

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

Danielli Züge Lucho

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES DE  
TREINAMENTO LOCOMOTOR EM ESTEIRA INICIADO PRECOCEMENTE  
APÓS A LESÃO MEDULAR POR CONTUSÃO EM RATOS**

Porto Alegre

2022

Danielli Züge Lucho

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES DE  
TREINAMENTO LOCOMOTOR EM ESTEIRA INICIADO PRECOCEMENTE  
APÓS A LESÃO MEDULAR POR CONTUSÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre

2022

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros dispendidos para execução deste projeto e pela bolsa a mim concedida neste Mestrado;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da instituição, pela oportunidade de vivenciar grandes experiências e aprender com excelentes mestres em uma universidade pública;

Ao Professor Dr. Carlos Alexandre Netto pela acolhida, pelos ensinamentos e pela confiança, calma e positividade com que conduziu esta orientação;

Aos meus colegas contemporâneos de laboratório, pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica, por todo o auxílio e momentos de descontração que compartilhamos;

Aos ex-alunos do laboratório de hipóxia-isquemia e neuroproteção, que trabalharam anteriormente na linha de pesquisa com lesão medular, por toda ajuda e aprendizagem oportunizados;

Ao melhor presente que esta jornada poderia ter me proporcionado, ter contado com a amizade e parceria incondicional do Andrey Vinicios Soares de Carvalho, que se tornou peça essencial neste trabalho e na minha vida;

Aos meus pais, Edson e Lisiane Lucho, por serem porto seguro em qualquer escolha que eu faça e por nunca medirem esforços pela minha vida acadêmica;

Ao meu irmão, Leonardo Züge Lucho, por me dar motivos para ser exemplo e fazer sempre o meu melhor;

Ao meu grande amor, Eduardo Soares, com quem compartilho meus dias, tornando tudo mais leve e cheio de vida; seu incentivo e sua presença são fundamentais.

## RESUMO

A lesão medular espinal (LME) altera o funcionamento dos sistemas sensorial, motor e autonômico, deixando com algum grau de incapacidade a maioria dos acometidos. Sua fisiopatologia envolve uma cascata de eventos como inflamação, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, ativação de vias apoptóticas e consequente morte celular, decorrentes do impacto inicial, causado por trauma mecânico. A maioria das LME são incompletas, com alguma preservação medular. Estratégias terapêuticas têm se concentrado na possibilidade de plasticidade do tecido neural residual da medula espinal (ME) lesada, visando não somente a compensação da função corporal alterada, mas também potencializar a recuperação do indivíduo acometido. O treino locomotor em esteira (TLE) é uma importante estratégia de reabilitação física que parece melhorar a função motora após a ocorrência da LME. Todavia, estudos com modelos experimentais de LME trazem resultados controversos quanto à promoção de benefícios ou prejuízos aos animais expostos ao TLE. É de comum acordo na literatura existente que os resultados da intervenção através do TLE são diretamente influenciados pelo protocolo de treino utilizado, incluindo tempo para início após a LME, além da intensidade em que o exercício é realizado. Essas são variáveis importantes e ainda pouco estudadas. Exercícios com menor intensidade parecem estar relacionados a efeitos neuroprotetores, enquanto aqueles realizados em maior intensidade têm demonstrado efeitos negativos para o SNC, provavelmente devido à resposta ao estresse induzido. Assim, esse trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do TLE realizado com diferentes intensidades e iniciado precocemente após a LME por contusão em ratos Wistar machos. Foram realizados dois experimentos, ambos com protocolo de TLE de 20 minutos por dia, realizado em intensidade leve ou moderada e iniciado 7 dias após a LME. Em um dos experimentos, os animais foram expostos à intervenção somente por 5 dias e, no outro, 5 dias por semana, durante 4 semanas. Verificou-se que os animais treinados em maior intensidade durante 4 semanas demonstraram pior locomoção do que os treinados em menor intensidade e ainda, aqueles treinados em menor intensidade durante 5 dias, tiveram melhora da função mitocondrial da ME. No entanto, esses resultados ainda são controversos, à medida que a pior recuperação motora dos animais treinados por 4 semanas em maior intensidade não se relacionou com maior lesão na estrutura da ME e a melhor função mitocondrial para os animais treinados por 5 dias em menor intensidade não foi associada a uma recuperação locomotora efetiva. É importante salientar que tão necessário quanto compreender possíveis efeitos benéficos de um tratamento, é preciso também ter a devida atenção quando efeitos negativos são encontrados, a fim de promover sempre a melhor forma de intervenção, proporcionando benefícios com o menor risco de prejuízos aos tratados. Novos estudos são necessários para elucidar as variáveis importantes para definir protocolos efetivos de TLE como intervenção terapêutica após a LME.

**Palavras-chave:** traumatismos da medula espinal; treinamento físico; reabilitação; reabilitação neurológica

## ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) alters the function of the sensory, motor and autonomic systems, leaving most of those affected disabled. Its pathophysiology involves a cascade of events such as inflammation, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, activation of apoptotic pathways and consequent cell death, resulting from the initial impact caused by mechanical trauma. Most SCIs are incomplete, with some spinal cord preservation. Therapeutic strategies have focused on the possibility of plasticity of the residual neural tissue of the injured spinal cord (SC), aiming not only to compensate for the altered body function, but also to enhance the recovery of the affected individual. Treadmill training (TT) is an important physical rehabilitation strategy that seems to improve motor function after the occurrence of SCI. However, studies with experimental models of SCI bring controversial results regarding the promotion of benefits or harm to animals exposed to TT. It is in common agreement in the existing literature that the results of the intervention through the TT are directly influenced by the training protocol used, including time to start after the SCI, in addition to the intensity at which the exercise is performed. These are important variables and still little studied. Lower intensity exercises seem to be related to neuroprotective effects, while those performed at higher intensity have shown negative effects on the central nervous system (CNS), probably due to the response to induced stress. Therefore, this study aimed to investigate the effects of TLE performed at different intensities, starting early after SCI due to contusion in rats. Two experiments were carried out, both with a TT protocol of 20 minutes per day, performed at mild or moderate intensity and started 7 days after the SCI. In one of the experiments, the animals were exposed to the intervention only for 5 days and, in the other, 5 days a week, for 4 weeks. It was found that animals trained at a higher intensity for 4 weeks showed worse locomotion than those trained at a lower intensity, and even those trained at a lower intensity for 5 days seem to have improved the mitochondrial function of spinal cord (SC). However, these results are still controversial, as the worse motor recovery of animals trained for 4 weeks at higher intensity was not related to greater damage to the SC structure and better mitochondrial function for animals trained for 5 days at lower intensity was not associated with effective locomotor recovery. It is important to point out that as necessary as it is to understand possible beneficial effects of a treatment, it is also necessary to pay due attention when negative effects are found, in order to always promote the best form of intervention, providing benefits, without risk of harm to those treated. It is suggested that new studies be carried out, which may elucidate the important variables to define effective TT protocols as a therapeutic intervention after SCI.

**Keywords:** spinal cord injury; exercise; rehabilitation; neurological rehabilitation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representações anatômicas macroscópicas da medula espinal.....	11
<b>Figura 2</b> – Ilustração esquemática demonstrando a classificação topográfica funcional nas lesões medulares espinais em humanos.....	12
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática dos principais eventos envolvidos na fisiopatologia da lesão medular espinal.....	16
<b>Figura 4</b> – Linha do tempo do Experimento 1.....	25
<b>Figura 5</b> – Linha do tempo do Experimento 2.....	26
<b>Figura 6</b> – Imagem do equipamento <i>New York University Impactor (NYU Impactor)</i> .....	28
<b>Figura 7</b> – Imagem da esteira ergométrica adaptada para ratos Insight®.....	29
<b>Figura 8</b> – Imagem do campo aberto.....	30
<b>Figura 9</b> – Representação gráfica dos resultados obtidos pela avaliação locomotora (experimento 1).....	37
<b>Figura 10</b> – Avaliação histológica da medula espinal.....	38
<b>Figura 11</b> – Representação gráfica dos resultados obtidos pela avaliação locomotora (experimento 2).....	39
<b>Figura 12</b> – Representação gráfica dos resultados obtidos pela avaliação bioquímica da medula espinal.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação da intensidade do exercício a partir do volume de oxigênio máximo.....	29
<b>Tabela 2</b> – Escala de Basso Beattie e Bresnahan.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazolepropionico
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ASIA</b>	<i>American Spinal Injury Association</i>
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>BBB</b>	Escala de Basso, Beattie e Bresnahan
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>Covid-19</b>	Doença do Coronavírus 2019
<b>CREAL</b>	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
<b>C5</b>	Quinta Vértebra Cervical
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DCF</b>	2',7'-Diclorofluoresceína
<b>DCF-DA</b>	Diacetato de 2',7'-Diclorofluoresceína
<b>ELA</b>	Esclerose Lateral Amiotrófica
<b>ERN</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>HBSS</b>	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina-1alfa
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1beta
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>LME</b>	Lesão Medular Espinal
<b>L5</b>	Quinta Vértebra Lombar
<b>ME</b>	Medula Espinal
<b>mPTPs</b>	Poros de Transição da Permeabilidade mitocondrial
<b>MTG</b>	<i>MitoTracker Green</i>
<b>MTR</b>	<i>MitoTracker Red</i>
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>NYU</b>	<i>New York University</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico



<b>SN</b>	Sistema Nervoso
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TF</b>	Tampão Fosfato
<b>TLE</b>	Treino Locomotor em Esteira
<b>T8</b>	Oitava Vértebra Torácica
<b>T9</b>	Nona Vértebra Torácica
<b>T10</b>	Décima Vértebra Torácica
<b>T11</b>	Décima Primeira Vértebra Torácica
<b>T12</b>	Décima Segunda Vértebra Torácica
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	Volume de Oxigênio Máximo

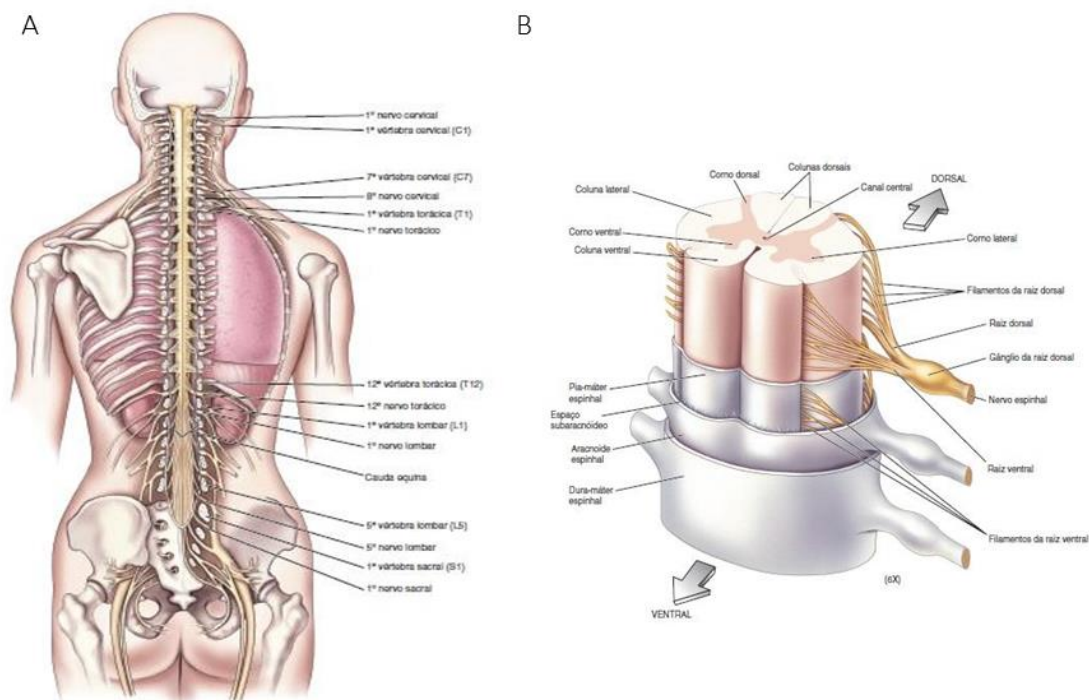
## SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>11</b>
1.1 Fisiopatologia da Lesão Medular Espinal.....	13
1.2 Reabilitação da Lesão Medular Espinal.....	16
<b>1.3 Justificativa.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Hipótese.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Objetivos.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Objetivo Geral.....	22
1.5.2 Objetivos Específicos.....	22
<b>2 Metodologia.....</b>	<b>24</b>
2.1 Aspectos Éticos.....	24
2.2 Animais.....	24
2.3 Experimentos.....	24
2.4 Avaliação do VO <sub>2</sub> máx.....	26
2.5 Modelo de lesão medular traumática.....	27
2.6 Protocolo de treino locomotor em esteira.....	28
2.7 Avaliação da função motora.....	29
2.8 Avaliação de parâmetros morfológicos.....	32
2.8.1 Perfusão transcardíaca.....	33
2.8.2 Análise do volume de lesão.....	33
<b>2.9 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....</b>	<b>34</b>
2.9.1 Decapitação.....	34
2.9.2 Análise da massa e função mitocondrial.....	34
2.9.3 Análise dos níveis de DCF (2',7'- diclorofluoresceína).....	34
<b>2.10 Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
<b>3 Resultados.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Experimento 1.....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Avaliação do VO <sub>2</sub> máx.....	36
3.1.2 Avaliação da função motora.....	36
3.1.3 Análise histológica do volume de lesão.....	37
<b>3.2 Experimento 2.....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Avaliação do VO <sub>2</sub> máx.....	38

3.2.2 Avaliação Locomotora.....	38
3.2.3 Análise da massa e do potencial de membrana mitocondrial.....	39
3.2.4 Análise dos níveis de DCF.....	40
<b>4 Discussão.....</b>	<b>41</b>
<b>5 Conclusões.....</b>	<b>48</b>
<b>6 Considerações Finais.....</b>	<b>49</b>
<b>7 Referências.....</b>	<b>50</b>

## 1 Introdução

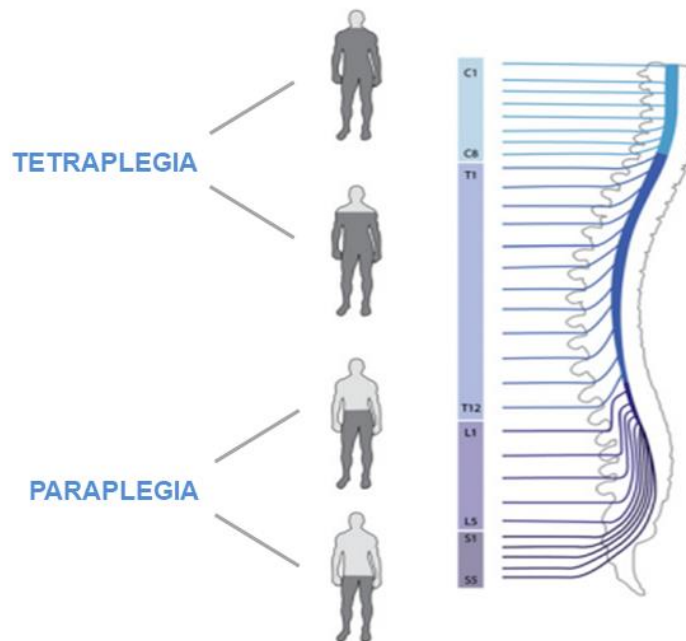
A medula espinal é o principal canal de comunicação entre encéfalo e o corpo, pelo qual passam informações sensoriais e motoras através dos tratos espinais longitudinais (componentes da substância branca), localizados ao redor de corpos neuronais espinais (componentes da substância cinzenta) (KIRSHBLUM et al., 2011). A Figura 1A apresenta uma visão posterior e longitudinal dessa estrutura, que é circundada e protegida pela coluna vertebral (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). A Figura 1B apresenta uma visão transversal da medula espinal, envolta pelas meninges pia-máter, aracnoide e dura-máter, em que é possível visualizar a substância branca, composta pelas colunas de fibras axonais: lateral, ventral e dorsal, bem como, a substância cinzenta, composta pelos corpos neuronais nos cornos lateral, ventral e dorsal (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).



**Figura 1** – Representações anatômicas macroscópicas da medula espinal em visão longitudinal (A) e transversal (B) (Adaptado de BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).

A lesão na estrutura da medula espinal, comumente denominada como lesão medular espinal (LME) afeta a condução de sinais sensoriais, motores e autonômicos, repercutindo diretamente na funcionalidade desses sistemas. De acordo com a *American Spinal Injury Association (ASIA)*, quando esta lesão acontece nos elementos neurais da medula espinal a nível cervical ou torácico alto, há comprometimento na função dos membros superiores e inferiores, do tronco e órgãos pélvicos, sendo essa condição definida como tetraplegia. Quando o dano

neurológico se dá ao nível dos segmentos torácico baixo, lombar e sacral da medula espinal, o comprometimento funcional pode ocorrer na região do tronco, órgãos pélvicos e membros inferiores de acordo com o local precisamente afetado, sendo paraplegia a denominação dessa condição (KIRSHBLUM et al., 2011). A figura 2 ilustra esquematicamente a classificação topográfica funcional (tetraplegia e paraplegia) nas LME em humanos.



**Figura 2** – Ilustração esquemática demonstrando a classificação topográfica funcional – tetraplegia e paraplegia – nas lesões medulares espinais em humanos, de acordo com o segmento neural atingido. (Modificada de BARNABÉ-HEIDER; FRISÉN, 2008).

As incapacidades individuais resultantes de uma LME são diretamente dependentes da gravidade do insulto. Uma ruptura completa da medula espinal leva à perda permanente e irreversível de todas as conexões neuronais abaixo do nível lesado, tornando a recuperação funcional altamente improvável. Lesões incompletas, com preservação do tecido medular, apresentam potencial para algum nível de recuperação, variando de acordo com a quantidade de tecido neural preservado (BAREYRE; LOY, 2019).

Estima-se que em torno de 133 a 226 mil pessoas sejam afetadas pela LME no mundo por ano, gerando consequências devastadoras a esses indivíduos, além de elevados custos sociais (KUMAR et al., 2018; LEE et al., 2013). A principal etiologia da LME é traumática, destacando-se entre as causas: acidentes automobilísticos, quedas e violência (KUMAR et al., 2018; JAZAYERI et al., 2014). No Brasil, presume-se que ocorram entre 16 a 26 novos casos desse tipo de lesão por milhão de habitantes a cada ano (ROUANET et al., 2017). O trauma na

medula espinal atinge principalmente homens jovens, com média etária de 40 anos (KUMAR et al., 2018).

### 1.1 Fisiopatologia da Lesão Medular Espinal

A complexa fisiopatologia da LME acontece em duas etapas, denominadas fases primária e secundária. A fase primária ocorre no momento do impacto inicial, podendo a medula espinal ser contundida ou seccionada devido a um mecanismo de lesão por compressão, distração ou translação da coluna vertebral (QUADRI et al., 2018). A ocorrência de contusão é o achado mais frequente e essa fase é marcada por hemorragia local, edema e isquemia, que progridem até o início da fase secundária (ZHOU; HE; REN, 2014; QUADRI et al., 2018).

Visando compreender a fisiopatologia da fase secundária da LME, estudos em diferentes modelos animais têm sido amplamente utilizados há algumas décadas. Uma vez que a LME em humanos ocorre comumente em função de algum impacto físico sobre o canal vertebral circundante, que posteriormente comprime a estrutura da medula espinal, é possível reproduzir esse tipo de lesão em ratos, removendo parte da parede óssea do canal espinal e, em seguida, submetendo a medula espinal exposta a lesões por compressão ou contusão (KJELL; OLSON, 2016). As lesões por contusão têm sido realizadas através de um dispositivo de queda de peso, causadas por uma haste de aceleração que impacta a medula espinal, sendo considerado um modelo bastante fiel à biomecânica que ocorre nas lesões humanas (KJELL; OLSON, 2016; SHARIF-ALHOSEINI et al., 2017). O aparato amplamente utilizado para mimetizar esse tipo de LME em animais é o *New York University Impactor (NYU Impactor)*, descrito por Gruner (1992), que possui uma haste com peso de 10 gramas, podendo ser elevada a alturas de 6,25; 12,5; 25; 50 ou 75 mm, produzindo lesões de gravidade variável após a queda que impacta diretamente a estrutura da ME (GRUNER, 1992; NICOLA, 2013; NICOLA et al., 2016; NICOLA et al., 2017; MARQUES, 2018; MARQUES et al., 2018).

Frente a esses estudos, foi possível determinar que a fase secundária é subdividida em aguda, subaguda e crônica; compreendendo uma cascata de eventos decorrentes da fase primária, como inflamação, estresse oxidativo e ativação de vias apoptóticas, levando à progressão da lesão para além da zona central atingida pelo trauma mecânico (LI et al., 2018; QUADRI et al., 2018, ANJUM et al., 2020).

A fase aguda é caracterizada por isquemia espinal, edema vascular e excitotoxicidade glutamatérgica. A isquemia medular causa edemas citotóxicos, iônicos e vasogênicos. Nesse estado fisiopatológico, o equilíbrio do influxo de água no compartimento intracelular é perturbado, levando ao inchaço celular e perda da integridade do citoesqueleto. O edema iônico

ocorre pelo aumento da permeabilidade da barreira entre o sangue e a medula espinal, que aumenta o transporte de íons transendotelial, causando a perda desses e de água do espaço intersticial. A lesão endotelial e a inflamação aumentam o tamanho dos poros, permitindo que grandes moléculas presentes no plasma passem pela membrana celular, resultando em edema vasogênico. Esses processos provocam a formação de radicais livres e excitotoxicidade glutamatérgica. A ativação dos receptores glutamatérgicos – NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico), além dos receptores de cainato – durante a LME, eleva as concentrações de glutamato, levando à excitotoxicidade persistente e morte celular. Níveis elevados de glutamato em células necróticas alteram o fluxo iônico aumentando as concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (cálcio), que leva à inibição da respiração mitocondrial e depleção de energia (ANJUM et al., 2020).

As mitocôndrias são um componente importante para o metabolismo celular, uma vez que geram moléculas de ATP (trifosfato de adenosina), produzindo e armazenando energia. O acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol decorrente da LME, aumenta os poros de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTPs), perturbando o gradiente de prótons, inativando a produção de ATP e aumentando o influxo de água e outros componentes na matriz mitocondrial, resultando em inchaço e, posteriormente, morte celular. A maior parte da energia requerida pelas estruturas do SNC advém das mitocôndrias e energia suficiente é necessária para a sobrevivência neuronal. Assim, a disfunção mitocondrial pode levar à morte neuronal (QUADRI et al., 2018, ANJUM et al., 2020).

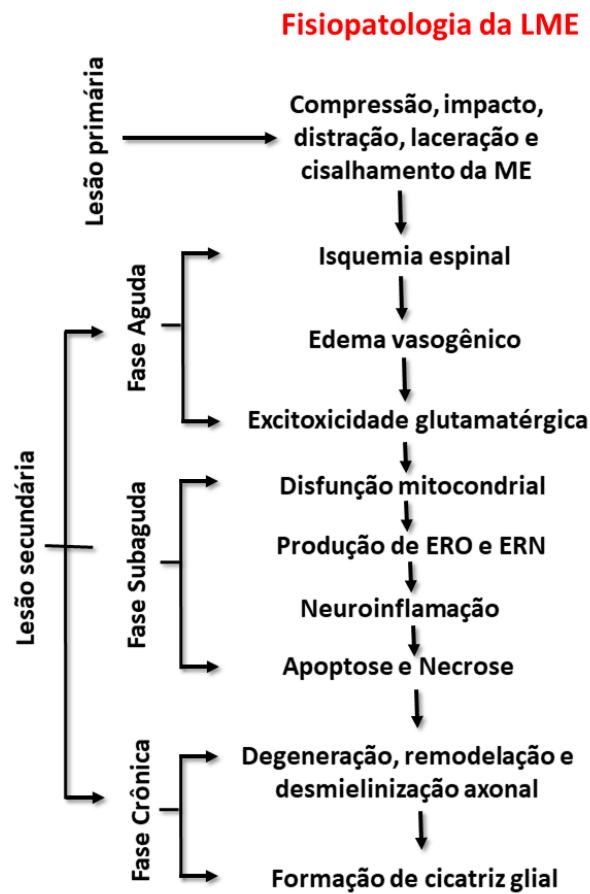
A fase subaguda da lesão secundária é caracterizada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), ocasionadas por níveis aumentados de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, disfunção mitocondrial, degradação do ácido araquidônico e ativação da enzima óxido nítrico sintase. ERO e ERN levam a danos nas membranas celulares neuronais, no citoesqueleto e em organelas que são essenciais para o funcionamento celular, especificamente exacerbando a disfunção mitocondrial. A produção de radicais livres ou estresse oxidativo é um processo bem caracterizado envolvido na LME, sendo definido como um desequilíbrio entre altos níveis de ERO e ERN e baixos níveis de defesas antioxidantes. Em condições fisiológicas ERO e ERN são essenciais e estão envolvidas em muitas funções celulares. Todavia, o SNC apresenta níveis moderados de antioxidantes endógenos, que diminuem na condição patológica da LME, à medida que os níveis de ERO e ERN aumentam, danificando lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e promovendo a lise da membrana celular neuronal, acarretando na perda dessas células (QUADRI et al., 2018; ANJUM et al., 2020).

Ainda na fase subaguda, há a invasão de monócitos, neutrófilos, células linfocíticas T e B e macrófagos para o tecido espinal, associada à liberação de citocinas inflamatórias como interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), caracterizando uma neuroinflamação (NICOLA et al., 2017; MARQUES, 2018; QUADRI et al., 2018, ANJUM et al., 2020). Todos esses processos levam à apoptose e necrose neuronal e de células gliais, como oligodendrócitos. Os oligodendrócitos são células gliais responsáveis pela produção de mielina, um revestimento protetor das células nervosas que acelera a condução do impulso nervoso. A apoptose de oligodendrócitos leva à degeneração, remodelação e desmielinização axonal sustentada, retardando a passagem de informação ao longo dos axônios (NICOLA et al., 2016; NICOLA et al., 2017; MARQUES et al., 2018; QUADRI et al., 2018; ANJUM et al., 2020).

Posteriormente, na fase crônica da lesão medular secundária, há a formação de cicatriz glial, um mecanismo celular reativo, facilitado pelos astrócitos. Os astrócitos são importantes componentes do SN que iniciam o processo de cicatrização após a LME como uma resposta de defesa, visando limitar e reparar o dano local, isolando a área lesionada. Todavia, o aumento contínuo dessas células no local da lesão leva à formação de cicatriz glial, que se torna um importante obstáculo ao crescimento axonal após a LME (NICOLA et al., 2016; QUADRI et al., 2018; ANJUM et al., 2020).

A Figura 3 apresenta, esquematicamente, os principais eventos relacionados à fisiopatologia da LME.





**Figura 3:** Representação esquemática dos principais eventos envolvidos na fisiopatologia da LME (lesão medular espinal). (Adaptado de ANJUM et al., 2020)

## 1.2 Reabilitação da Lesão Medular Espinal

A LME é um evento altamente influente na vida do indivíduo afetado, deixando incapacitados a maioria dos acometidos (BAREYRE; LOY, 2019). Diante da comum irreversibilidade desse tipo de trauma, diferentes estratégias de reabilitação têm sido estudadas em humanos e animais visando potencializar a recuperação funcional, bem como, melhorar a qualidade de vida dessas pessoas (BAREYRE; LOY, 2019; MORAWIETZ; MOFFAT, 2013). Considerando que a maioria das lesões medulares são incompletas, há ainda a possibilidade de uma mudança plástica do SNC, de modo que a reabilitação não deve estar focada apenas na compensação da deficiência, mas na maximização do potencial de recuperação do indivíduo (MORAWIETZ; MOFFAT, 2013).

Dentre as estratégias de reabilitação estudadas, estão as terapias farmacológicas com o uso de fármacos, como o Riluzol, Magnésio e Minociclina A. O Riluzol é um bloqueador de

canais de sódio, que suprime o influxo de sódio em neurônios lesionados, restringindo a liberação pré-sináptica de glutamato e protegendo as células de morte por excitotoxicidade, levando à redução no tamanho da lesão, bem como, melhora em parâmetros sensório-motores e eletrofisiológicos. Já o Magnésio pode atuar como um antagonista do receptor NMDA para diminuir a excitotoxicidade, também funcionando com um agente anti-inflamatório, reduzindo o tamanho da área lesada e gerando recuperação comportamental. A Minociclina A é uma tetraciclina bacteriostática que demonstrou propriedades neuroprotetoras em modelos pré-clínicos de lesões no SNC, em função de seu efeito anti-inflamatório mediado pela inibição da ativação microglial e da produção de citocinas inflamatórias, como IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ , sendo capaz de aumentar a preservação tecidual e a recuperação motora (AHUJA et al., 2017).

Outros tratamentos que têm se mostrado promissores na recuperação da LME são aqueles que envolvem transplantes celulares, como por exemplo, utilizando células-tronco precursoras neurais, células-tronco mesenquimais e células olfativas embainhadas. As células-tronco precursoras neurais são capazes de se diferenciar em neurônios específicos do SNC, oligodendrócitos e astrócitos, integrando-se ao circuito neural existente, melhorando a recuperação comportamental. As células-tronco mesenquimais são capazes de reparar tecidos conjuntivos, diferenciando-se em miócitos, osteoblastos, condrócitos e adipócitos, podendo também modular a inflamação local e sistêmica, levando à diminuição da infiltração de células inflamatórias periféricas e ao aumento no volume tecidual da ME lesada. Já as células olfativas embainhadas são capazes de proteger os neurônios olfativos expostos, fagocitando rapidamente detritos e micróbios, ao mesmo tempo em que fornecem fatores tróficos, melhorando o crescimento de neuritos e a remielinização endógena. Essas células parecem exercer as mesmas funções sobre neurônios da ME quando implantas após a LME, resultando em importante recuperação comportamental (NICOLA, 2013; NICOLA et al., 2016; AHUJA et al., 2017; ANJUM et al., 2020).

Uma importante estratégia de reabilitação física, bastante utilizada em seres humanos após a LME, é o treino locomotor em esteira (TLE), que parece oferecer benefícios para a funcionalidade de membros inferiores dos indivíduos após a LME, melhorando padrões como velocidade da marcha e distância percorrida (MORAWIETZ; MOFFAT, 2013; BAREYRE; LOY 2019). Contudo, questões importantes relacionadas ao momento de início e intensidade ideal do TLE permanecem sem resposta (BAREYRE; LOY, 2019).

Buscando compreender os mecanismos subjacentes à recuperação funcional de indivíduos afetados pela LME e submetidos ao TLE como forma de reabilitação, modelos animais com roedores têm sido utilizados (BAREYRE; LOY, 2019). Esses estudos trazem

resultados controversos quanto à promoção de benefícios ou prejuízos aos animais expostos ao TLE. O tempo para início do TLE após a exposição do animal à LME parece ser uma variável importante para distinguir estudos que tiveram resultados positivos daqueles que apresentaram resultados negativos (BATTISTUZZO et. al, 2012).

Em uma revisão sistemática que avaliou os efeitos do treinamento físico na promoção da recuperação locomotora de animais expostos à LME, os estudos foram mais propensos a apresentar resultados positivos quando o início do TLE se deu em períodos mais tardios após a lesão (entre 7 e 16 dias), enquanto aqueles que iniciaram o TLE em período precoce (após 5 dias da LME), tiveram uma tendência a apresentar resultados negativos (BATTISTUZZO et. al., 2012).

O trabalho de Marques e colegas (2018), avaliou diferentes momentos para início do TLE após a LME em ratos: 7, 14, ou 28 dias. O protocolo de TLE consistiu em 20 minutos por dia de exposição, 5 dias por semana, durante 10 semanas, com intensidade aumentando progressivamente, iniciada em 6m/min na primeira semana, chegando à 11,5m/min na última semana de treinamento. Os autores verificaram que os animais que iniciaram o treino em período precoce, ou seja, 7 dias após o trauma, tiveram pior desempenho locomotor após duas semanas de treinamento, associado a maior volume de lesão na estrutura da medula espinal quando comparados ao grupo com LME que não realizou o TLE. Os grupos que iniciaram o TLE em momento tardio, 14 e 28 dias após a LME, obtiveram melhor recuperação motora associada a menor volume de lesão na estrutura da medula espinal, demonstrando que os benefícios do TLE na LME podem estar relacionados ao momento de início do exercício. Além disso, os autores inferem que o protocolo de TLE realizado também é capaz de influenciar a recuperação promovida pelo exercício.

No estudo de Nicola e colaboradores (2016), foi analisado o efeito do transplante de células-tronco mesenquimais em associação com o TLE e também o efeito de TLE isolado sobre a LME em ratos. O protocolo de treino, também iniciado em período precoce, no 3º dia após a lesão, foi executado durante 20 minutos por dia, 5 vezes por semana, durante 6 semanas e com intensidade constante de 10,5m/min. Nesse trabalho, foi verificado que somente o TLE não foi capaz de promover recuperação locomotora aos animais, em relação ao grupo com lesão não treinado. Todavia, quando associado ao transplante de células-tronco, o TLE promoveu maior recuperação motora da 1ª à 3ª semana após a lesão. Também não houve diferença entre o volume de lesão na estrutura da ME dos animais que realizaram o TLE de forma isolada, em comparação aos animais com LME não treinados. Os autores discutem que o momento de início

do TLE, bem como a intensidade na qual é realizado, podem interferir na recuperação proporcionada pelo exercício.

Em outro estudo, que expôs camundongos após 7 dias da LME incompleta a 20 minutos de treinamento locomotor em esteira, 5 vezes por semana, durante 3, 6 ou 9 semanas, com intensidade inicial de 6m/min sendo gradualmente aumentada para 10-12m/min durante o treino, verificou-se um efeito limitado na recuperação do movimento dos membros posteriores dos animais, independente do tempo pelo qual os animais foram expostos ao tratamento. Os autores acreditam que grande parte desse resultado se deve a uma recuperação substancial dos camundongos não treinados e sugerem que futuros estudos pré-clínicos devam voltar sua atenção ao tipo, intensidade, duração das sessões e do programa de treinamento. Questões que, segundo eles, ainda permanecem sem resposta (BATTISTUZZO et al., 2016).

Por outro lado, um estudo demonstrou que ratos com LME incompletas expostos ao TLE durante 20-30 minutos, 5 dias por semana, durante 10 semanas, obtiveram melhores resultados na avaliação locomotora dos membros posteriores e na plasticidade neural do que aqueles não treinados. O protocolo de TLE utilizado consistiu em uma velocidade inicial leve, fixada em 3m/min, com aumentos diários, chegando até 11-13m/min. Os autores pontuam que a recuperação da medula espinal depende criticamente do tipo, qualidade, quantidade e momento de início do protocolo de treinamento (SUN et al., 2013).

Conforme descrito, diversos autores concordam que os resultados da intervenção através do TLE são diretamente influenciados pelo protocolo utilizado, incluindo tempo para início após a LME, tipo de exercício realizado, duração das sessões e do programa de treinamento, além da intensidade do treino. Essas são variáveis importantes e ainda pouco estudadas, que devem ser consideradas para compreender quando a exposição ao TLE traz benefícios ou prejuízos em estudos experimentais com modelos animais de LME (BATTISTUZZO et al., 2012; SUN et al., 2013; BATTISTUZZO et al., 2016; NICOLA et al., 2016; MARQUES et al., 2018; BAREYRE; LOY, 2019).

Explorando a respeito das diferentes intensidades do TLE, enquanto uma modalidade de exercício físico, pode-se considerar a proposta de Howley (2001), que descreve sobre a classificação de intensidade para determinada atividade física, levando em consideração o esforço requerido durante sua realização. O autor propõe uma medida de intensidade relativa para o exercício, a partir da análise do volume máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ) consumido enquanto se pratica determinada atividade. Tal medida considera que um exercício muito leve, que dispense pouco esforço físico, consuma 20% do  $VO_{2máx}$ , enquanto um exercício de moderada intensidade, que dispense maior esforço físico consuma entre 40 e 59% do  $VO_{2máx}$ ,

podendo chegar até uma intensidade vigorosa, com esforço físico máximo, consumindo 100% do  $VO_{2máx}$ .

O exercício físico é atualmente bem conhecido por promover a neuroproteção em estruturas do SNC, como por exemplo, o cérebro. Evidências concluem que a melhora na função muscular, proporcionada pelo exercício, leva a sinalizações cerebrais que contribuem com esse efeito neuroprotetor. Dentre os efeitos do exercício na musculatura esquelética e, de maneira similar, no cérebro, estão a estimulação da síntese de proteínas mitocondriais, provendo a biogênese, melhorando a estrutura, função e eficiência mitocondrial nesses tecidos. As mitocôndrias possuem também, relevante papel no controle de sobrevivência celular. Entre os mecanismos envolvidos nesse controle, está o potencial de membrana mitocondrial, que, quando deteriorado, pode desencadear sinalização de morte celular mitocondrial, levando à apoptose e necrose. Dessa forma, à medida que o exercício físico exerce efeitos positivos sobre a atividade mitocondrial, pode contribuir para a sobrevivência celular em casos de lesão em estruturas do SNC (WU et al., 2019; BURTSCHER et al., 2021).

Ainda, o exercício agudo induz a formação de ERO, no tecido muscular e nervoso, com danos oxidativos ocorrendo mais frequentemente em sessões de maior intensidade, enquanto as sessões realizadas em menor intensidade, reduzem o estresse oxidativo, reforçando as defesas antioxidantes. Elevações moderadas nos níveis de ERO são consideradas fisiológicas, por estarem relacionadas à sinalização e regulação redox necessárias para manutenção da homeostase celular, equilibrando níveis de oxidantes e antioxidantes, evitando o estresse oxidativo, caracterizado pelo respectivo desequilíbrio. Níveis moderados de ERO também são necessários para a promoção dos efeitos benéficos do exercício e são diretamente influenciados pela função mitocondrial, de forma que essa, quando prejudicada, resulta em danos oxidativos, prejudicando processos celulares, como a manutenção do potencial de membrana mitocondrial (BURTSCHER et. al, 2021).

Estudos com resultados positivos do TLE após a LME, indicam que o treinamento promove a neuroplasticidade da região lesada, através do brotamento axonal, aumentando as sinapses e diminuindo a atrofia muscular (WU et. al, 2016). Sabe-se que a intensidade do exercício afeta diretamente a neuroplasticidade no SNC. Um estudo que avaliou a plasticidade no hipocampo de ratos, após a exposição à diferentes intensidades de TLE, concluiu que somente os animais submetidos ao treinamento em intensidade leve obtiveram aumento de marcadores indicativos de neuroplasticidade. Eles discutem que o TLE, quando realizado em intensidade leve, previne a perda de células neuronais induzida por danos excitotóxicos ou desequilíbrio energético, melhora o estado oxidativo celular, aumenta o volume de substância

cinzenta e a integridade da substância branca, aumenta a sinalização de fatores neurotróficos, impactando positivamente a neuroplasticidade e a conectividade neural do cérebro. Os autores explicam ainda, que o exercício quando realizado em maior intensidade, é uma condição estressante, que induz a altos níveis de corticosterona, acarretando em efeitos deletérios sobre a função hipocampal. Além disso, a maior intensidade do exercício diminui a captação de glicose pelo cérebro, alterando o metabolismo energético e reduzindo a expressão de fatores neurotróficos (RAHMATI; KAZEMI, 2019).

Um estudo que avaliou os efeitos de diferentes intensidades de TLE sobre a plasticidade do hipocampo de ratos submetidos à isquemia cerebral demonstrou que o exercício de baixa intensidade, mas não o de maior intensidade, melhorou o desempenho da memória espacial dos animais, estando essa melhora relacionada a alterações estruturais e funcionais do hipocampo, como aumento da complexidade e densidade da coluna dendrítica, da neurogênese e da sinaptogênese. Também, conforme os autores, o exercício de maior intensidade não exerce tais efeitos positivos provavelmente devido à resposta ao estresse induzido. Eles observaram aumento nos níveis séricos de corticosterona no grupo que realizou exercícios em alta intensidade, sendo esse um hormônio conhecido por interagir negativamente com fatores neurotróficos, reduzindo a sua sinalização (SHIH; YANG; WANG et al., 2013).

Outro estudo que avaliou o efeito no hipocampo, da exposição ao TLE com diferentes intensidades, durante 4 semanas, sobre ratos submetidos à isquemia, observou resultados positivos no teste de reconhecimento e de localização de objetos para os animais treinados em baixa intensidade em contraste com os animais treinados em maior intensidade, que não demonstraram melhora na execução dos testes. Ainda, o número de neurônios no hipocampo foi maior para aqueles treinados em baixa intensidade em comparação aos que treinaram em maior intensidade. Os autores explicam que, possivelmente, o exercício realizado em maior intensidade foi suficiente para aumentar os níveis de corticosterona, hormônio conhecido por promover atrofia dendrítica e prejudicar a neurogênese no hipocampo, diminuindo a plasticidade dessa estrutura. Além disso, afirmam que o exercício de menor intensidade resulta em aumento de fatores tróficos e da neurogênese no hipocampo, favorecendo a plasticidade hipocampal (SHIMADA et al., 2013).

### **1.3 Justificativa**

Desse modo, levando em consideração que: a) os resultados observados em estudos envolvendo o TLE como estratégia de reabilitação após a lesão medular espinal são ainda controversos; b) a premissa de que o TLE pode trazer prejuízos à recuperação se iniciado precocemente, no período agudo pós-lesão medular; c) os benefícios ao sistema nervoso central de um programa de treinamento podem estar relacionados à sua intensidade; e d) a escassa evidência científica comparando diferentes intensidades de TLE em modelo experimental de lesão medular espinal; decidimos investigar os efeitos de diferentes intensidades de estímulo locomotor no tratamento da lesão medular em momento precoce, buscando por uma intervenção eficaz, que promova melhorias e não prejuízos aos indivíduos lesionados, justificando a realização deste estudo.

### **1.4 Hipótese**

O TLE em esteira iniciado precocemente após a LME em modelos experimentais, quando realizado em menor intensidade, promove efeitos teciduais e comportamentais benéficos, mas acarreta em prejuízos a esses sistemas, quando realizado em maiores intensidades.

### **1.5 Objetivos**

#### **1.5.1 Objetivo Geral**

Comparar os efeitos do treino locomotor em esteira realizado em intensidade leve ou moderada, sendo iniciado precocemente, 7 dias após a lesão medular espinal por contusão em ratos *Wistar*.

#### **1.5.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos de dois protocolos de TLE, com intensidade variável entre muito leve a leve ou de leve a moderada, iniciados precocemente, 7 dias após a LME, sobre a habilidade locomotora dos animais depois de 4 semanas expostos aos respectivos treinos;
- Avaliar os efeitos de dois protocolos de TLE, com intensidade variável entre muito leve a leve ou de leve a moderada, iniciados precocemente, 7 dias após a LME, sobre o volume de lesão na ME, depois de 4 semanas expostos aos respectivos treinos;
- Analisar os níveis de DCF (2',7'-diclorofluoresceína) como um parâmetro da produção de espécies reativas de oxigênio, após exposição ao TLE precoce, iniciado 7 dias após a LME

e realizado em intensidade leve ou moderada, durante 5 dias, sendo esse um período subagudo após o dano, quando respostas celulares e moleculares estão em evidência;

- Analisar a massa e a função mitocondrial após de exposição ao TLE precoce, iniciado 7 dias após a LME e realizado em intensidade leve ou moderada, durante 5 dias, sendo esse um período subagudo após o dano, quando respostas celulares e moleculares são proeminentes.



## 2 Metodologia

### 2.1 Aspectos Éticos

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número 37369.

### 2.2 Animais

Foram utilizados 143 ratos *Wistar* machos; esse total inclui as perdas pelo procedimento de lesão: aproximadamente 35% devido à mortalidade (FREEMAN; WRIGHT, 1953), e de 12%, em função de uma pontuação maior que 3,5 em escala avaliativa da função locomotora, no 2º dia de pós-operatório, indicando nível de locomoção acima do esperado para animais com LME nesse momento da avaliação. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, pesando entre 248-385 gramas com 45 dias de vida ao início dos experimentos.

Os animais permaneceram alojados no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, mantidos em grupos de dois a quatro em caixas *Plexiglass* (42cm x 34cm x 18cm) recobertas por maravalha, sob condições padrão (ciclo de 12 horas claro / 12 horas escuro) e controle da temperatura ( $\pm 22^{\circ}\text{C}$ ), com água e comida fornecidas à vontade.

Os animais eram pesados semanalmente para controle do estado de saúde e foram ambientados pelos 20 dias precedentes à indução do modelo de LME, ocorrido quando eles tinham em média 65 dias de vida.

### 2.3 Experimentos

Nesse estudo, foram realizados dois experimentos distintos em relação à duração do protocolo de treino e à variável a ser analisada, conforme descrito:

#### Experimento 1 (Figura 4)

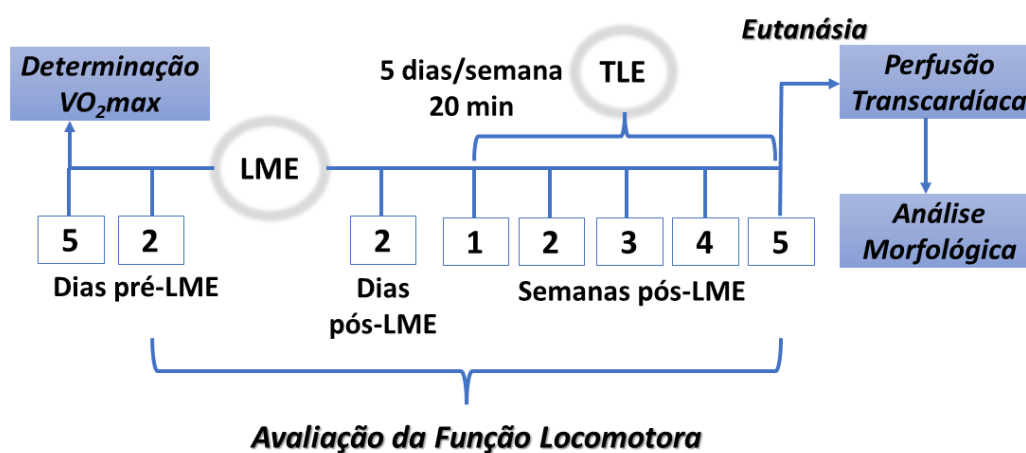
Esse experimento consistiu em protocolo de TLE de 20 minutos/dia, durante 5 dias, por 4 semanas, tendo iniciado no 7º dia após o procedimento cirúrgico para indução da LME. Os animais tiveram sua capacidade para o exercício avaliada através da análise da estimativa de captação de oxigênio máximo (volume de oxigênio máximo -  $\text{VO}_{2\text{máx}}$ ) no 5º dia prévio à LME. A função locomotora foi avaliada no 2º dia pré-LME e seguiu semanalmente até a eutanásia, que seu deu pelo processo de perfusão, para posterior avaliação morfológica da estrutura da medula espinal dos animais. Os grupos foram distribuídos conforme segue:

**Grupo controle (*Sham – SH*):** animais submetidos à laminectomia sem lesão medular.

**Grupo LM:** animais submetidos à laminectomia com lesão medular que não foram expostos ao protocolo de treino locomotor em esteira.

**Grupo LM-E1:** animais submetidos à laminectomia com lesão medular que foram expostos ao treino locomotor em esteira precoce, realizado a uma intensidade variável entre 38% (leve) e 57% (moderada) do  $VO_{2máx}$  previamente estabelecido.

**Grupo LM-E2:** animais submetidos à laminectomia com lesão medular que foram expostos ao treino locomotor em esteira precoce, realizado a uma intensidade variável entre 19% (muito leve) e 38% (leve) do  $VO_{2máx}$  previamente estabelecido.



**Figura 4** – Linha do tempo do Experimento 1. LME: lesão medular espinal; TLE: treino locomotor em esteira.

### Experimento 2 (Figura 5)

Esse experimento consistiu em protocolo de TLE de 20 minutos/dia, durante 5 dias, tendo iniciado no 7º dia após o procedimento cirúrgico para indução da LME. Os animais tiveram a estimativa do  $VO_{2máx}$  avaliada no 5º dia prévio à LME. A função locomotora foi avaliada no 2º dia pré e pós a LME e seguiu semanalmente até a eutanásia, que seu deu no 12º dia após a lesão, pelo processo de decapitação, para posteriores análises bioquímicas da medula espinal dos animais. Uma vez que esse experimento visou avaliar mecanismos bioquímicos relacionados à exposição ao TLE em intensidade leve ou moderada com período de início precoce após a LME, optou-se por um momento de eutanásia mais próximo da cirurgia de indução da lesão, pois é de conhecimento que no período agudo/subagudo após o dano, que as respostas a nível celular e molecular estão em evidência (NICOLA et al., 2017; MARQUES, 2018; QUADRI et al., 2018, ANJUM et al., 2020).

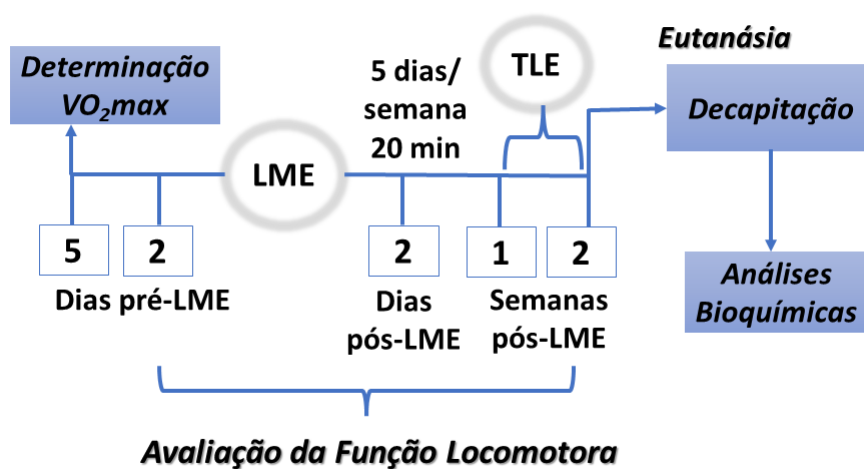
Os grupos foram distribuídos conforme segue:

**Grupo controle (Naive):** animais sem qualquer intervenção cirúrgica.

**Grupo LM:** animais submetidos à laminectomia com lesão medular que não foram expostos ao protocolo de treino locomotor em esteira.

**Grupo LM-E1:** animais submetidos à laminectomia com lesão medular que foram expostos ao treino locomotor em esteira precoce, realizado a uma intensidade moderada, correspondendo à 40% do  $VO_{2máx}$  previamente estabelecido.

**Grupo LM-E2:** animais submetidos à laminectomia com lesão medular que foram expostos ao treino locomotor em esteira precoce, realizado a uma intensidade leve, correspondendo à 20% do  $VO_{2máx}$  previamente estabelecido.



**Figura 5** – Linha do tempo do Experimento 2. LME: lesão medular espinal; TLE: treino locomotor em esteira.

## 2.4 Avaliação do $VO_{2máx}$

Para definição das diferentes intensidades de treino, foi realizada previamente à LME a estimativa do  $VO_{2máx}$  dos animais duas vezes: em primeiro momento, para adaptação dos animais e, em segundo momento, para mensuração dos valores obtidos. Nessa avaliação, todos os ratos caminharam na esteira em uma velocidade inicial baixa (mínimo de velocidade permitida pela esteira: 2m/min) seguida de aumentos progressivos de 5m/min a cada 3 min até o ponto de exaustão, ou seja, momento no qual o animal apresentou desistência em fazer a atividade e parou de caminhar, demonstrando incapacidade em continuar realizando o exercício. A carga de trabalho no momento da fadiga máxima (em metros/minutos) foi determinada como índice de capacidade de exercício e definido como  $VO_{2máx}$  (CECHETTI et al., 2012).

## 2.5 Modelo de lesão medular traumática

Para indução do modelo experimental de lesão medular, os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano em associação com fluxo de oxigênio (O<sub>2</sub>) a 2 litros por minuto (l/min) (KISSANE et al., 2018) até a perda total da sensibilidade, avaliada através do reflexo plantar de retirada. Foram então posicionados em decúbito ventral para realização da tricotomia na região dorsal, onde foi feita uma incisão de aproximadamente 5 cm sob a linha média com lâmina cirúrgica, deixando exposta a região da coluna vertebral entre a oitava e décima segunda vértebra torácica (T8 e T12), sendo os músculos paravertebrais inseridos entre T9 e T11 dissecados e, em seguida, foi removida a lâmina da vértebra T10 e o processo espinhoso de T9 (NICOLA et al., 2016). Utilizando o equipamento *New York University Impactor (NYU Impactor)* descrito por Gruner (1992) (Figura 6), a lesão medular incompleta 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 (NICOLA et al., 2017; MARQUES et al., 2018). Os animais foram continuamente anestesiados com isoflurano em associação com fluxo de O<sub>2</sub> a 2l/min ao longo da exposição ao procedimento cirúrgico (KISSANE et al., 2018) e, após a cirurgia, foram posicionados em uma placa aquecedora, suturados e então alojados em gaiolas com dois animais por caixa, mantidos nas mesmas condições de temperatura, alimentação e controle de luz. O esvaziamento vesical foi realizado manualmente pela pesquisadora por meio da manobra vesical manual (método de Crede), uma vez ao dia, por 5 dias. O esvaziamento intestinal não foi necessário, visto que o procedimento de indução desse modelo experimental não interfere na função de defecação dos animais (NICOLA, 2013; MARQUES, 2018). O antibiótico enrofloxacina (1mililitro(ml)/animal) foi administrado via oral por 5 dias após o procedimento cirúrgico para prevenir infecções, bem como, o analgésico dipirona (1ml/animal). A partir do terceiro dia pós-LME, os animais foram novamente agrupados com no máximo 4 animais por caixa (NICOLA, 2013).



**Figura 6:** Imagem do equipamento *New York University Impactor (NYU Impactor)*, utilizado para a indução do modelo experimental de lesão medular por contusão em ratos.

## 2.6 Protocolo de treino locomotor em esteira

Após 7 dias da indução da LME, os animais dos grupos LM-E1 e LM-E2 foram treinados em uma esteira ergométrica adaptada para ratos Insight<sup>®</sup> (Figura 7) (NICOLA et al., 2016; MARQUES et al., 2018) a duas diferentes intensidades, de acordo com o grupo ao qual pertencia o animal. Para o experimento 1, o programa de treinamento consistiu em 5 dias consecutivos, com 20 minutos por dia de exposição, durante 4 semanas, sendo que o grupo LM-E1 treinou em uma velocidade inicial de 6m/min e o grupo LM-E2, de 3m/min. Em ambos os grupos, houve progressão semanal de 1m/min (6% do  $VO_{2máx}$ ). Desse modo, o protocolo de treino do grupo LM-E1 foi de leve (38% do  $VO_{2máx}$ ) a moderado (57% do  $VO_{2máx}$ ) e do grupo LM-E2 foi de muito leve (19% do  $VO_{2máx}$ ) a leve (38% do  $VO_{2máx}$ ), conforme a classificação descrita por Howley, 2001 (Tabela 1). Já o protocolo de treino do experimento 2, consistiu em 20 minutos diários de exposição durante o período de 5 dias. O grupo LM-E1 treinou em uma velocidade fixa de 6m/min e o grupo LM-E2, de 3m/min, o que corresponde respectivamente à

um treino moderado (40% do  $VO_{2m\acute{a}x}$ ) e leve (20% do  $VO_{2m\acute{a}x}$ ), de acordo com a classificação descrita por Howley, 2001. Os animais dos grupos que não passaram pelo TLE (SH e LM), permaneceram durante 20 minutos em uma esteira desligada, localizada no mesmo ambiente em que os animais dos grupos treinados estavam realizando o exercício (LU et al., 2017).



**Figura 7:** Imagem da esteira ergométrica adaptada para ratos Insight<sup>®</sup>, na qual os animais executaram o treino locomotor.

<b>Tabela 1 – Classificação da intensidade do exercício a partir do <math>VO_{2m\acute{a}x}</math> descrita por Howley (2001)</b>	
<b>Intensidade</b>	<b>% <math>VO_{2m\acute{a}x}</math></b>
<b>Muito leve</b>	<b>&lt;20</b>
<b>Leve</b>	<b>20-39</b>
<b>Moderado</b>	<b>40-59</b>
<b>Intenso</b>	<b>60-84</b>
<b>Muito intenso</b>	<b>85-99</b>
<b>Máximo</b>	<b>100</b>

## **2.7 Avaliação da função motora**

A função motora dos membros posteriores dos animais foi verificada por meio de filmagem da atividade locomotora espontânea em campo aberto (Figura 8), de um animal por vez, durante 4 minutos, para ambos os experimentos. Os vídeos foram analisados por dois avaliadores cegos quanto ao tratamento recebido, sendo a avaliação realizada através da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) descrita em 1995 (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995), que tem 22 valores que vão de 0, representando paralisia total, ao 21, que indica

locomoção normal (Tabela 2). O valor médio entre a recuperação de cada pata posterior do animal – direita e esquerda, foi considerado como pontuação final em cada momento de avaliação. Todos os animais foram avaliados 2 dias antes da indução do modelo de LME, sendo excluídos aqueles que apresentaram algum déficit motor nesse momento. Os animais foram também avaliados 2 dias após a cirurgia para fins de comprovação da efetividade da lesão induzida e exclusão daqueles nos quais o procedimento não se fez efetivo. Os animais do experimento 1 permaneceram sendo avaliados semanalmente até o final da quarta semana de TLE, enquanto os animais do experimento 2, foram avaliados 5 dias após o início do TLE, anteriormente à eutanásia. O número de animais utilizados por grupo para a análise da avaliação locomotora foi distribuído conforme segue: experimento 1: SH (n=12); LM (n=12); LM-E1 (n=9); LM-E2 (n=11) e experimento 2: Naive (n=8); LM (n=8); LM-E1 (n=8) e LM-E2 (n=8).



**Figura 8:** Imagem do campo aberto utilizado para filmagem da locomoção espontânea dos animais

<b>Tabela 2</b> – Pontuações, respectivas características do movimento dos membros posteriores dos animais e definições da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (Adaptada de MOLINA, 2006 e SANTOS et al., 2011)		
<b>Pontuação</b>	<b>Características</b>	<b>Definições</b>
0	Nenhum movimento observável do membro posterior	
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho	Discreto: movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreto de outra	Extenso: movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento
3	Movimento extenso de duas articulações	Dois articulações: geralmente quadril e joelho
4	Movimento discreto das três articulações do membro posterior	Três articulações: quadril, joelho e tornozelo
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira	Terceira articulação: tornozelo
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira	
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior	
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso	Pedalada: movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior Sem suporte de peso: Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (ou seja, quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar	Com suporte de peso: Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou elevação da coxa Passada dorsal: O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo Ocasional: Menos do que ou igual à metade das vezes, < 50% Frequente: Mais do que a metade, mas não sempre, 51- 94% Consistente: Quase sempre ou sempre, 95 – 100%
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior	Passo plantar: A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para a frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso Coordenação dos membros anterior e posterior: Para todo passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam
11	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior	
12	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior	
13	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior	



14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície, bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional	
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial	
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação	
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos	
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos	
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo	
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco	Instabilidade do tronco: Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada	

## 2.8 Avaliação de parâmetros morfológicos

Para análise do volume de lesão na medula espinal dos animais do experimento 1, foi realizada a eutanásia pelo procedimento de perfusão transcardíaca ao término da exposição ao

respectivo protocolo de TLE. O número de animais utilizados por grupo foi distribuído conforme segue: SH (n=10); LM (n=9); LM-E1 (n=9) e LM-E2 (n=9).

### 2.8.1 Perfunção transcárdica

Os animais foram profundamente anestesiados com isoflurano por via inalatória, realizando-se, posteriormente, a toracotomia com exposição do coração, sendo inserida no ventrículo esquerdo, uma cânula ligada a uma bomba de perfusão. Após uma segunda incisão, desta vez, no átrio direito, foi perfundida, inicialmente, uma solução salina (150 ml), para lavagem da árvore vascular e, após, uma solução fixadora (300 ml) composta de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (TF) com pH 7,4. Após esse procedimento, a medula espinal (região entre C5 a L5) foi removida e pós-fixada na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão, por 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as medulas espinais foram crioprotetidas pela imersão em solução de sacarose 15% a 4°C, onde permaneceram até submergirem. Após, a solução de sacarose foi trocada por outra, então com concentração de 30%, também a 4°C, onde, novamente permaneceram até a submersão. Depois de realizada a crioproteção, as medulas foram congeladas em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C (NICOLA, 2013; MARQUES, 2018).

### 2.8.2 Análise do volume de lesão

Para análise do volume de lesão, as medulas espinais (porção entre T8 e T12) foram processadas em criostato, com cortes transversais de 20 µm cada e intervalo de 300 µm entre cada corte. Os cortes foram então corados através da técnica de coloração com hematoxilina-eosina. As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio (Nikon), inicialmente em 20x e depois ampliadas em 100%. O corte que apresentou a maior área de lesão foi denominado epicentro, sendo então escolhidas 21 secções (10 cortes acima, 10 cortes abaixo e o epicentro) para análise através do *software Image J*. A área de lesão de cada corte, assim como a área de tecido íntegro, foram estimadas e todo e qualquer tipo de tecido necrótico dentro da cavidade foi contabilizado como parte da lesão. Assim, a área de lesão e a área de tecido íntegro foram medidas e multiplicadas pela distância entre secções (300µm) para obter o volume de lesão e volume de tecido íntegro. A proporção de lesão em relação ao tecido íntegro foi calculada por meio da equação:  $[(\text{volume de lesão} \times 300) / \text{volume intacto}]$  (NICOLA, 2017; MARQUES, 2018).

## 2.9 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Para a análise da massa e função mitocondrial e dos níveis de DCF (2',7'-diclorofluoresceína) dos animais do experimento 2, foi realizada a eutanásia por decapitação ao término da exposição ao respectivo protocolo de TLE. O número de animais utilizados por grupo foi distribuído conforme segue: análise de massa e potencial mitocondrial: Naive (n=7); LM (n=8); LM-E1 (n=7) e LM-E2 (n=6); análise dos níveis de DCF: Naive (n=7); LM (n=8); LM-E1 (n=7) e LM-E2 (n=7).

### 2.9.1 Decapitação

Para o procedimento de eutanásia por decapitação, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano, por via inalatória e, posteriormente submetidos à decapitação com o auxílio de uma guilhotina (Insight®).

### 2.9.2 Análise da massa e função mitocondrial

Após dissecação da medula espinal, 100 mg de tecido foram submetidas à uma leve dissociação com um pilão em *Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)*, filtradas em um coador de células (com poros de 70 µm), dissociadas em 1 miligrama (mg) de colagenase e depois, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi removido, e o pellet novamente suspenso com *HBSS*, dessa vez, contendo os fluorocromos *MitoTracker Red (MTR)*, um marcador de potencial mitocondrial e *MitoTracker Green (MTG)*, um marcador de massa mitocondrial, por 1h30min em temperatura ambiente. Após, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, com citômetro BD FACSCalibur™, onde a fluorescência de 10.000 eventos foi quantificada. Os dados foram analisados com o software FlowJo® (ODORCYK, 2020; MARQUES, 2018; NICOLA et al., 2017).

### 2.9.3 Análise dos níveis de DCF (2',7'- diclorofluoresceína)

Os níveis de DCF (2',7'- diclorofluoresceína) foram determinados a partir da oxidação de DCFH, com o intuito de analisar a formação de espécies reativas de oxigênio. Após dissecação da medula espinal, 100 mg de tecido foram submetidas à uma leve dissociação com um pilão em *Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)*, filtradas em um coador de células (com poros de 70 µm), dissociadas em 1 miligrama (mg) de colagenase e depois, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi removido, e o pellet incubado com diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA), preparado em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo KCl 140 mM, durante 1h30min. Após a incubação, a fluorescência

DCF foi analisada por citometria de fluxo, com citômetro BD FACSCalibur™, onde a fluorescência de 10.000 eventos foi quantificada. Os dados foram analisados com o software FlowJo® (ODORCYK, 2020; MARQUES, 2018; NICOLA et al., 2017).

### **2.10 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados através do software SPSS, versão 20.0. Para verificar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados referentes à avaliação locomotora, demonstraram distribuição não-paramétrica e foram analisados pelos testes de Friedman para amostras relacionadas e de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Os dados das avaliações morfológica e bioquímica apresentaram distribuição normal e foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey (HAZRA; GOGTAY, 2016; NICOLA et al., 2016; MARQUES et al., 2018).

### 3. Resultados

#### 3.1 Experimento 1

##### 3.1.1 Avaliação do $VO_{2m\acute{a}x}$

A estimativa de captação máxima de oxigênio ( $VO_{2m\acute{a}x}$ ) dada em m/min de todos os animais foi avaliada. Todavia, para verificar a capacidade média máxima de exercício dos animais, foram utilizados os valores obtidos pelos grupos que de fato passariam pelo protocolo de TLE (LM-E1 e LM-E2). O valor médio obtido foi de 15,83 m/min.

##### 3.1.2 Avaliação da função motora

Para a análise da avaliação locomotora dos animais, realizada através da escala BBB, verificou-se um potencial de recuperação espontânea nos animais lesados, com progressão da pontuação na escala diferindo entre o 2º dia de pós-operatório e a 2ª, 3ª, 4ª e 5ª semana ( $p < 0,05$ ) e também entre a 2ª semana e a 3ª, 4ª e 5ª semana ( $p < 0,05$ ), em ambos os casos, considerando todos os grupos submetidos à cirurgia (Figura 9A).

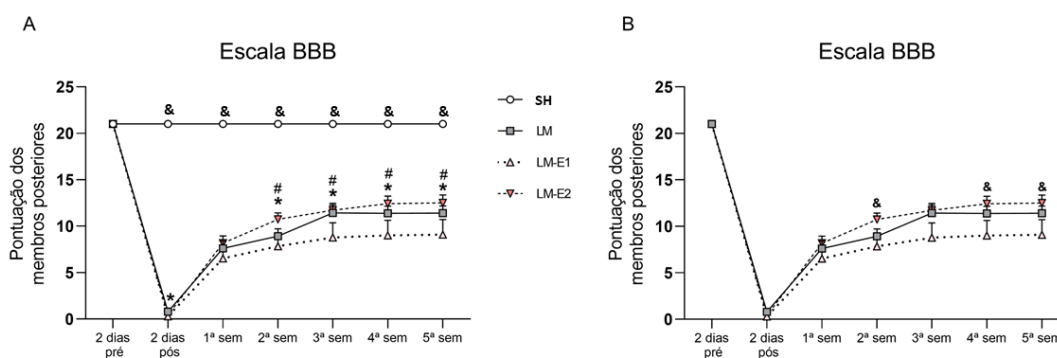
A análise das diferenças intergrupos, foi executada em duas situações distintas: uma delas, considerando todos os grupos experimentais (SH, LM, LM-E1, LM-E2 – Figura 9A) e a outra, levando em consideração somente os grupos submetidos à LME (LM, LM-E1, LM-E2 – Figura 9B). Para a avaliação que considerou todos os grupos experimentais, observou-se que o grupo SH (*sham*), submetido somente ao processo de laminectomia, sem LME, obteve pontuação superior em todos os momentos de avaliação, a partir do segundo dia de pós-operatório, em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Isso demonstra que, previamente à cirurgia, todos os animais incluídos no experimento apresentavam locomoção normal, que foi alterada nos grupos que passaram pelo procedimento, já a partir do 2º dia de pós-operatório. O grupo SH manteve a função locomotora preservada em todos os momentos posteriores de avaliação.

Na análise que considerou somente os grupos expostos à LME, observou-se que o grupo LM-E1 (treinado em intensidade de leve a moderada) apresentou escores reduzidos na escala BBB em relação ao grupo LM-E2 (treinado em intensidade muito leve a leve) nas semanas 2, 4 e 5 ( $p < 0,05$ ). A pontuação média máxima obtida pelo grupo LM-E1 foi de 9 no momento prévio à eutanásia, enquanto a pontuação média máxima do grupo LM-E2 foi de 12,5, considerando o mesmo momento de avaliação. Isso indica que, ao final do protocolo de TLE, os animais do grupo LM-E1 demonstravam suporte de peso das patas posteriores somente na fase de apoio quando em passo plantar ou passada dorsal com suporte de peso, mas sem realizar

nenhuma passada plantar, enquanto o grupo LM-E2, apresentava bom suporte de peso nas patas posteriores e alguma coordenação das patas anteriores e posteriores durante a marcha.

A pontuação média máxima obtida pelo grupo LM no momento de avaliação prévio à eutanásia foi de 11,7, demonstrando um nível de recuperação locomotora médio entre o grupo LM-E1 e LM-E2. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística entre os grupos LM-E1 e LM, nem entre LM-E2 e LM em todos os momentos de avaliação, percebemos através da análise gráfica dos resultados, uma tendência à menores escores para o grupo LM-E1 em comparação ao grupo LM a partir da terceira semana de avaliação.

Desse modo, protocolo de TLE iniciado precocemente e realizado durante 4 semanas, piorou a recuperação para os animais que treinaram em maiores intensidades.

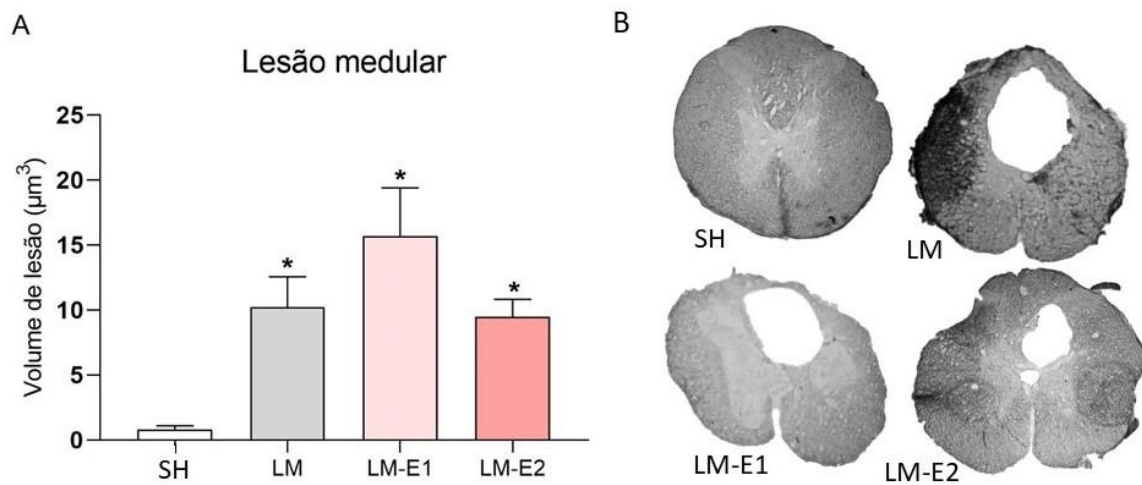


**Figura 9:** representação gráfica dos resultados obtidos pela avaliação locomotora. **A.** Evolução na recuperação dos animais ao longo do tempo após a LME, com (\*) diferenças entre 2º dia de pós operatório e a 2ª, 3ª, 4ª e 5ª semana ( $p < 0,05$ ), (#) entre a 2ª semana e a 3ª, 4ª e 5ª semana ( $p < 0,05$ ) para todos os grupos submetidos à LME e (&) pontuações superiores para o grupo sem intervenção cirúrgica (SH) em relação aos demais grupos, submetidos à LME ( $p < 0,05$ ), em todos os momentos de avaliação a partir do 2º dia de pós-operatório. **B.** Escores reduzidos (&) para o grupo LM-E1 em relação ao grupo LM-E2 ( $p < 0,05$ ) na 2ª, 4ª e 5ª semana, não havendo diferenças significativas entre os grupos LM-E2 e LM e LM-E1 e LM em todos os momentos de avaliação.

### 3.1.3 Análise histológica do volume de lesão

Com relação à análise tecidual da ME dos animais, verificou-se que o grupo sem intervenção cirúrgica (SH) apresentou área total preservada, diferindo ( $p < 0,05$ ) dos demais grupos experimentais que passaram pelo procedimento cirúrgico, confirmando a ocorrência da LME nesses grupos. Não foram verificadas diferenças estatísticas significativas na comparação do volume de lesão entre os grupos lesados (LM, LM-E1 e LM-E2) (Figura 10). No entanto, a análise dos gráficos indica clara tendência de um maior volume de lesão na ME do grupo LM-E1, quando comparado aos grupos LM-E2 e LM, demonstrando que o protocolo de TLE iniciado 7 dias após a LME e realizado durante 4 semanas em maior intensidade, leva a um

aumento no tamanho da lesão em comparação a realizar o treino em menor intensidade, ou mesmo, não realizar qualquer tratamento.



**Figura 10:** avaliação histológica da medula espinal. **A.** Quantificação do volume de lesão para cada grupo experimental, confirmando a ocorrência de lesão (\*) nos grupos submetidos ao procedimento cirúrgico em relação ao grupo *sham*, não cirúrgico, que apresenta total preservação tecidual ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença significativamente estatística para a comparação entre os demais grupos. **B.** Imagens representativas de cortes transversais da medula espinal para cada grupo experimental.

## 3.2 Experimento 2

### 3.2.1 Avaliação do $\text{VO}_{2\text{máx}}$

A estimativa indireta de captação máxima de oxigênio ( $\text{VO}_{2\text{máx}}$ ) dada em m/min de todos os animais foi avaliada. Todavia, para verificar a capacidade média máxima de exercício dos animais, foram utilizados os valores obtidos pelos grupos que de fato passariam pelo protocolo de TLE (LM-E1 e LM-E2). O valor médio obtido foi de 15 m/min.

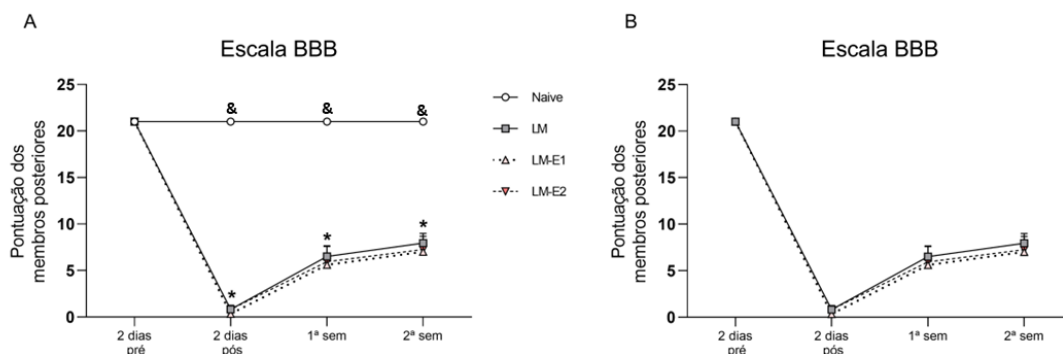
### 3.2.2 Avaliação Locomotora

Para a análise da avaliação locomotora dos animais, realizada através da escala BBB, verificou-se um potencial de recuperação espontânea nos animais lesados ao longo do tempo, com progressão da pontuação na escala diferindo entre o 2º dia de pós-operatório, a 1ª e 2ª semana ( $p < 0,05$ ), considerando todos os grupos submetidos à cirurgia.

A análise das diferenças intergrupos foi realizada em duas situações distintas: uma delas, considerando todos os grupos experimentais (Naive, LM, LM-E1, LM-E2 – Figura 11A) e a outra, levando em consideração somente os grupos submetidos à LME (LM, LM-E1, LM-E2 – Figura 11B). Para a avaliação que considerou todos os grupos experimentais, observou-se que o grupo Naive, não submetido a qualquer tipo de intervenção cirúrgica, obteve pontuação

superior em todos os momentos de avaliação, a partir do segundo dia de pós-operatório, em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Isso demonstra que, previamente à cirurgia, todos os animais incluídos no experimento apresentavam locomoção normal, que foi alterada para os grupos que passaram pelo procedimento, a partir do 2º dia de pós-operatório. O grupo Naive manteve a função locomotora preservada em todos os momentos posteriores de avaliação.

Na análise que considerou somente os grupos expostos à LME, não foram observadas diferenças significativas entre eles, considerando todos os momentos de avaliação. A pontuação média máxima obtida pelo grupo LM-E2 foi de 7, no momento prévio à eutanásia, enquanto a pontuação média máxima do grupo LM-E1 foi de 6 e do grupo LM foi de 8. Isso indica que os animais dos respectivos grupos moviam duas ou três articulações de forma extensa, sem realizar suporte de peso durante a marcha. Assim, verificou-se que o protocolo de 5 dias de TLE iniciado precocemente, em intensidades leve ou moderada, não ofereceu prejuízos ou benefícios à locomoção dos animais que treinaram, em comparação aos que não realizaram o exercício e nem mesmo entre os grupos treinados em diferentes intensidades.



**Figura 11:** representação gráfica dos resultados obtidos pela avaliação locomotora. **A.** Evolução na recuperação dos animais ao longo do tempo após a LME, com (\*) diferenças entre 2º dia de pós operatório e a 1ª e 2ª semana para todos os grupos submetidos à LME ( $p < 0,05$ ) e, (&) pontuações superiores para o grupo sem intervenção cirúrgica (Naive) e os demais grupos, submetidos à LME ( $p < 0,05$ ), em todos os momentos de avaliação, a partir do 2º dia de pós-operatório. **B.** Não foram encontradas diferenças significativas na pontuação dos animais, considerando somente os grupos com LME.

### 3.2.3 Análise da massa e do potencial de membrana mitocondrial

Com o objetivo de verificar o efeito da exposição ao protocolo de 5 dias de TLE sobre a função mitocondrial na medula espinal analisou-se, por citometria de fluxo, a intensidade da fluorescência dos fluorocromos *Mitotracker Red e Green*, marcadores de potencial e massa mitocondrial, respectivamente. Foram identificadas maiores intensidades de fluorescência em ambos os marcadores para o grupo LM-E2 (treinado em intensidade leve) em relação ao grupo Naive (sem qualquer intervenção cirúrgica e não treinado,  $p < 0,05$ ) e ao grupo LM (com LME,



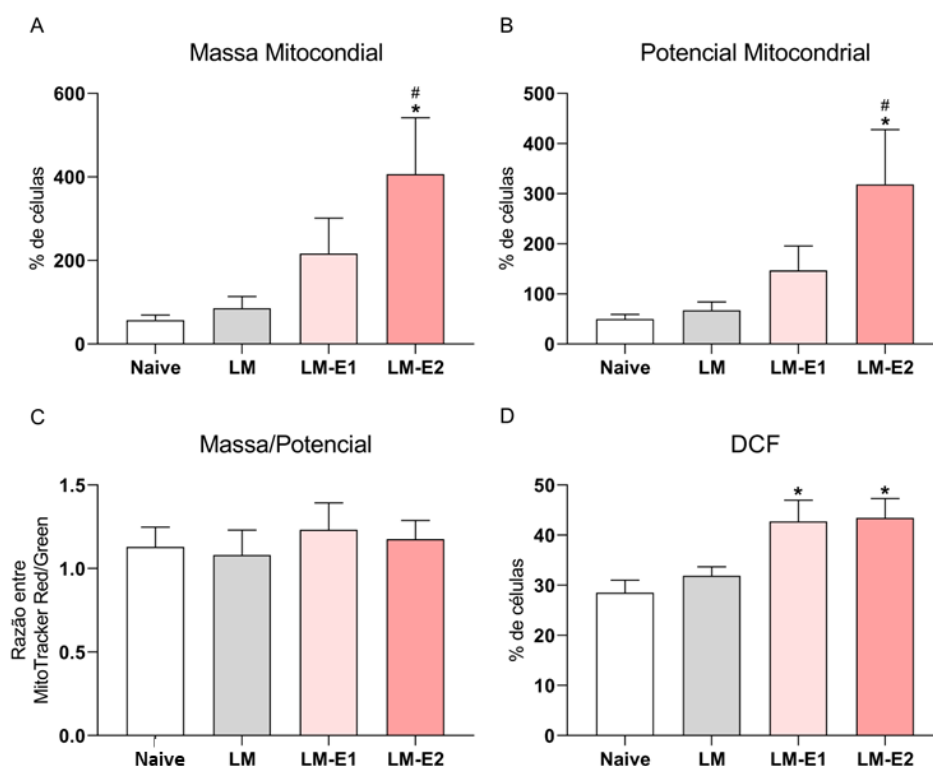
não treinado,  $p < 0,05$ ) (Figuras 12 A e B). Não houve diferenças estatísticas para a análise da relação entre massa e potencial mitocondrial entre os grupos (Figura 12 C).

Assim, o protocolo de 5 dias de TLE iniciado precocemente em intensidade leve foi capaz de aumentar a função mitocondrial da ME dos animais em relação a não realizar o exercício.

### 3.2.4 Análise dos níveis de DCF

Para a análise dos níveis DCF (2',7'-diclorofluoresceína) verificados como um parâmetro de estresse oxidativo, após 5 dias de exposição ao protocolo de TLE, foram encontrados níveis significativamente mais elevados para ambos os grupos treinados, LM-E1 (treinado em intensidade moderada) e LM-E2 (treinado em intensidade leve) em relação ao grupo Naive ( $p < 0,05$ ). No entanto, não houveram diferenças significativas estatísticas para os grupos treinados em ambas intensidades em relação ao grupo com LME não treinado (LM).

Dessa forma, o protocolo de 5 dias de TLE iniciado precocemente em qualquer intensidade aumenta o nível de estresse oxidativo nos animais treinados em relação aos animais não treinados e que não passaram pelo procedimento cirúrgico.



**Figura 12:** representação gráfica dos resultados obtidos pela avaliação bioquímica da medula espinal. Maior intensidade da fluorescência de *MitoTracker Green*, marcador de massa mitocondrial (A) e de *MitoTracker Red*, marcador de potencial de membrana mitocondrial (B) para o grupo LM-E2 em relação aos grupos Naive (\* $p < 0,05$ ) e LM (# $p < 0,05$ ); não houve diferenças significativas intergrupos para a relação entre massa e potencial mitocondrial (C) e níveis maiores de DCF (2',7'-diclorofluoresceína) foram encontrados nos grupos LM-E1 e LM-E2 em relação ao grupo Naive (D) (\* $p < 0,05$ ).

#### 4 Discussão

Nesse estudo investigamos os efeitos do TLE iniciado precocemente, 7 dias após a LME em ratos, buscando confirmar nossa hipótese inicial, de que essa modalidade de tratamento promove efeitos positivos quando realizado em menor intensidade, mas leva à efeitos deletérios quando realizado em maiores intensidades. No primeiro experimento o protocolo de TLE iniciou no 7º dia após a LME e consistiu em 5 dias de treino, durante 20 minutos ao dia, por 4 semanas.

Foi verificado que o grupo treinado em intensidade de leve a moderada (LM-E1) obteve recuperação locomotora das patas posteriores inferior ao grupo que treinou em intensidade que variou de muito leve a leve (LM-E2) nas avaliações realizadas na segunda, quarta e quinta semana. Não houve diferença significativamente estatística para a habilidade locomotora das patas posteriores entre os grupos treinados em qualquer intensidade e o grupo que não passou pelo TLE (LM), o que pode estar relacionado à uma recuperação espontânea acima da média esperada após a lesão, para os animais desse grupo. Todavia, há uma clara tendência de pior recuperação para o grupo que treinou em maior intensidade em comparação ao grupo com LM não treinado, a partir da terceira semana. Assim, quando iniciado em período precoce, 7 dias após a LME, o TLE promoveu pior recuperação funcional quando realizado em maiores intensidades.

Em uma revisão sistemática, os resultados se mostraram controversos a respeito da promoção de melhor recuperação locomotora proporcionada pelo treinamento físico em animais com LME. Dos 41 artigos incluídos, não houve melhora na locomoção dos animais em 11 deles. Nos demais, observou-se que algum aspecto do movimento foi melhorado pelo treinamento. Em 40% dos estudos analisados, houve resultado positivo na locomoção dos animais quando o treinamento teve um tempo de duração menor do que 6 semanas, como realizado no primeiro experimento, quando os animais treinaram durante 4 semanas, mas, nesse caso, não houve resultados positivos após os protocolos de TLE em relação aos animais não treinados. Para estudos com lesão medular incompleta, assim como feito nesse estudo, 25% dos estudos realizados em ratos não demonstraram efeitos positivos do exercício para a locomoção dos animais. Dentre os estudos que apontaram resultados negativos, 72% deles iniciaram o TLE em período precoce após a LME, da mesma forma como realizado no presente estudo, ou tardaram mais de 16 dias para início do treinamento (BATTISTUZZO et al., 2012).

Os resultados aqui apresentados corroboram os achados de Marques e colaboradores (2018), que verificaram pior recuperação funcional na segunda semana de avaliação para o grupo que realizou o TLE com início em 7 dias após a LME, em relação ao grupo com LME

que não passou pelo protocolo de treinamento. Nesse estudo, os animais foram treinados 5 dias por semana, 20 minutos por dia, a uma intensidade inicial de 6m/min, com aumentos semanais progressivos até 11,5m/min ao longo das 10 semanas de exposição ao tratamento.

Em outro estudo com início do protocolo de treinamento em período precoce, após 3 dias da LME, em que os animais treinaram a uma velocidade de 0,3 m/s, durante 20 minutos, 5 dias por semana, por 6 semanas, não foram encontrados resultados positivos significativos para a função das patas posteriores do grupo que realizou o TLE em comparação ao grupo somente com LME, que não passou pelo treinamento, de modo que ambos os grupos obtiveram recuperação locomotora similar (NICOLA, 2013; NICOLA et al., 2016).

Em um estudo em que foram avaliados os efeitos do treinamento de marcha na esteira e de fármacos antidepressivos na recuperação da lesão medular em ratos, com o protocolo de treino de marcha consistindo em 15 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, em velocidade de 6-21 cm/s<sup>-1</sup>, também não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos treinados na esteira e o grupo controle lesado, com relação à função motora das patas posteriores dos animais (CRISTANTE et al., 2013).

Acreditamos que a pior recuperação locomotora do grupo treinado em maior intensidade, verificada em nosso estudo, possa estar relacionada ao fato de que o exercício, quando realizado em intensidades mais altas, leva à uma condição estressante ao organismo, induzindo aumentos nos níveis de corticosterona, conhecida por interagir negativamente com fatores neurotróficos, reduzindo a sinalização desses, o que pode acarretar em efeitos negativos para a plasticidade do tecido nervoso, repercutindo na função motora (SHIH; YANG; WANG et al., 2013; RAHMATI; KAZEMI, 2019).

Ainda sobre o experimento 1, buscou-se investigar possíveis diferenças teciduais na ME para os grupos experimentais. No entanto, apenas confirmou-se que os grupos expostos à indução do modelo experimental obtiveram lesão da estrutura, enquanto o grupo *sham*, não cirúrgico, demonstrou preservação tecidual total, não havendo diferenças significativamente estatísticas nas comparações para o volume de tecido lesado entre os demais grupos do estudo.

Tal ocorrência parece se repetir em outros estudos, como o de Nicola e colegas (2016), já citado anteriormente, em que não houve diferenças significativas para o volume de lesão em cortes longitudinais de ME na comparação entre o grupo somente com LM e o grupo com LM submetido a um protocolo de TLE, iniciado 3 dias após a cirurgia. No trabalho supracitado, de Marques e colaboradores (2018), os autores encontraram maior área de lesão em cortes transversais de ME, após 10 semanas de treinamento, para animais que iniciaram o TLE em período precoce com relação aos animais que iniciaram em período tardio. Também nesse

estudo, após as 10 semanas de treinamento, observou-se um efeito deletério na morfologia da ME para os animais que iniciaram precocemente o TLE, 7 dias após a LME, demonstrando maior área de lesão do que aqueles não submetidos a qualquer tratamento.

Em outro trabalho supracitado, em que os autores avaliaram os efeitos do treinamento de marcha na esteira e de fármacos antidepressivos na recuperação da lesão medular em ratos, também não foram encontradas diferenças significativas no volume de lesão da ME entre os grupos treinados e não treinados (CRISTANTE et al., 2013).

Em outro estudo, os autores, que avaliaram os efeitos do TLE em animais com LME incompleta, não encontraram diferenças significativas entre a porcentagem de substância branca poupada na área de lesão máxima para os grupos treinados e não treinados (FOUAD et al., 2000).

Considerando o trabalho de Marques e colaboradores (2018), que verificou pior recuperação locomotora para os animais que iniciaram o TLE em período precoce após a LME, em associação com um maior volume de lesão na medula espinal após 10 semanas de treinamento, acreditamos que, embora também tenhamos verificado pior recuperação funcional e tendência a um maior dano na ME para o grupo treinado em maior intensidade em comparação ao grupo treinado em menor intensidade, talvez um tempo maior de treinamento fosse necessário para que encontrássemos diferenças morfológicas significativas entre os grupos.

No segundo experimento desse estudo, o protocolo de TLE também foi iniciado no 7º dia após a LME, porém, nesse caso, foram realizados somente 5 dias de treino, durante 20 minutos e verificou-se que não houve resultados positivos ou negativos para a locomoção das patas posteriores dos animais treinados em qualquer intensidade (LM-E1 - moderada e LM-E2 - leve) quando comparados ao grupo com lesão medular não treinado (LM), em qualquer momento da avaliação. Em uma revisão sistemática, já descrita anteriormente, os autores observaram que, em 60% dos trabalhos analisados, períodos de treinamento físico prolongados, com tempo superior a 6 semanas, tendem a ser mais eficazes para melhorar a função locomotora dos animais com LME (BATTISTUZZO et al., 2012). Como esse experimento consistiu em um curto período de exposição ao protocolo de TLE, uma possibilidade é de que um tempo maior seria necessário, visando obter resultados positivos para a função das patas posteriores dos animais.

Todavia, no trabalho já citado, de Marques e colaboradores (2018), em que os animais iniciaram o TLE em período precoce, 7 dias após a LME, foram observados prejuízos na função locomotora dos animais em relação aos animais que não passaram pelo treinamento, na segunda semana após a LME, ou seja, após somente uma semana de treinamento. Com isso, pode-se

pensar que resultados negativos poderiam ter sido encontrados no experimento 2 do presente estudo, no qual o TLE também iniciou 7 dias após a LME e somente uma semana de TLE foi realizada. O protocolo de TLE realizado por Marques e colegas, consistiu em 20 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 10 semanas, com intensidade inicial de 6m/min, progredindo semanalmente até a intensidade de 11,5m/min. Assim, podemos observar intensidade inicial similar àquela em que os animais do grupo LM-E1 foram treinados por uma semana, no experimento 2 do presente estudo. No entanto, nesse caso, não foram encontrados resultados negativos para a locomoção dos animais após exposição ao protocolo de TLE. Atribuímos essa ocorrência ao fato de que trabalhos com modelos experimentais podem apresentar problemas de replicabilidade, uma vez que serão utilizadas outras cepas de animais e também, fatores ambientais podem interferir nos resultados encontrados entre experimentos realizados em momentos diferentes e por pessoas diferentes (CRABBE, 1999).

A possível participação da função mitocondrial da ME de ratos submetidos a dois protocolos de TLE, realizados em diferentes intensidades, iniciados 7 dias após a LME, com duração de 5 dias, sendo 20 minutos por dia, conforme o experimento 2 desse estudo, foi identificada pelas maiores intensidades de fluorescência para marcadores de massa e potencial mitocondrial para o grupo LM-E2 (treinado em intensidade leve) em relação ao grupo Naive (sem qualquer intervenção cirúrgica e não treinado) e ao grupo LM (com LME, não treinado). Acredita-se que o treino em intensidade leve promoveu aumento da função mitocondrial em relação aos animais não treinados, com ou sem intervenção cirúrgica.

Ademais, níveis significativamente mais elevados de DCF (2',7 -diclorofluoresceína) foram encontrados em ambos os grupos treinados, LM-E1 (treinado em intensidade moderada) e LM-E2 (treinado em intensidade leve) em relação ao grupo Naive. No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos treinados em ambas as intensidades em relação ao grupo com LME não treinado (LM). Desse modo, o TLE iniciado precocemente em qualquer intensidade (leve ou moderada), promoveu maior nível de estresse oxidativo em relação ao grupo sem intervenção cirúrgica, mas não se mostrou diferente em relação ao grupo somente com intervenção cirúrgica, sem treinamento.

De acordo com a literatura, os benefícios do exercício a nível molecular, mais especificamente com relação às mitocôndrias, são atualmente melhor compreendidos no músculo esquelético, com ênfase para o aumento da biogênese e função mitocondrial, que podem ocorrer após uma única sessão de exercício. Elevações moderadas nos níveis de espécies reativas de oxigênio são consideradas fisiológicas e necessárias para adaptações benéficas ao exercício, de modo que o exercício agudo induz a formação de espécies reativas de oxigênio,

com dano oxidativo ocorrendo com maior frequência em sessões de maior intensidade (BURTSCHER et al., 2021). Essas afirmações reforçam os achados do presente trabalho, em que foi verificada maior massa e função mitocondrial da medula espinal para o grupo treinado em menor intensidade, em associação com aumentos nos níveis de espécies reativas de oxigênio em ambos os grupos treinados.

Sabe-se ainda que, embora através de vias moleculares menos conhecidas, o exercício também oferece claros benefícios a outros órgãos e tecidos, como, por exemplo, o cérebro, levando a aumento do fluxo sanguíneo, com efeitos proeminentes em componentes envolvidos na biogênese mitocondrial e na neurogênese adulta do hipocampo (BURTSCHER et al., 2021). O exercício induz uma série de adaptações celulares e subcelulares, sendo talvez uma das mais importantes, a modulação da rede mitocondrial em diversos órgãos e tecidos, dentre eles, o cérebro (BERNARDO et al., 2016). Não foram encontrados estudos relacionando massa e potencial mitocondrial em ratos com LME que passaram por TLE.

Em um estudo que avaliou a interferência do treinamento em esteira sobre a função mitocondrial do hipocampo de ratos submetidos a modelos experimentais de depressão, os autores encontraram aumento do potencial mitocondrial nos animais treinados em relação àqueles que não realizaram o exercício (WU et al., 2019), assim como demonstrado no presente estudo, para outra estrutura do SNC, em que houve um aumento do potencial mitocondrial da ME para animais com LME treinados em intensidade leve em relação a animais não treinados.

Outro estudo que avaliou os impactos sobre a função mitocondrial após o treino locomotor em esteira com modelos experimentais da doença de Alzheimer (DA), através de um protocolo consistindo em 30 minutos/dia de exercício, 5 dias por semana, durante 4 semanas, verificou que o exercício foi capaz de atenuar a disfunção mitocondrial ocorrida nos animais DA não treinados através de aumentos na atividade da enzima mitocondrial citocromo c oxidase no hipocampo dos ratos com DA que passaram pelo protocolo de TLE (LU et al., 2017).

Em outro estudo, verificou-se que o potencial mitocondrial, alterado no cérebro de ratos após exposição crônica a altas doses de tramadol, um opioide atípico, comumente utilizado para aliviar a dor de moderada a intensa, teve sua disfunção atenuada nos grupos que passaram pelo TLE prévio, em um protocolo de 30 minutos de treino por dia, durante 5 dias, por 4 semanas (MEHDIZADEH et al., 2017).

Um estudo que analisou a função mitocondrial da medula espinal de camundongos transgênicos (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur), um modelo de esclerose lateral amiotrófica (ELA), após um protocolo de exercício físico com natação por 30 minutos ao dia, 5 dias por semana, encontrou maiores níveis da enzima antioxidante glutatona peroxidase para os animais

com ELA que realizaram o exercício, quando comparados aos que não realizaram. Eles discutem que esse efeito pode estar relacionado à manutenção da função mitocondrial e produção de ERO, possivelmente em nível fisiológico (DZIK et al., 2021), bem como o encontrado no presente estudo, em que animais que passaram pelo TLE em intensidade leve parecem ter melhor função mitocondrial ao mesmo tempo em que tiveram seus níveis de ERO aumentados.

O TLE quando iniciado em período precoce após a LME e realizado durante 4 semanas em maior intensidade, requerendo maior esforço físico, promoveu menor recuperação locomotora em comparação a treinar em menor intensidade, com menor esforço físico. Em contrapartida, esses resultados relacionados à função locomotora não foram corroborados com a análise estrutural da ME, que não demonstrou níveis maiores de lesão entre os grupos treinados em qualquer intensidade e os não treinados, considerando o mesmo protocolo de treinamento. Vários autores também não encontraram diferenças teciduais na comparação entre grupos treinados e não treinados (FOUAD et al., 2000; CRISTANTE et al., 2013; NICOLA et al., 2016). O trabalho de Marques e colegas (2018), que demonstrou maior área de lesão para o grupo treinado em comparação ao não treinado, expôs os animais ao protocolo de treinamento durante 10 semanas, diferentemente de nosso estudo, em que os animais treinaram durante 4 semanas. Assim, podemos considerar que talvez o tempo no qual expomos os animais ao TLE não foi suficiente para gerar alterações estruturais na ME.

Ainda, o TLE quando iniciado em período precoce após a LME, durante 5 dias consecutivos, levou à melhora na função mitocondrial para os grupos treinados em menor intensidade em comparação aos não treinados e, ambos os grupos treinados, em qualquer intensidade, demonstraram maiores níveis de estresse oxidativo em relação ao grupo sem lesão, não treinado. Pensamos que, assim como outros estudos que encontraram melhora na função mitocondrial e aumento no estresse oxidativo após exposição à protocolos de exercício físico para outras estruturas do SNC, como o cérebro (LU et al., 2017; MEHDIZADEH et al., 2017; WU et al., 2019; DZIK et al., 2021), isso também pode se aplicar às reações celulares ocorridas na ME lesada após o TLE em menor intensidade. Acreditamos que o aumento do estresse oxidativo possa estar relacionado à manutenção da função mitocondrial e produção de ERO, provavelmente no nível fisiológico e necessário para a ocorrência dos efeitos benéficos do exercício, uma vez que no período em que esse parâmetro foi avaliado, essas respostas não mais estariam relacionadas somente à lesão na ME. No entanto, a avaliação locomotora não corroborou esses achados, de modo que não houve melhora na recuperação motora dos animais treinados em menor intensidade quando comparados aos não treinados. Embora um tempo mais

próximo à LME seja necessário para que determinadas alterações celulares e moleculares sejam detectadas (NICOLA et al., 2017; MARQUES, 2018; QUADRI et al., 2018, ANJUM et al., 2020), possivelmente o tempo de exposição ao TLE não foi suficiente para gerar alterações comportamentais, sendo necessário um tempo mais longo de treinamento para que uma melhora na locomoção fosse detectada (BATTISTUZZO et al., 2012; BATTISTUZZO et al., 2016).

Acreditamos que nossos achados podem confirmar a hipótese inicial que tínhamos, de que o TLE realizado precocemente após a LME em ratos promove efeitos benéficos quando realizado em menor intensidade, mas leva à prejuízos quando realizado em maiores intensidades, uma vez que animais treinados em maior intensidade durante 4 semanas parecem ter demonstrado pior locomoção e aqueles treinados em menor intensidade durante 5 dias, parecem ter melhorado a função mitocondrial da ME.

Todavia, em concordância com a literatura vigente a respeito da intervenção com TLE após a LME em ratos (BATTISTUZZO et al., 2012), nossos resultados ainda são controversos, à medida que não pudemos confirmar a pior recuperação motora dos animais treinados em maior intensidade com maior lesão na estrutura da ME e melhor função mitocondrial para os animais treinados em menor intensidade com uma recuperação locomotora efetiva.

Consideramos que tão necessário quanto compreender possíveis efeitos benéficos de um tratamento, é preciso também ter a devida atenção quando efeitos negativos são encontrados, assim como verificado nesse estudo. Todavia, nossos resultados não devem desencorajar a utilização do TLE em pessoas com LME, pois, apesar de a pesquisa sobre a temática na área clínica ser ainda bastante limitada, é de conhecimento que essa modalidade de reabilitação oferece benefícios aos sistemas muscular e cardiovascular além de melhorar parâmetros da marcha dos indivíduos (HICKS, 2020). No entanto, futuros estudos devem se concentrar em elucidar as variáveis importantes para definir protocolos efetivos de TLE, descobrindo o momento de início e intensidade ideais, a fim de promover sempre a melhor forma de intervenção terapêutica, proporcionando benefícios, sem risco de prejuízos aos tratados.



## 5 Conclusões

A partir dos dados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

- O TLE em modelos experimentais de LME, quando iniciado precocemente e realizado durante 4 semanas, em intensidade variável entre leve a moderada, promove pior recuperação da função motora do que quando realizado em intensidade variável entre muito leve a leve;
- O TLE em modelos experimentais de LME, quando iniciado precocemente e realizado durante 4 semanas, em qualquer intensidade, não aumenta o dano à estrutura da ME em comparação a não realizar o exercício;
- O TLE em modelos experimentais de LME, quando iniciado precocemente e realizado durante 5 dias em qualquer intensidade, não promove recuperação locomotora superior a não realizar o treinamento;
- O TLE em modelos experimentais de LME, quando iniciado precocemente e realizado durante 5 dias em intensidade leve, melhora a função mitocondrial na ME em relação a não realizar o exercício;
- O TLE em modelos experimentais de LME, quando iniciado precocemente e realizado durante 5 dias em qualquer intensidade promove maiores níveis de DCF, como um parâmetro de estresse oxidativo, em relação a não realizar o exercício.

O tratamento em modelos experimentais de LME com TLE iniciado precocemente em intensidade variável entre leve à moderada promove prejuízo na função locomotora dos animais, mas oferece benefícios à função mitocondrial da ME quando realizado em intensidade leve. Todavia, ambos os protocolos de TLE ainda trazem resultados controversos à medida que a pior recuperação motora dos animais treinados em maior intensidade não se confirma com maior lesão na estrutura da ME, enquanto a melhora da função mitocondrial para os animais treinados em menor intensidade não está associada a uma recuperação locomotora efetiva.

## **6 Considerações Finais**

O projeto de Mestrado que deu origem à essa Dissertação teve seu andamento bastante prejudicado, devido às restrições compulsórias de mobilidade e presença ocorridas durante a pandemia da Covid-19 por longo período na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Outro fato de importância a ser considerado foi a limitação institucional relacionada à indisponibilidade do equipamento necessário para cortes histológicos (criostato) no Departamento de Bioquímica e no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da instituição.

Tais circunstâncias, influenciaram diretamente os passos necessários à finalização deste projeto de pesquisa. Assim, como perspectiva, esperamos avaliar a interferência dos dois protocolos de TLE em diferentes intensidades sobre a musculatura das patas posteriores dos animais, bem como, analisar a presença de citocinas pró-inflamatórias na estrutura da ME desses animais, visando confirmar nossa hipótese inicial com um maior conjunto de resultados.

A partir dos nossos resultados, sugerimos que estudos futuros com LME em modelos experimentais invistam em elucidar as variáveis importantes para definir protocolos efetivos de TLE, testando outras intensidades, diferentes tempos de duração para cada treino e para o treinamento total, a fim de promover uma intervenção terapêutica que ofereça benefícios e não prejuízos aos tratados.

## 7 Referências

- AHUJA, C. S. et al. Traumatic Spinal Cord Injury—Repair and Regeneration. **Neurosurgery**, v. 80, n. 3S, p. S9–S22, 21 fev. 2017.
- ANJUM, A. et al. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7533, 13 out. 2020.
- BAREYRE, FLORENCE M.; LOY, K. Rehabilitation following spinal cord injury: how animal models can help our understanding of exercise-induced neuroplasticity. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 3, p. 405, 2019.
- BARNABÉ-HEIDER, F.; FRISÉN, J. Stem Cells for Spinal Cord Repair. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 1, p. 16–24, jul. 2008.
- BASSO, D. Michele; BEATTIE, Michael S.; BRESNAHAN, Jacqueline C.. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. **Journal Of Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p.1-21, fev. 1995.
- BATTISTUZZO, C. R. et al. A Systematic Review of Exercise Training To Promote Locomotor Recovery in Animal Models of Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, n. 8, p. 1600–1613, 20 maio 2012.
- BATTISTUZZO, C. R. et al. Gait recovery following spinal cord injury in mice: Limited effect of treadmill training. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 39, n. 3, p. 335–343, 18 jan. 2016.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.
- BERNARDO, T. C. et al. Physical Exercise and Brain Mitochondrial Fitness: The Possible Role Against Alzheimer’s Disease. **Brain Pathology**, v. 26, n. 5, p. 648–663, set. 2016.
- BURTSCHER, J. et al. The Muscle-Brain Axis and Neurodegenerative Diseases: The Key Role of Mitochondria in Exercise-Induced Neuroprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6479, 17 jun. 2021.
- CECHETTI, Fernanda et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiology Of Learning And Memory**, v. 97, n. 1, p.90-96, jan. 2012.
- CRABBE, J. C. Genetics of Mouse Behavior: Interactions with Laboratory Environment. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1670–1672, 4 jun. 1999.
- CRISTANTE, A. F. et al. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. **Spinal Cord**, v. 51, n. 6, p. 501–507, 9 abr. 2013.

DZIK, K. P. et al. Swim Training Ameliorates Hyperlocomotion of ALS Mice and Increases Glutathione Peroxidase Activity in the Spinal Cord. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11614, 27 out. 2021.

FOUAD, K. et al. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. **Behavioural Brain Research**, v. 115, n. 1, p. 107–113, out. 2000.

FREEMAN, L. W.; WRIGHT, T. W. Experimental Observations of Concussion and Contusion of the Spinal Cord. **Annals of Surgery**, v. 137, n. 4, p. 433–443, abr. 1953.

GRUNER, J. A. A Monitored Contusion Model of Spinal Cord Injury in the Rat. **Journal of Neurotrauma**, v. 9, n. 2, p. 123–128, jan. 1992.

HAZRA, A.; GOGTAY, N. Biostatistics series module 3: Comparing groups: Numerical variables. **Indian Journal of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 251, 2016.

HICKS, A. L. Locomotor training in people with spinal cord injury: is this exercise? **Spinal Cord**, 24 jun. 2020.

HOWLEY, E. T. Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. Supplement, p. S364–S369, jun. 2001.

JAZAYERI, S. B. et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. **European Spine Journal**, v. 24, n. 5, p. 905–918, 21 jun. 2014.

KIRSHBLUM, S. C. et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury (Revised 2011). **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 34, n. 6, p. 535–546, nov. 2011.

KISSANE, Roger W. P. et al. Effects of treadmill training on microvascular remodeling in the rat after spinal cord injury. **Muscle & Nerve**, v. 59, n. 3, p.370-379, 27 dez. 2018.

KJELL, J.; OLSON, L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 10, p. 1125–1137, 1 out. 2016.

KUMAR, R. et al. Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. **World Neurosurgery**, v. 113, p. e345–e363, maio 2018.

LEE, B. B. et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. **Spinal Cord**, v. 52, n. 2, p. 110–116, 26 fev. 2013.

LI, H. et al. The Effects of Icariin on Enhancing Motor Recovery Through Attenuating Pro-inflammatory Factors and Oxidative Stress via Mitochondrial Apoptotic Pathway in the Mice Model of Spinal Cord Injury. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 16 nov. 2018.

LU, Y. et al. Treadmill Exercise Exerts Neuroprotection and Regulates Microglial Polarization and Oxidative Stress in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 56, n. 4, p. 1469–1484, 20 fev. 2017.

MARQUES, M. R. et al. Locomotor Training Promotes Time-dependent Functional Recovery after Experimental Spinal Cord Contusion. **Neuroscience**, v. 392, p. 258–269, nov. 2018.

MARQUES, Marília Rossato. **Efeitos do treino locomotor em esteira iniciado em diferentes períodos após a lesão medular**. 2018. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MEHDIZADEH, H. et al. Mitochondrial impairments contribute to spatial learning and memory dysfunction induced by chronic tramadol administration in rat: Protective effect of physical exercise. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 79, p. 426–433, out. 2017.

MOLINA, Alessandra Eira Iague Sleiman. **Análise da sensibilidade e reprodutibilidade da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar**. 2006. 127f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MORAWIETZ, C.; MOFFAT, F. Effects of Locomotor Training After Incomplete Spinal Cord Injury: A Systematic Review. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 94, n. 11, p. 2297–2308, nov. 2013.

NICOLA, F. C. et al. Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 9, 2016.

NICOLA, F. DO C. et al. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. **Brain Research**, v. 1663, p. 95–105, maio 2017.

NICOLA, Fabrício do Couto. **Associação do treino locomotor em esteira e células-tronco no tratamento da lesão medular espinhal**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

ODORCYK, Felipe Kawa. **Diferenças no substrato metabólico utilizado e na função mitocondrial induzem prognósticos distintos à hipóxia-isquemia neonatal em diferentes estágios de desenvolvimento em ratos Wistar**. 2020. 125 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

QUADRI, S. A. et al. Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury. **Neurosurgical Review**, 11 jul. 2018.

RAHMATI, M.; KAZEMI, A. Various exercise intensities differentially regulate GAP-43 and CAP-1 expression in the rat hippocampus. **Gene**, v. 692, p. 185–194, abr. 2019.

ROUANET, C. et al. Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 6, p. 387–393, jun. 2017.

SANTOS, G. B. DOS et al. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 87–91, abr. 2011.

SHARIF-ALHOSEINI, M. et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. **Spinal Cord**, v. 55, n. 8, p. 714–721, 24 jan. 2017.

SHIH, P.-C.; YANG, Y.-R.; WANG, R.-Y. Effects of Exercise Intensity on Spatial Memory Performance and Hippocampal Synaptic Plasticity in Transient Brain Ischemic Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e78163, 25 out. 2013.

SHIMADA, H. et al. Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 243, p. 21–27, abr. 2013.

SUN, T. et al. Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 27, p. 2540–2547, set. 2013.

WU, Q. et al. Neuromuscular interaction is required for neurotrophins-mediated locomotor recovery following treadmill training in rat spinal cord injury. **PeerJ**, v. 4, p. e2025, 11 maio 2016.

WU, T. et al. Treadmill Exercise Ameliorates Depression-Like Behavior in the Rats With Prenatal Dexamethasone Exposure: The Role of Hippocampal Mitochondria. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 26 mar. 2019.

ZHOU, X.; HE, X.; REN, Y. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 20, p. 1787, 2014.