013. Injectable alginate hydrogel loaded with GDNF promotes functional recovery in a hemisection model of spinal cord injury. *Int J Pharm* 455 (1-2), 148-158.
- Aras, M.; Altas, M.; Motor, S.; Dokuyucu, R.; Yilmaz, A.; Ozgiray, E.; Seraslan, Y.; Yilmaz, N.; 2015. Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. *Injury* 46 (8), 1471-1474.
- Assinck, P.; Duncan, G.J.; Hilton, B.J.; Plemel, J.R.; Tetzlaff, W.; 2017. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat. Neurosci* 20, 637-647.
- Ballermann, M.; Fouad, K.; 2006. Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *Eur J Neurosci* 23 (8), 1988-1996.
- Bamber, N.L.; Li, H.; Lu, X.; Oudega, M.; Aebischer, P.; Xu, X.M.; 2001. Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded mini-channels. *Eur J Neurosci* 13, 257-268.
- Bareyre, F.M.; Schwab, M.E.; 2003. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci* 26 (10), 555-563.
- Bartholdi, D.; Schwab, M.E.; 1997. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 9 (7), 1422-1438.
- Basso, D.M.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C.; 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12, 1-21.

- Battistuzzo, C.; Callister, R.; Callister, R.; Galea, M.; 2012. A systematic review of exercise training to promote locomotor recovery in animal models of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 29, 1600-1613.
- Battistuzzo, C.R.; Rank, M.M.; Flynn, J.R.; Morgan, D.L.; Callister, R.; Callister, R.J.; Galea, M.P.; 2017. Effects of treadmill training on hindlimb muscles of spinal cord-injured mice. *Muscle Nerve* 55 (2), 232-242.
- Battistuzzo, C.R.; Rank, M.M.; Flynn, J.R.; Morgan, D.L.; Callister, R.; Callister, R.J.; Galea, M.P.; 2016. Gait recovery following spinal cord injury in mice: Limited effect of treadmill training. *J S Cord Med* 39 (3), 335-343.
- Beattie, M.S.; Li, Q.; Bresnahan, J.C.; 2000. Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury. *Prog Brain Res* 128, 9-21.
- Behrman, A.L.; Ardolino, E.M.; Harkema, S.J.; 2017. Activity-Based Therapy: From basic science to clinical application for recovery after spinal cord injury. *J Neurol Phys Ther* 41, S39-S45.
- Bethea, J.R.; 2000. Spinal cord injury-induced inflammation : a dual-edged sword. *Prog. Brain Res. Brain Res* 128, 33-42.
- Bethea, J.R.; Dietrich, W.D.; 2002. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol* 15 (3), 355-360.
- Bican, O.; Minagar, A.; Pruitt, A.A.; 2013. The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurol Clin* 31 (1), 1Y18.
- Biering-Sorensen, B.; Kristensen, I.B.; Kjaer, M.; Biering-Sorensen, F.; 2009. Muscle after spinal cord injury. *Muscle Nerve* 40, 499-519.
- Blight, A.R.; 1991. Morphometric analysis of a model of spinal cord injury in guinea pigs, with behavioral evidence of delayed secondary pathology. *J Neurol Sci* 103, 156-171.
- Blomgren, K.; Leist, M.; Groc, L.; 2007. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* 12, 993-1010.
- Boyce, V.S.; Tumolo, M.; Fischer, I.; Murray, M.; Lemay, M.A.; 2007. Neurotrophic factors promote and enhance locomotor recovery in untrained spinalized cats. *J Neurophysiol* 98, 1988-1996.
- Bracken, M.B.; Shepard, M.J.; Collins, W.F.; Holford, T.R.; Young, W.; Baskin, D.S.; Eisenberg, H.M.; Flamm, E.; Leo-Summers, L.; Maroon, J.; 1990. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 322 (20), 1405-1411.

- Brazg, G.; Fahey, M.; Holleran, C.L.; Connolly, M.; Woodward, J.; Hennessy, P.W.; Schmit, B.D.; Hornby, T.G.; 2017. Effects of training intensity on locomotor performance in individuals with chronic spinal cord injury: A randomized crossover study. *Neurorehabil Neural Repair* 31 (10-11), 944-954.
- Bregman, B.S.; Kunkel-Bagden, E.; Schnell, L.; Dai, H.N.; Gao, D.; Schwab, M.E.; 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378 (6556), 498-501.
- Burns, A.S.; Marino, R.J.; Flanders, A.E.; Flett, H.; 2012. Clinical diagnosis and prognosis following spinal cord injury. *Handb Clin Neurol* 109, 47-62.
- Burns, A.S.; Marino, R.J.; Kalsi-Ryan, S.; Middleton, J.W.; Tetreault, L.A.; Dettori, J.R.; Mihalovich, K.E.; Fehlings, M.G.; 2017. Type and timing of rehabilitation following acute and subacute spinal cord injury: a systematic review. *Global Spine J* 7 (3suppl), 175S-194S.
- Busch, S.A.; Silver, J.; 2007. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 17, 120-127.
- Byers, J.S.; Huguenard, A.L.; Kuruppu, D.; Liu, N.K.; Xu, X.M.; Sengelaub, D.R.; 2012. Neuroprotective effects of testosterone on motoneuron and muscle morphology following spinal cord injury. *J Comp Neurol* 520 (12), 2683-2696.
- Caicco, M.J.; Zahir, T.; Mothe, A.J.; Ballios, B.G.; Kihm, A.J.; Tator, C.H.; Schoichet, M.S.; 2013. Characterization of hyaluronanmethylcellulose hydrogels for cell delivery to the injured spinal cord. *J Biomed Mater Res A* 101 (5), 1472-1477.
- Carlson, S.L.; Parrish, M.E.; Springer, J.E.; Doty, K.; Dossett, L.; 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 151 (1), 77-88.
- Carty, A.; McCormack, K.; Coughlan, G.F.; Crowe, L.; Caulfield, B.; 2013. Alterations in body composition and spasticity following subtetanic neuromuscular electrical stimulation training in spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev* 50 (2), 193-202.
- Casella, G.T.B.; Bunge, M.B.; Wood, P.M.; 2006. Endothelial cell loss is not a major cause of neuronal and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Exp Neurol* 201 (1), 8-20.
- Casha, S.; Zygun, D.; McGowan, M.D.; Bains, I.; Yong, V.W.; Hurlbert, R.J.; 2012. Results of phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain* 135 (4), 1224-36.
- Centenaro, L.A.; da Cunha Jaeger, M.; Ilha, J.; de Souza, M.A.; Balbinot, L.F.; Do Nascimento, P.S.; Marcuzzo, S.; Achaval, M.; 2013. Implications of olfactory lamina propria transplantation on hyperreflexia and myelinated fiber regeneration in rats with complete spinal cord transection. *Neurochem Res*, 38 (2), 371-381.

- Cha, J.; Heng, C.; Reinkensmeyer, D.J.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; De Leon, R.D.; 2007. Locomotor ability in spinal rats is dependent on the amount of activity imposed on the hindlimbs during treadmill training. *J Neurotrauma*, 24 (6), 1000-1012.
- Chen, H.C.; Fong, T.H.; Hsu, P.W.; Chiu, W.T.; 2013a. Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, anti-inflammation, and neuroprotection. *J Surg Res* 179, e203-e210.
- Chen, K.; Marsh, B.C.; Cowan, M.; Al'Joboori, Y.D.; Gigout, S.; Smith, C.C.; Messenger, N.; Gamper, N.; Schwab, M.E.; Ichiyama, R.M.; 2017. Sequential therapy of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training leads to cumulative improvements after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 292, 135-144.
- Chen, M.F.; Huang, T.Y, Kuo, Y.M.; Yu, L.; Chen, H.I.; Jen, C.J.; 2013b. Early postinjury exercise reverses memory deficits and retards the progression of closed-head injury in mice. *J Physiol* 591 (4), 985-1000.
- Chen, Y.; Chen, X.Y.; Jakeman, L.B.; Chen, L.; Stokes, B.T.; Wolpaw, J.R.; 2006. Operant conditioning of H-Reflex can correct a locomotor abnormality after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 26 (48), 12537-12543.
- Cheng, Z.; Zhu, W.; Cao, K.; Wu, F.; Li, J.; Wang, G.; Li, H.; Lu, M.; Ren, Y.; He, X.; 2016. Anti-inflammatory mechanism of neural stem cell transplantation in spinal cord injury. *Int J Mol Sci*. 17 (9), e1380.
- Cho, T.A.; 2015. Spinal cord functional anatomy. *Continuum (Minneapolis)* 21 (1), 13-35.
- Chou, W.; Liu, Y.F.; Lin, C.H.; Lin, M.T.; Chen, C.C.; Liu, W.P.; Chang, C.P.; Chio, C.C.; 2018. Exercise Rehabilitation Attenuates Cognitive Deficits in Rats with Traumatic Brain Injury by Stimulating the Cerebral HSP20/BDNF/TrkB Signalling Axis. *Mol Neurobiol* 55 (11), 1-10.
- Cortes, M.; Elder, J.; Rykman, A.; Murray, L.; Avedissian, M.; Stampas, A.; Thickbroom, G.W.; Pascual-Leone, A.; Krebs, H.I.; Valls-Sole, J.; Edwards, D.J.; 2013. Improved motor performance in chronic spinal cord injury following upper-limb robotic training. *NeuroRehabilitation* 33(1), 57-65.
- Côté, M.P.; Azzam, G.A.; Lemay, M.A.; Zhukareva, V.; Houlié, J.D.; 2011. Activity-dependent increase in neurotrophic factors is associated with an enhanced modulation of spinal reflexes after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 28(2), 299-309.
- Cote, M.P.; Menard, A.; Gossard, J.P.; 2003. Spinal cats on the treadmill: changes in load pathways. *J Neurosci* 23, 2789-2796.
- Cramer, G.D.; 2014. General characteristics of the spine. In: *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Nerves* (Third Edition). p. 15-64.

- Crane, A.T.; Fink, K.D.; Smith, J.S.; 2012. The effects of acute voluntary wheel running on recovery of function following medial frontal cortical contusions in rats. *Restor Neurol Neurosci* 30(4), 325-333.
- Cristante, A.F.; Oliveira, R.P.; Marcon, R.M.; Ferreira, R.; Santos, G.B.; 2013. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord* 51 (6), 501.
- Dai, G.; Liu, X.; Zhang, Z.; Yang, Z.; Dai, Y.; Xu, R.; 2013. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. *Brain Research* 1533, 73-79.
- David, S.; Kroner, A.; 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12 (7), 388.
- De Leon, R.D.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; 2001. Is the recovery of stepping following spinal cord injury mediated by modifying existing neural pathways or by generating new pathways? A perspective. *Phys. Ther* 81, 1904-1911.
- De Leon, R.D.; Hodgson, J.A.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; 1998. Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats. *J Neurophysiol* 79 (3), 1329-1340.
- De Leon, R.D.; Acosta, C.N.; 2006. Effect of robotic-assisted treadmill training and chronic quipazine treatment on hindlimb stepping in spinally transected rats. *J. Neurotrauma* 23, 1147-1163.
- DeJong, G.; Tian, W.; Hsieh, C.H.; Junn, C.; Karam, C.; Ballard, P.H.; Smout, R.J.; Horn, S.D.; Zanca, J.M.; Heinemann, A.W.; Hammond, F.M.; Backus, D.; 2013. Rehospitalization in the first year of traumatic spinal cord injury after discharge from medical rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil* 94 (4 suppl), S87-S97.
- Diaz, E.; Morales, H.; 2016. Spinal cord anatomy and clinical syndromes. In: *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. WB Saunders. p. 360-371.
- Dietz, V.; 2002. Proprioception and locomotor disorders. *Nat Rev Neurosci* 3, 781-790.
- Do Espírito Santo, C.C.; Dal Secco, D.; Meireles, A.; de Freitas, G.R.; Bobinski, F.; Cunha, M.P.; Rodrigues, A.L.S.; Swarowsky, A.; Santos, A.R.S.; Ilha, J.; 2018. Locomotor Treadmill Training Promotes Soleus Trophism by Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Paraplegic Rats. *Neurochem Res* 43 (6), 1-11.
- Dupont-Versteegden, E.E.; Houle, J.D.; Gurley, C.M.; Peterson, C.A.; 1998. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol* 275, C1124-1133.

- Dusart, I.; Schwab, M.E.; 1994. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6 (5), 712-724.
- Duysens, J.; Van de Crommert, W.A.A.; 1998. Neural control of locomotion; Part 1: The central pattern generator from cats to humans. *Gait Posture* 7, 131-141.
- Edgerton, V.R.; Tillakaratne, N.J.K.; Bigbee, A.J.; de Leon, R.D.; Roy, R.R.; 2004. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annu Rev Neurosci* 27, 145-167.
- Edwards, D.J.; Cortes, M.; Thickbroom, G.W.; Rykman, A.; Pascual-Leone, A.; Volpe, B.T.; 2013. Preserved corticospinal conduction without voluntary movement after spinal cord injury. *Spinal Cord* 51 (10), 765-767.
- El-Kheir, W.A.; Gabr, H.; Awad, M.R.; Ghannam, O.; Barakat, O.; Farghali, H.A.; El Maadawi, Z.M.; Ewes, I.; Sabaawy, H.E.; 2014. Autologous bone marrow-derived cell therapy combined with physical therapy induces functional improvement in chronic spinal cord injury patients. *Cell transplant* 23 (6), 729-745.
- Elmore, S.; 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Fawcett, J.W.; Asher, R.A.; 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49, 377-391.
- Fawcett, J.W.; Curt, A.; Steeves, W.P.; Tuszynski, M.H.; Lammertse, D.; Bartlett, P.F.; Blight, A.R.; Dietz, V.; Ditunno, J.; Dobkin, B.H.; Havton, L.A.; Ellaway, P.H.; Fehlings, M.G.; Privat, A.; Grossman, R.; Guest, J.D.; Kleitman, N.; Nakamura, M.; Gaviria, M.; Short, D.; 2007. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials. *Spinal cord* 45 (3), 190.
- Fleming, J.C.; Norenberg, M.D.; Ramsay, D.A.; Dekaban, G.A.; Marcillo, A.E.; Saenz, A.D.; Pasquale-Styles, M.; Dietrich, W.D.; Weaver, L.C.; 2006. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 129, 3249-3269.
- Foret, A.; Quertainmont, R.; Botman, O.; Bouhy, D.; Amabili, P.; Brook, G.; ...Franzen, R.; 2010. Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. *J Neurochem*, 112 (3), 762-772.
- Fouad, K.; Metz, G.A.; Merkler, D.; Dietz, V.; Schwab, M.E.; 2000. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behav. Brain Res* 115, 107-113.
- Fouad, K.; Schnell, L.; Bunge, M.B.; Schwab, M.E.; Liebscher, T.; Pearse, D.D.; 2005. Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci* 25, 1169-1178.

- Gensel, J.C.; Donnelly, D.J.; Popovich, P.G.; 2011. Spinal cord injury therapies in humans: an overview of current clinical trials and their potential effects on intrinsic CNS macrophages. *Expert Opin Ther Targets* 15 (4), 505-518.
- Gensel, J.C.; Tovar, A.; Hamers, F.P.T.; Deibert, R.J.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C.; 2006. Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *J Neurotrauma* 23 (1), 36-54.
- Giangregorio, L.M.; Hicks, A.L.; Webber, C.E.; Phillips, S.M.; Craven, B.C.; Bugaresti, J.M.; McCartney, N.; 2005. Body weight supported treadmill training in acute spinal cord injury: impact on muscle and bone. *Spinal Cord* 43, 649-657.
- Goldshmit, Y.; Lythgo, N.; Galea, M.P.; Turnley, A.M.; 2008. Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery. *J Neurotraum* 25 (5), 449-465.
- Gomez-Pinilla, F.; Ying, Z.; Opazo, P.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; 2001. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci* 13:1078-1084.
- Gorassini, M.A.; Norton, J.A.; Nevett-Duchcherer, J.; Roy, F.D.; Yang, J.F.; 2009. Changes in locomotor muscle activity after treadmill training in subjects with incomplete spinal cord injury. *J Neurophysiol* 101, 969-979.
- Gray, C.S.; French, J.M.; Bates, D.; Cartlidge, N.E.; James, O.F.; Venables, G.; 1990. Motor recovery following acute stroke. *Age Ageing* 19, 179-184.
- Gregory, C.M.; Vandenborne, K.; Castro, M.J.; Dudley, G.A.; 2003. Human and rat skeletal muscle adaptations to spinal cord injury. *Can J Appl Physiol* 28, 537-544.
- Griesbach, G.S.; Hovda, D.A.; Molteni, R.; Wu, A.; Gomez-Pinilla, F.; 2004. Voluntary exercise following traumatic brain injury: Brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience* 125, 129-139.
- Griesbach, G.S.; Gómez-Pinilla, F.; Hovda, D.A.; 2007. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. *J Neurotrauma* 24 (7), 1161-1171.
- Grossman, R.G.; Fehlings, M.G.; Frankowski, R.F.; Burau, K.D.; Chow, D.S.; Tator, C.; et al.; 2014. A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 31 (3), 239-255.
- Grossman, S.D.; Rosenberg, L.J.; Wrathall, J.R.; 2001. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 168, 273-282.

- Gruner, J.A.; 1992. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma* 9, 123-126.
- Gulino, R.; Dimartino, M.; Casabona, A.; Lombardo, S.A.; Perciavalle, V.; 2007. Synaptic plasticity modulates the spontaneous recovery of locomotion after spinal cord hemisection. *Neurosci Res* 57 (1), 148-56.
- Hamid, S.; Hayek, R.; 2008. Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview. *Eur Spine J* 17 (9), 1256-1269.
- Harkema, S.J.; 2001. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking. *Neuroscientist* 7 (5), 455-468.
- Hassanzadeh, S.; Jameie, S.B.; Mehdizadeh, M.; Soleimani, M.; Namjoo, Z.; Soleimani, M.; 2018. FNDC5 expression in purkinje neurons of adult male rats with acute spinal cord injury following treatment with methylprednisolone. *Neuropeptides* 70, 16-25.
- Hicks, A.L.; Admas, M.M.; Martin, G.K.; Giangregorio, L.; Latimer, A.; Phillips, S.M.; McCartney, N.; 2005. Long-term body-weight-supported treadmill training and subsequent follow-up in persons with chronic SCI: effects on functional walking ability and measures of subjective well-being. *Spinal Cord* 43, 291-298.
- Hicks, R.R.; Boggs, A.; Leider, D.; Kraemer, P.; Brown, R.; Scheff, S.W.; Seroogy, K.B.; 1998. Effects of exercise following lateral fluid percussion brain injury in rats. *Restor. Neurol. Neurosci* 12, 41-47.
- Hilton, B.J.; Assinck, P.; Duncan, G.J.; Lu, D.; Lo, S.; Tetzlaff, W.; 2013. Dorsolateral funiculus lesioning of the mouse cervical spinal cord at C4 but not at C6 results in sustained forelimb motor deficits. *J Neurotrauma* 30, 1070-1083.
- Himi, N.; Takahashi, H.; Okabe, N.; Nakamura, E.; Shiromoto, T.; Narita, K.; Koga, T.; Miyamoto, O.; 2016. Exercise in the early stage after stroke enhances hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and memory function recovery. *J Stroke and Cerebrovasc Dis* 25 (12), 2987-2994.
- Ho, C.H.; Wuermsler, L.A.; Priebe, M.M.; Chiodo, A.E.; Scelza, W.M.; Kirshblum, S.C.; 2007. Spinal cord injury medicine. Epidemiology and classification. *Arch Phys Med Rehabil* 88 (3) 49-54.
- Hoffman-Goetz, L.; Spagnuolo, P.A.; Guan, J.; 2008. Repeated exercise in mice alters expression of IL-10 and TNF- α in intestinal lymphocytes. *Brain Behav. Immun* 22, 195-199.
- Hornby, T.G.; Straube, D.S.; Kinnaird, C.R.; Holleran, C.L.; Echaz, A.J.; Rodriguez, K.S.; Wagner, E.J.; Narducci, E.A.; 2011. Importance of specificity, amount, and intensity of locomotor training to improve ambulatory function in patients poststroke. *Top Stroke Rehabil* 18 (4), 293-307.

- Houle, J.D., Côté, M.P.; 2013. Axon regeneration and exercise-dependent plasticity after spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci* 1279 (1), 154-163.
- Huang, W.L.; George, K.J.; Ibba, V.; Liu, M.C.; Averill, S.; Quartu, M.; Hamlyn, P.J.; Priestley, J.V.; 2007. The characteristics of neuronal injury in a static compression model of spinal cord injury in adult rats. *Eur J Neurosci* 25 (2), 362-372.
- Hulsebosch, C.E.; 2002. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ* 26 (4), 238-255.
- Hurley, S.D.; Olschowka, J.A.; O'Banion, M.K.; 2002. Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. *J Neurotrauma* 19 (1), 1-15.
- Hutchinson, K.J.; Linderman, J.K.; Basso, D.M.; 2001. Skeletal muscle adaptations following spinal cord contusion injury in rat and the relationship to locomotor function: a time course study. *J Neurotrauma* 18, 1075-1089.
- Hyun, J.K.; Kim, H.W.; 2010. Clinical and experimental advances in regeneration of spinal cord injury. *J Tissue Eng* 2010, 650857.
- Ilha, J.; Centenaro, L.A.; Cunha, N.B.; de Souza, D.F.; Jaeger, M.; Do Nascimento, P.S.; Kolling, J.; Ben, J.; Marcuzzo, S.; Wyse, A.T.S.; Gottfried, C.; Gottfried, C.; 2011. The beneficial effects of treadmill step training on activity-dependent synaptic and cellular plasticity markers after complete spinal cord injury. *Neurochem Res*, 36 (6), 1046-1055.
- Itosaka, H.; Kuroda, S.; Shichinohe, H.; Yasuda, H.; Yano, S.; Kamei, S.; Kawamura, R.; Hida, K.; Iwasaki, Y.; 2009. Fibrin matrix provides a suitable scaffold for bone marrow stromal cells transplanted into injured spinal cord: a novel material for CNS tissue engineering. *Neuropathology* 29 (3): 248-257.
- Jackson, A.B.; Dijkers, M.; Devivivo, M.; Poczatek, R.B.; 2004. A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. *Arch Phys Med Rehabil* 85, 1740-1748.
- Jayaraman, A.; Gregory, C.M.; Bowden, M.; Stevens, J.E.; Shah, P.; Behrman, A.L.; Vandenborne, K.; 2005. Lower extremity skeletal muscle function in persons with incomplete spinal cord injury. *Spinal Cord* 44 (11), 680-687.
- Jia, Y.F.; Gao, H.L.; Ma, L.J.; Li, J.; 2015. Effect of nimodipine on rat spinal cord injury. *Genet Mol Res* (1), 1269-1276.
- Jung, S.Y.; Kim, D.Y.; Yune, T.Y.; Shin, D.H.; Baek, S.B.; Kim, C.J.; 2014. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in rats. *Exp Ther Med* 7 (3), 587-593.

- Jung, S.Y.; Seo, T.B.; Kim, D.Y.; 2016. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. *J Exerc Rehabil* 12 (4), 284.
- Karsy, M.; Hawryluk, G; 2017. Pharmacologic management of acute spinal cord injury. *Neurosurg Clin N Am* 28 (1), 49-62.
- Kao, T.; Shumsky, J.S.; Murray, M.; Moxon, K.A.; 2009. Exercise induces cortical plasticity after neonatal spinal cord injury in the rat. *J Neurosci* 29 (23), 7549-7557.
- Kiecolt-Glaser, J.K.; Dura, J.R.; Speicher, C.E.; Trask, O.J.; Glaser, R.; 1991. Spousal caregivers of dementia victims: longitudinal changes in immunity and health. *Psychosom Med* 53, 345-362.
- Kim, Y.H.; Ha, K.Y.; Kim, S.I.; Wrathall, J.; Shields, C.; Roskams, A.; 2017. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clin. Orthop. Surg* 9 (1), 1-9.
- Klusman, I.; Schwab, M.E.; 1997. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res* 762 (1-2), 173-184.
- Kong, X.; Gao, J.; 2017. Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *J. Cell. Mol. Med* 21(5), 941-954.
- Kubasak, M.D.; Jindrich, D.L.; Zhong, H.; Takeoka, A.; McFarland, K.C.; Munoz-Quiles, C.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; Ramon-Cueto, A.; Phelps, R.E.; 2008. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain* 131, 264-276.
- Kubasak, M.D.; Jindrich, D.L.; Zhong, H.; Takeoka, A.; McFarland, K.C.; Muñoz-Quiles, C.; ... Phelps, P.E.; 2007. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain* 131 (1), 264-276.
- Kucher, K.; Johns, D.; Maier, D.; Abel, R.; Badke, A.; Baron, H.; Thietje, R.; Casha, S.; Meindi, R.; Gomez-Mancilla, B.; Pfister, C.; Rupp, R.; Weidner, N.; Mir, A.; Schwab, M.E.; Curt, A.; 2018. First-in-Man Intrathecal Application of Neurite Growth-Promoting Anti-Nogo-A Antibodies in Acute Spinal Cord Injury. *Neurorehabil Neural Repair* 32 (6-7), 578-589.
- Kwon, B. 2004. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 4, 451-464.
- Lee, B.B.; Cripps, R.A.; Fitzharris, M.; Wing, P.C.; 2014. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord* 52, 110-116.
- Lee, J.; Thumbikat, P.; 2015. Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surg* 1-10.

- Lee, Y.S.; Zdunowski, S.; Edgerton, V.R.; Roy, R.R.; Zhong, H.; Hsiao, I.; Lin, V.W.; 2010. Improvement of gait patterns in step-trained, complete spinal cord-transected rats treated with a peripheral nerve graft and acidic fibroblast growth factor. *Exp Neurol* 224, 429-437.
- Levi, A.D.; Anderson, K.D.; Okonkwo, D.O.; Park, P.; Bryce, T.N.; Kurpad, S.N.; Aarabi, B.; Hsieh, J.; Gant, K.; 2018. Clinical Outcomes from a Multi-Center Study of Human Neural Stem Cell Transplantation in Chronic Cervical Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* (in press).
- Lewen, A.; Matz, P.; Chan, P.H.; 2000. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 17, 871-890.
- Li, Y.; Gu, R.; Zhu, Q.; Liu, J.; 2018. Changes of Spinal Edema and Expression of Aquaporin 4 in Methylprednisolone-treated Rats with Spinal Cord Injury. *Ann Clin Lab Sci* 48 (4), 453-459
- Li, W.T.; Zhang, X.Y.; Xue, H.; Ni, C.P.; Wang, E.G.; An, L.B.; 2013. Comparison of three different time points of starting treadmill training in spinal cord injured rats. *Dev Neurorehabil* 16 (6), 382-390.
- Lipton, S.A.; Rosenberg, P.A.; 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330, 613-622.
- Liu, M.; Bose, P.; Walter, G.A.; Anderson, D.K.; Thompson, F.J.; Vandenborne, K.; 2006. Changes in muscle T2 relaxation properties following spinal cord injury and locomotor training. *Eur J Appl Physiol* 97, 355-361.
- Liu, M.; Bose, P.; Walter, G.A.; Thompson, F.J.; Vandenborne, K.; 2008. A longitudinal study of skeletal muscle following spinal cord injury and locomotor training. *Spinal cord* 46 (7), 488-493.
- Liu, M.; Stevens-Lapsley, J.E.; Jayaraman, A.; Ye, F.; Conover, C.; Walter, G.A.; Bose, P.; Thompson, F.J.; Borst, S.E.; Vandenborne, K.; 2010. Impact of treadmill locomotor training on skeletal muscle IGF1 and myogenic regulatory factors in spinal cord injured rats. *Eur J Appl Physiol* 109, 709-720.
- Liu, M.; Wu, W.; Li, H.; Li, S.; Huang, L.T.; Yang, Y.Q.; Sun, Q.; Wang, C.X.; Yu, Z.; Hang, C.H.; 2015. Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice. *J Spinal Cord Med* 38 (6), 745-753.
- Loane, D.J.; Byrnes, K.R.; 2010. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7 (4), 366-377.
- Long, J.; Federico, P.; Perez, M.A.; 2017. A novel cortical target to enhance hand motor output in humans with spinal cord injury. *Brain* 140 (6), 1619-1632.
- Mai, J.K.; Paxinos, G. *The human nervous system*. Academic Press, 2011.

- Martinez, M.; Delivet-Mongrain, H.; Rossignol, S.; 2013. Treadmill training promotes spinal changes leading to locomotor recovery after partial spinal cord injury in cats. *J Neurophysiol* 109, 2909-2922.
- Maynard, F.M.; Michael, B.B.; Creasey, G.; Ditunno, J.F.; Donovan, W.H.; Ducker, T.B.; Garber, S.L.; Marino, R.J.; Stover, S.L.; Tator, C.H.; Waters, R.L.; Wilberger, J.E.; Young, W.; 1997. International standards for neurological and functional classifications of spinal cord injury. *Spinal Cord* 35, 266-274.
- McDonald, J.W.; Howard, M.J.; 2002. Repairing the damaged spinal cord: A summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Prog Brain Res* 137, 299-309.
- McGee, A.W.; Strittmatter, S.M.; 2003. The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci* 26, 193-198.
- Mendonça, M.V.P.; Larocca, T.F.; de Freitas Souza, B.S.; Villarreal, C.F.; Silva, L.F.; Matos, A.C.; Novaes, M.A.; Bahia, C.M.; de Oliveira Melo Martinez, A.C.; Kaneto, C.M.; Furtado, S.B.; Sampaio, G.P.; Soares, M.B.; dos Santos, R.R.; 2014. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther* 5 (6), 126.
- Metz, G.A.; Whishaw, I.Q.; 2002. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing and coordination. *J Neurosci Methods* 115 (2), 169-179.
- Morse, L.R.; Stolzmann, K.; Nguyen, H.P.; Jain, N.B.; Zayac, C.; Gagnon, D.R.; Tun, C.G.; Garshick, E.; 2008. Association between mobility mode and C-reactive protein levels in men with chronic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 89 (4), 726-731.
- Mothe, A.J.; Tam, R.Y.; Zahir, T.; Tator, C.H.; Shoichet, M.S.; 2013. Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials* 34 (15), 3775-3783.
- Moraska, A.; Deak, T.; Spencer, R.L.; Roth, D.; Fleshner, M.; 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279 (4), R1321-R1329.
- Morrison, S.A.; Lorenz, D.; Eskay, C.P.; Forrest, G.F.; Basso, D.M.; 2018. Longitudinal recovery and reduced costs after 120 sessions of locomotor training for motor incomplete spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 99 (3), 555-562.
- Moshonkina, T.R.; Gilerovich, E.G.; Fedorova, E.A.; Avelev, V.D.; Gerasimenko, Y.P.; Otellin, V.A.; 2004. Morphofunctional basis for recovery of locomotor movements in rats with completely crossed spinal cord. *Bull Exp Biol Med* 138 (2), 198-201

Nardone, R.; Florea, C.; Höller, Y.; Brigo, F.; Versace, V.; Lochner, P.; Golaszewski, S.; Trink, E.; 2017. Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. *Zoology* 123, 101-114.

Nicola, F.D.C.; Marques, M.R.; Odorcyk, F.; Arcego, D.M.; Petenuzzo, L.; Aristimunha, D.; Vizuet, A.; Sanches, E.F.; Pereira, D.P.; Maurmann, N.; Dalmaz, C.; Pranke, P.; Netto, C.A.; 2017. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res* 1663, 95-105.

Nicola, F.D.C. Efeito neuroprotetor do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de dente decíduo humano em ratos Wistar submetidos à lesão medular. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017.

Nicola, F.D.C.; Rodrigues, L.P.; Crestani, T.; Quintiliano, K.; Sanches, E.F.; Willborn, S.; Aristimunha, D.; Boisserand, L.; Pranke, P.; Netto, C.A.; 2016. Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. *Braz J Med Biol Res* 49 (9), e5319.

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

Obermair, F.J.; Schroter, A.; Thallmair, M.; 2008. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury. *Physiology* 23, 296-304.

Oh, M.J.; Seo, T.B.; Kwon, K.B.; Yoon, S.J.; Elzi, D.J.; Kim, B.G.; Namgung, U.; 2009. Axonal outgrowth and Erk1/2 activation by training after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 26 (11), 2071-2082.

Oyinbo, C.A.; 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp* 71, 281-299.

Otis, J.S.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; Talmadge, R.J.; 2004. Adaptations in metabolic capacity of rat soleus after paralysis. *J Appl Physiol* 96, 584-596.

Panjabi, M.M.; Wrathall, J.R.; 1988. Biomechanical analysis of experimental spinal cord injury and functional loss. *Spine (Phila Pa 1976)* 13, 1365-1370.

Papa, S.; Caron, I.; Erba, E.; Panini, N.; de Paola, M.; Mariani, A.; Colombo, C.; Ferrari, R.; Pozzer, D.; Zanier, E.R.; Pischietta, F.; Lucchetti, J.; Bassi, A.; Valentini, G.; Simonutti, G.; Rossi, F.; Moscatelli, D.; Forloni, G.; Veglianese, P.; 2016. Early modulation of pro-inflammatory microglia by minocycline loaded nanoparticles confers long lasting protection after spinal cord injury. *Biomaterials* 75, 13-24.

Pearson, K.G.; Rossignol, S.; 1991. Fictive motor patterns in chronic spinal cats. *J Neurophysiol* 66 (6), 1874-1887.

- Petersen, A.M.W.; Pedersen, B.K.; 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98 (4), 1154-1162.
- Petitjean, M.E.; Pointillart, V.; Dixmierias, F.; Wiart, L.; Sztark, F.; Lassié, P. Thicoipé, M.; Dabadie, P.; 1998. Medical treatment of spinal cord injury in the acute stage. *Ann Fr Anesth Reanim* 17 (2), 115-122.
- Phelan, J.N.; Gonyea, W.J.; 1997. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247 (2), 179-188.
- Piao, C.; Stoica, B.A.; Wu, J.; Sabirzhanov, B.; Zhao, Z.; Cabatbat, R.; Loane, D.J.; Faden, A.I.; 2013. Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury." *Neurobiol Dis* 54, 252-263.
- Pierrot-Deseilligny, E.; 2002. Propriospinal transmission of part of the corticospinalvexcitation in humans. *Muscle Nerve* 26, 155-172
- Pineau, I.; Sun, L.; Bastien, D.; Lacroix, S.; 2010. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain Behav Immun* 24, 540-553.
- Plemel, J.R.; Yong, V.W.; Stirling, D.P.; 2014. Immune modulatory therapies for spinal cord injury—past, present and future. *Exp Neurol* 258, 91-104.
- Plotnikoff, N.; Murgo, A.; Faith, R.; Wybran, J. *Stress and Immunity*. CRC Press. 1991.
- Popovich, P.G.; Lemeshow, S.; Gensel, J.C.; Tovar, C.A.; 2012. Independent evaluation of the effects of glibenclamide on reducing progressive hemorrhagic necrosis after cervical spinal cord injury. *Exp Neurol* 233 (2), 615-622.
- Popovich, P.G.; Wei, P.; Stokes, B.T.; 1997. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377 (3), 443-464.
- Profyris, C.; Cheema, S.S.; Zang, D.; Azari, M.F.; Boyle, K.; Petratos, S.; 2004. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 15, 415-436.
- Quadri, S.A.; Farooqui, M.; Ikram, A.; Zafar, A.; Khan, M.A.; Suriya, S.S.; Claus, C.F.; Fiani, B.; Rahman, M.; Ramachandran, A.; Armstrong, I.I.T.; Taqui, M.A.; Mortazavi, M.M.; 2018. Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury. *Neurosurg Rev* (in press).
- Qin, W.; Bauman, W.A.; Cardozo, C.; 2010. Bone and muscle loss after spinal cord injury: organ interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1211, 66-84.
- Raineteau, O.; Schwab, M.E.; 2001. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci* 2, 263-273.

- Ramer, M.S.; Harper, G.P.; Bradbury, E.J.; 2000. Progress in spinal cord research – A refined strategy for the International Spinal Research Trust. *Spinal Cord* 38 (8), 449-472.
- Reilly, B.D.; Franklin, C.E.; 2016. Prevention of muscle wasting and osteoporosis: the value of examining novel animal models. *J Exp Biol* 219 (Pt17), 2582-2595.
- Risedal, A.; Zeng, J.; Johansson, B.B.; 1999. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 997-1003.
- Rivlin, A.S.; Tator, C.H.; 1978. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg. Neurol* 10, 38-43.
- Rosenzweig, E.S.; Courtine, G.; Jindrich, D.L.; Brock, J.H.; Ferguson, A.R.; Strand, S.C.; Nout, Y.S.; Roy, R.R.; Miller, D.M.; Beattie, M.S.; Havton, L.A.; Bresnahan, J.C.; Edgerton, V.R.; Tuszynski, M.H.; 2010. Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury. *Nat Neurosci* 13, 1505-1510.
- Rossignol, S.; Brustein, E.; Bouyer, L.; Barthélemy, D.; Langlet, C.; Leblond, H.; 2004. Adaptive changes of locomotion after central and peripheral lesions. *Can J Physiol Pharmacol* 82 (8-9), 617-627.
- Rossignol, S.; 2006. Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/or peripheral lesions in the adult mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1473), 1647-1671.
- Rouanet, C.; Reges, D.; Rocha, E.; Gagliardi, V.; Silva, G.S.; 2017. Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. *Arq Neuropsiquiatr* 75 (6), 387-393.
- Rowland, J.W.; Hawryluk, G.W.; Kwon, B.; Fehlings, M.G.; 2008. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus* 25, 1-17.
- Sakai, K.; Yamamoto, A.; Matsubara, K.; Nakamura, S.; Naruse, M.; Yamagata, M.; Sakamoto, K.; Tauchi, R.; Wakao, N.; Imagama, S.; Hibi, H.; Kadomatsu, K.; Ishiguro, N.; Ueda, M.; 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*; 122: 80-90.
- Sámano, C.; Nistri, A.; 2017. Mechanism of neuroprotection against experimental spinal cord injury by riluzole or methylprednisolone. *Neurochem Res* (in press).
- Scivoletto, G.; Morganti, B.; Molinari, M.; 2005. Early versus delayed inpatient spinal cord injury rehabilitation: an Italian study. *Arch Phys Med Rehabil* 86, 512-516.

- Shen, X.; Li, A.; Zhang, Y.; Dong, X.M.; Shan, T.; Wu, Y.; Jia, J.; Hu, Y.; 2013. The effect of different intensities of treadmill exercise on cognitive function deficit following a severe controlled cortical impact in rats. *Int J Mol Sci* 14 (11), 21598-21612.
- Shin, H.Y.; Kim, H.; Kwon, M.J.; Hwang, D.H.; Lee, K.; Kim, B.G.; 2014. Molecular and cellular changes in the lumbar spinal cord following thoracic injury: regulation by treadmill locomotor training. *PLoS One* 9(2), e88215.
- Shin, J.C.; Kim, D.H.; Yu, S.J.; Yang, H.E.; Yoon, S.Y.; 2013. Epidemiologic change of patients with spinal cord injury. *Ann Rehabil Med* 37, 50-56.
- Smith, J.A.; Das, A.; Ray, S.K.; Banik, N.L.; 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87 (1), 10-20.
- Sobani, Z.A.; Quadri, S.A.; Enam, A.; 2010. Stem cells for spinal cord regeneration: current status. *Surg Neurol Int* 1, 93-107.
- Song, M.K.; Kim, E.J.; Kim, J.K.; Park, H.K.; Lee, S.G.; 2018. Effect of regular swimming exercise to duration-intensity on neurocognitive function in cerebral infarction rat model. *Neurol Res* (in press).
- Steeves, J.D.; Kramer, J.K.; Fawcett, J.W.; Cragg, J.; Lammertse, D.P.; Blight, A.R.; Marino, R.J.; Ditunno, J.F.; Coleman, W.P.; Geisler, F.H.; Guest, J.; Jones, L.; Burns, S.; Schubert, M.; van Hedel, H.J.; Curt, A.; 2011. Extent of spontaneous motor recovery after traumatic cervical sensorimotor complete spinal cord injury. *Spinal Cord* 49, 257-265.
- Stevens, J.E.; Liu, M.; Bose, P.; O'Steen, W.A., Thompson, F.J.; Anderson, D.K.; Vandeborne, K.; 2006. Changes in soleus muscle function and fiber morphology with one week of locomotor training in spinal cord contusion injured rats. *J Neurotrauma* 23 (11), 1671-1681.
- Sumida, M.; Fujimoto, M.; Tokuhira, A.; Tominaga, T.; Magara, A.; Uchida, R.; 2001. Early rehabilitation effect for traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 82, 391-395.
- Sundseth, A.; Thommessen, B.; Ronning, O.M.; 2012. Outcome after mobilization within 24 hours of acute stroke: a randomized controlled trial. *Stroke* 43, 2389-2394.
- Sunshine, J.E.; Dagal, A.; Burns, S.P.; Bransford, R.J.; Zhang, F.; Newman, S.; Nair, B.G.; Sharar, S.R.; 2017. Methylprednisolone therapy in acute traumatic spinal cord injury: Analysis of a regional spinal cord model systems database. *Anesth Analg* 124 (4), 1200-1205.
- Sykova, E.; Homola, A.; Mazanec, R.; Lachmann, H.; Konradova, S.L.; Kobyłka, P.; Pádr, R.; Neuwirth, J.; Komrská, V.; Vávra, V.; Stulí, J.; Bojar, M.; 2006. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant* 15, 675-87.

- Taghipour, Z.; Karbalaie, K.; Kiani, A.; Niapour, A.; Bahramian, H.; Nasr-Esfahani, M.H.; Baharvand, H.; 2012. Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev* 21, 1794-1802.
- Teeter, L.; Gassaway, J.; Taylor, S.; LaBarbera, J.; McDowell, S.; Backus, D.; Zanca, J.M.; Natale, A.; Cabrera, J.; Smout, R.J.; Kreider, S.E.; Whiteneck, G.; 2012. Relationship of physical therapy inpatient rehabilitation interventions and patient characteristics to outcomes following spinal cord injury: the SCIR rehab project. *J Spinal Cord Med* 35, 503-526.
- Tillakaratne, N.J.; Guu, J.J.; De Leon, R.D.; Bigbee, A.J.; London, N.J.; Zhong, H.; Ziegler, M.D.; Joynes, R.L.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; 2010. Functional recovery of stepping in rats after a complete neonatal spinal cord transection is not due to regrowth across the lesion site. *Neuroscience* 166, 23-33.
- Timoszyk, W.K.; Nessler, J.A.; Acosta, C.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; Reinkensmeyer, D.J.; de Leon, R.; 2005. Hindlimb loading determines stepping quantity and quality following spinal cord transection. *Brain Res* 1050, 180-189.
- Ufuk, T.; Ganesh, S.; Sigurd, B.; 2005. Spine cord injury: an update. *Semin Spine Surg* 17, 73-83.
- Van de Crommert, H.W.; 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 (3), 251-263.
- Voytik, S.L.; Przyborski, M.; Badylak, S.F.; Konieczny, S.F.; 1993. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dv Dyn* 198, 214-224.
- Wang, J.; Pearse, D.D.; 2015. Therapeutic hypothermia in spinal cord injury: the status of its use and open questions. *Int J Mol Sci* 16 (8), 16848-16879.
- Ward, R.E.; Huang, W.; Kostusiak, M.; Pallier, P.N.; Michael-Titus, A.T.; Priestley, J.V.; 2014. A characterization of white matter pathology following spinal cord compression injury in the rat. *Neuroscience* 260, 227-239.
- Wells, J.E.; Hurlbert, R.J.; Fehlings, M.G.; Yong, V.W.; 2003. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 126, 1628-1637.
- Werning, A.; Muller, S.; Nanassy, A.; Cagol, E.; 1995. Laufband therapy based on "rules of spinal locomotion" is effective in spinal cord injured persons. *Eur J Neurosci* 7, 823-829.
- West, C.R.; Taylor, B.J.; Campbell, I.G.; Romer, L.M.; 2014. Effects of inspiratory muscle training on exercise responses in Paralympic athletes with cervical spinal cord injury. *Scand J Med Sci Sports* 24, 764-772.

- Whiteneck, G.; Gassaway, J.; Dijkers, M.P.; Heinemann, A.W.; Kreider, S.E.; 2012. Relationship of patient characteristics and rehabilitation services to outcomes following spinal cord injury: the SCIREhab project. *J Spinal Cord Med* 35, 484-502.
- Wilson, J.R.; Forgione, N.; Fehlings, M.G.; 2013. Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury. *CMAJ* 185 (6) 485-492.
- Wirz, M.; Colombo, G.; Dietz, V.; 2001. Long term effects of locomotor training in spinal humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71 (1), 93-96.
- Wrathall, J.R.; Pettegrew, R.K.; Harvey, F.; 1985. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups. *Exp Neurol* 88, 108-122.
- Wolpaw, J.R.; Tennissen, A.M.; 2001. Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. *Annu Rev Neurosci* 24, 807-843.
- Ying, Z.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R.; Gómez-Pinilla, F.; 2005. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol* 193 (2), 411-419.
- Young, W.; 2002. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res* 137, 231-255.
- Yune, T.Y.; Chang, M.J.; Kim, S.J.; Lee, Y.B.; Shin, S.W.; Rhim, H.; Kim, Y.C.; Shin, M.L.; Oh, Y.J.; Han, C.T.; Markelonis, G.J.; Oh, T.H.; 2003. Increased production of tumor necrosis factor- α induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 20, 207-219.
- Zaccagnini, G.; Martelli, F.; Magenta, A.; Cencioni, C.; Fasanaro, P.; Nicoletti, C.; Biblioli, P.; Pelicci, P.G.; Capogrossi, M.C.; 2007. p66SHcA and oxidative stress modulate myogenic differentiation and skeletal muscle regeneration after hind limb ischemia. *J Biol Chem* 282, 31453-31459.
- Zeman, R.J.; Zhao, J.; Zhang, Y.; Zhao, W.; Wen, X.; Wu, Y.; Pan, J.; Bauman, W.A.; Cardozo, C.; 2009. Differential skeletal muscle gene expression after upper or lower motor neuron transection. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 458, 525-535.
- Zörner, B.; Bachmann, L.C.; Filli, L.; Kapitza, S.; Gullo, M.; Bolliger, M.; Starkey, M.L.; Röthlisberger, M.; Gonzenbach, R.R.; Schwab, M.E.; 2014. Chasing central nervous system plasticity: the brainstem's contribution to locomotor recovery in rats with spinal cord injury. *Brain* 137 (6), 1716-1732.
- Zhu, C.; Wang, X.; Qiu, L.; Peeters-Scholte, C.; Hagberg, H.; Blomgren, K.; 2004. Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem* 90 462-471.

9. Anexo

Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS).

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 28088
Título: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA NAS FASES SUBAGUDA E CRÔNICA EM UM MODELO DE LESÃO MEDULAR POR CONTUSÃO EM RATOS

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

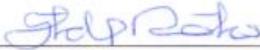
CARLOS ALEXANDRE NETTO - coordenador desde 02/01/2015
Marília Rossato Marques - Aluno de Doutorado desde 02/01/2015

Equipe Externa:

Eduardo Farias Sanches - pesquisador desde 02/01/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/11/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 262 ratos machos Wistar adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 8 de Dezembro de 2014



STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética