



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA
PATOLÓGICA

Anne Caroline Rodrigues dos Santos

**O EXERCÍCIO FÍSICO ACELERA A RECUPERAÇÃO FUNCIONAL SENSITIVO-
MOTORA, MELHORA A PRESERVAÇÃO TECIDUAL E APRESENTA EFEITOS
IMUNOMODULATÓRIOS EM MODELO DE LESÃO COMPRESSIVA DA
MEDULA ESPINAL**

Rio de Janeiro
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA
PATOLÓGICA**

Anne Caroline Rodrigues dos Santos

**O EXERCÍCIO FÍSICO ACELERA A RECUPERAÇÃO FUNCIONAL SENSITIVO-
MOTORA, MELHORA A PRESERVAÇÃO TECIDUAL E APRESENTA EFEITOS
IMUNOMODULATÓRIOS EM MODELO DE LESÃO COMPRESSIVA DA
MEDULA ESPINAL**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Anatomia Patológica (Neurociência).
Orientadora: Profa. Dra. Suelen Adriani Marques.

Rio de Janeiro

2024

Ficha catalográfica

Anne Caroline Rodrigues dos Santos

O EXERCÍCIO FÍSICO ACELERA A RECUPERAÇÃO FUNCIONAL SENSITIVO-MOTORA, MELHORA A PRESERVAÇÃO TECIDUAL E APRESENTA EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS EM MODELO DE LESÃO COMPRESSIVA DA MEDULA ESPINAL

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Anatomia Patológica.

Aprovado por:

Profa. Dra. Suelen Adriani Marques (orientadora)
Profa. Adjunta do Instituto de Biologia - UFF

Profa. Dra. Kátia Carneiro de Paula (examinadora)
Profa. Associada do Instituto de Ciências Biomédicas e da Faculdade de Medicina - UFRJ

Prof. Dr. Marcos Fábio Henriques dos Santos (examinadora)
Professor Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Prof. Dr. Felipe Leite Oliveira (examinadora)
Professor Associado do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Profa. Dra. Juliana Ferreira Vasques (examinadora)
Profa. Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Rio de Janeiro

2024

“Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas, mas
ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma
humana.”
(Carl G. Jung)

“Quem costuma vir de onde eu sou
Às vezes não tem motivos para seguir
Então levanta e anda.
Mas eu sei que vai, que o sonho te traz
Coisas que te faz prosseguir
Então levanta e anda.
Somos maior, nos basta só sonhar, seguir.”
(Emicida)

Dedico aos meus pais,
meus exemplos, minha fortaleza,
minha luz, minha vida.

AGRADECIMENTOS

Sim! Finalmente esse dia chegou.

Há 5 anos, 3 meses e 16 dias, no dia 18/03/2019, eu entrava em uma das aventuras mais difíceis da minha jornada acadêmica. Nesta jornada, teve um pouco de tudo: muitas versões de mim, tentando conjugar vida profissional, vida pessoal e vida acadêmica; teve um projeto que se redesenhou múltiplas vezes até se encontrar com a pesquisadora que o desenvolveu (risos); e teve uma pandemia no meio do caminho, trazendo inquietudes, desafios, mas muita, muita certeza de que a minha função como pesquisadora e desenvolvedora de ciência brasileira tem um sentido muito importante.

Cairei no clichê em dizer que não foi fácil. E de fato não foi. Muitas vezes, o medo tocou em mim e me tentou em acreditar que esse dia não chegaria. Mas, com lágrimas nos olhos (neste exato minuto, depois de um dia exaustivo entre sala de aula, avaliação de pacientes e escrita desta tese), me vejo lembrando daquela menina alagoana que nunca pensou em desistir. Não ia ser agora que daria esse desgosto para ela rsrs. Se eu pudesse voltar no tempo e rever aquela menina, que saiu de casa com 14 anos em busca do desconhecido, falaria para ela que vai valer a pena demais cada minuto (até as horas de madrugada rsrs). Agradeço a ela (mais uma versão de mim) por não ter desistido.

Mas, esse momento jamais existiria se não fosse meu Pai amado e minha Nossa Senhora que, em primeiro lugar, nunca me impediram de sonhar e de ter forças para isso. Agradeço a Deus e a minha Mãe por ter me dado saúde e discernimento para que esse momento chegasse. Sem eles, nada existiria.

Minhas orações não foram somente feitas por mim. Há algo muito mais poderoso e que me protege, mesmo que à distância. Meu pai e minha mãe, sr. Otávio e Dn. Goret, nos momentos de maior dificuldade, eram vocês o meu espelho, a minha força, a minha potência. Eu agradeço infinitamente por terem acreditado no meu sonho desde sempre. Eu me lembro perfeitamente de cada palavra de vocês nesta jornada. De cada conversa, abraço, olhar. Eu me lembro de estarmos no auditório do Centro de Tecnologia/UFRJ, após a minha formatura, e sonharmos com esse momento: ser doutora. O sonho que se sonha junto é realidade. E olha onde chegamos! Sempre foi por vocês, para vocês! Meu coração é infinitamente grato por poder, neste momento, tê-los comigo. Não existe presente maior, não existe sensação melhor.

Como diz o mestre Djavan, “pai e mãe, ouro de mina”. Amo vocês infinitamente!

Ao meu irmão, Otávio (Tívio), te agradeço por estar comigo em grande parte desta jornada. Apesar de tudo, ter você comigo, como minha família, me fez lembrar muitas vezes de porque parei aqui neste lugar. Minha família sempre foi minha maior riqueza. E sou feliz por te ter nesta etapa.

Agradeço a toda a minha família que sempre esteve em orações por mim, em especial as minhas madrinhas, Josefa e Maristela, meu padrinho Davi, minha mãe emprestada Silvete, minha voinha, Dorinha. Obrigada, obrigada, obrigada.

Ao meu noivo, Ronaldo, que me fez enxergar a vida com leveza, amor e aconchego (e açaí e chococcino da Kopenhagen rrsrs). Foi você que segurou a minha mão e disse que ia dar certo, infinitas vezes. Eu te agradeço por cada fruta levada enquanto eu trabalhava, por cada vez que me buscou de madrugada no Fundão, por ficar ao meu lado durante algum estudo, por aguentar minhas oscilações de humor (risos infinitos) e minhas ausências, por cada conversa de ânimo e impulso, por cada vez que foi abrigo e calma no meio do mar bravo. A vida é muito melhor ao seu lado. Sonhar contigo é muito melhor. Sou feliz por saber que te tenho ao meu lado e que te encontrarei todos os dias na nossa casa, nosso lar. Que conversaremos sobre o nosso dia, sobre nossas metas, sobre o que há de bom ou o que nos angustia, e comeremos cuscuz, ou uma sopinha de ervilha, ou um crepezinho logo depois rrsr. Eu amo você, menino! Daqui até Saturno.

E te agradeço ainda mais pela família que me deu, que me acolheu e me abraçou. D. Fátima (minha florzinha), sr. Luiz, Reinaldo e Bárbara, agradeço demais por todos os momentos de acolhida no meio das tempestades. Agradeço cada jantar depois de um dia exaustivo de trabalho, cada conversa animadora, pelo olhar atento e as palavras de encorajamento. Além disso, agradeço demais pelo presente que foi André Luiz na minha vida. Dinda é mais feliz por ter nosso menino luz, que amo do fundo do meu coração!

Como diz nosso querido Emicida, “quem tem um amigo, tem tudo”. Eu nem sei o que seria de mim sem vocês. Não tem como começar essa lista se não por ela: minha Robbin, minha companheira de laboratório (ah! Quantas madrugadas envolvidas kkkkk), minha baby! Renata, quem diria que aquela conversa despreziosa no início de 2017, para uma seleção de aluna de IC, nos levaria até aqui. Meu Deus, que presente! Mais que companheiras noturnas e de madrugada no lab (afinal, meu mestrado só saiu porque tive você e o doutorado não seria

diferente), viramos companheiras de vida. Eu te agradeço infinitamente por ter acreditado nesta pesquisa comigo, por ter levado nosso estudo para diversos eventos, por todos os prêmios que ganhou, por topou o horário alternativo de pesquisa (rsrsrs) mas, ainda mais, te agradeço por sua lealdade, seu apoio e seu estímulo. Zeramos o game. Deu certo!

Nil, minha amiga de todas as horas, que soube ser escuta atenta no meio do caos. Te agradeço por cada jantinha, por cada palavra, por estar ao meu lado sempre e sempre. Dividimos a bancada e seguimos como companheiras de vida. Agradeço ao destino por aquele encontro em março de 2017, num simpósio na UFF. Foi naquele momento que o universo me deu um presente, uma irmã. Esse momento tem muito do seu carinho e olhar para comigo. E agradeço também por ter me dado Joicyara de presente. Minha amiga, potência alagoana, que muitas das vezes foi inspiração de força e garra. Joici, obrigada por ter sido colo muitas vezes que precisei desabafar, por todos os momentos família, por todo o carinho e cuidado.

Luiza, minha lulu, mais que a melhor doutoranda fazedora de imuno que eu conheço, te agradeço por todos os momentos e todas as imunos rsrs. É um prazer fazer pesquisa contigo, mas ainda mais é um prazer ter sua alegria no dia a dia.

Anna, minha querida Anna Lectícia Martinez Martinez Toledo, obrigada por todo o apoio, por ter topado em fazer experimento nos últimos 45 minutos do segundo tempo, por toda a paciência e parceria. Foi e é um prazer fazer ciência contigo e te ter como amiga nessa jornada.

Aos meus amigos, Anne (Anita) e Miguel (Guel), que desde sempre e para todo sempre estão comigo nesta jornada louca da vida. Feliz em poder tê-los desde quando éramos somente sonhadores e, hoje, estamos concretizando sonhos. Sou feliz por tê-los ao meu lado me apoiando em cada momento da minha vida.

Minhas amigas da Faculdade de Ciências Médicas de Três Rios, como não agradecer por vocês. Fabiana, mamacita, obrigada por todo o estímulo e força desde o primeiro momento. Por todos os doces que suavizam a rotina, por todas as conversas e almoços. Laila, lailita, quantas vezes você foi inspiração! Quero ser que nem você quando crescer rsrs. Eu te agradeço por cada acolhida (e cada vinho kkkkk) na sua casa, no meio da nossa rotina louca. Você foi acolhimento no meio do caos infinitas vezes. Mariana, marilinda, você foi fundamental nesta jornada. Eu te agradeço por me ouvir, por ser amiga, por ser parceira. Por escutar meus medos e minhas inseguranças e me fazer maior. Que todo mundo tenha a sorte de ter uma Mariana na vida! Te agradeço por cada pizza Davos (kkkkk) e por todas as acolhidas. Márcia Emília,

Marcinha, muitas das vezes se fez mãe na ausência física da minha. Grata por cada conselho, cada ponte aérea Rio x Três Rios, por cada carona de madrugada ou de volta para casa. Obrigada por ter sido colo materno todas as vezes que precisei. Aproveito e agradeço à diretoria da Faculdade de Ciências Médicas de Três Rios, por todo o apoio para que esse momento chegasse, e a todos os funcionários da mesma que sempre se colocaram ao meu lado nesta jornada.

E falando de mãe, há alguém que não brincou em serviço em ser minha mãe emprestada. Bendito seja o dia que te conheci em 2015, Núbia Horiba. Minha eterna gratidão por ter acreditado naquela menina de 20 anos. Por ter incentivado, por ter apoiado, por ter me feito mais forte. Não haveria enfermeira Carol se não fosse a enfermeira Núbia. Não haveria mestrado e doutorado se não fosse todo o seu acolhimento, compreensão e impulso que você me proporcionou. Extremamente grata por ter sido muito mais que uma mentora, chefe e referência de enfermeira na minha vida. Agradeço também a Ivi, que muitas vezes compartilhou desta jornada e todos os seus altos e baixos comigo, se fazendo sempre parceira nesta etapa.

E esta etapa não estaria acontecendo se, em 2013, eu não tivesse sido abraçada por Tamires Massoto. Minha chefinha, sempre seguirei agradecendo por essa oportunidade. Foi você que me ensinou o básico, que me incluiu inicialmente no mundo da neurociência. Te agradeço por tudo.

Agradeço à profa. Dra. Suelen Marques, minha orientadora, mãe científica e mestra. Minha querida teacher, há 11 anos você tinha uma aluna de iniciação científica e, hoje, por suas mãos, me torno doutora. Você me ensinou muito mais que neurociência. Me ensinou a ser mais humana, mais empática. Me ensinou que ser docente é ter uma relação de segurança com seu aluno. Foi com você que aprendi que tipo de docente gostaria de ser e mais: foi com você que entendi que queria ser docente e isso ressignificou muita coisa na minha jornada. Serei eternamente grata por tudo!

Agradeço à profa. Dra. Ana Martinez, minha querida chefe de laboratório, que deu oportunidade para aquela IC, muito curiosa, mas tão menina, e sempre direcionou em busca de bons frutos. Ser doutoranda no seu laboratório, podendo colher um pouco do seu conhecimento é uma honra. Te agradeço por todas as orientações e correções de paper, pela paciência, pelos puxões de orelha e acolhimento de sempre.

Agradeço aos professores Henrique Mendonça e Fernanda Almeida, que sempre estiveram abertos para me direcionar e se colocaram para auxiliar. Foi um prazer aprender

neurociência com vocês.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que compartilharam comigo muitos momentos desta jornada: Juliana (nunca vou esquecer do lanchinho da madrugada e do bolo da qualificação), Bruna (obrigada por todo o apoio com a logística de compras), Tiago (obrigada por todo o suporte e sempre pronto em tirar as dúvidas), Manu (sempre muita prestativa e parceira de desabafos), Felipe (parceiro de anos de lab), Roberta (acho que nossa troca em Búzios fez nossas incertezas se encontrarem rsrs e foi fundamental para estreitarmos nossos laços. Obrigada pela parceria), Domethila (parceira de orientadora e de labutas rsrs), Greice (obrigada pelas trocas), Caio (obrigada demais pelas ricas trocas e compartilhamento de ideias), Pestana (obrigada pelo carinho, acolhimento e conversas sempre), Thamyres, Milena e Guilherme, além de toda a rica troca com os ICs, em especial Pedro, Bruno, Gabriel e Camila. Agradeço também ao nosso técnico de laboratório, Jorge, por sempre se colocar prestativo em ajudar sempre que preciso.

Agradeço à profa. Morgana Castelo Branco e a doutoranda Ana Carolina Campos pela parceria na colaboração com os testes de ELISA. Vocês foram fundamentais no coração deste trabalho.

Agradeço também aos técnicos do ICB, Gabriel e Graziela, por todo o suporte com o manuseio e geração de imagem no Confocal, e por toda a equipe do Microtomógrafo Skyscan, do NAB/UFF

Agradeço a todos os colegas de plantão que se fizeram presentes nessa jornada.

Agradeço aos meus alunos, que me fazem lembrar todos os dias sobre a minha escolha de ser uma professora e pesquisadora melhor. Aos meus pacientes, que dão significado ao meu trabalho, pois a minha missão como pesquisadora está atrelada a impactar diretamente a eles, por meio da assistência.

Enfim, a cada um que fez parte desse processo, meu profundo agradecimento e gratidão por tudo!

RESUMO

Introdução: a incidência de lesão medular traumática é bastante elevada e estima-se que 2.5 milhões de pessoas vivam com este tipo de lesão em todo o mundo. Ela promove condições limitantes sensório-motoras, que prejudicam a qualidade de vida do paciente. A reabilitação física é uma das realidades terapêuticas bem estabelecidas na clínica, com o objetivo de melhorar a função e minimizar problemas sistêmicos, a atrofia muscular e as contraturas articulares, através da modulação do microambiente inflamatório, tornando-se um importante foco de investigação terapêutica. **Objetivo:** avaliar a influência de um protocolo de exercício na modulação do microambiente inflamatório da lesão, neuroplasticidade e recuperação sensório-motora, após lesão medular compressiva em camundongos. **Metodologia:** utilizamos camundongos fêmeas de 8-12 semanas de idade, C57BL/6, submetidos à lesão medular por compressão extradural. O estudo foi desenvolvido com 3 grupos: SHAM (somente laminectomia); SCI (lesado sem tratamento) e TMT (lesado, treinado até 28 dias pós lesão (dpo), com 2 treinos de 10 minutos na esteira ergométrica, com intervalo de 10 minutos de descanso entre eles, e após este período, apenas treino de 10 minutos, por 56 dias). O treinamento foi iniciado 7 dias após a injúria. Foram realizadas avaliações funcionais semanais e eletroneuromiografia no 56º dia. As avaliações morfológicas e bioquímicas foram realizadas após a eutanásia dos animais. **Resultados:** o grupo SHAM não apresentou alteração, sendo utilizado como padrão de normalidade. Em relação às avaliações funcionais, o grupo TMT apresentou melhor desempenho locomotor no Basso Mouse Scale (BMS), a partir de 21 dias após a lesão, quando comparado ao grupo SCI ($p < 0,01$). E também apresentou melhor desempenho que o grupo SCI ($p < 0,001$) em relação ao retorno sensório tátil nas patas traseiras 56 dpo, no analgesímetro digital. Quanto à atividade neuromuscular, os grupos TMT e SHAM apresentaram melhor desempenho na eletroneuromiografia em relação à amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC) quando comparado ao SCI ($p < 0,001$). O grupo TMT também apresentou menor atrofia muscular comparado ao SCI ($p < 0,05$), e maior número de junções neuromusculares, quando comparado ao SCI (sóleo: $p < 0,05$, gastrocnêmio: $p < 0,01$). A espessura da parede da bexiga do grupo TMT foi similar ao grupo SHAM, e obtiveram uma diferença estatística significativa comparado ao SCI ($p < 0,001$), indicando menor inflamação sistêmica. O perfil inflamatório local analisado pela ELISA mostrou que o grupo TMT obteve níveis aumentados de citocinas anti-inflamatórias e menor expressão de citocinas pró-inflamatórias quando comparado ao grupo SCI. Esses dados foram complementados pela maior expressão de micróglia com perfil M2, menor hiperatividade de astrócitos e menor ativação de apoptose no grupo TMT. A microtomografia no grupo SCI mostrou maior espalhamento da lesão, e a densidade evidente pode ser correlacionada com processo inflamatório crônico e presença de fibrose local. A microscopia eletrônica de varredura, usada para verificar a plasticidade neural e a sobrevivência celular, foi possível ver uma integridade de tratos preservados no grupo TMT. **Conclusão:** o protocolo que ajusta o volume de exercício de acordo com a fase pós lesão pode modular a qualidade da resposta regenerativa, e tem potencial para melhorar a recuperação funcional, a plasticidade neuromuscular, a modulação do perfil inflamatório local e sistêmico, a redução do espalhamento da lesão e maior preservação tecidual.

Palavras-chave: lesão medular, treinamento em esteira ergométrica, neurodegeneração, microambiente inflamatório.

ABSTRACT

Introduction: The incidence of traumatic spinal cord injury is high, and estimating that 2.5 million people live with this type of injury worldwide. It promotes limiting sensorimotor conditions, which impair the patient's quality of life. Physical rehabilitation is one of the well-established therapeutic realities in the clinic to improve function and minimize systemic problems, muscle atrophy, and joint contractures through modulation of the inflammatory microenvironment, becoming an important focus of therapeutic investigation. **Objective:** To evaluate the influence of an exercise protocol on modulating the inflammatory microenvironment of the lesion, neuroplasticity, and sensorimotor recovery after compressive spinal cord injury in mice. **Methodology:** We used 8-12-week-old female C57BL/6 mice subjected to spinal cord injury by extradural compression. We study 3 groups: SHAM (laminectomy only), SCI (injured without treatment), and TMT [injured, trained up to 28 days post-injury (dpo), with two 10-minute treadmill workouts, with a 10-minute rest interval between them, and after this period, only 10-minute workout minutes, for 56 days]. Training began seven days after the injury. We performed functional assessments weekly, then the electroneuromyography on the 56th day. Morphological and biochemical evaluations were made after the animal's euthanasia. **Results:** The SHAM group showed no alteration and was used as a normality standard. Regarding functional assessments, the TMT group showed better locomotor performance in the BMS from 21 days after the injury compared to the SCI group ($p < 0.01$). TMT also exhibited better performance than the SCI group ($p < 0.001$) in the return of tactile sensitivity in the hind paws 56 days after injury measured by digital analgesiometer. Regarding neuromuscular activity, the TMT and SHAM groups showed better performance in electroneuromyography regarding the amplitude of the compound muscle action potential (PAMC) when compared to the SCI ($p < 0.001$). Concerning neuromuscular activity, the TMT and SHAM groups showed better performance in electroneuromyography regarding the amplitude of the compound muscle action potential (CMAP) when compared to the SCI ($p < 0.001$). The TMT group also showed less muscle atrophy compared to SCI ($p < 0.05$) and a higher number of neuromuscular junctions compared to SCI (soleus: $p < 0.05$ and gastrocnemius: $p < 0.01$). The bladder wall thickness from the TMT group was similar to the SHAM group and obtained a statistically significant difference compared to the SCI ($p < 0.001$), indicating less systemic inflammation. The local inflammatory profile analyzed by ELISA showed that the TMT group had increased levels of anti-inflammatory cytokines and lower expression of pro-inflammatory cytokines than the SCI group. These data are complemented by the greater expression of microglia with an M2 profile, less hyperactivity of astrocytes, and less activation of apoptosis in the TMT group. Microtomography in the SCI group showed more lesion spread, and the evident density can be correlated with a chronic inflammatory process and the presence of local fibrosis. Scanning electron microscopy, used to verify neural plasticity and cell survival, showed the tracts preserved in the TMT group. **Conclusion:** The protocol that adjusts the exercise volume according to the post-injury phase can modulate the quality of the regenerative response and has the potential to improve functional recovery, neuromuscular plasticity, modulation of the local and systemic inflammatory profile, reduction

of spread of the lesion and higher tissue preservation.

Keywords: spinal cord injury, treadmill training, neurodegeneration, inflammatory microenvironment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da medula espinal intacta.	23
Figura 2 - Fotomicrografia de secção de medula espinal corada com Luxol Fast Blue.	23
Figura 3 - Representação esquemática do local da lesão medular.	25
Figura 4 - Dinâmica temporal da ativação de células gliais induzida pós-lesão.	27
Figura 5 - Dinâmica espacial da ativação de células gliais induzida por SCI.	31
Figura 6 - Plasticidade após lesão e o CPG.	33
Figura 7 - Foto do procedimento cirúrgico com o modelo de lesão adaptado de 30 g por 10 segundos.	35
Figura 8 - Desenho experimental do trabalho.	36
Figura 9 - Aparato do teste de caminhada em escada em uma vista fronto-lateral com as medidas específicas.	39
Figura 10 - Analgesímetro digital para teste de sensibilidade mecânica (Von Frey).	40
Figura 11 - Equipamento utilizado para o registro eletroneuromiográfico - Power Lab 4/35 (AD Instruments, Austrália).	41
Figura 12 - Esquema das áreas sistemáticas utilizadas para quantificar as fibras mielínicas e razão G (G-ratio).	46
Figura 13 - O exercício promove melhora no padrão locomotor.	48
Figura 14 - Análise de teste de caminhada em escada horizontal. Comparação entre os grupos no LWT.	50
Figura 15 - Gráfico de barra sobre a análise do analgesímetro digital (Von Frey eletrônico).	51
Figura 16 - Análise do registro eletroneuromiográfico.	53
Figura 17 - Análise da atrofia muscular.	54
Figura 18 - - Análise de marcação de α -bungarotoxina no músculo Sóleo e Gastrocnêmio.	55
Figura 19 - - Representação qualitativa da parede da bexiga.	58
Figura 20 - Gráfico de barras representando os níveis das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.	60
Figura 21 - Análise qualitativa e quantitativa TMEM+Arginase.	62
Figura 22 - - Análise qualitativa e quantitativa TMEM+iNOS.	63
Figura 23 - Análise qualitativa e quantitativa GFAP.	65
Figura 24 - Análise qualitativa e quantitativa GFAP.	66
Figura 25 - Análise qualitativa e quantitativa da região de funículo antero-lateral da ME,	56

dias após lesão.	67
Figura 26 - Análises morfométricas da medula espinal.	68
Figura 27 - Representação medular após microtomografia nos grupos SHAM, SCI e TMT, com 56 dias após a lesão.	69
Figura 28 - Representação longitudinal das medulas nos grupos pela micrografia, com 56 dias após a lesão.	70
Figura 29 - Representação das medulas nos grupos, pela microscopia de varredura, com 56 dias após a lesão.	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios para Escore da Escala BMS.

37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh - Acetilcolina
AT - Azul de toluidina
ATP - Adenosina trifosfato
BDNF - Fator Neurotrófico derivado do encéfalo
BMS – Escala de avaliação de basso (Basso Mouse Scale)
C57BL/6 –Linhagem de camundongo
CPG - Gerador central de padrões de marcha
Dpo – Dias pós-operatório
ENMG -Eletroneuromiografia
FAF - Arma de fogo
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial
GDNF - Fator neurotrófico derivado das células da glia
HE- Hematoxilina e eosina
IP - Intrapéritoneal
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-10 – Interleucina-10
IL-13 – Interleucina-13
IL-6 - Interleucina-6
IL-8- Interleucina-8
JNM - Junções neuromusculares
LM - Lesão medular
LME – Lesão medular espinal
LRP – Limiar de retirada da pata
LWT - Teste de caminhada em escada horizontal (Ladder Walking Test)
ME – Medula espinal
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MicroTC -Microtomografia
ML - Microscopia de luz
MO - Microscopia Óptica
mV – milivolts

NG2 - Receptor pró-apoptótico

NGF - Fator de crescimento do nervo

NT3 - Neurotrofina-3

NT4 - Neurotrofina-4

ON – Óxido Nítrico

OPC – Células precursoras de oligodendrócitos

PAMC - Potencial de ação muscular composto

PCR - Proteína C reativa

PD - Pata direita

PE - Pata esquerda

pH - Potencial hidrogeniônico

SCI – Lesão na medula espinal (Spinal Cord Injury)

SHAM – Animal falso operado – apenas laminectomia

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

TGF- α - Fator de transformação de crescimento α

TGF- β 1 - Fator de transformação de crescimento β 1

TMT - Treino em esteira ergométrica, - lesado, com protocolo de treino por 10', descanso de 10' e retorno do treinamento por mais 10' até 28 dpo, e, após, protocolo de treinamento por 10', 3x/semana, até 56 dias.

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VEGF - Fator de crescimento derivado do endotélio vascular

Sumário

1. Introdução	21
1.1 Lesão medular traumática: aspectos epidemiológicos e clínicos	21
1.2 Arquitetura da medula espinal	22
1.3 Fase aguda e crônica da lesão medular traumática	24
1.4 Fisiopatologia da lesão medular traumática: eventos primários e secundários da lesão	24
1.5 Microambiente da lesão medular: resposta inflamatória pós lesão	26
1.6 Realidade terapêutica: reabilitação física	31
2. Objetivo geral	34
2.1 Objetivos específicos	34
3. Metodologia	34
3.1 Animais	34
3.2 Procedimento cirúrgico	35
3.3 Grupos experimentais	36
3.4. Avaliação funcional	36
3.4.1 Escala Basso para avaliação locomotora (BMS)	37
3.4.3 Teste de caminhada em escada horizontal (LWT)	38
3.4.3 Teste de alodinia mecânica (Von Frey eletrônico)	39
3.4.4 Análise por eletroneuromiografia (ENMG)	40
3.5 Preparo do material para microscopia óptica (MO)	41
3.6 Preparo do material para microscopia eletrônica de transmissão (MET)	41
3.7 Análise da atrofia muscular	42
3.7.1 Avaliação do peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio	42
3.7.2 Avaliação das junções neuromusculares (JNM)	42
3.8 Análise do microambiente inflamatório	43
3.9 Análise morfométrica	45
3.10 Análise de microtomografia (microTC)	46
3.11 Análise por microscopia de varredura (MEV)	47
3.12 Análises estatísticas	47
4. Resultados	47
4.1. Análise funcional	47
4.1.1 Avaliação locomotora (BMS)	48
4.1.2 Teste em caminhada em escada horizontal	49
4.1.3 Teste de alodinia mecânica (Von Frey eletrônico)	50
4.1.4 Análise por eletroneuromiografia	51
4.1.5 Análise neuromuscular	53
4.1.6 Avaliação da parede vesical e neuroinflamação	57
4.1.7 Análise da neuroinflamação por ELISA	59
4.1.8 Avaliação por imuno-histoquímica	61
4.1.9 Avaliação de cortes semifinos (G ratio)	65
4.1.9 Análise da microtomografia	67
4.1.10 Análise da microscopia de varredura	69

5. Discussão	70
5.1 Terapia: treinamento físico em esteira ergométrica	71
5.2 Exercício, neuroinflamação e lesão medular	73
5.2.1 Neuroinflamação avaliada pelas citocinas inflamatórias	73
5.2.2 Neuroinflamação e alterações sistêmicas	76
5.3 Exercício na regeneração nervosa, plasticidade e sobrevivência celular	77
6. Conclusões	78
Referências	79
Apêndice	89

1. Introdução

1.1 Lesão medular traumática: aspectos epidemiológicos e clínicos

A lesão da medula espinal (SCI, do inglês Spinal Cord Injury) é uma condição debilitante, de forma transitória ou irreversível, e que causa morbidade e mortalidade significativa no Brasil e no mundo, com grande impacto físico, psíquico e social. As principais causas traumáticas são acidente automobilístico, queda de altura, mergulhos e violência (ferimentos por arma de fogo ou arma branca), afetando principalmente a população masculina (ÆSØY *et al.*, 2016; James *et al.*, 2019, Rede SARAH 2021), o que a reflete como um importante problema de saúde pública.

A incidência de SCI traumática é bastante elevada e estima-se que 2.5 milhões de pessoas vivam com lesão medular em todo o mundo, sendo 270.000 casos de paciente na América do Norte (Lee *et al.*, 2014; Merritt *et al.*, 2019). Dados dos Estados Unidos mostraram que a incidência anual de LME é de aproximadamente 17.000 pessoas por ano, e as despesas do primeiro ano de um paciente com tetraplegia elevada são superiores a 1 milhão de dólares (Spinal Cord Injury, 2016; Taylor *et al.*, 2022). A lesão medular espinal (LME) afeta 1.3 milhão de norte-americanos, com mais da metade ocorrendo após trauma e, no Brasil, poucos estudos avaliaram a epidemiologia da LM, porém estima-se que haja uma incidência de 16 a 26 por milhão por ano, sendo as principais causas acidentes automobilísticos e ferimentos por arma de fogo (FAF), advindo de atos de violência (Rouanet *et al.*, 2017), sendo a disfunção locomotora o sintoma mais reconhecível da SCI e é acompanhada por outras consequências médicas que se desenvolvem nesta população (Sezer *et al.*, 2015).

As manifestações clínicas dependerão do nível e grau da lesão, que podem ser classificadas como completas ou não completas. Nas lesões completas, de forma aguda ou crônica, existe perda sensitiva e paralisia motora total abaixo do nível da lesão, tendo em vista a interrupção completa dos tratos nervosos. Em uma lesão incompleta, tem-se a preservação de grupos musculares e áreas sensitivas que não foram afetadas, que podem ser alvos do processo de reabilitação para melhora da qualidade de vida do paciente.

Estas lesões provocam déficits sensoriais, motores e autonômicos, com mudanças estruturais, bioquímicas e fisiológicas (Houle e Côté, 2013; Jiang *et al.*, 2021) que comprometem a performance funcional e geram grande impacto na expectativa de vida destes indivíduos (Reier, 2004; Hagg e Oudega, 2006; Jiang *et al.*, 2021). Apesar dos avanços em cuidados médicos intensivos, procedimentos cirúrgicos e técnicas de reabilitação, os indivíduos afetados ainda experimentam déficits neurológicos substanciais. Eles também

possuem um maior risco de apresentar complicações cardiovasculares, trombose venosa profunda, osteoporose, infecção urinária de repetição, lesão por pressão, disreflexia autonômica e dor neuropática (Priebe *et al.*, 2007; Eli *et al.*, 2021).

1.2 Arquitetura da medula espinal

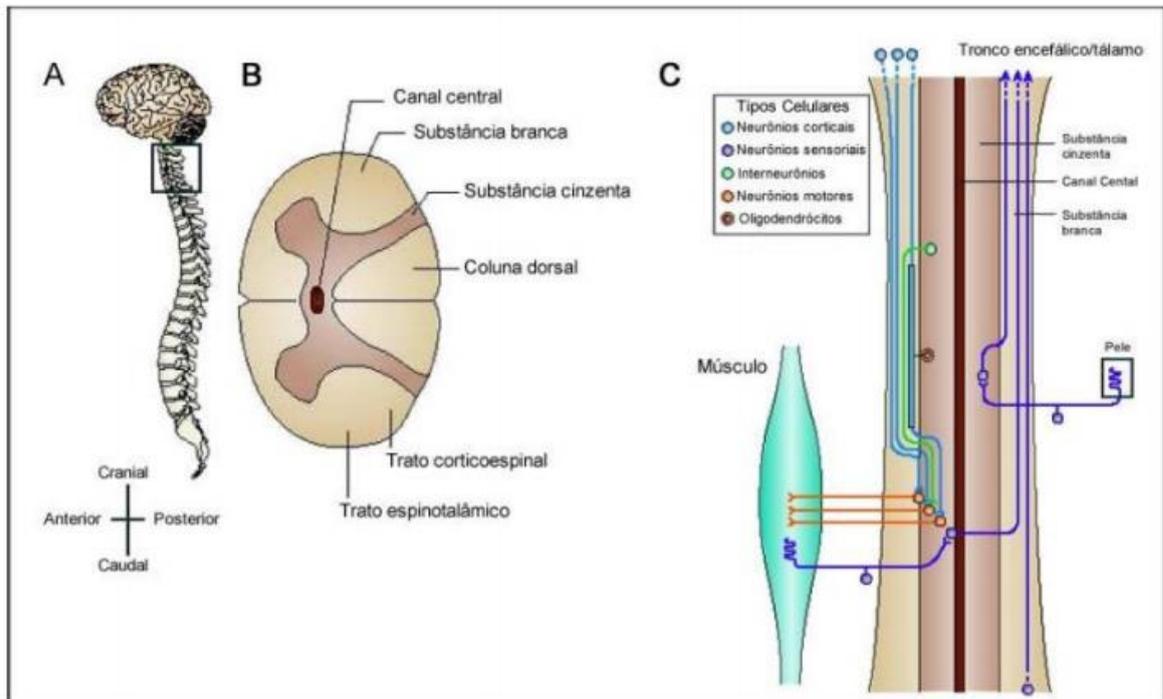
A Medula Espinal (ME) é um dos componentes do sistema nervoso central (SNC) e a principal estrutura afetada na lesão medular traumática. Está localizada dentro da coluna vertebral, seu limite superior é o bulbo do tronco encefálico e apesar de sua estrutura finalizar na altura da segunda vértebra lombar (L2) no indivíduo adulto, com um comprimento aproximado de 40-45cm, é conectada pelo seu limite caudal (cone medular, meninges e fáschia) ao sacro por onde se projetam as raízes dos segmentos equivalentes (Martinez *et al.*, 2014). Nela residem todos os neurônios motores que inervam os músculos e também os neurônios eferentes autonômicos. Recebe também toda a informação sensitiva do corpo e alguma da cabeça, além de atuar no processamento inicial da informação de todos estes estímulos sensitivos.

A ME é anatomicamente segmentada, ou seja, cada porção da ME que dá origem a um nervo espinal constitui um segmento (Martinez *et al.*, 2014). Existem 31 segmentos (Figura 1A) – 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 coccígeo. No entanto, esta segmentação não é visível, e toda a estrutura apresenta-se como um contínuo longitudinal com dois alargamentos (intumescência cervical C5-T1 e intumescência lombosacra L2-S3) e uma terminação caudal (cone medular) (Machado *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2014; Ahuja *et al.*, 2017).

Em corte transversal, a ME (Figura 1B) é organizada com a substância cinzenta no centro, com formato de borboleta formando o H medular, constituída principalmente por corpos neuronais, e com a substância branca ao redor, composta por fibras mielinizadas que formam as vias ascendentes e descendentes da ME, e se projetam para regiões específicas no encéfalo e na periferia. Na substância branca existem fibras nervosas, sendo a maior parte mielínicas, dispostas paralelamente ao eixo longitudinal da medula. Essas fibras originam-se tanto da medula e projetam para o encéfalo (fibras ascendentes) quanto o inverso (do encéfalo para a medula), chamadas de fibras descendentes, que, portanto, formarão os tratos (Figura 1C). Na parte superior da medula, observamos o corno dorsal, e na parte inferior, o corno ventral. Na região central da substância cinzenta está o canal medular, também chamado de

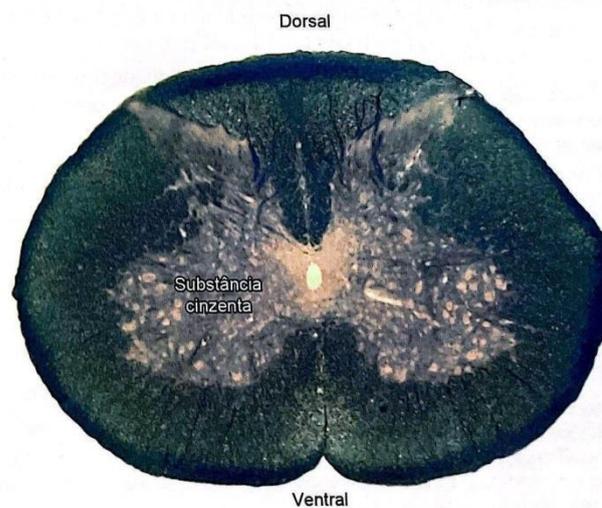
canal endimário, revestido pelas células endimárias (Figura 2). Em ambas as regiões, encontramos ainda as células gliais e células da microglia (Thuret *et al.*, 2006).

Figura 1 - Esquema da medula espinal intacta.



Visão transversal, além de suas conexões (tratos) que se direcionam aos centros superiores (a) e (b) e sistema nervoso periférico (SNP), e a visão sagital (c). Fonte: Adaptado de Ahuja *et al.*, 2017.

Figura 2 - Fotomicrografia de secção de medula espinal corada com Luxol Fast Blue.



Neste modelo, pode-se observar a substância cinzenta, formando o H medular, e a substância branca no entorno. Na parte superior, observamos o corno dorsal, e na parte inferior, o corno ventral. Fonte: Adaptado, Martinez *et*

al., 2014.

Após uma lesão traumática, a citoarquitetura da medula espinal é seriamente modificada, devido ao rompimento dos tratos axonais, o que gera uma desconexão entre o SNC e seus órgãos alvos, levando, a eventos destrutivos sequenciais, com degeneração progressiva, alteração da resposta reflexa e comprometimento sensitivo motor abaixo do segmento lesado.

1.3 Fase aguda e crônica da lesão medular traumática

No aspecto clínico, os danos e a recuperação após trauma agudo do sistema nervoso central (SNC) incluem 3 fases características. A fase aguda, a fase intermediária ou sub-aguda, com estágios iniciais entre 24-72 horas após lesão, e a fase crônica da lesão, descrita em humanos após aproximadamente 60 dias de lesão e em animais, após 4 semanas de lesão (Houle e Tessler, 2003; Hagg e Oudega, 2006; Schwab *et al.*, 2006).

Em lesões medulares, a fase aguda, iniciada imediatamente após o impacto mecânico, é caracterizada clinicamente pelo estado de choque medular, que é descrito como a perda transitória imediata da atividade reflexa abaixo do nível da lesão e a completa ausência de resposta aos estímulos nociceptivos na pele, além de alterações esfínterianas e termorregulatórias, bem como, neuropatologicamente, pelo aumento no volume do tecido lesado (edema) e inflamação, causado por um conjunto de processos patológicos referidos como injúria secundária à lesão (Tator e Fehlings, 1991; de Almeida *et al.*, 2023). Qualquer resposta reflexa dos membros, por menor que seja, em resposta ao estímulo da pele é considerado um sinal de recuperação do choque medular e o início da evolução para a próxima fase (Tator e Fehlings, 1991; Claxton *et al.*, 1998; Yue *et al.*, 2019). O termo lesão secundária descreve os danos causados pelas mudanças subsequentes no meio extracelular, e é usado para distinguir dos danos causados pela lesão primária, descrita como o impacto mecânico original (Sekhon e Fehlings, 2001; Zipser *et al.*, 2022).

A fase sub-aguda, com até 2 semanas após lesão é considerada como um período com grande potencial para intervenção terapêutica (Coumans *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2022). Ela começa e se manifesta por características como apoptose neuronal, desmielinização axonal, degeneração Walleriana, remodelação axonal e formação de cicatriz glial, conforme mostrado em. A lesão secundária subaguda leva à fase de lesão secundária crônica da LME, caracterizada pela formação de cavidade cística, morte axonal e maturação da cicatriz glial (Anjum *et al.*, 2020)

A partir da fase crônica, há a formação de cicatriz glial, que é um mecanismo celular reativo que é facilitado pelos astrócitos e ocorre durante a fase secundária crônica da LME. A cicatrização dos astrócitos (astrogliose) é o processo natural do corpo que protege e inicia a cura pós-LME (Zipser *et al.*, 2022). Os astrócitos são um componente importante do sistema nervoso, sensíveis às mudanças como alteração na expressão gênica, hipertrofia e excitações. Os outros principais constituintes do tecido cicatricial são os pericitos e os tecidos conjuntivos. Na fisiologia normal, o número de astrócitos é 10 vezes maior no parênquima da medula espinal do que o de pericitos. No entanto, 2 semanas após a lesão, os pericitos são o dobro do número de astrócitos. Os pericitos secretam marcadores específicos que promovem os fibroblastos a expressar matriz extracelular, como a fibronectina, que serve como o principal componente dos tecidos conjuntivos cicatriciais (Anjum *et al.*, 2020)

1.4 Fisiopatologia da lesão medular traumática: eventos primários e secundários da lesão

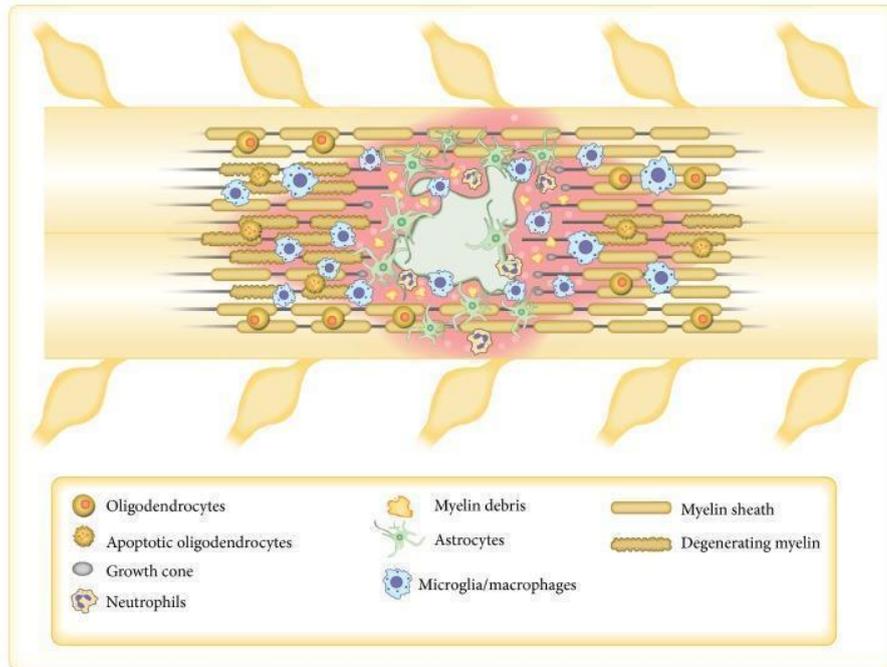
A fisiopatologia da lesão medular é um processo que se desenvolve em duas etapas, apresentando mecanismos primários e secundários à lesão (Hagg e Oudega, 2006; Rouanet *et al.*, 2017; Sterner *et al.*, 2023). A lesão primária é causada pelo dano mecânico no momento da lesão e pela privação de energia. Estes eventos resultam na ruptura dos tratos ascendentes e descendentes e morte celular acima e abaixo do sítio da lesão, prejudicando as funções motoras, sensitivas e autonômicas (Li *et al.*, 2022).

A lesão secundária envolve uma cascata de eventos biológicos e celulares que são rapidamente instigados em resposta à lesão primária, a fim de controlar a homeostase e minimizar os danos. De forma paradoxal, esta etapa é amplamente responsável por exacerbar o dano inicial e gerar um ambiente inibitório que bloqueia os esforços endógenos de reparo, regeneração e remielinização, com evolução da degeneração Walleriana (Ronsynet *et al.*, 2008, Fehlings e Vawda, 2011).

Os processos secundários de lesão incluem: inflamação, isquemia, peroxidação lipídica, produção de radicais livres, desregulação de canais iônicos, desmielinização, astrogliose, formação de cicatriz glial, processo degenerativo, necrose, apoptose e ativação glial (Fehlings e Vawda, 2011; Mietto *et al.*, 2015) (Figura 3). Estes processos degenerativos secundários ampliam a área primária de lesão em direção rostral e caudal (Hagg e Oudega, 2006; Ronsyn *et al.*, 2008; Mietto *et al.*, 2015), aumentam a gravidade da lesão por acentuar os déficits neurológicos, sensoriais, motores e autonômicos, com mudanças estruturais,

bioquímicas e fisiológicas (Houle e Côté, 2013; Jung *et al.*, 2016) e agravam o quadro funcional dependendo da sua magnitude.

Figura 3 - Representação esquemática do local da lesão medular.



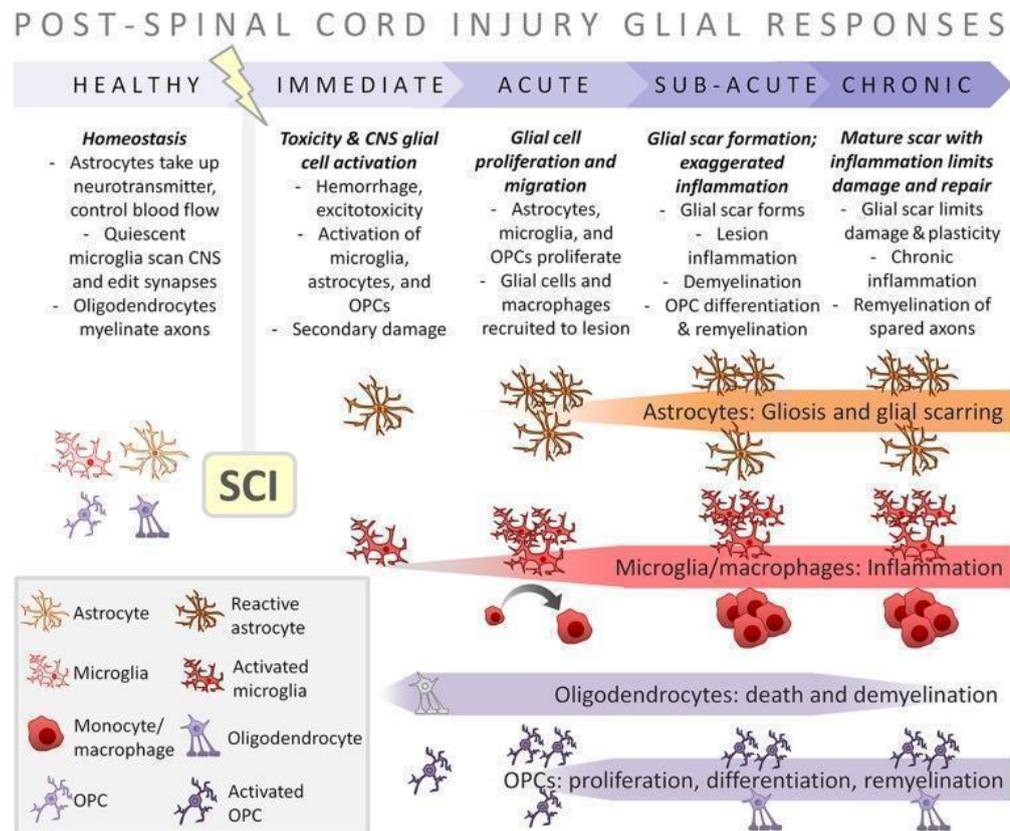
O insulto à medula espinhal gera imediatamente uma forte área hemorrágica seguida pela ativação das células gliais. Concomitante, os axônios que sofrem degeneração e os corpos celulares neuronais mortos provocam o recrutamento de células inflamatórias da periferia. Os neutrófilos, primeiras células inflamatórias a alcançar o parênquima tecidual, secretam moléculas que podem exacerbar o dano tecidual e vascular. Ao longo da lesão, os monócitos infiltram-se na medula espinhal, onde se transformam em macrófagos, persistindo de dias a meses no local da lesão e contribuindo assim para o processo degenerativo ou regenerativo. Além dos eventos inflamatórios, os neurônios poupados iniciam a maquinaria regenerativa, favorecendo a formação da cicatriz glial. Fonte: Adaptado, Mietto *et al.*, 2015.

1.5 Microambiente da lesão medular: resposta inflamatória pós lesão

A resposta do sistema imune que se segue a uma LME tem sido foco de estudos nos últimos anos e sabe-se que a inflamação exerce um efeito importante no progresso da degeneração e regeneração após uma lesão traumática, dependendo da fase. Após a injúria, há a quebra da barreira hematomedular e a ruptura dos vasos sanguíneos, causando hemorragia, que promovem aumento da expressão de moléculas de adesão de leucócitos na superfície das células endoteliais e ao aumento de proteínas plasmáticas para o parênquima do tecido lesionado, incluindo citocinas pró e anti-inflamatórias, devido ao intenso processo inflamatório ocasionado por neutrófilos, microglia reativa, macrófagos e astrócitos, além dos oligodendrócitos e OPCs, desde a fase aguda até a crônica (Gaudet *et al.*, 2018). Seguindo,

haverá proliferação glial e migração especificamente para o sítio da lesão, na fase aguda; formação da cicatriz glial e exagerada inflamação, na fase subaguda, se fazendo uma importante fase de intervenção terapêutica; e maturação da cicatriz glial (com maior componente fibrótico e maior conteúdo de células gliais) e reparo, na fase crônica (Figura 4). Essa atividade inflamatória, de acordo com cada fase, proporciona mudanças no microambiente medular que influenciam na expressão de proteínas locais, responsáveis por diferentes eventos celulares, tais como, neuroproteção, proliferação e maturação de células precursoras neuronais, regeneração axonal e remielinização (Yong *et al.*, 2019; Sterner *et al.*, 2023).

Figura 4 - Dinâmica temporal da ativação de células gliais induzida pós-lesão.



Inicialmente, no tecido saudável do SNC, astrócitos, microglia e oligodendrócitos/OPCs têm papéis fundamentais na manutenção da homeostase. Imediatamente após a lesão medular, os astrócitos, a microglia e os OPCs são ativados: eles proliferam, secretam citocinas e contribuem para danos secundários. Em tempos agudos pós-lesão, células imunes hematogênicas, incluindo macrófagos, são recrutadas para o local da lesão. Além disso, astrócitos, microglia e outras células gliais migram em direção ao local da lesão e forma-se a cicatriz glial. Em tempos subagudos a crônicos pós-LME, a cicatriz glial amadurece e impede a plasticidade do axônio. Em contrapartida, a cicatriz glial é fundamental para a não expansão, rostral e caudal, da lesão provocada pela inflamação. Os oligodendrócitos em zonas de perilesão são suscetíveis à citotoxicidade, mas a sua morte é parcialmente compensada pela proliferação, diferenciação e remielinização de OPC. A diferenciação e a remielinização pelos OPCs podem prosseguir em tempos crônicos pós-LME. Fonte: Adaptado, Gaudet *et al.*, 2018.

No entanto, os mecanismos exatos da sinalização e ação das proteínas envolvidas durante o dano secundário, inflamação, recrutamento e polarização da micróglia, ativação de astrócitos e cicatrização glial, remielinização ou crescimento e plasticidade axonal ainda precisam ser melhor explorados (Cizcova *et al.*, 2014). Há poucos estudos que investigam a expressão proteica diante do cenário desfavorável dos eventos pós lesão e seu microambiente hostil a regeneração, uma vez que há a exarcebação da inflamação e não evolução para a fase resolutive, os quais comprometem a performance funcional e gera uma resposta de regeneração não efetiva são de extrema relevância (Mieto *et al.*, 2015; DiSabato *et al.*, 2016; Sterner *et al.*, 2023).

Dentro do contexto inflamatório pós-LME, as principais proteínas que podem induzir as respostas em relação ao microambiente hostil após lesão medular traumática são as citocinas. Essas moléculas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis, produzidas por diversos tipos celulares no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK); e atuam especialmente por mecanismos parácrino e autócrino (Sommer *et al.*, 2010), de forma pleiotrópica. As diferentes citocinas podem desencadear ações semelhantes; e com frequência, são formadas em cascata, com uma citocina estimulando suas células-alvo a produzir mais citocinas, a partir da modulação da transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem influenciar a resposta inflamatória aumentando-a (citocinas pró-inflamatórias) ou atenuando-a (citocinas anti-inflamatórias) (Sommer *et al.*, 2010; Sterner *et al.*, 2023).

As citocinas podem ter ações pró-inflamatórias, modulando o perfil M1 da microglia, ou anti-inflamatórias, modulando o perfil M2 da microglia, de acordo com o microambiente no qual estão localizadas (Sommer *et al.*, 2010). Entre as principais citocinas pró-inflamatórias no microambiente pós-lesão, podemos citar as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral); e dentre as anti-inflamatórias são as IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β (Fator de crescimento transformador β) e FTG β (fator transformador de crescimento β). No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (Lee *et al.*, 2014).

As primeiras citocinas formadas após lesão tecidual são IL-1 β , produzida pela microglia e macrófagos derivados da periferia, e TNF α , produzido pela microglia, macrófagos derivados da periferia, monócitos e astrócitos (Hellenbrand *et al.*, 2021), as quais atuam

diretamente sobre receptores específicos dos neurônios sensitivos e levam à síntese “em cascata” de outros efetores, como outras citocinas, quimiocinas, neurotrofinas, óxido nítrico, cininas, lipídeos, trifosfato de adenosina (ATP) e membros da via de complemento. Esses elementos, por sua vez causam proliferação e hipertrofia das células gliais do SNC, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias relevantes como TNF α , IL-1 β e IL-6, sendo essa última também de alta importância na cinética da fisiopatologia da lesão medular traumática, sendo liberada por astrócitos e microglia (Obata *et al.*, 2006; Hellenbrand *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021).

Após a injúria, às células gliais peri-lesionais, como microglia e astrócitos, alteram seus fenótipos e atividades, em resposta ao microambiente inflamatório, com liberação de citocinas pró-inflamatórias para regulação da inflamação. Na inflamação subaguda, células da glia passam a responder e atuar com maior intensidade aos estímulos em que estão submetidas, os restos de tecido necrótico de detritos celulares são eliminados, há orientação para reorganização do ambiente com revascularização, formação de novos vasos por meio da secreção de VEGF (do inglês Fator de Crescimento derivado do Endotélio Vascular), resolução do edema e reparação da barreira hematomedular (Norenberg *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2021). Acredita-se que a IL-10 tenha a função de inibir a liberação de fatores pró-inflamatórios e diminuir a resposta inflamatória. E adicionalmente, as citocinas TGF- β 1 (Fator de transformação de crescimento β 1) (liberadas por linfócitos, macrófagos e células dendríticas), IL-10 (monócitos, células T, B e dendríticas) e IL-13 (produzidas por células T e células dendríticas, além de estar envolvido na produção do TGF- β 1), desempenham papéis na inibição do desenvolvimento e progressão da inflamação (Junttila *et al.*, 2018; Hellenbrand *et al.*, 2021).

Em relação às células gliais, a atividade dos astrócitos, em uma situação fisiológica, regula a disponibilidade de neurotransmissores e fluxo sanguíneo, já em situação após lesão, tornam-se reativos, formando uma cicatriz glial que limita a expansão da lesão e regeneração de axônios. A microglia, na medula saudável, realiza varredura de patógenos e controle da densidade das sinapses; e após SCI acentua a função fagocítica e pode promover plasticidade. Enquanto OPC e oligodendrócitos em microambiente normal saudável mantêm efetiva condução axonal através de mielinização e suporte trófico, após injúria, tentam proliferar e remielinizar os axônios danificados. Desta forma, o microambiente de resposta à injúria solicita respostas reparativas de todos os tipos de célula glial (Mietto *et al.*, 2015; Sterner *et al.*, 2023).

Essas respostas mudam com o tempo e são definidas pela localização espacial relativa à lesão (Gaudet *et al.*, 2018; Pang *et al.*, 2021). Após SCI, a glia, como microglia e astrócitos, secreta toxinas e citocinas em resposta ao dano mecânico influenciando diretamente na modulação inflamatória. Os astrócitos, embora não sejam células imunes, demonstraram desempenhar um papel crucial nas respostas imunes inatas e adaptativas pós-lesão do SNC (Colombo *et al.*, 2016). Estudos documentaram que IL-1 β localmente aumentado pode mediar a síntese de MCP-1, KC e MIP-2 através da ativação da sinalização MyD88/IL-1R1 em astrócitos, e essas quimiocinas podem resultar na infiltração de neutrófilos e monócitos, assim desencadeando neuroinflamação no local da lesão (Pinear *et al.*, 2010; DiSabato *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020).

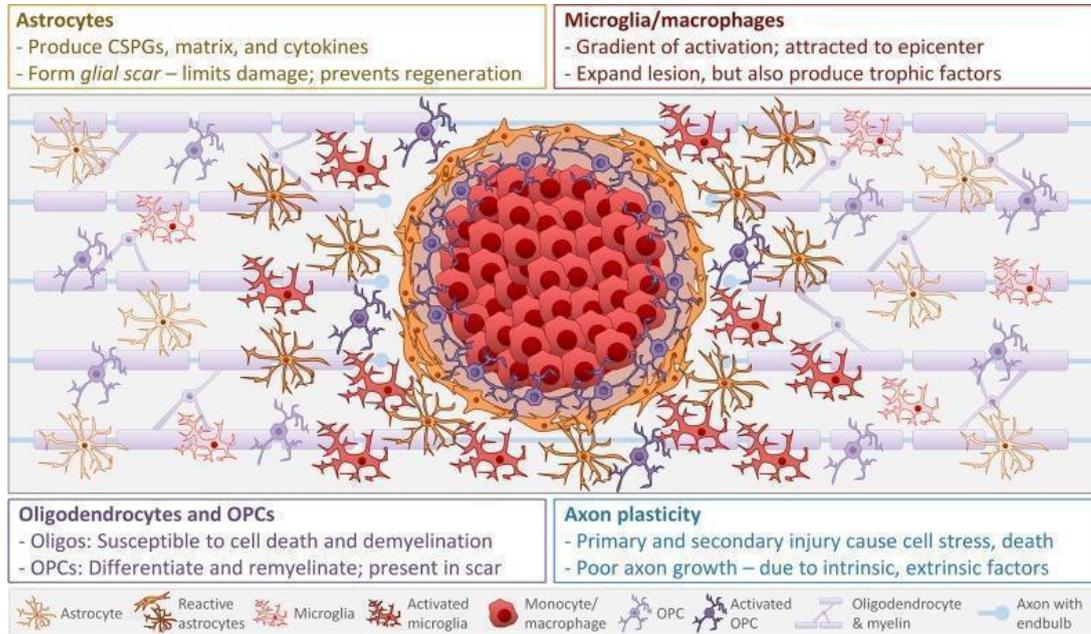
Além disso, após a lesão do SNC, os astrócitos ativados expressam e secretam uma ampla gama de moléculas, incluindo quimiocinas, citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e óxido nítrico, que juntos criam um microambiente pró-inflamatório. No entanto, astrócitos inibidos na sinalização de NF- κ B reduziram significativamente a expressão de genes pró-inflamatórios e de estresse oxidativo, exercendo assim um efeito neuroprotetor (Dvotiantchikova *et al.*, 2009, Garcia *et al.*, 2016; Hellenbrand *et al.*, 2021).

Para elucidar o comportamento dessas citocinas, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é uma técnica consolidada que pode ser usada para esclarecer mecanismos da neuroinflamação, sendo ele um dos ensaios mais específicos e sensíveis para detecção de biomoléculas em pesquisas (Tabatabaei e Ahmed, 2022). O estudo das citocinas requer ferramentas analíticas com alta seletividade, resolução e sensibilidade (Pomastowski; Buszewski, 2014), e ELISAs otimizados, que incluem várias etapas que são realizadas em sequência usando um protocolo definido, podem auxiliar nesta análise molecular (O'connor, 2015).

Os macrófagos são importantes células do sistema imunológico que participam na modulação do microambiente da lesão (Li *et al.*, 2020), podendo ser ativados após a lesão. Assim como os macrófagos derivados de monócitos, a micróglia também pode exibir um espectro fenotípico pró-inflamatório (denominado M1, secretando TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12) ou pró-reparo (denominado M2, secretando IL-10, IL-13). Após a lesão medular, ocorre inicialmente uma resposta mista M1/M2 (Kiergl *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2021). A liberação de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão ativa ainda mais células residentes, derivadas do sangue para fagocitar detritos (Gensel *et al.*, 2015) e afeta o fenótipo das outras células residentes próximas, tais como a micróglia. Coletivamente, a SCI desencadeia diversas ativações gliais e recrutamento celular com efeitos complexos na função neuronal (Figura 5),

os quais também podem ser influenciados pelo exercício físico.

Figura 5 - Dinâmica espacial da ativação de células gliais induzida por SCI.



Em tempos subagudos a crônicos pós-LM, as respostas das células gliais se estabilizaram para limitar danos adicionais e a plasticidade do axônio. As células gliais formam um gradiente de ativação, com pico de ativação no epicentro ou próximo a ele. Os astrócitos (amarelo) tornam-se reativos, proliferam e contribuem para a cicatriz glial. Microglia e macrófagos (vermelho) tornam-se hiperativados por períodos prolongados e macrófagos hematogênicos são recrutados para o epicentro da lesão. A micróglia e os macrófagos exacerbam os danos secundários, mas os fatores derivados da micróglia/macrófagos também podem promover o crescimento e a remielinização dos axônios. Oligodendrócitos e células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) (roxo) são suscetíveis à citotoxicidade. Os OPCs podem diferenciar e remielinizar, mas também produzem fatores inibidores do crescimento e contribuem para a cicatriz glial. A presença de vários tipos de células gliais ativadas destaca a importância de compreender as reações e interações das células gliais pós-SCI. Fonte: Adaptado, Gaudet *et al.*, 2018.

1.6 Realidade terapêutica: reabilitação física

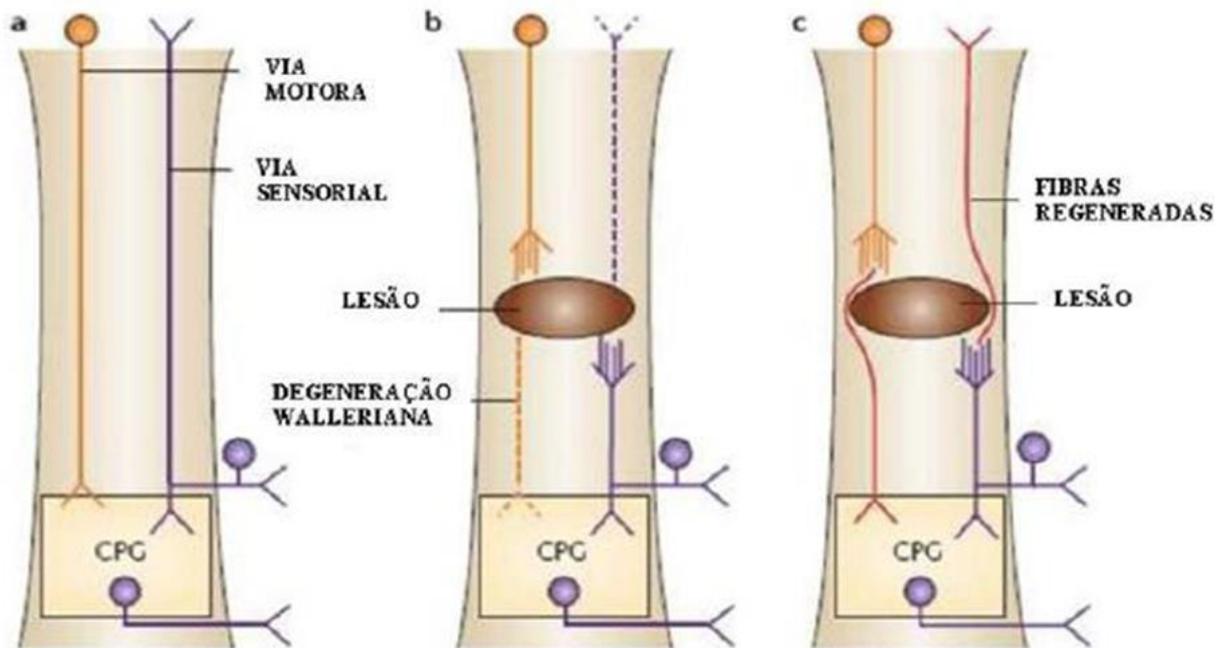
Diante da lesão medular e toda a sua complexidade fisiopatológica, algumas terapias são utilizadas na clínica para melhoria da sintomatologia do quadro. As pesquisas atuais demonstram que hoje em dia, as pessoas com LME vivem mais e alcançam maior independência funcional como resultado da melhora no manejo médico, da reabilitação, tecnológico e farmacológico da LME (Gólmara-Toldrà *et al.*, 2014). Atualmente, a reabilitação física é uma das poucas realidades terapêuticas regularmente estabelecidas em humanos após lesão medular. Este tratamento visa aprimorar a função e minimizar problemas sistêmicos (Hagg e Oudega, 2006; Duan *et al.*, 2021; Sutor *et al.*, 2022). A atividade física melhora diretamente as condições de atrofia muscular e contraturas articulares, que são comuns após este tipo de lesão e limitam a amplitude de movimento, afetam a força e a resistência muscular

e também diminuem a possibilidade de execução adequada da ação, funcionando como um fator limitante à performance motora per si (Moriyama *et al.*, 2006; Cobiauchi *et al.*, 2017).

Sendo assim, a prática regular de exercício melhora a função sensorial e motora em ratos e humanos (Hesse *et al.*, 1995; Skinner *et al.*, 1996; Harkema *et al.*, 1997; Trimble *et al.*, 1998; Hutchinson *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2016), além de preservar massa muscular e a função do motoneurônio (Beaumont *et al.*, 2004; Gazula *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2021). Estes efeitos benéficos podem ser atribuídos ao aumento nos níveis de neurotrofinas, tais como, NT-3 e NT-4 (do inglês neurotrophin 3 e neurotrophin 4) na medula espinal e músculo esquelético de ratos exercitados (Gómez-Pinilla *et al.*, 2002; Dupont-Versteegden *et al.*, 2004; Cobiauchi *et al.*, 2017).

A corrida em esteira ergométrica é geralmente selecionada devido às maiores respostas do metabolismo aeróbio, pois o treinamento de intensidade controlada em esteira induz alguns dos maiores e mais consistentes efeitos do treinamento físico (Kemi *et al.*, 2002; Massoto *et al.*, 2020). Estudos apontam que o treino locomotor em humanos, com lesão medular neurologicamente incompleta, aumenta a habilidade para andar na esteira motorizada com aparato para suporte de peso (Thuret *et al.*, 2006) e proporciona regeneração neuronal após lesão nervosa central (Liao *et al.*, 2017). Acredita-se que isto ocorra porque, após lesão medular, a repetição dos estímulos oriundos da pele, músculos e articulações promovidas pelo exercício, podem ativar a circuitaria do gerador central de padrão da marcha (CPG, do inglês central pattern generator) e impulsionar a plasticidade dessa circuitaria, presente na medula lombosacra (Figura 6, Collazon-Castro *et al.*, 2006); Kondratskaya *et al.*; 2019).

Figura 6 - Plasticidade após lesão e o CPG.



Tratos ascendentes e descendentes normais, conectando centros corticais com centros medulares e regiões periféricas (a). Quando lesados, o segmento distal destes tratos sofre degeneração Walleriana e o segmento proximal não regenera plenamente, falhando na reconexão com seus alvos (b). Por isso, informações ascendentes (sensitivas) não alcançam os centros supraespinais e as descendentes (motoras e autonômicas) são desconectadas da circuitaria caudal espinal, incluindo o CPG, o qual é responsável pela função locomotora coordenada. Muitas das pesquisas em lesão medular focam na possibilidade de induzir estas vias de projeção lesadas a regenerar e formar a circuitaria original com o arranjo normal, como ilustrado em (c) Axônios regenerando estão em vermelho. Fonte: Thuret, 2006.

Além disso, o exercício está relacionado à mediação da resposta inflamatória, através da modulação das citocinas, pela regulação de células gliais como microglia e astrócitos, necessárias por conduzir a inflamação aos locais de sítio de lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da lesão e, portanto, sendo uma importante chave para estudo no que tange a regeneração axonal e plasticidade (Mu *et al.*, 2022; Choi *et al.*, 2024).

O mecanismo pelo qual a reabilitação física melhora a função, principalmente com foco na modulação do microambiente, em humanos, após lesão, precisa ser melhor entendido, para também ser adequadamente controlado e explorado terapêuticamente em humanos. Portanto, experimentações criteriosas e padronizadas em modelos de lesão experimental são extremamente importantes para testar a efetividade dos diferentes paradigmas em relação ao incremento da plasticidade nervosa, reorganização da circuitaria medular, resgate da junção neuromuscular e função muscular, além de auxiliar a testar abordagens das terapias para a reabilitação (Trimble *et al.*, 1998; Edgerton *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2016; Cobia *et al.*,

2017). Esta investigação é experimental e relevante, pois há relatos na literatura de plasticidade com resultados negativos na atividade física precoce após a lesão medular, tais como alodinia, relacionados com a via de sinalização do BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) (Endo *et al.*, 2009; Sayyah *et al.*, 2022), bem como sinais negativos relacionados à intensidade e carga do exercício após lesão (Ilha *et al.*, 2008; Ilha *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2023).

Nosso grupo definiu, em trabalhos anteriores (Massoto *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2024), um protocolo de exercício que procurou correlacionar os benefícios do exercício com a fase clínica pós-lesão, tanto em termos de frequência (3x/semana), quanto de intensidade do exercício (treino por 10 minutos, descanso de 10 minutos, e retorno do treino por mais 10 minutos, até o meio da sobrevida. Após, treinamento de 10 minutos, até o fim da sobrevida). Este protocolo mostrou-se válido para estimular um bom retorno funcional.

Portanto, neste trabalho, pretendemos avaliar o efeito de um protocolo pré-estabelecido de exercício com esteira ergométrica, iniciado na fase aguda até o período crônico, visando a modulação do microambiente após lesão medular em camundongos, a regeneração nervosa na medula espinal, a reorganização neuromuscular e o retorno das funções sensitivo-motoras.

2. Objetivo geral

Avaliar a influência de um protocolo específico de exercício na esteira ergométrica na modulação do microambiente inflamatório da lesão, neuroplasticidade e recuperação sensório-motora, após lesão medular compressiva em camundongos.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a recuperação sensório-motora induzida pelo exercício após SCI, através das análises por testes funcionais sensitivo-motor e eletrofisiológico.
- Avaliar a plasticidade neuromuscular induzida pelo exercício após SCI, a partir da análise da junção neuromuscular e atrofia muscular, por microscopia óptica.
- Avaliar a modulação do microambiente inflamatório a partir da avaliação de citocinas, através do ensaio de ELISA; perfil de celularidade inflamatória, por imunohistoquímica e resposta inflamatória sistêmica, por meio da análise da parede da bexiga.
- Avaliar a influência do exercício na regeneração nervosa, análises morfológicas e morfométricas.

- Avaliar a influência do exercício na plasticidade e sobrevivência celular na medula espinal, através da microtomografia e microscopia eletrônica de varredura.

3. Metodologia

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6, fêmeas, adultas jovens dentre 8-12 semanas, submetidas ao procedimento cirúrgico para promover a lesão medular, sob efeito de anestesia profunda. O uso de fêmeas visou diminuir lesões externas, como poderia ocorrer no saco escrotal no macho, devido à perda de movimento das patas traseiras. Esta lesão implica em grande comprometimento locomotor para o animal, e a gravidade da limitação funcional está diretamente relacionada com as alterações estruturais secundárias ao procedimento cirúrgico. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central de Camundongos do CCS, da UFRJ, e, posteriormente, foram mantidos em biotério do próprio laboratório, com livre oferta de ração e água, além da regulação do ciclo claro/escuro. Todos os procedimentos e manuseio dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação Científica da UFRJ (CEUA/UFRJ, protocolo número 01200.001568/2013-87).

3.2 Procedimento cirúrgico

Fêmeas C57Bl/6 adultas jovens foram anestesiadas com solução de ketamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg), por via intraperitoneal (ip). Realizou-se a tricotomia e assepsia da região dorsal com água e álcool a 70% e uma incisão na linha média. A musculatura foi divulsionada até visualizar a coluna vertebral de T8 a T10. A laminectomia foi feita ao nível de T9 e a lesão medular por compressão extradural realizada utilizando um clip vascular com 30g de força de oclusão, por 10 segundos (Kent Scientific Corporation, código INS14120, EUA) para promover uma lesão moderada (Figura 7). Após a cirurgia, administramos antibiótico tópico na incisão da pele e infusão subcutânea de soro fisiológico 0,9% (1ml), acrescido de antibiótico sistêmico profilático (Flotril, 2,5 mg/Kg/d, por via subcutânea, Bayer). Manobras de esvaziamento da bexiga foram executadas, duas vezes ao dia, até retorno do controle da função vesical. Animais SHAM foram submetidos à laminectomia sem, contudo, sofrerem lesão medular. O retorno da função vesical foi monitorado, pelo registro diário até pleno esvaziamento espontâneo.

Figura 7 - Foto do procedimento cirúrgico com o modelo de lesão adaptado de 30g por 10 segundos.



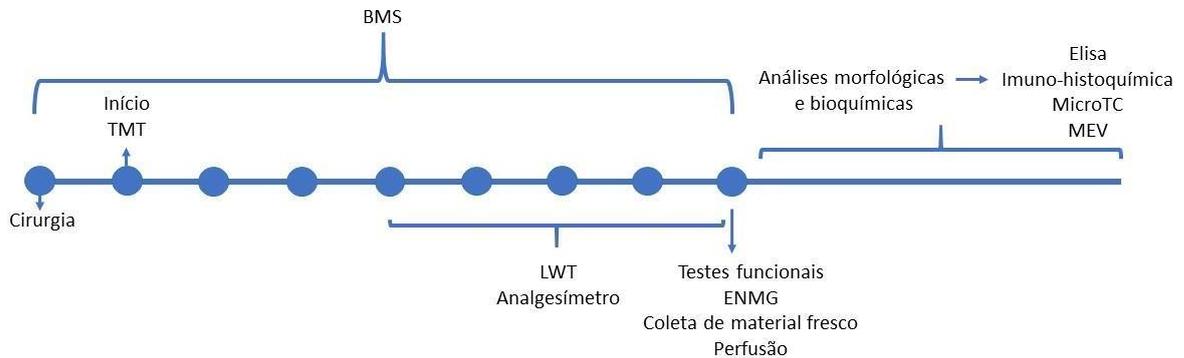
Em (a), podemos ver a medula espinal exposta, em (b) o momento da compressão extradural com o clipe e em (c) vemos a lesão compressiva após a retirada do clipe, mostrando anel hemorrágico evidente. Fonte: Massoto *et al.*, 2020.

3.3 Grupos experimentais

Antes da cirurgia, os animais foram adaptados por 1 semana às tarefas a serem executadas. Os grupos foram formados por animais escolhidos aleatoriamente, distribuídos nos seguintes grupos: SHAM, apenas sofreu a laminectomia; SCI, grupo submetido ao procedimento de laminectomia e lesão; e TMT, grupo submetido ao procedimento de laminectomia, lesão e tratamento, conforme o protocolo proposto.

O treino no grupo TMT iniciou o protocolo de exercício em esteira ergométrica 7 dias após SCI, na frequência de 3 vezes na semana (Massoto *et al.*, 2020), e duração de 20 minutos, divididos em 2 ciclos de 10 minutos, com intervalo de 10 minutos entre eles, até o dia 28 após lesão (Santos *et al.*, 2024). Após esse prazo, o grupo foi submetido a um protocolo de treino de apenas 10 minutos, 3 vezes por semana, até o fim da sobrevivência (56 dias). A velocidade da esteira foi adaptada de forma gradativa de acordo com o estado do animal, variando de 6 a 12 m/min, conforme preconizado na literatura (Courtine *et al.*, 2008), conforme esquema do desenho experimental na Figura 8.

Figura 8 - Desenho experimental do trabalho.



Esquema experimental do trabalho, com disposição dos testes e experimentos realizados ao longo e no fim da sobrevivência. Cada ponto representa uma semana de sobrevivência animal. Fonte: A autora, 2024.

3.4. Avaliação funcional

Realizamos, em todos os grupos experimentais, avaliações semanais da função sensorial e motora a fim de graduar o distúrbio sensitivo-motor nestes animais e avaliar o desempenho da performance funcional. Todas as análises foram feitas de forma cega, a fim de não gerar comprometimento nas avaliações. Os animais foram adaptados ao ambiente de todos os testes antes da lesão e os valores de normalidade do animal são obtidos antes da cirurgia, e após plena adaptação. Utilizamos para isso os seguintes testes: teste de Alodinia Mecânica (Von Frey eletrônico), Escala Basso para avaliação locomotora (BMS), Teste de Caminhada em Escada Horizontal (LWT) e eletroneuromiografia (ENMG). Os testes estão brevemente descritos abaixo:

3.4.1 Escala Basso para avaliação locomotora (BMS)

A BMS provê uma indicação grosseira da habilidade locomotora e determina as fases de recuperação locomotora (quadro 2 - inicial, intermediária e final) e características desta locomoção. É uma escala de 9 pontos, onde 9 é o valor de normalidade e 0 indica plegia. Essa escala analisa 7 categorias funcionais, descritas abaixo:

- Movimento articular na articulação do tornozelo;
- Posicionamento das patas posteriores e suporte de peso;
- Passos;
- Coordenação entre patas traseiras e dianteiras;

- Posicionamento da pata durante o deslocamento;
- Estabilidade de tronco;
- Posicionamento da cauda.

Os animais foram observados durante 4 minutos, no labirinto de campo aberto, para registro do seu comportamento locomotor levando em consideração as 7 categorias descritas acima, e a qualidade e duração dos eventos positivos e negativos apresentados, conforme Basso e colaboradores (2006).

O escore individual é obtido a partir da análise dos animais (ver quadro 2) e foi registrado como a média por animal (patas direita e esquerda) para obtermos um escore do BMS para cada camundongo e, então, a média do grupo foi calculada, em cada tempo analisado, para a análise estatística, sendo $n=5/\text{grupo}$.

Quadro 1 - Critérios para Escore da Escala BMS.

Fases da recuperação	Escore da BMS
Inicial	(0) nenhum movimento de tornozelo (1) movimento de tornozelo discreto (2) movimento de tornozelo amplo
Intermediária	(3) posicionamento plantar da pata com ou sem suporte de peso – OU – passos dorsais, ocasionais, freqüentes ou constante, sem nenhum passo plantar
Final	(4) Passos plantares ocasionais (5) Passos plantares, de freqüente a constante, sem nenhuma coordenação – OU - passos plantares, de freqüente a constante, com alguma coordenação, e a posição da pata rodada no contato inicial e ao ser levantada (6) Passos plantares, de freqüente a constante com alguma coordenação, e a posição da pata paralela no contato inicial – OU - passos plantares, de freqüente a constante, maior coordenação, e a posição da pata rodada no contato inicial e ao ser levantada (7) Passos plantares, de freqüente a constante com maior coordenação, e a posição da pata paralela no contato inicial e rodada ao ser levantada – OU - passos plantares, de freqüente a constante, maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada, com instabilidade de tronco severa (8) Passos plantares, de freqüente a constante com maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada e instabilidade de tronco moderada – OU - passos plantares, de freqüente a constante, maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada, com estabilidade de tronco normal e cauda abaixada ou oscilando nas posições abaixada e erguida (9) Passos plantares, de freqüente a constante com maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada e cauda sempre erguida

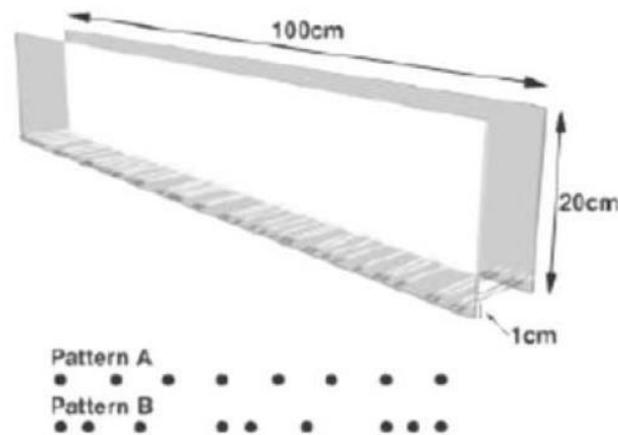
Fonte: Basso *et al.*, 2006.

3.4.3 Teste de caminhada em escada horizontal (LWT)

O teste de caminhada em escada descreve uma nova tarefa para avaliar caminhadas especializadas do rato e/ou camundongo para medir a coordenação da função das patas anteriores e posteriores ao mesmo tempo. Os camundongos foram estimulados a caminhar ao longo de uma escada horizontal no qual o espaçamento dos degraus é variável e é mudado

periodicamente. As alterações no espaçamento dos degraus impedem os animais da aprendizagem da localização absoluta e relativa dos degraus e assim minimiza a capacidade dos animais para compensar as dificuldades através da aprendizagem. Além disso, a alteração do espaçamento entre os degraus permite que o teste seja usado repetidamente em estudos a longo prazo (Figura 10), sem viés do aprendizado. Avaliaremos a quantidade de passos totais e dos passos corretos, a partir do 28º dia de sobrevivência, visto que antes não há presença de passos, $n=5/\text{grupo}$.

Figura 9 - Aparato do teste de caminhada em escada em uma vista fronto-lateral com as medidas específicas.



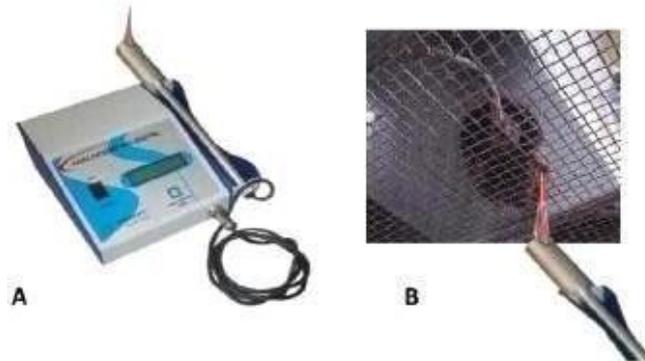
Em (a) e (b) a representação de dois padrões possíveis de organização do espaçamento dos degraus para realização do teste. Fonte: Metz e Whishaw, 2009.

3.4.3 Teste de alodinia mecânica (Von Frey eletrônico)

Avaliamos o limiar de retirada da pata, em gramas, pela indução de pressão gradativa, com o braço transdutor do analgesímetro digital (Insight® - Figura 10) acoplado ao pino sensor de 1,00 mm, sobre a superfície plantar das patas traseiras (Tena *et al.*, 2012). Os animais foram observados em sala silenciosa e com pouca iluminação, para evitar estresse e respostas alteradas. Durante o experimento, os animais ficaram contidos em pequenas gaiolas com assoalho de tela de arame através do qual se introduz o pino sensor na superfície plantar medial da pata. Haverá um período prévio para aclimação destes animais no novo ambiente de 15 minutos, após o qual o teste será realizado. O transdutor registra a pressão quando o animal retira a pata, ou seja, registra o limiar de retirada da pata (LRP) em gramas. Logo após a retirada

da pata pelo animal ocorre a manifestação de dor através da expressão conhecida como *Flick* (movimento vacilante da pata). Realizaremos três medidas para cada pata e será obtido a média por animal, a partir do 28º dia de sobrevivência, visto que antes não há diferença estatística entre os grupos, $n=5/\text{grupo}$.

Figura 10 - Analgesímetro digital para teste de sensibilidade mecânica (Von Frey).



O equipamento Analgesímetro digital (a). Execução do teste pela aplicação de uma força através de um pino encoberto com uma ponteira de polipropileno na extremidade do braço transdutor (b). Fonte: A autora, 2017.

3.4.4 Análise por eletroneuromiografia (ENMG)

A eletroneuromiografia é um procedimento que objetiva analisar a latência e a amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC). Utilizamos este recurso para o estudo do PAMC e para avaliar a integridade da condução do nervo e intensidade do recrutamento das fibras musculares. Por se tratar de um procedimento invasivo e com risco para o animal, este experimento será realizado no último dia de sobrevivência do animal, imediatamente antes da eutanásia por perfusão. Sob efeito de anestesia (Ketamina e xilazina intraperitoneal), foi realizado laminectomia ao nível de C0-C1, e estimulado esta área com o eletrodo de estimulação (estímulo de 10V).

O registro eletrofisiológico foi obtido no músculo gastrocnêmio com o eletrodo de captação. O eletrodo neutro (de aterramento) foi colocado na camada subcutânea da pele do animal. São feitos até 5 pulsos de estímulos elétricos com intervalo regulado e com intensidade de voltagem de 10V (Figura 11). Os registros foram captados no músculo gastrocnêmio e registrados em milivolts (mV). Os 3 grupos estudados (SHAM, SCI e TMT), foram avaliados neste procedimento, sendo $n=5/\text{grupo}$. O teste foi realizado no último dia de sobrevivência, visto o risco de morte animal, devido à invasão realizada para desenvolver o procedimento.

Figura 11 - Equipamento utilizado para o registro eletroneuromiográfico - Power Lab 4/35 (AD Instruments, Austrália).



O equipamento Power Lab (a). Em (b), visualização do software em vigência LabChart e o animal preparado para receber o estímulo. Em (c), animal com a medula espinal exposta na região cervical, com a inserção do eletrodo de estímulo e os eletrodos de captação (vermelho – músculo, sinalizado pela seta vermelha; e preto – tendão, sinalizado seta preta) e o de aterramento (verde – subcutâneo, sinalizado pela seta verde). Fonte: Dos Santos Ramalho *et al.*, 2018.

3.5 Preparo do material para microscopia óptica (MO)

Ao término do tempo de sobrevivência de cada grupo, os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg), por via intraperitoneal, e sacrificados por perfusão intracardíaca com paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7.4. As medulas espinais foram dissecadas ao nível das vértebras T8-T10, pós-fixadas na mesma solução utilizada para a perfusão e processadas para microscopia de luz (ML) por congelamento. Para isto, o material foi lavado em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, e posteriormente foi realizada a crioproteção em concentrações crescentes de sacarose (10 e 20%, 6 horas cada, e 30 % durante a noite). Logo após, o material foi incluído em OCT (Tissue-Tek) e submetido ao congelamento a -25° . Cortes transversais seriados no criostato (Leica, EUA), na espessura de 10 μ m, foram obtidos a partir destes blocos, (aproximadamente distância de 4mm de medula espinal, contendo a área da lesão e regiões acima e abaixo) e recolhidos em lâminas de vidro gelatinizadas, em total de 6 baterias com 8 lâminas. As lâminas referentes ao epicentro da lesão foram utilizadas para análise por imunofluorescência de diferentes marcadores celulares .

3.6 Preparo do material com protocolo de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os animais foram perfundidos com solução fixadora contendo paraformaldeído a 4%,

glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Após a perfusão, as medulas espinais foram dissecadas e deixadas na mesma solução fixadora fresca. Após 24 horas, esse material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% com ferricianeto de potássio e Cloreto de Cálcio em tampão cacodilato, desidratado em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 80, 90 e 100%) e incluídos em resina EPON. O material foi emblocado em resina EPON fresca e polimerizado por 48h na estufa (temperatura 60°C). Posteriormente, os blocos foram aparados para formar a pirâmide com base trapezoidal e cortados no ultramicrotomo (RMC) na espessura de 500 nm (cortes transversais semifinos), coletados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina (AT) e observados ao microscópio de luz. Os cortes semifinos foram utilizados para análises morfométricas, n=5/grupo.

3.7 Análise da atrofia muscular

3.7.1 Avaliação do peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio

Após a perfusão, 56 dias pós lesão, músculos sóleo e gastrocnêmio médio bilateral, de cada animal, foram dissecados e pesados, na balança de precisão (AY202, Shimadzu) conforme descrito por Zhang e colaboradores (2016) a fim de avaliar a perda de massa muscular por desuso. Foram realizadas a pesagem dos músculos de cada pata e gerada média aritmética por músculo para cada animal, e esta média foi utilizada para gerar os dados de média do grupo experimental que o animal pertence, sendo n=5/grupo.

3.7.2 Avaliação das junções neuromusculares (JNM)

Com o objetivo de quantificar o número de junções neuromusculares, realizamos uma marcação para a placa motora terminal nos músculos sóleo e gastrocnêmio retirados de animais de cada um dos três grupos. A alfa-bungarotoxina (α -BTX) é uma neurotoxina contida no veneno da serpente krait de Taiwan. Produz paralisia dos músculos estriados, bloqueando os receptores colinérgicos na junção neuromuscular. Os espécimes foram incluídos em OCT (Tissue-Tek) e, posteriormente congelados a -20°C. O material já congelado foi cortado em criostato (Leica CM 1850), obtendo-se cortes longitudinais com 60 μ m de espessura. Estes cortes foram coletados em lâminas gelatinizadas e armazenados para posterior realização de imunomarcação. Os cortes foram levados para uma estufa a -57°C por 10 min, posteriormente foram lavados duas vezes por cinco minutos em PBS pH 7,4. Em seguida, para bloqueio de

sítios inespecíficos, foi utilizada uma solução contendo PBS, triton-x 100 a 0,3% e soro de cabra (NGS) a 10%, por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o marcador anti- α -Bungarotoxina, (1:200, B13423, Invitrogen) diluído em solução de bloqueio por um período de 2 horas. Então, os cortes foram lavados em PBS pH 7,4 por quatro vezes de cinco minutos cada. Ao final, as lâminas montadas com meio de montagem aquoso fluoromount (Eletron Microscopy Science, cat.17984- 25), e armazenadas a -20°C para posterior análise no microscópio confocal (LEICA, TCS SPS), onde foram realizadas fotos em 20x e 40x.

A quantificação das placas motoras foi realizada em microscópio utilizando 3 cortes seriados por animal com uma distância mínima de 400 μm para evitar que a mesma placa motora fosse contabilizada 2 vezes (Durço *et al*, 2020). Estes dados foram comparados com os dados da eletroneuromiografia e com os funcionais, a fim de avaliar a plasticidade neuromuscular, sendo $n=5/\text{grupo}$.

3.8 Análise do microambiente inflamatório

Para análise do perfil de citocinas, 56 dias após a lesão, a metodologia utilizada envolveu a realização de ensaios por ELISA. Os animais foram submetidos à anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg) por via intraperitoneal. A medula fresca, aproximadamente 2,5 mm de material, foi coletada e mantida por 24 horas em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C em meio DMEM low (1000 μl) (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para a dosagem das citocinas, sendo $n=3/\text{grupo}$.

As citocinas pró-inflamatórias (IL- 1β , IL-6 e TNF α) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13) foram quantificadas no sobrenadante da medula utilizando o kit comercial da R&D Systems, seguindo o protocolo estabelecido. Em resumo, amostras de 100 μL foram adicionadas a cada poço das placas de 96 poços previamente revestidas com anticorpos, seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, 100 μL de solução de trabalho foram adicionados a cada poço, seguido de mais 1 hora de incubação à temperatura ambiente antes da adição da solução de substrato de 100 μL . A reação foi interrompida com a adição de 50 μL de solução de parada, e a leitura da absorbância foi realizada a 450 nm.

Também realizamos imuno-histoquímica para rastrear a modulação das células do sistema imune em cortes congelados da medula e a influência da modulação dos perfis M1 e M2 de macrófago/micróglia. Sendo assim realizamos a marcação para TMEM119 (micróglia),

óxido nítrico sintase (M1) e arginase (M2), além da averiguação para apoptose, através da caspase 3 clivada, e cicatriz glial, pela marcação de GFAP (proteína ácida fibrilar glial).

As lâminas contendo os cortes medulares foram incubadas com permanganato de potássio por 10 minutos para bloqueio da biotina endógena. Em seguida, foram lavadas em PBS (do inglês, phosphate buffered saline) pH 7,4 duas vezes por cinco minutos. Para o bloqueio de ligação a sítios inespecíficos, foi utilizada uma solução de PBS contendo triton X-100 a 0,3%, e soro normal de cabra (NGS, do inglês, normal goat serum) a 10%, por uma hora em temperatura ambiente. Logo após, exceto para os controles negativos, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho TMEM 119 (1: 100, HPA051870, Sigma), anticorpo monoclonal de camundongo óxido nítrico sintase (1:100 , sc-7271, Santa Cruz), anticorpo monoclonal de camundongo Arginase 1 (1:100, sl6arg, Invitrogen), anticorpo policlonal de coelho Caspase 3 ativa (1:100, AB3623, Merck), anticorpo policlonal de coelho GFAP (1:500, G9269, Sigma), na solução de bloqueio por vinte e quatro horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes por cinco minutos cada e, então, incubadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 546 cabra anti coelho (1:500, A11035, Molecular Probes), Alexa Fluor 488 cabra anti camundongo (1:500, A11001, Molecular Probes), Alexa Fluor 488 cabra anti rato (1:500, A11006, Invitrogen), de acordo com a espécie por duas horas em temperatura ambiente.

Em seguida, foram lavadas em PBS quatro vezes por cinco minutos cada, foi incubado o marcador nuclear 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI, 20mg/mL, sigma) por cinco minutos. Ao final, as lâminas foram lavadas em PBS duas vezes por cinco minutos, e montadas com meio de montagem fluoromount (Eletron Microscopy Science, cat.17984- 25), armazenadas no freezer a -20°C para posterior análise. Foram realizados controles negativos, com omissão do anticorpo primário para todas as reações. As imagens foram capturadas utilizando o microscópio confocal (LEICA, TCS SPS). câmera AxioCam MRC com o programa Axiovision, aumento de 20x, normatizando o mesmo tempo de exposição para capturar todas as imagens sendo capturadas 3 fotos de cada medula de cada animal (1 foto do epicentro da medula, 1 foto acima do epicentro e 1 foto abaixo para a análise de TMEM+arginase e TMEM+iNOS (Alka *et al*, 2022). Para a quantificação de GFAP e Caspase-3-clivada, foram capturadas fotos no aumento de 20x, normatizando o mesmo tempo de exposição para todas as imagens. Para esta quantificação, foi fotografada a área total da medula, a qual foi analisada posteriormente. A quantificação da área de marcação da imunofluorescência foi realizada com auxílio do programa Image Pro Plus, a partir do cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para a

relação TMEM+Arginase e TMEM+iNOS, e densidade integrada, para GFAP e Caspase-3-clivada (Kakulas, 1984; Alka *et al*, 2022), da sendo n=3/grupo.

3.8.1. Análise da resposta sistêmica à inflamação

Para avaliação da resposta sistêmica à inflamação e adaptação da parede vesical em resposta à lesão, 56 dias pós lesão, como um fator de verificação de retorno de funcionalidade, bexigas foram avaliadas dissecadas e incluídas na parafina. Para isto o material foi lavado em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e água destilada, desidratado em concentrações crescentes de álcool (um banho de 1 hora nas concentrações de 70, 80 e 90%, e dois banhos de 1 hora no álcool absoluto), diafanizado em xilol (2 banhos sequenciais por 1 hora cada), impregnado em parafina (dois banhos de parafina à 56°C em estufa) e incluído, em posição transversal, em parafina nova. Estes blocos foram cortados transversalmente, no micrótomo (45 Rotary microtome, Lipshaw MFG. Co), na espessura de 10 µm, e os cortes foram recolhidos em lâminas gelatinizadas (SIGMA). Utilizamos os cortes transversais para análise quantitativa e a coloração de hematoxilina-eosina (HE) para visualizar a morfologia do tecido. Foram usados 3 cortes por animal para esta análise, sendo n=3/grupo.

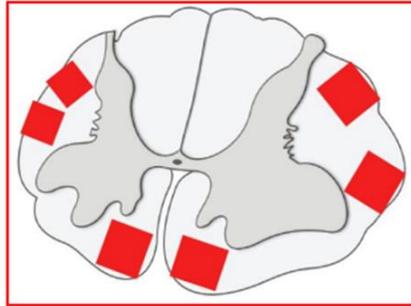
3.9 Análise morfométrica

Para a quantificação do número de fibras mielinizadas, e razão G, utilizamos cortes transversais semifinos da ME na região da lesão, corados com azul de toluidina. Obtivemos as imagens utilizando o microscópio Axioscop plus 2 (objetiva de 100x) e o sistema de câmera Axiocam MRC com o programa Axiovision. Foram obtidos 6 campos de imagem por animal (3 campos em cada lado da ME). Estas imagens foram obtidas nas áreas de substância branca anterior, antero-lateral e antero-posterior (Figura 12). As meninges e a fissura mediana ventral foram utilizadas como referência para a obtenção de duas fotografias anteriores bilaterais. Enquanto as duas fotografias laterais foram feitas perto do corno ventral e dorsal, respectivamente, em cada lado da ME, com um total de quatro fotografias laterais. Através deste método sistemático, podemos contar as fibras nervosas que vemos em toda a área do corte transversal, evitando assim viés de amostragem (Marques *et al.*, 2009).

A Razão-G foi calculada dividindo o diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra e os resultados foram estratificados nas seguintes faixas: 0,1-0,2; 0,2-0,3; 0,3-0,4; 0,4-0,5; 0,5- 0,6;

0,6-0,7; 0,7-0,8; 0,8-0,9 e 0,9-1,0 (Chomiak *et al.*, 2009). As quantificações de fibras mielinizadas, vasos sanguíneos e o cálculo da Razão-G foram feitas utilizando o software ImageJ, sendo sendo n=5/grupo.

Figura 12 - Esquema das áreas sistemáticas utilizadas para quantificar as fibras mielínicas e razão G (G-ratio).



Representação dos 6 campos fotografados, em aumento de 1000x, para quantificação das fibras mielinizadas normais na substância branca da medula espinal. Fonte: Massoto *et al.*, 2020.

3.10 Análise de microtomografia (microTC)

O preparo da amostra foi realizado conforme o protocolo de desidratação e inclusão detalhado no tópico de preparo para MET. Após a secagem do material infiltrado em EPON, a microtomografia foi utilizado um scanner micro-CT SkyScan 1275 (Bruker®) para investigações tridimensionais de amostras com alta resolução, usando condições de imagem previamente otimizadas.

A técnica de microtomografia foi conduzida sob condições específicas, utilizando uma voltagem de 41 kV e uma corrente de 200 uA. O tempo de exposição foi fixado em 55 ms para garantir a obtenção de imagens detalhadas. Para a reconstrução das imagens, foi utilizado o software NRecon 1.7 (Bruker®). O tamanho do pixel foi definido como 10,0 μm , enquanto a amostra foi rotacionada por 180 graus com um passo angular de 0,2 graus para capturar uma gama abrangente de informações tridimensionais cruciais para a análise proposta. Essas configurações experimentais específicas mostraram-se essenciais para assegurar a precisão e representação precisa das características internas das amostras estudadas, sendo n=3/grupo.

3.11 Análise por microscopia de varredura (MEV)

A fim de verificar as características topográficas gerais da medula espinal, após o

tempo de sobrevivência, utilizamos a microscopia eletrônica de varredura (MEV), oito semanas após a cirurgia, sendo retirado um segmento 2mm rostrais e 2 mm caudais em relação ao epicentro da lesão. Após a fixação por imersão, como descrito anteriormente, o segmento

Cada medula foi lavada em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4), pós-fixado em OsO₄ 1% + 0,8% de ferrocianeto de potássio + 5 nM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4), por seis horas, e em seguida foi lavado em tampão cacodilato 0,1M e água destilada. Os segmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80% e 90%, por duas vezes de sete minutos cada, e 100%, por duas vezes de 15 minutos) e solução de hexametildisilazano (HMDS) (primeiramente em uma proporção de 1:1 com etanol 100% e, em sequência, isoladamente com HMDS 100% por 10 minutos cada).

Por fim, a amostra foi metalizada através de um metalizador (Denton Vacuum Desk II, Estados Unidos da América). As amostras foram posicionadas cuidadosamente num suporte contendo fita adesiva dupla face e pulverizadas com ouro (FL-9496 Balzers Union Coater), com a parte do sítio da lesão para cima. O suporte contendo as amostras foi levado ao microscópio eletrônico de varredura (EVO MA10 - ZEISS) para análise e obtenção das eletromicrografias, sendo n=3/grupo.

3.12 Análises estatísticas

Todos os dados quantitativos foram analisados utilizando o software GraphPad Prisma 8.0, utilizando testes estatísticos adequados às amostras, utilizando as análises one-way ANOVA e two-way ANOVA, pós-testes Bonferroni ou Tukey`s, e foi considerado um índice de confiança de 95%, com valores de $p < 0,05$ para a significância.

4. Resultados

4.1. Análise funcional

4.1.1 Avaliação locomotora (BMS)

A análise da função pela escala BMS evidenciou que o grupo SHAM ($9,0 \pm 0,0$) não apresentou alteração do seu padrão locomotor ao longo do prazo analisado, por isso os valores deste grupo foram usados como padrão de normalidade e apresentou diferença estatística

significativa por todo o período de sobrevivência em relação aos grupos lesados (SCI e TMT). Todos os animais lesados apresentaram significativa perda funcional após lesão. No dia seguinte à lesão, todos os grupos lesados apresentaram completa paralisia das patas posteriores, caracterizando o período de choque medular.

No entanto, os grupos SCI e TMT começaram a apresentar uma diferença estatística significativa em relação ao somente lesado a partir de 21 dpo (dias pós operatório). O grupo TMT ($4,02 \pm 0,45$) apresentou uma melhora estatística significativa em relação ao SCI ($1,48 \pm 0,29$; $p < 0,001$, Figura 13), ao fim da sobrevivência de 56 dpo. O grupo SCI se manteve na fase inicial de recuperação, com retorno motor e funcional primário, sem desenvolvimento de uma motricidade mais elaborada, diferente do grupo TMT, que alcançou a fase intermediária. Isso demonstra que o exercício influenciou a performance locomotora e recuperação funcional após lesão, apresentando melhora significativa quando comparado ao grupo SCI.

Figura 13 - O exercício promove melhora no padrão locomotor.

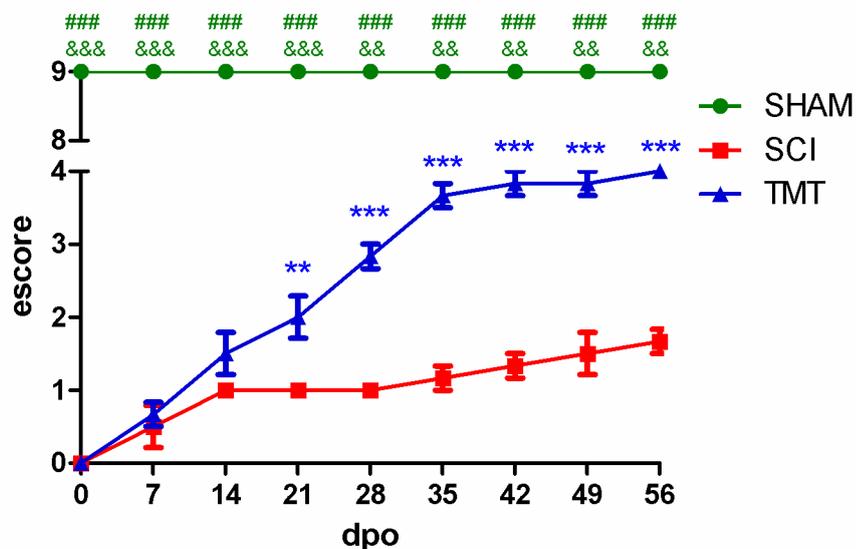


Gráfico de linhas mostrando resultados progressivos do BMS ao longo do tempo de sobrevivência estudado. Por todo o tempo de sobrevivência, o grupo SHAM obteve diferença estatística significativa em relação aos grupos SCI (#) e TMT (&). A partir de 21 dias, o grupo TMT apresentou diferença estatística em relação ao grupo SCI, mantendo-a até o 56º dia. Análise estatística: two-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores &&& e ** $p < 0,01$, ###, &&& e *** $p < 0,001$; $n = 5$ /grupo. Fonte: A autora, 2024.

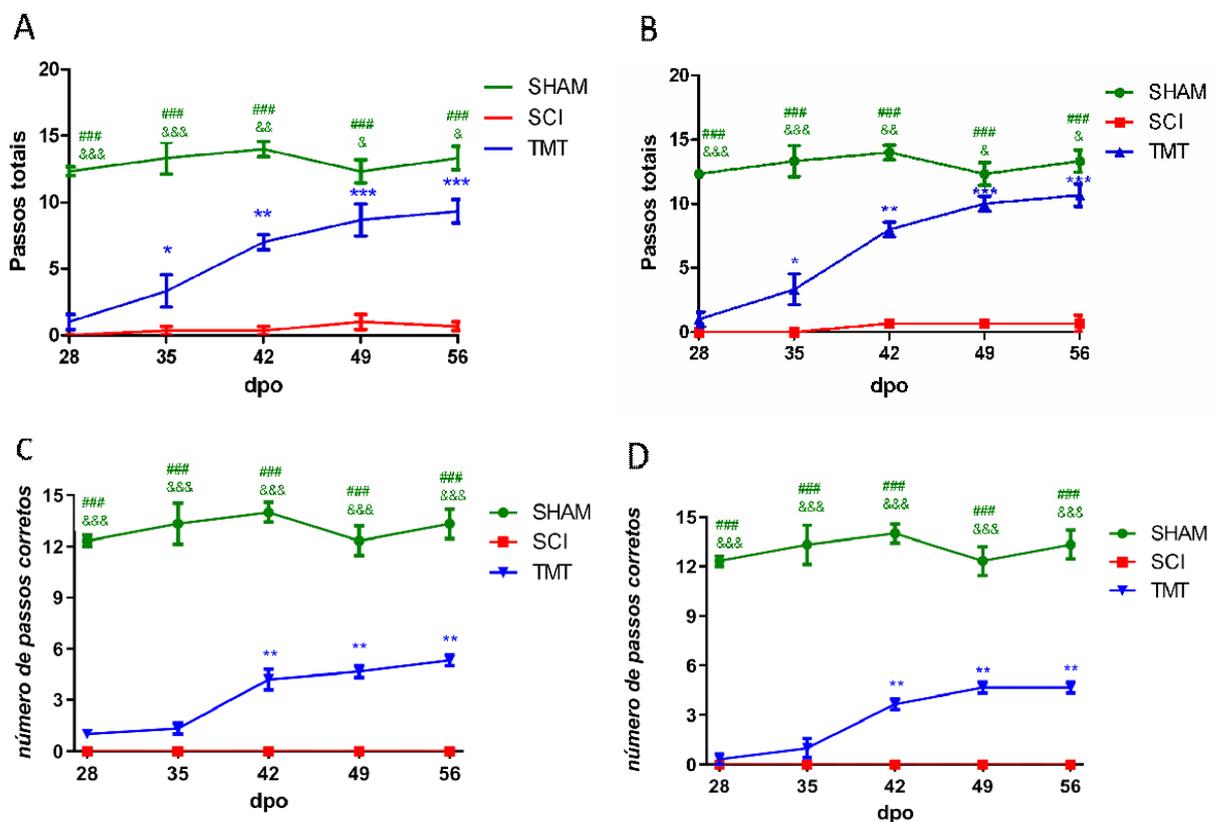
4.1.2 Teste em caminhada em escada horizontal

Avaliamos o número de passos totais e corretos no Teste de Caminhada em Escada Horizontal (Figura 14), a partir de 28 dias pós lesão, corte temporal onde os animais começam a demonstrar movimentos de passo. Na análise de passos totais, ao fim da sobrevivência, o grupo

TMT [pata direita (PD): $8,233\pm 1,663$; pata esquerda (PE): $7,871\pm 1,587$, $p<0,01$] apresentou diferença significativa em relação ao grupo SCI (PD: $0,6358\pm 0,1700$; PE: $0,6667\pm 0,1625$) (diferença representada pelos asteriscos azuis), na análise de ambas as patas, a partir do 35º dia de sobrevivida (Figuras 14A e 14B).

Em relação aos passos corretos, no 56º dpo, foi verificado que o grupo TMT (PD: $5,687\pm 0,458$; PE: $7,871\pm 0,421$, $p<0,01$) apresentou uma diferença estatística significativa em relação ao grupo SCI (PD: $0,000\pm 0,000$; PE: $0,000\pm 0,000$) (Figura 14C e 14D). Esta efetividade quanto ao número de passos corretos efetuados sugere a influência deste protocolo de exercício na melhor performance funcional, refletida no grupo TMT. Apesar do grupo SHAM, o nosso padrão de normalidade, (PD: $11,45\pm 0,3965$; PE: $11,15\pm 0,5351$; $p<0,05$) apresentar diferença estatística em relação ao grupo TMT, performance do TMT foi bem melhor do que quando comparamos o SHAM com o grupo SCI ($p<0,01$) indicando o impacto positivo do exercício em relação ao retorno da locomoção e passos corretos.

Figura 14 - Análise de teste de caminhada em escada horizontal. Comparação entre os grupos no LWT.



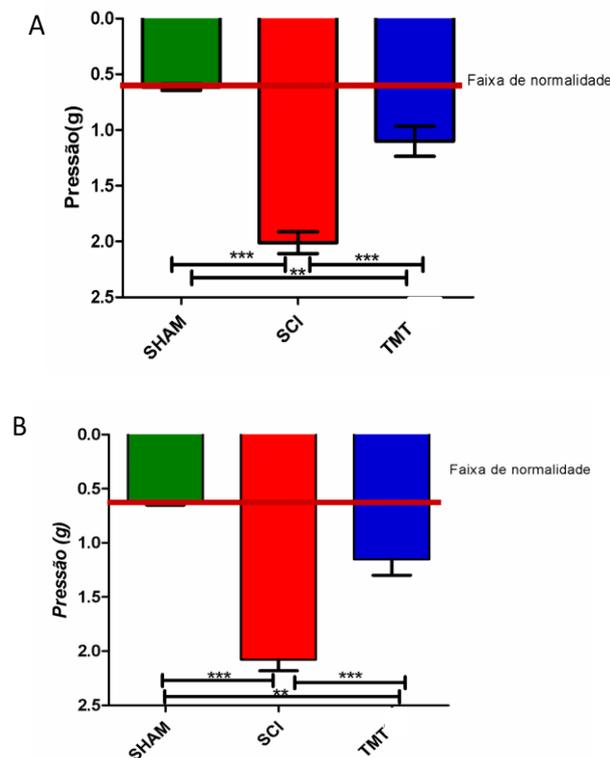
Dados apresentados de forma isolada por pata (PD: pata direita (A e C); PE: pata esquerda (B e D), devido assimetria evidente em camundongos pós lesão medular. (A-B) Em relação ao número total de passos totais dados, o grupo TMT apresentou diferença estatística em relação ao grupo SCI a partir de 35 dias pós lesão. (C-D) Em relação ao número de passos corretos, houve diferença significativa entre os grupos lesados, a partir do 42º dia.

Em ambas as análises, o grupo SHAM obteve diferença estatística significativa em relação ao SCI (#) e TMT (&). Análise estatística: two-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores: & e * $p < 0,05$; && e ** $p < 0,01$; ###, &&& e *** $p < 0,001$; $n = 5$ /grupo. Fonte: A autora, 2024.

4.1.3 Teste de alodinia mecânica (Von Frey eletrônico)

Os resultados do teste de alodinia mecânica avaliaram a sensibilidade tátil/dolorosa na região plantar das patas traseiras dos animais. Testamos ambas as patas traseiras, direita e esquerda (Figura 15A e 15B, respectivamente), realizando uma média aritmética de cada pata por animal e, posteriormente, por grupo. Os valores do grupo SHAM (PD: $0,61 \pm 0,02$ – PE: $0,62 \pm 0,01$ - PE) foram considerados como padrão de normalidade. Nossos resultados apontam para uma importante perda sensorial no grupo SCI (PD: $2,20 \pm 0,65$, PE: $2,01 \pm 0,68$), vista no 56º dia, quando comparado ao grupo SHAM, o que configura a efetividade do modelo de lesão utilizado pelo grupo e a reprodutibilidade do procedimento cirúrgico. O grupo TMT (PD: $1,10 \pm 1,17$; PE: $1,15 \pm 1,12$) apresentou limiar de detecção de pressão com valor mais próximo ao padrão de normalidade, SHAM, com diferença estatística significativa quando comparado ao grupo SCI ($p < 0,001$).

Figura eletrônico 15 -Gráfico de barra sobre a análise do analgesímetro digital (Von Frey Dinâmica espacial da ativação de células gliais induzida por SCI.



Comparação da evolução da sensibilidade mecânica, no 56º dia, através da avaliação dos resultados do Analgesímetro digital (Von Frey eletrônico), dados apresentados com a média das patas direita (a) e esquerda (b).

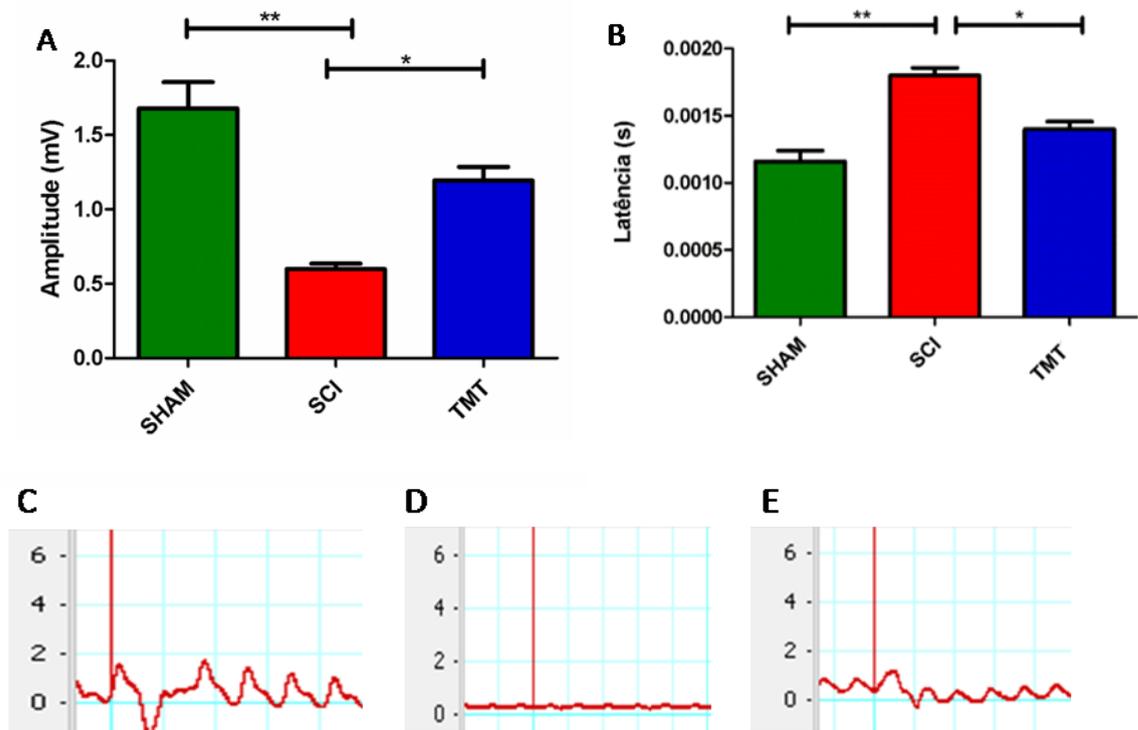
Representação dos valores referentes a pressão (em grama), registrada pelo analgesímetro no momento do reflexo de retirada da pata testada. Os grupos lesados tiveram um aumento do limiar de detecção, quando comparados ao SHAM. Apesar do grupo SHAM apresentar limiar menor do que o grupo TMT ($p < 0,01$), tanto o grupo SHAM quanto o TMT apresentaram melhores resultados que o SCI ($p < 0,001$), com diferença estatística significativa. Análise estatística: One-way ANOVA e pós-teste Turkey's $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$; $n = 5/\text{grupo}$. Fonte: A autora, 2024.

4.1.4 Análise por eletroneuromiografia

Avaliamos a latência e a amplitude do PAMC (verificada pelo pico de cada onda – Figura 16), através de análise por eletroneuromiografia (ENMG), nos grupos SHAM, SCI e TMT, após 8 semanas da lesão. Realizamos o estímulo no segmento cervical (C1) e fizemos o registro no músculo gastrocnêmio. Os valores do grupo SHAM foram utilizados como parâmetros de normalidade.

Todos os animais lesados apresentaram redução da amplitude e aumento da latência do PAMC, provavelmente devido à redução/bloqueio na passagem do potencial de ação pela área da lesão. O grupo SCI ($0,59 \pm 0,79$) apresentou pior resultado na amplitude do PAMC, quando comparado aos demais grupos, SHAM ($1,55 \pm 0,33$, $p < 0,01$) e TMT ($1,18 \pm 1,05$, $p < 0,05$). E o grupo TMT também apresentou diminuição da amplitude, no entanto, não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao SHAM (Figura 16A). Quanto à latência, o grupo SHAM ($0,0012 \pm 0,26$) e TMT ($0,0014 \pm 0,21$) apresentaram melhores resultados que o grupo SCI ($0,0018 \pm 0,21$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente), com diferença estatística significativa. Apesar da latência do grupo TMT ser um pouco elevada quando comparada ao SHAM, não houve diferença estatística entre estes grupos (Figura 16B). Traçados da eletroneuromiografia referentes aos grupos SHAM, SCI e TMT, respectivamente (C-E).

Figura 16 - Análise do registro eletroneuromiográfico.



Comparação de amplitude (a) e latência (b) da eletroneuromiografia entre os grupos estudados. (a) O grupo SHAM apresentou diferença significativa em relação ao grupo somente lesão, quanto à amplitude, todavia não houve quando comparado ao TMT. O grupo TMT teve um melhor desempenho na ENMG e apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo SCI. (b) Em relação à latência da eletroneuromiografia, todos os grupos obtiveram uma diferença estatística significativa em relação ao grupo SCI. Esses dados demonstram a efetividade do protocolo de tratamento, tendo o grupo TMT valores próximos do padrão de normalidade. Traçados da eletroneuromiografia referentes aos grupos SHAM (A), SCI (b) e TMT (c), respectivamente. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 5/\text{grupo}$. Fonte: A autora, 2024.

4.1.5 Análise neuromuscular

A redução do peso do músculo pode ser usada como indicativo de atrofia por perda de sua massa muscular e este é um evento comumente associado à lesão medular. Realizamos a pesagem dos músculos sóleo e gastrocnêmio ($n=5/\text{grupo}$) para avaliar o impacto de nossos tratamentos na condição da atrofia.

Apesar dos músculos provenientes dos grupos lesados (SCI e TMT) apresentarem redução significativa de seu peso quando comparado ao SHAM (sóleo: $0,017 \pm 0,0549$; gastrocnêmio: $0,0723 \pm 0,3274$), observamos que o grupo TMT apresentou menor redução de sua massa muscular, em ambos os músculos. Esta maior preservação da massa muscular do sóleo no grupo TMT ($0,011 \pm 1,078$) foi estatisticamente significativa quando comparamos com o grupo SCI ($0,07 \pm 0,0061$, $p > 0,05$) (Figura 17A). Também foram averiguadas diferenças

estatísticas significativas em relação à média dos pesos dos gastrocnêmios dentre os grupos lesados (SCI $0,0373 \pm 0,0211$ e TMT $0,0573 \pm 0,02570$, $p < 0,05$) e entre SHAM e os demais grupos (SCI e TMT), $p < 0,001$ e, $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 17B), o que provavelmente deve-se a influência do protocolo de exercício empregado no grupo TMT.

Figura 17 - Análise quantitativa da atrofia muscular.

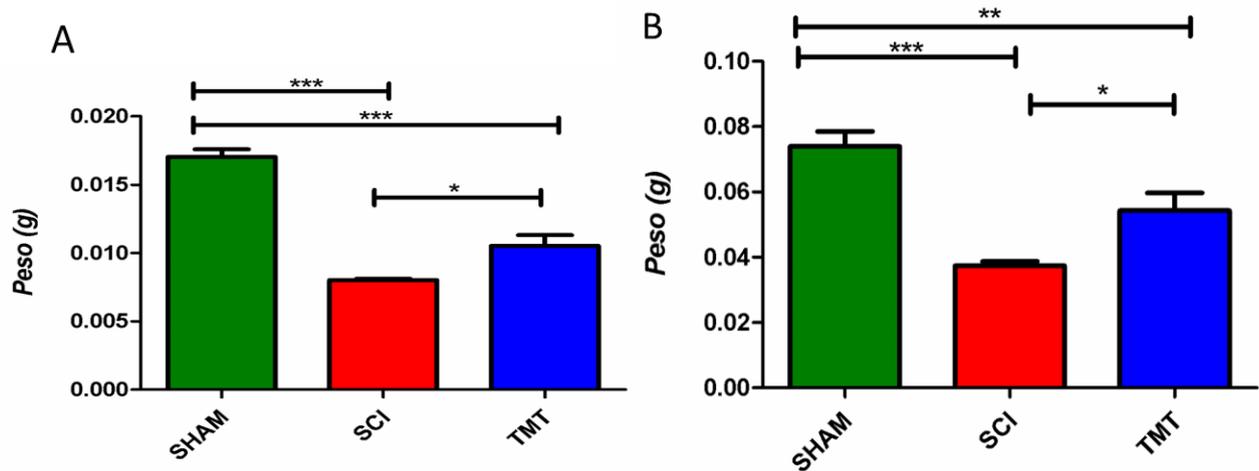
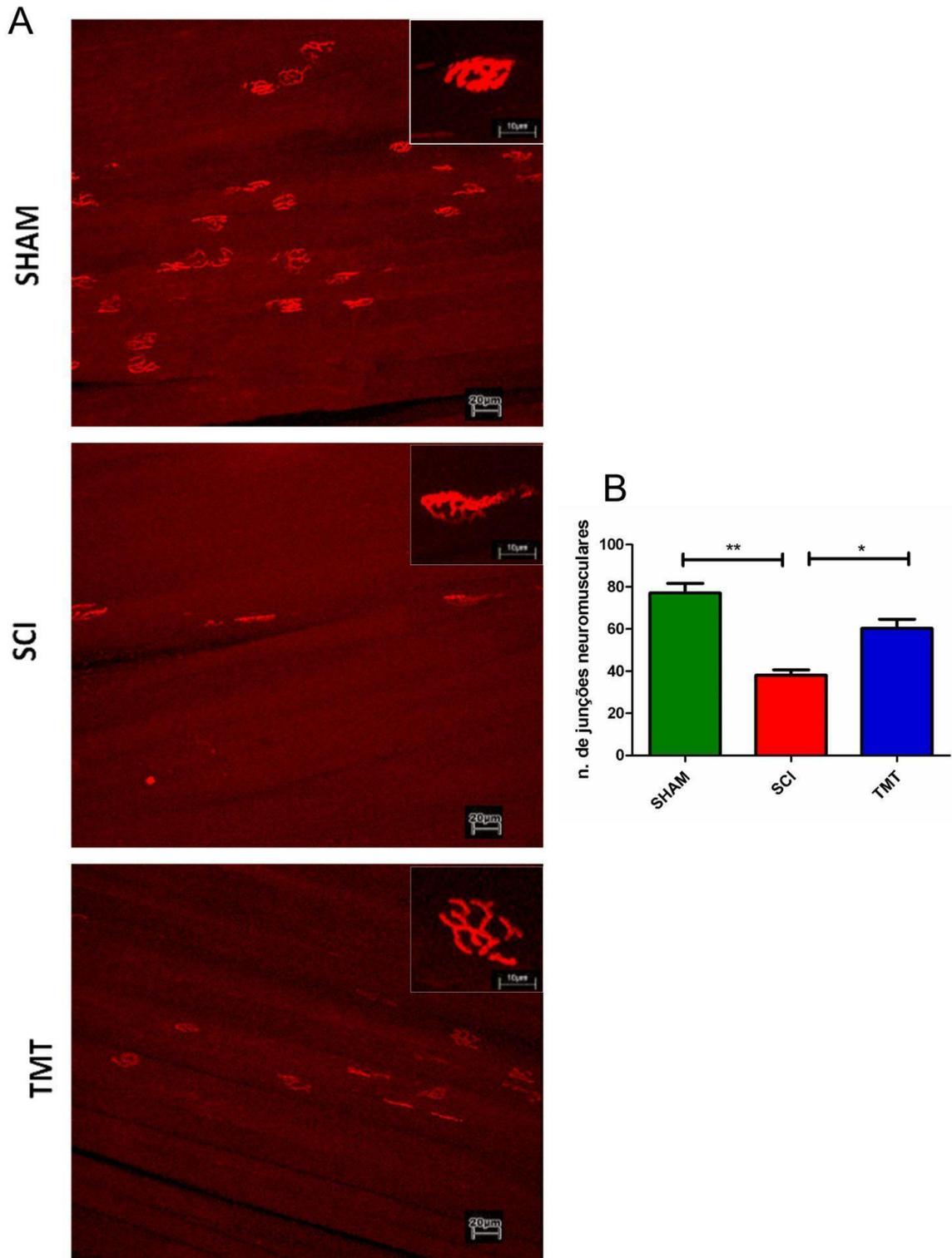
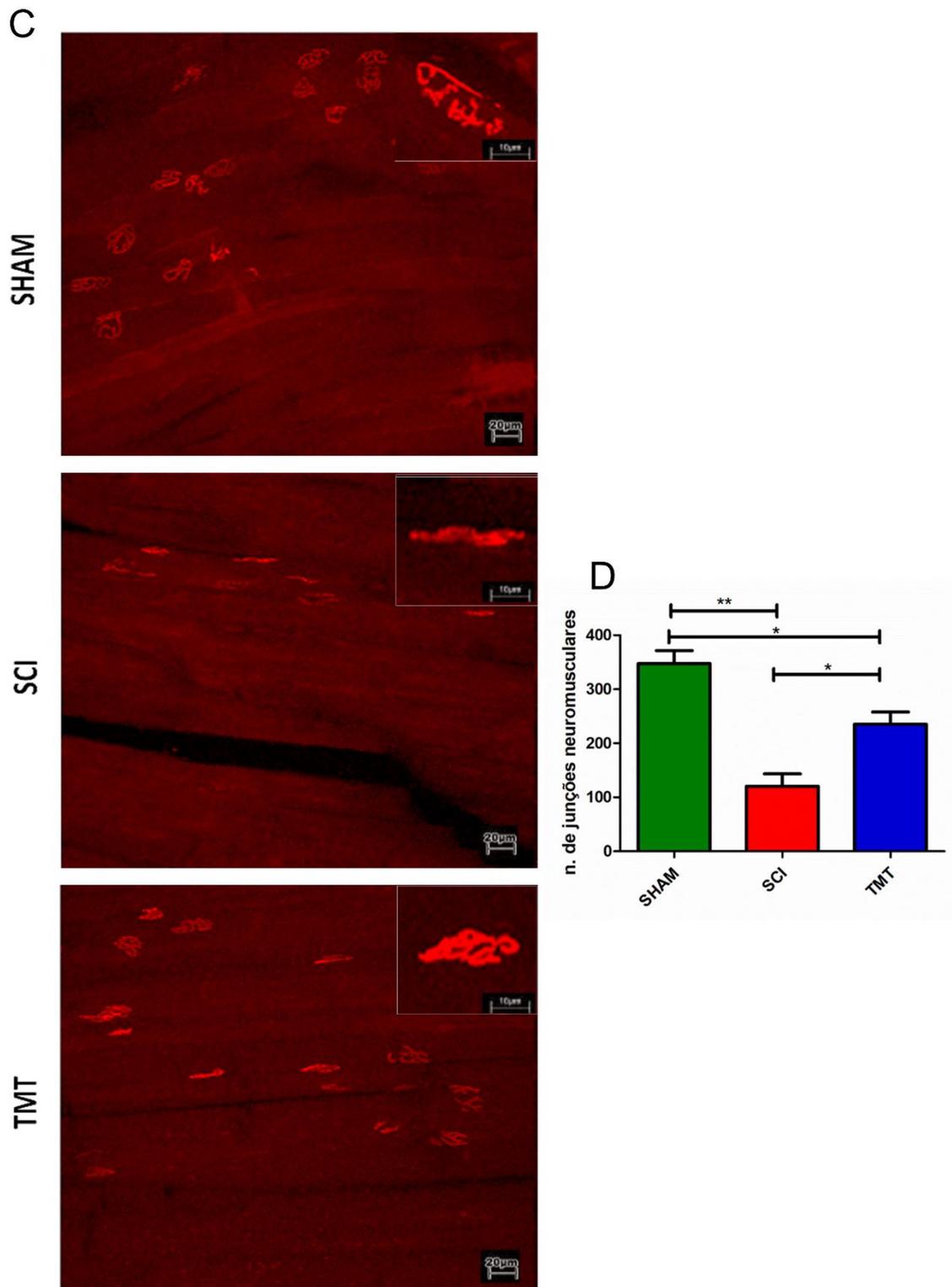


Gráfico de barras representando o peso do músculo sóleo por grupo (a-b). O grupo SHAM apresentou diferença significativa quando comparado aos lesados em ambas as análises musculares. O grupo TMT também apresentou diferença significativa quando comparado ao SCI, na avaliação do sóleo e gastrocnêmio. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 5$ /grupo. Fonte: A autora, 2024.

Em relação a avaliação da marcação de α -bungarotoxina nos músculos, foi possível avaliar quali (Figura 18A e 18C) e quantitativamente (Figura 18B e 18D) a preservação morfológica das placas motoras (mantendo o formato de “pretzels”) dentre os grupos. O grupo TMT apresentou maior preservação de junções neuromusculares quando comparado ao SCI (sóleo: $p < 0,05$, gastrocnêmio: $p < 0,01$) mostrando a efetividade do exercício na manutenção da neurotransmissão na junção neuromuscular. Isso reflete que o exercício possibilita uma maior preservação de massa muscular, diminuindo a atrofia, favorecendo o retorno funcional após lesão.

Figura 18 - Análise de marcação de α -bungarotoxina no músculo Sóleo e Gastrocnêmio.

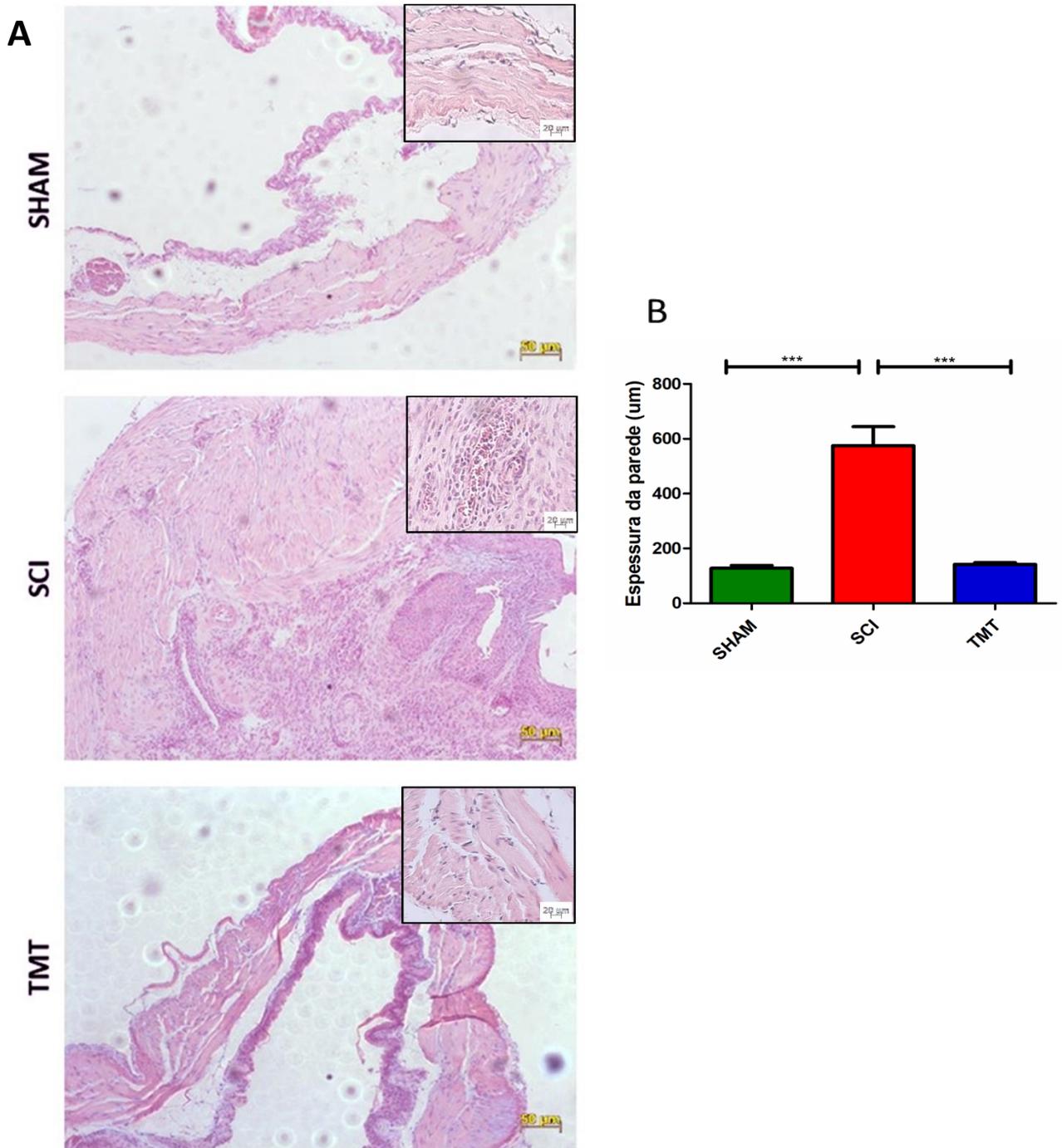


Em (a) e (c), representação das marcações dos grupos SHAM, SCI e TMT para avaliação de placas motoras. Escala: 20 μ m e 10 μ m, respectivamente. Gráficos de barras representando a quantificação de junções neuromusculares no sóleo e gastrocnêmio, por grupo (b) e (d). Para o sóleo, obtivemos diferença significativa entre o grupo SHAM e TMT e o somente lesado (b). Na avaliação do gastrocnêmio, o grupo SHAM demonstrou uma maior preservação de junções neuromusculares, verificando diferenças entre o controle e os lesados (d). Além disso, houve diferença entre os grupos SCI e TMT, tendo o TMT maior número de junções quando comparado ao SCI. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 5$ /grupo.

4.1.6 Correlação da parede vesical e lesão medular

Para avaliação da relação da lesão medular com disfunção sistêmica e repercussões inflamatórias, realizamos coloração de HE para verificarmos a espessura da parede vesical. Além de ser possível alinharmos uma conexão da espessura da bexiga com o retorno funcional do animal, é possível relacionar os achados vesicais com a inflamação sistêmica, muitas vezes ocorridas nos quadros de trauma raquimedular. A avaliação quali (Figura 19A) e quantitativa (Figura 19B) demonstrou que o grupo TMT ($141.577 \pm 0,33$) apresentou a espessura da parede da bexiga muito próxima ao padrão de normalidade, grupo SHAM ($127.857 \pm 0,46$). No entanto, o grupo SCI ($574.963 \pm 1,92$) apresentou uma importante hipertrofia da camada muscular, bem como um importante infiltrado inflamatório majoritariamente mononuclear, com pouco infiltrado polimorfonuclear. Os grupos SHAM e TMT obtiveram uma diferença estatística significativa em relação ao SCI ($p < 0,001$), porém não entre si.

Figura 19 - Representação qualitativa e análise quantitativa da parede da bexiga.

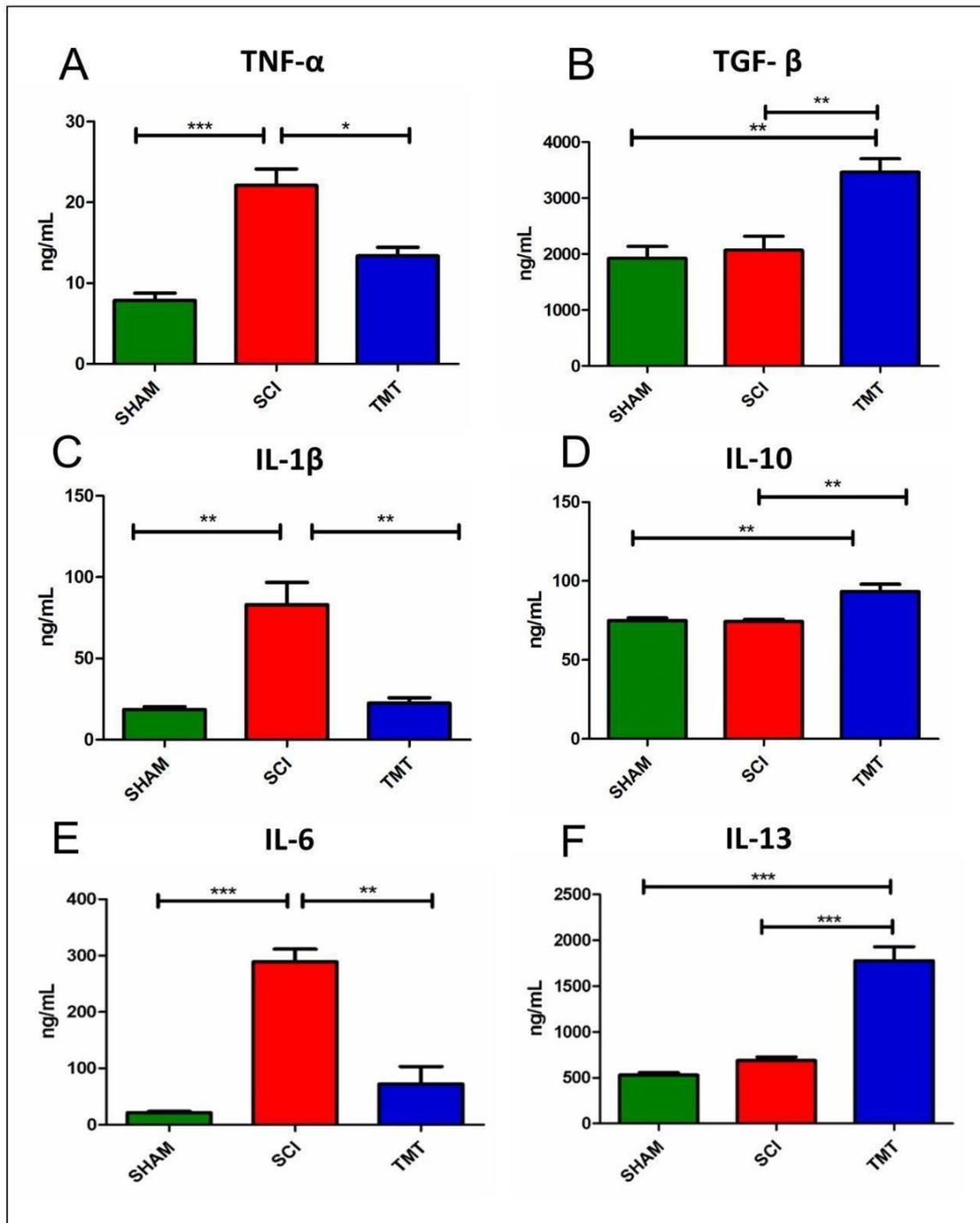


Em (a), análise qualitativa da parede da bexiga, por grupo escala de 50µm, 20x. Em (b), Gráfico de barras representando a espessura da bexiga. Obteram diferença significativa entre o grupo SCI para com o SHAM e o TMT. Valores: Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey`s. ***p<0,01. n=3/grupo. Fonte: A autora, 2024.

4.1.7 Análise da neuroinflamação por ELISA

A fim de verificar mais intimamente a modulação inflamatória diante do tratamento proposto, avaliamos, pela técnica de ELISA, as citocinas pró-inflamatórias, A - TNF- α , C - IL-1 β e E - IL-6 e anti-inflamatórias, B - TGF- β , D - IL-10 e F - IL-13. O grupo SHAM funcionou como nosso padrão de normalidade na expressão destas citocinas. O grupo TMT apresentou maior expressão das citocinas pró-inflamatórias e menor expressão das citocinas anti-inflamatórias quando comparado ao grupo SCI, sugerindo uma modulação anti-inflamatória induzida pelo exercício no ambiente inflamatório após lesão medular. Ao contrário, o grupo SCI apresenta franco processo pró-inflamatório, elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias quando comparado ao SHAM e TMT (Figura 20). O exercício, portanto, poderia favorecer uma polarização em relação à população inflamatória para o perfil anti inflamatório.

Figura 20 - Gráfico de barras representando os níveis das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.



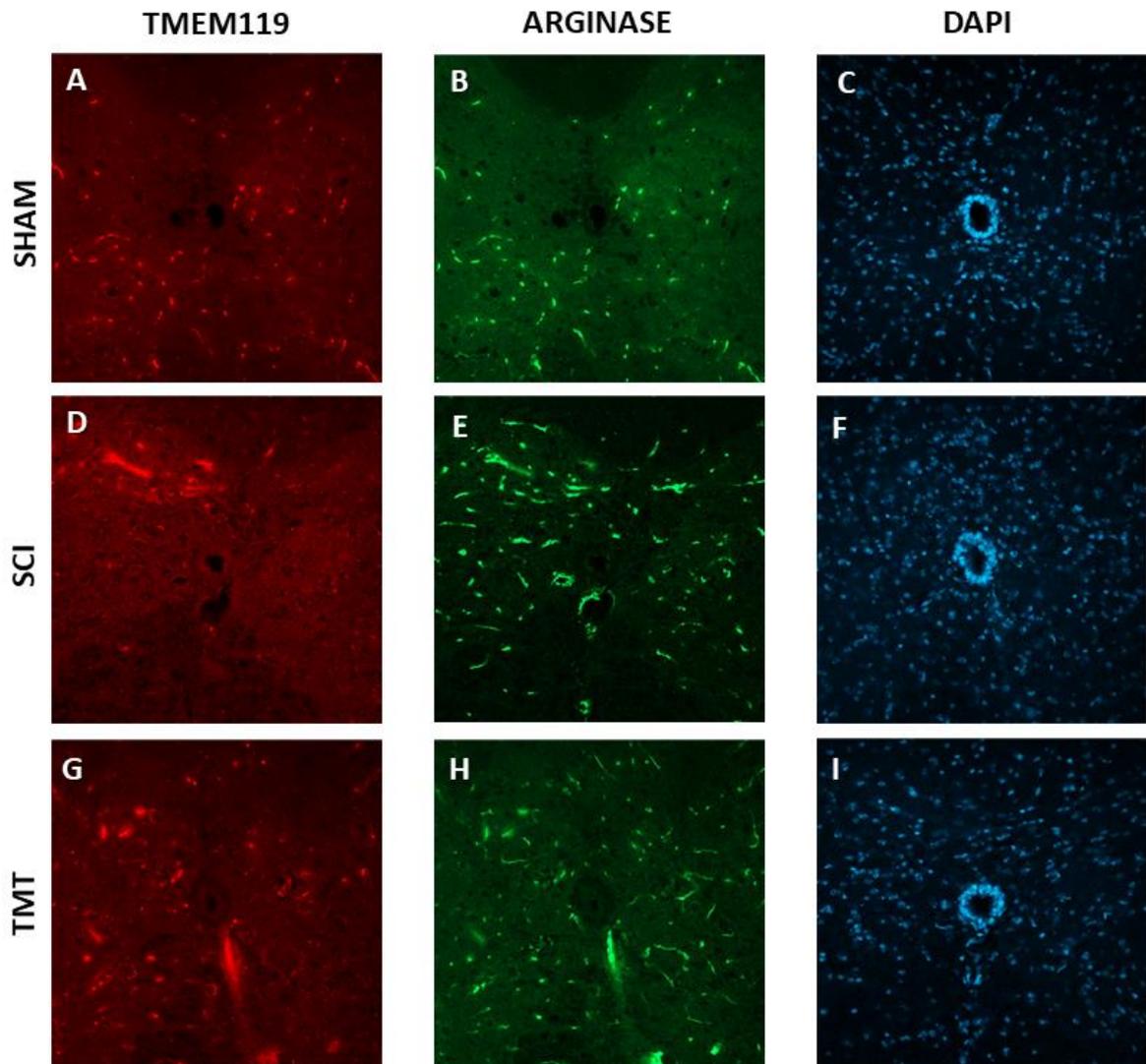
Em A - TNF- α ; B - TGF- β 1; C - IL-1 β , D - IL-10, E - IL-6 e F - IL-13, em ng/mL. Dentre as citocinas, o grupo TMT tem destaque, demonstrando melhores níveis das citocinas anti-inflamatórias. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$. $n = 3$ /grupo.

4.1.8 Avaliação por imuno-histoquímica

Com o objetivo de investigar a população de células inflamatórias e correlacionar com os dados obtidos nos testes anteriores, realizamos e avaliamos a imunomarcção para TMEM119, Arginase (Figura 21) e iNOS (Figura 22), além de avaliar o comportamento de astrócitos, pelo GFAP (Figura 23), e ativação de apoptose celular, pela Caspase-3-clivada (Figura 24).

Primeiramente, podemos observar que os cortes transversais com a marcação TMEM+Arginase teve uma marcação maior no grupo TMT, de modo que foi refletido pela quantificação utilizando a correlação de Person, onde demonstrou uma correlação de $(0.85\pm 0,66)$, o que demonstra que a maior parte de população de microglia marcada por TMEM119 teria um perfil voltado para M2, ou seja, um perfil mais antiinflamatório, diferente do grupo SCI $(0,46\pm 0,46)$ (Figura 21), o que infere a possibilidade do exercício enquanto uma terapia de modulação do microambiente inflamatório, auxiliando na polarização de um perfil de microglia antiinflamatória. Houve diferença estatística significativa entre estes grupos.

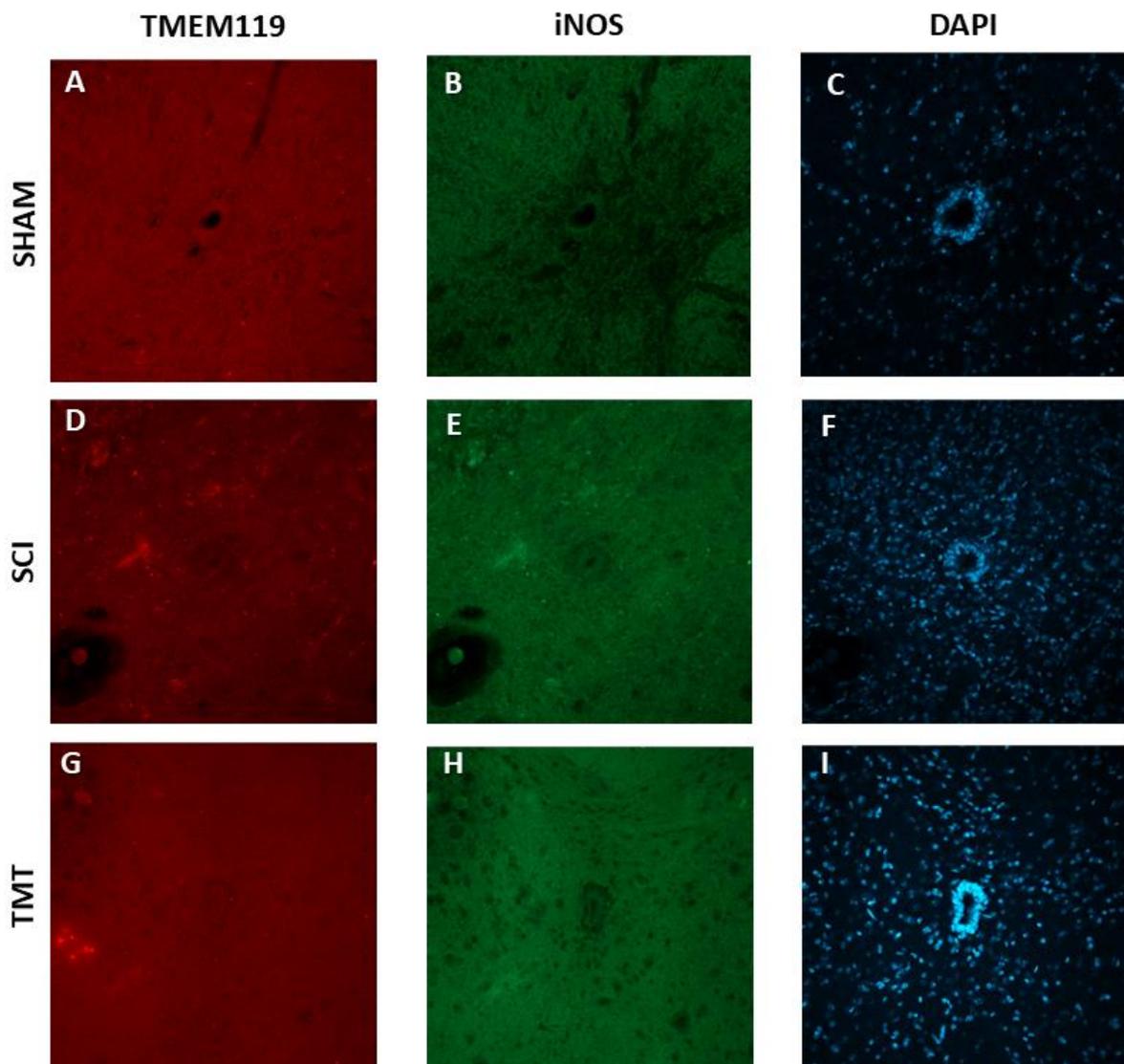
Figura 21 - Análise qualitativa e quantitativa TMEM+Arginase.

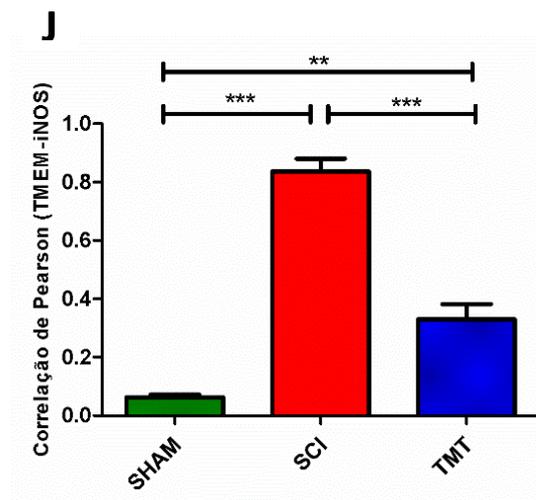


Em A, D e G, marcações para TMEM119 (marcador de população geral de microglia). Em B, E e H, marcações para Arginase (marcador de população microglial de perfil M2), pela correlação de Pearson. Destaca-se a relação aumentada da população geral de microglia para o perfil M2 no grupo TMT. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$. $n = 3/\text{grupo}$.

Em relação a quantificação TMEM+iNOS, o grupo SCI obteve uma maior correlação entre as marcações ($0,836\pm 0,43$), demonstrando possuir uma maior população pró-inflamatória, com a prevalência do perfil M2. Em contrapartida, o grupo TMT ($0,33\pm 0,49$) apresentou uma menor correlação, demonstrando efeitos benéficos do exercício em relação à modulação do perfil pró-inflamatório (Figura 22). Houve diferença estatística significativa entre estes grupos.

Figura 22 - Análise qualitativa e quantitativa TMEM+iNOS

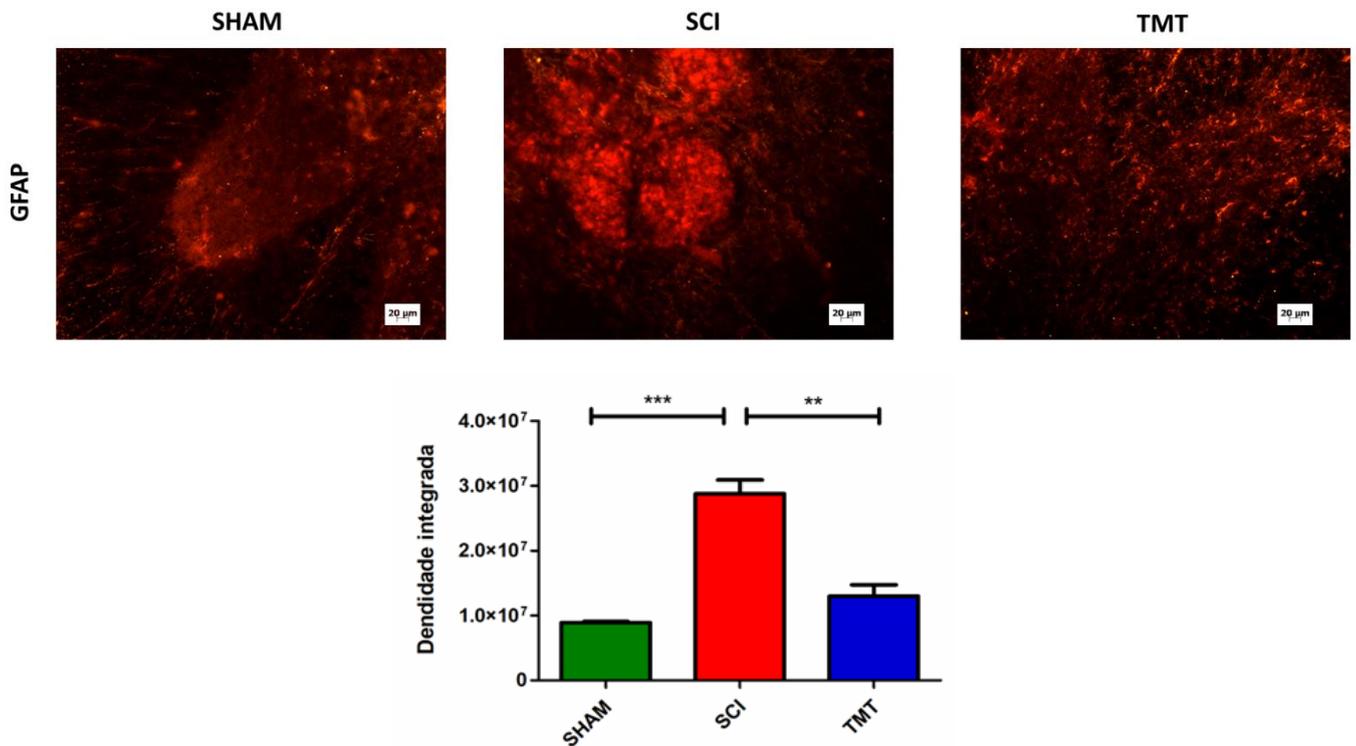




Em (a), (d) e (g), marcações para TMEM119 (marcador de população geral de microglia). Em (b), (e) e (h), marcações para iNOS (marcador de população microglial de perfil M1), pela correlação de Pearson. Destaca-se a relação aumentada da população geral de microglia para o perfil M1 no grupo SCI. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$. $n = 3/\text{grupo}$.

A fim de analisarmos o comportamento de outra importante célula da glia, o astrócito, dentro do contexto da sua participação na formação da cicatriz glial, foi realizada a marcação para GFAP. Foi utilizada a quantificação da densidade integrada de cortes transversais imunomarcados com a proteína de interesse. Neste contexto, a marcação do grupo TMT foi menor que a do grupo SCI ($p > 0,01$), com presença de diferença estatística significativa entre estes grupos, demonstrando que o exercício induziria a uma atividade regulatória dos astrócitos reativos, favorecendo a uma maior modulação da formação da cicatriz glial, auxiliando a plasticidade nervosa (Figura 23).

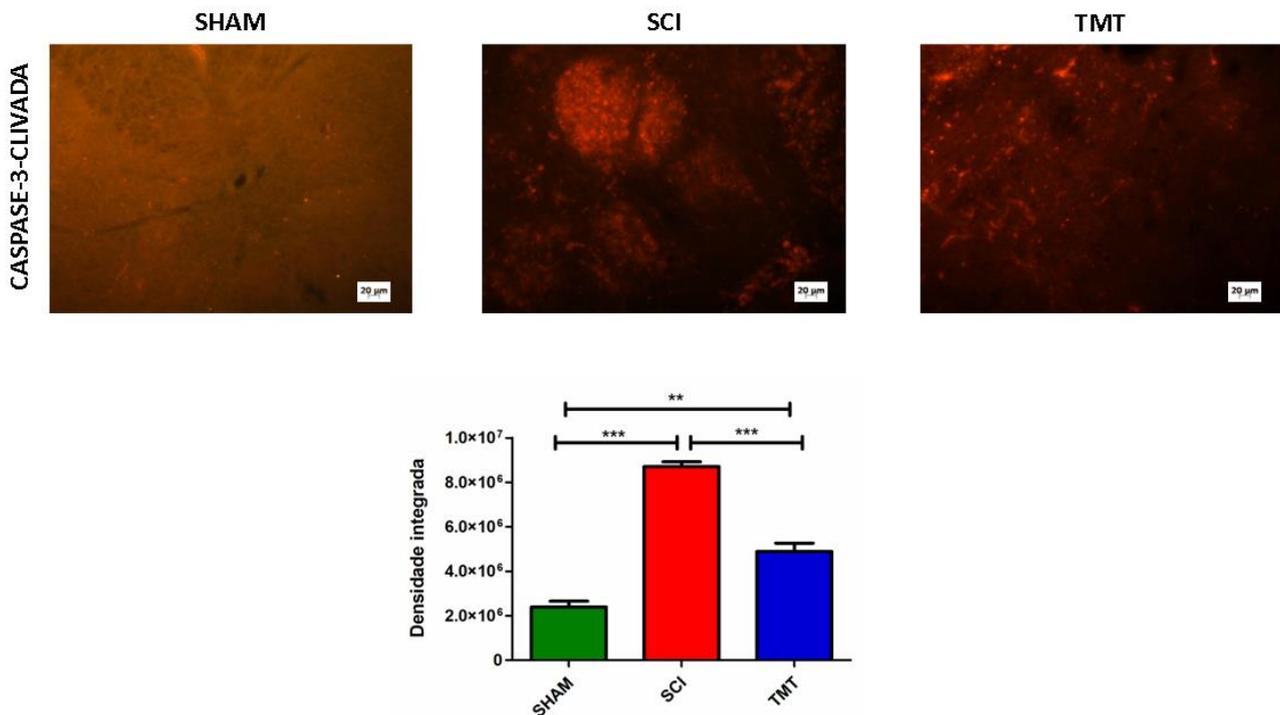
Figura 23 - Análise qualitativa e quantitativa GFAP.



Os grupos foram avaliados, a partir da densidade integrada, para análise da área de marcação de GFAP, a fim de avaliar a área de formação de cicatriz glial. Destaca-se a maior densidade de marcação para o grupo SCI, em contrapartida ao grupo TMT. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$. $n = 3/\text{grupo}$.

No contexto de sobrevivência celular, avaliamos o nível de ativação de morte celular por meio da marcação por Caspase-3-clivada, que é descrita como uma enzima que atua na apoptose e é amplamente utilizada para marcação da ativação da atividade apoptótica. Ao avaliarmos os grupos, percebemos uma menor marcação de densidade integrada no grupo TMT ($p > 0,001$) quando comparada ao grupo SCI, com presença de diferença estatística significativa entre estes grupos. Este dado pode direcionar para os benefícios do exercício em relação à sobrevivência celular diante de um processo de lesão, como o trauma medular (Figura 24).

Figura 24 - Análise qualitativa e quantitativa Caspase-3-clivada.

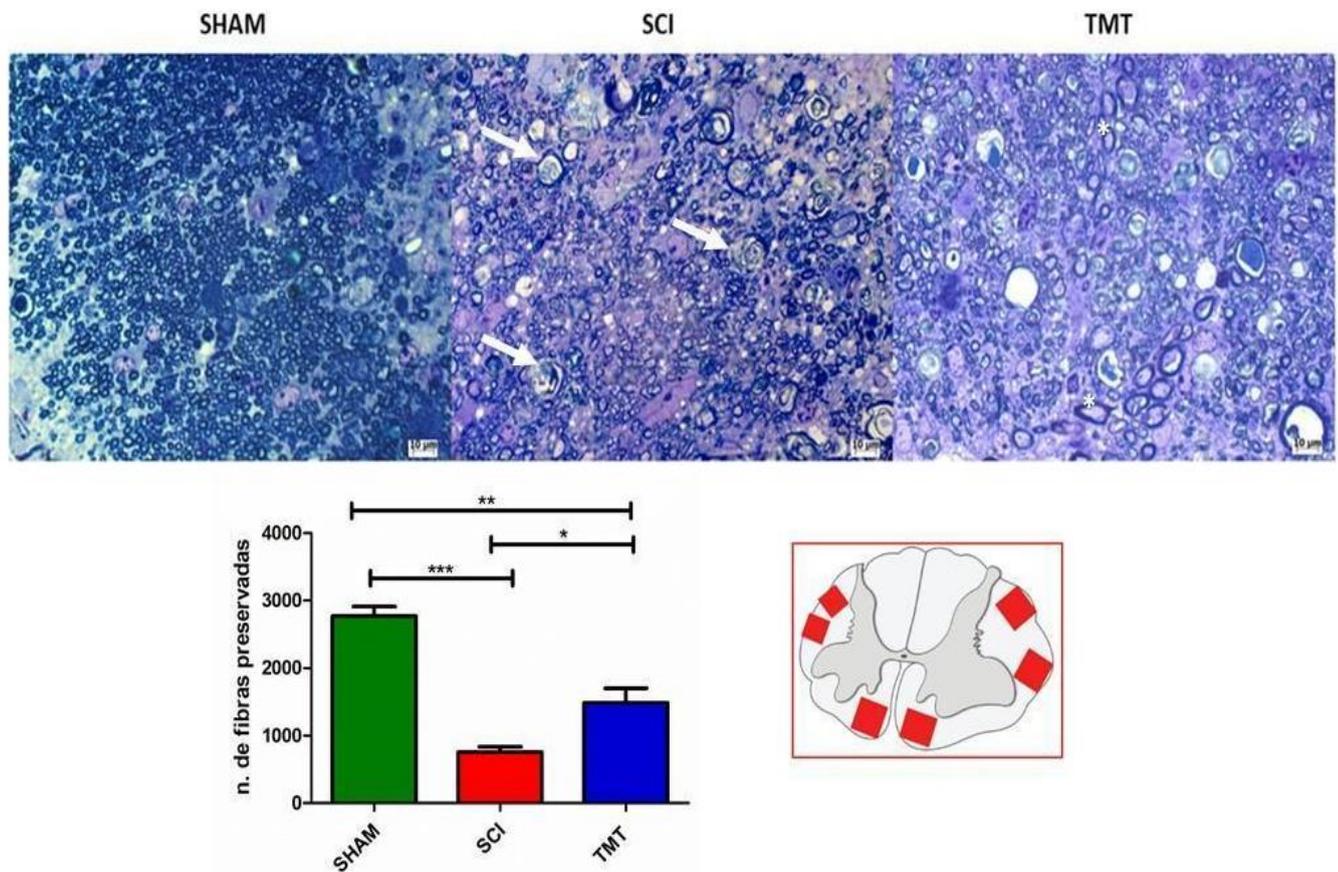


Os grupos foram avaliados, a partir da densidade integrada, para marcação de Caspase-3-clivada, a fim de avaliar a área de formação de cicatriz glial. Destaca-se a maior densidade de marcação para o grupo SCI, em contrapartida ao grupo TMT, demonstrando uma diferença estatística significativa entre os grupos. Análise estatística: one-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. Valores: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$. $n = 3/\text{grupo}$.

4.1.9 Avaliação de cortes semifinos (G ratio)

A partir dos cortes transversais semi finos, corados com azul de toluidina, analisamos a distribuição das fibras mielínicas nos grupos estudados. Qualitativamente, a análise revelou que o grupo SCI exibiu maior desorganização tecidual, presença de pequenas cavitações na substância branca e inúmeras fibras nervosas ainda em degeneração, quando comparados ao grupo TMT. O grupo TMT, 56 dias após a lesão, apresentou maior número de fibras mielínicas preservadas ($1658 \pm 73,58$) quando comparado ao outro grupos SCI ($199,7 \pm 20,66$, * $p < 0,05$) (Figura 25).

Figura 25 - Análise qualitativa e quantitativa da região de funículo antero-lateral da ME, 56 dias após lesão.



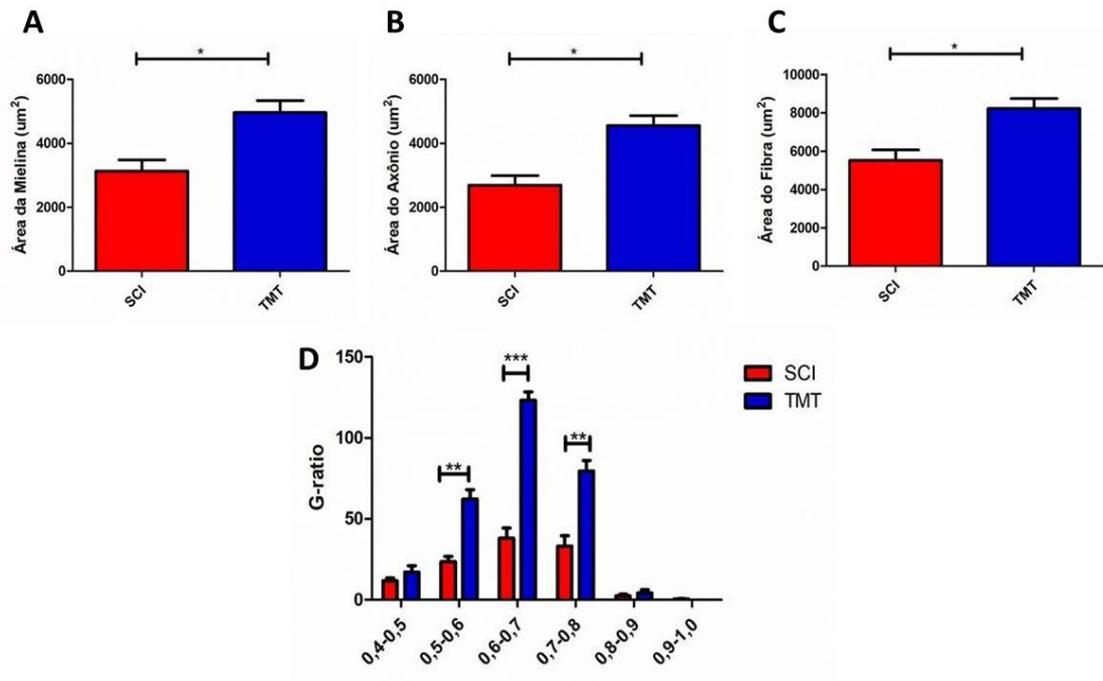
Cortes transversais semifinos corados com azul de toluidina, denominados pelo grupo pertencente. Grupo SHAM exibindo a organização típica da área de substância branca na medula espinal (ME) íntegra. Observe várias fibras mielínicas em degeneração (setas) e a desorganização tecidual maior no grupo SCI, quando comparado ao grupo tratado TMT, que exibe fibras preservadas de diferentes calibres (asteriscos). Gráfico de barra mostrando a média do número de fibras mielínicas preservadas por grupo. Os grupos tratados obtiveram maior quantidade de fibras mielínicas preservadas em relação aos controles. Esquema da ME mostrando as 6 regiões para captura da imagem ao microscópio de luz para quantificação das fibras mielínicas. Barra de Escala= 100 μ m. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Análise Estatística: One-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. $n=3$ /grupo.

Para análise da razão-G, quantificamos a área da mielina, a área da fibra e do axônio com o programa ImageJ. Em relação a área de mielina, o grupo TMT ($4963\pm 37,76$, $p<0,05$) apresentou uma diferença estatística significativa quando comparado ao grupo SCI ($3130\pm 36,63$) (Figura 26A). O grupo TMT apresentou valores maiores em relação a área de axônios em relação ao SCI (respectivamente SCI $2694\pm 136,0$ e TMT $4558\pm 111,3$, $p<0,05$) (Figura 26B). Na Figura 26C, houve diferença entre os grupos analisados ($p<0,05$) referente à área da fibra (SCI $5516\pm 136,0$ e TMT $8223\pm 111,3$).

A Figura 26D mostra o gráfico com os resultados estratificados da razão-G. A maioria dos valores para o grupo TMT estão na faixa de 0.6-0.8, o que é um excelente resultado, visto que a razão-G ótima para a ME é de 0.79 (Chomiak e Hu, 2009). O número de fibras na faixa

de 0,6-0,7, o grupo TMT ($123,2 \pm 7,000$, $p < 0,001$) foi estatisticamente diferente em relação ao grupo SCI ($38 \pm 8,667$). Na faixa de 0,5-0,6 e 0,7-0,8, o grupo TMT demonstrou uma diferença estatística significativa em relação ao SCI ($p < 0,01$).

Figura 26 - Análises morfométricas da medula espinal.

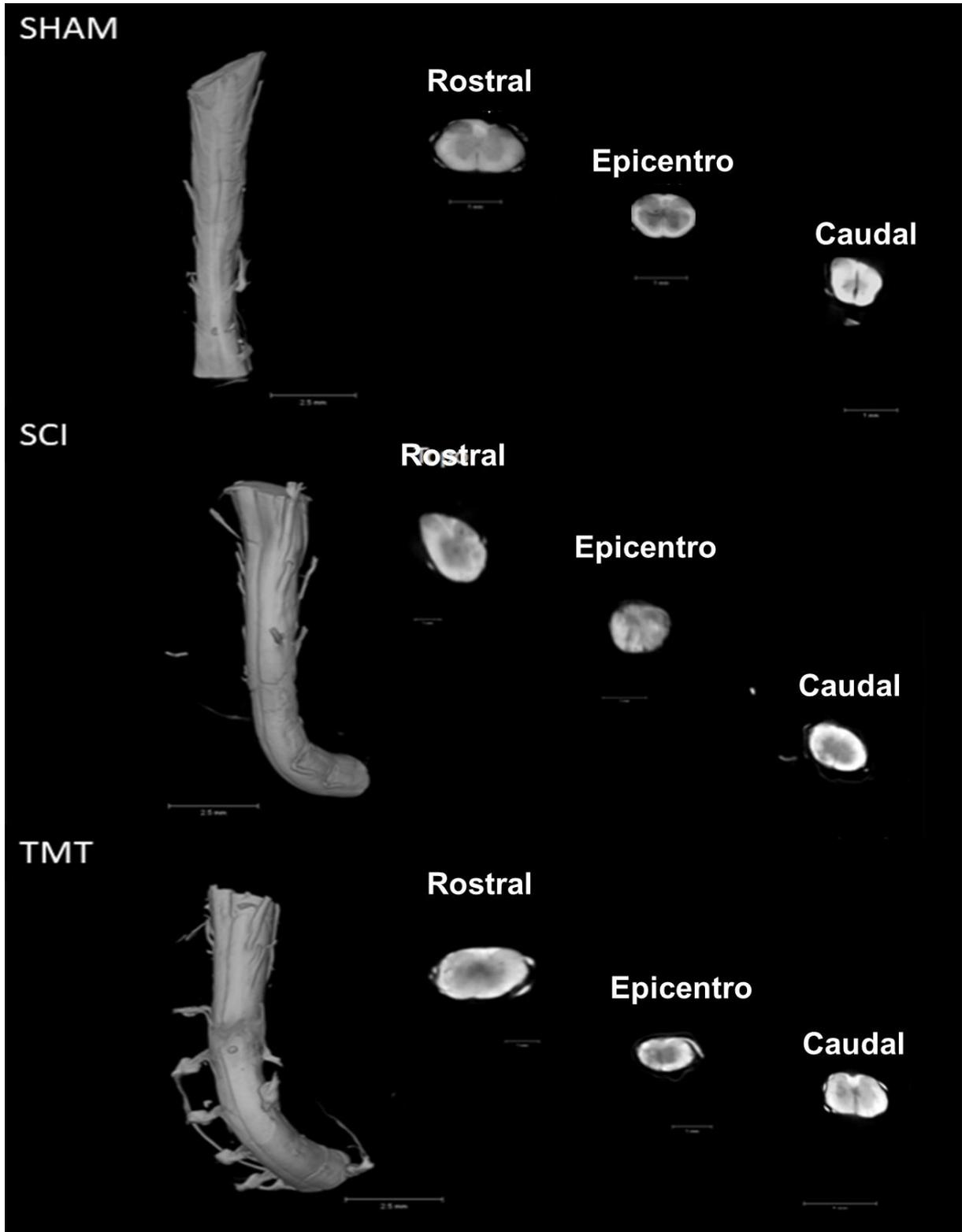


Área da fibra nervosa (a); Área da mielina (b); Área do axônio (c). Estratificação por faixas dos valores da razão G (d). Todos os grupos exibiram maioria das fibras na faixa entre 0,5-0,8 μm. O grupo TMT apresentou um desvio do gráfico para a esquerda, exibindo mais fibras na faixa entre 0,6-0,8. Valores representam média ± EPM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Análise Estatística: Two-way ANOVA e Pós teste Bonferroni, $n=5$ /por grupo. Fonte: A autora, 2024.

4.1.9 Análise da microtomografia

A microtomografia revelou-se uma técnica importante para avaliar o impacto deste modelo de lesão na destruição do tecido da medula espinal e observar de forma tridimensional a resposta regenerativa. Podemos observar na Figura 27, a montagem em 2D da medula e os cortes transversais da região rostral (topo), epicentro da lesão (meio) e caudal (base), em todos os grupos após 56 dias. Pela organização nos cortes transversais, observa-se, qualitativamente, uma organização da substância branca mais preservada no grupo TMT, quando comparado ao SCI, sendo esse o grupo mais próximo da organização do grupo SHAM.

Figura 27 - Representação medular após microtomografia nos grupos SHAM, SCI e TMT, com 56 dias após a lesão.

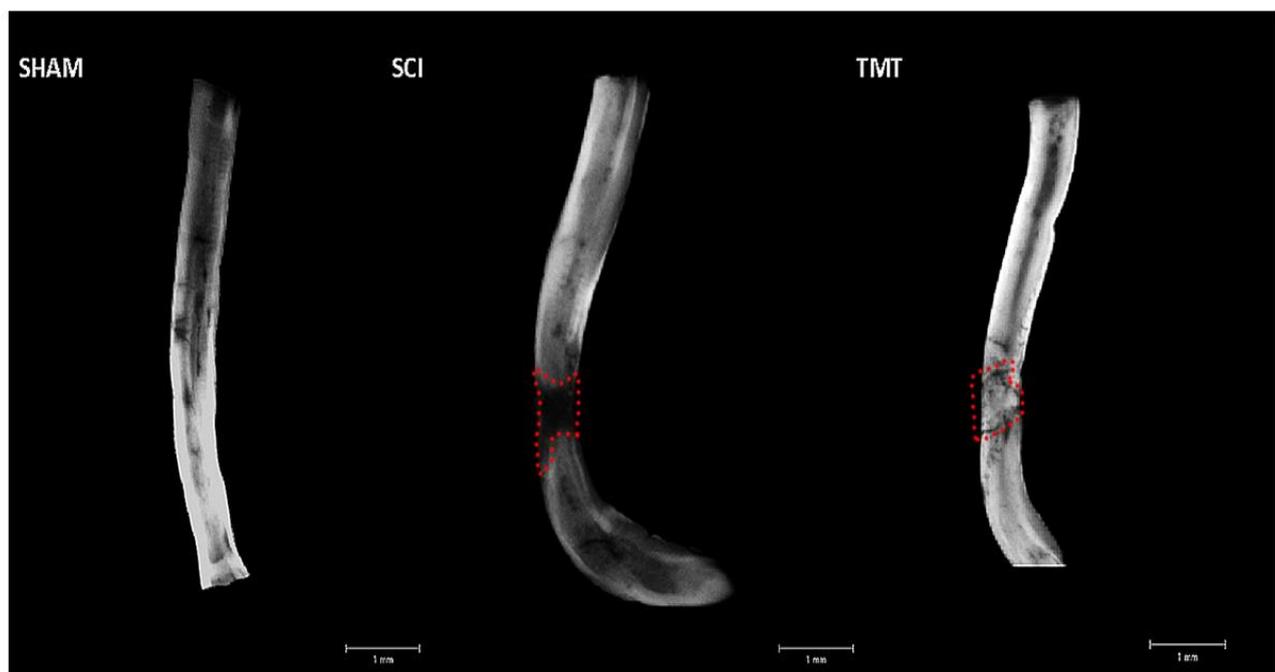


Para cada grupo, podemos perceber o modelo em 2D (à esquerda da imagem) e o corte transversal (à direita da imagem). Escala: 2.5m (medula completa) e 1 mm (corte transversal) (n=3/grupo). Fonte: A autora, 2024.

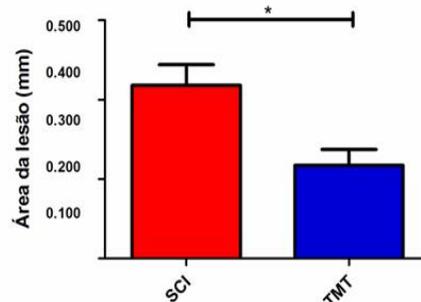
Quanto à extensão da área da lesão, foram realizadas 3 análises por grupo, de forma a averiguar uma média da área (espalhamento rostral e caudal) (Figura 28A) da lesão por cada animal/grupo. Quanto maior a área, podemos averiguar que pode-se ter um maior repercussão inflamatória, com relação aos danos secundários já citados anteriormente. O grupo SCI ($p > 0,05$) apresentou uma maior área de lesão quando comparado ao grupo TMT, o que demonstra que o exercício tem um potencial de capacidade protetora (Figura 28B).

Figura 28 - Representação longitudinal das medulas nos grupos pela micrografia, com 56 dias após a lesão.

A



B

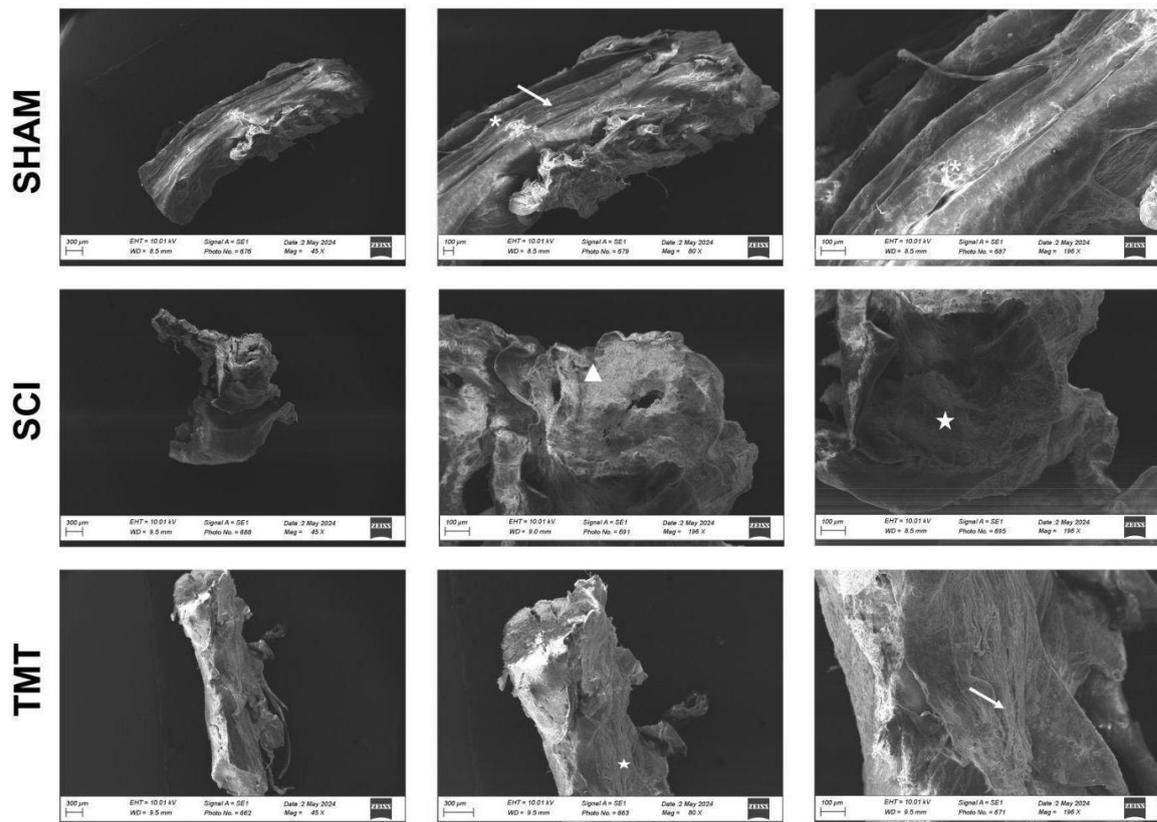


Micrografia dos grupos SHAM, SCI e TMT (a). Neste eixo, podemos observar a demarcação da área de lesão (círculo vermelho). Escala: 2.5mm (corte transversal). Gráfico de barras para comparação da área da lesão (mm²) entre SCI e TMT (b). Observa-se uma diferença estatística significativa entre os grupos. Análise estatística: One-way ANOVA e Pós-teste Tukey's. * $p < 0,05$. $n = 3$. Fonte: A autora, 2024.

4.1.10 Análise da microscopia de varredura

Para verificar as características gerais da topografia medular após a lesão, realizamos a avaliação do grupo SHAM, enquanto parâmetro de normalidade, e dos grupos SCI e TMT (Figura 29), nos aumentos de 45x, 80x e 196x, respectivamente em cada coluna. Ao analisarmos qualitativamente a medula do grupo SHAM, podemos observar a orientação e organização dos tratos intactos (seta), bem como a vascularização íntegra (asterisco). No grupo SCI, é possível perceber a desorganização do H medular (cabeça de seta) e uma região cavitária (estrela). No grupo TMT, a região cavitária se demonstra, qualitativamente, com menor área, demonstrando maior preservação nervosa (estrela) e com melhor visualização dos tratos (seta).

Figura 29 - Representação das medulas nos grupos, pela microscopia de varredura, com 56 dias após a lesão.



Microscopia de varredura dos grupos SHAM, SCI e TMT, com 56 dias após a lesão. Escala de 300 μm (45x e 80x) e 100 μm (196x). Fonte: A autora, 2024.

5. Discussão

Apesar dos avanços tecnológicos e ensaios clínicos, as possibilidades terapêuticas disponíveis e relevantes para os pacientes com lesão de ME ainda é muito reduzida e se apresenta como um desafio para clínicos e pesquisadores. No nosso estudo, investigamos, do ponto de vista funcional, morfológico e bioquímico, o uso da atividade física, que já é uma realidade terapêutica aplicada, mas que precisa ter seus mecanismos bem trabalhados, principalmente no que se diz respeito de imunomodulação, plasticidade e preservação neuromuscular, para melhor direcionamento na clínica. Portanto, estudos experimentais com variáveis controladas são necessários para investigação.

5.1 Terapia: treinamento físico em esteira ergométrica

A fisiopatologia da lesão medular consiste em um evento primário que causa morte de células neurais e interrupção das conexões axonais. A LME resulta de mecanismos de lesão primários e secundários. A lesão primária refere-se à lesão física imediata na medula espinal como consequência de laceração, contusão, compressão e contração do tecido neural (Mietto *et al.*, 2015). A lesão secundária já está relacionada à sequelas que incluem alterações como ruptura da barreira hematoencefálica, penetração de proteínas séricas na medula espinal, respostas inflamatórias (alterações nas quimiocinas e citocinas) com a atividade glial gerando recrutamento inflamatório para o sítio da lesão, eventos vasculares como hemorragia, edema e isquemia, apoptose, excitotoxicidade, produção de radicais livres/peroxidação lipídica e desequilíbrio de metaloproteinases ativadas (de Almeida *et al.*, 2023). Essas alterações levam à desmielinização, necrose e apoptose do parênquima medular (Dumont *et al.*, 2001; Hejrati e Fehlings, 2021).

Estas alterações justificam a dificuldade na regeneração atribuída principalmente ao microambiente hostil da medula lesionada (Kamada *et al.*, 2005; Yiu e He, 2006; Ren *et al.*, 2023). Sendo assim, um dos maiores desafios da pesquisa é alinhar protocolos de terapias a fim de efetivar a modulação do microambiente pós lesão.

O treino locomotor com esteira ergométrica e suporte parcial de peso em pacientes com lesão medular já é uma realidade na prática clínica e tem sido alvo de muitas pesquisas na área (Van de Bran *et al.*, 2012). A recuperação funcional locomotora foi determinada utilizando os escores BMS e nos dados Teste de Caminhada em Escada Horizontal (Ladder Walking Teste).

Nossos dados mostraram que o grupo TMT, que passou pelo treinamento em esteira obteve um melhor desempenho e retorno motor, atingindo fase intermediária no score BMS e demonstrando maior ganho de passos totais/corretos no LWT. Esses resultados estão em concordância com estudos anteriores em que os animais submetidos ao treino em esteira após lesão medular apresentam ganhos funcionais expressivos em fases tardias da análise, inclusive em relação ao retorno de sensibilidade tátil (subaguda e crônica) (Ilha *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2018; Massoto *et al.*, 2020).

Estes dados também entram em concordância com pesquisas anteriores com humanos. Em 2012, Buehner e colaboradores observaram que o treino em esteira com suporte de peso, em pacientes humanos com lesão incompleta, como do nosso modelo, representou uma mudança de classe na escala da ASIA de B para C e de C para D, que classifica os pacientes de acordo com a severidade da lesão. Além disso, houve um aumento de 28% para 47% dos pacientes que atingiram a marcha comunitária sem auxílio, o que significa um grande ganho para a independência desses indivíduos.

Em nosso estudo, o grupo TMT apresentou melhor amplitude e latência do PAMC por estudo eletroneuromiográfico, quando comparado ao grupo SCI, assim como, maior preservação na quantidade de fibras nervosas mielínicas nas regiões de funículos, quando comparado ao TMT. E esta maior preservação tecidual pode responder pela condução adequada e maior recrutamento muscular no PAMC (refletido na amplitude da curva), sugerindo portanto que os benefícios do exercício possam estar relacionado à maior preservação estrutural e otimização da condução e propagação do potencial de ação e recrutamento muscular, conforme dissertado por Marques e colaboradores (2009). O treinamento de passos que fornece uma carga alternada dos membros e passos rítmicos e repetitivos pode estimular a atividade neural e melhorar os padrões ENMG e a amplitude (Ward *et al.*, 2016), gerando congruência com os resultados do BMS e LWT.

Marques *et al.*, (2018) mostraram que o treinamento locomotor trouxe preservação de áreas de fibras musculares, assim como nossos dados. Cobianchi e colaboradores (2017) verificaram que a atividade física tem um impacto significativo na produção de neurotrofinas, pois alguns dias de exercício aumentam os níveis de BDNF e NT-3 nos músculos. Além disso, em seu trabalho, relataram que a expressão de GDNF (fator neurotrófico derivado das células da glia) no músculo esquelético parece ser produzida diretamente pelo estiramento, enquanto a despolarização da membrana pela acetilcolina (ACh) diminui seu conteúdo. A expressão de GDNF aumenta nos músculos e na medula espinal após exercícios em esteira e induz alterações

morfológicas nas junções neuromusculares (JNM) que são dependentes de atividade, incluindo aumento da atividade metabólica muscular (Brazg *et al.*, 2017). Portanto, o retorno funcional pode ser correlacionado à preservação de massa muscular, como percebida nos nossos dados, tanto do músculo sóleo quanto gastrocnêmio, também verificados anteriormente em trabalhos do nosso grupo (Santos *et al.*, 2024).

Além disso, foi possível avaliar mais intimamente a interação treinamento com recuperação neuromuscular a partir da análise das JNM. Segundo Li *et al.*, (2020), as JNM são um tipo de sinapse periférica que transmite eficientemente informações dos nervos motores para as fibras musculares e auxiliam na estimulação neuronal para induzir contrações musculares.

Sendo assim, conforme há preservação neural, menor a atrofia muscular e, conseqüentemente, maior preservação de junções (Jones *et al.*, 2016; Cobianchi *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que o número de junções musculares, tanto no sóleo quanto no gastrocnêmio, foi maior no grupo TMT, demonstrando a capacidade de preservação de fibras musculares atreladas ao número de junções diante do protocolo de exercício empregado. Esse dado também corrobora o dado da ENMG, onde a neurotransmissão são direcionadas para a junção neuromuscular, resultando finalmente em contração do músculo esquelético e resposta efetiva (Jung *et al.*, 2016; Cobianchi *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2024).

5.2 Exercício, neuroinflamação e lesão medular

5.2.1 Neuroinflamação avaliada pelas citocinas inflamatórias

Nossos dados demonstraram um aumento dos níveis de citocinas anti inflamatórias no grupo TMT com o exercício e um menor nível de citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados sinalizam a importância neuroprotetora do exercício com capacidade de prevenir e modular condições inflamatórias (Di Penta *et al.*, 2004). Embora existam vários efeitos positivos da inflamação após a LME, a contínua e persistente infiltração de células imunológicas é o principal contribuinte para a degeneração neural (Garcia *et al.*, 2016), diversos estudos descrevem menor incidência de inflamação sistêmica de baixo grau, bem como neurodegeneração e declínio cognitivo em indivíduos que praticam atividades físicas regularmente (Colbert *et al.*, 2004; Yong *et al.*, 2019).

A neuroinflamação é mediada comumente pela microglia no SNC. Ela é reconhecida por terem uma enorme gama de funções e podem existir como membros de um de dois

subtipos: como células com funções pró-inflamatórias e potencialmente tóxicas (M1) ou como células com funções anti-inflamatórias/reguladoras e funções reparativas (M2) (Mishra *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2023), com a liberação de fatores neurotróficos e de crescimento, por exemplo. O exercício, portanto, poderia modular suas atividades e favorecer o fenótipo anti-inflamatório (Massoto *et al.*, 2020).

Segundo Petersen *et al.* (2004), o exercício agudo pode promover ou reduzir a inflamação, impactando a cascata inflamatória e aumentando com intensidade a liberação de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, como por exemplo, reduzindo níveis de interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 β (IL-1 β), proteína C reativa (PCR) e níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral α (TNF α), ligando o exercício crônico aos efeitos anti-inflamatórios. A deficiência de IL-1 β suprime o desenvolvimento da lesão, promove a plasticidade axonal e melhora os resultados neurológicos (Boato *et al.*, 2013).

Os efeitos duradouros do exercício crônico podem ser atribuídos à regulação da inflamação provocada por episódios agudos de exercício, que é parcialmente influenciada pela IL-6. IL-6 é uma citocina capaz de exercer efeitos pró e anti-inflamatórios no tecido periférico por meio de células T, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e osteoblastos. Esta citocina tem um papel claro no controle metabólico das células musculares e é liberada em resposta à contração muscular excêntrica (Febbraio *et al.*, 2002).

Durante a atividade física moderada, como modulada no nosso experimento de acordo com a fase clínica pós-lesão (aguda, subaguda e crônica), é possível liberar IL-6 nos músculos. Portanto, determinados níveis moderados de IL-6 podem direcionar esta atividade. Concentrações adequadas, não exacerbadas de IL-6, estimulam a circulação das citocinas anti-inflamatórias IL-1 α e IL-10 e também podem inibir a produção da citocina pró-inflamatória TNF α (Steensberg *et al.*, 2003; Cobianchi *et al.*, 2017). Além disso, IL-1 β e IL-6 induzem iNOS em astrócitos, micróglia, macrófagos e neurônios. A iNOS está altamente envolvida em processos inflamatórios, pois produz quantidades excessivas de moléculas de óxido nítrico (ON). O ON foi implicado na desmielinização e apoptose de células neuronais dependente de microglia (Anwar *et al.*, 2016).

Segundo Hellenbrand *et al.*, (2021), estas três citocinas inflamatórias, TNF, IL-1 e IL-6, que inclusive avaliamos no nosso estudo, foram estudadas extensivamente e são reguladas positivamente poucas horas após a lesão inicial. Esta produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias resulta em extensa infiltração de células imunes que continuam a produção de mediadores inflamatórios adicionais. Embora o grau de neuroinflamação dependa da extensão

do estímulo ou insulto primário, o insulto primário geralmente resulta em uma reação persistente do processo inflamatório após lesão do SNC, levando à morte celular adicional gradativa e a longo prazo.

Em contrapartida, o exercício influencia no controle de citocinas antiinflamatórias, evitando a inflamação prolongada. Kwiecien *et al.*, (2020) dissertou que em experimentos anteriores foi observado aumento geral de citocinas antiinflamatórias (IL-10 e IL-13), TGF- β 1 e fractalcina (CX3CL1) pós-LM, sugerindo que um processo anti inflamatório se desenvolve ao longo do tempo ao longo da astrogliose progressiva, a resposta reativa no SNC, em modelo de lesão medular traumática torácica. Astrócitos reativos estão associados à promoção da sobrevivência neuronal e à regulação da diferenciação de células-tronco neurais, no contexto da lesão medular, indicando uma associação com ações que restauram e preservam a homeostase após LME, além de refletir em menor formação da cicatriz glial (Clifford *et al.*, 2023), possibilitando maior plasticidade neural.

A IL-10 pode ser sintetizada por Th2, monócitos/macrófagos, astrócitos e microglia. Esta citocina suprime a resposta inflamatória de monócitos/macrófagos e a produção de múltiplas citocinas, moléculas de adesão celular, espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários de nitrogênio. Além disso, a IL-10 afeta a inflamação ativando micróglia/macrófagos e astrócitos e reduzindo a produção de IL-1 β e iNOS. Esta interleucina promove a sobrevivência neuronal e a recuperação funcional em modelos de LME em ratos e camundongos (Ren *et al.*, 2018).

Neste ambiente patológico, o treino físico específico poderá ser eficaz na redução ou prevenção da ativação da microglia, no perfil M1, e dos mecanismos inflamatórios e neuropáticos associados, bem como modulação de astrócitos. Os astrócitos ao redor da lesão tornam-se reativos e normalmente migram para o epicentro da lesão e auxiliam no processo de reparo tecidual (Okada *et al.*, 2017). No entanto, eventualmente se tornam astrócitos formadores da cicatriz glial, após LME, que produz inibidores de crescimento axonal e impede a regeneração axonal. Esta mudança fenotípica tem sido considerada unidirecional e irreversível, podendo-se perceber que a cicatriz glial é uma das principais causas da capacidade regenerativa limitada do SNC (Okada *et al.*, 2017). Nossos dados demonstraram que a modulação da cicatriz glial pelo exercício promove a neuroproteção e, portanto, favorece o remodelamento tecidual.

Conforme demonstrado por alguns estudos recentes (Cobianchi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020; Clifford *et al.*, 2023), a atividade física que causa neuroproteção após dano neural parece

ter um impacto significativo na inibição da reação pró-inflamatória microglial. Ao serem detectadas, as células microgliais proliferam e formam aglomerados espessos, com forma amebóide, e começam a fagocitar detritos celulares e materiais estranhos. Cascatas de sinalização complexas controlam a atividade microglial após lesões nervosas (Cobianchi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2022).

5.2.2 Neuroinflamação e alterações sistêmicas

A LM representa uma causa significativa de incapacidade e, dependendo da gravidade e do nível anatômico da lesão na medula espinal, os pacientes podem apresentar déficits neurológicos, incluindo a perda de funcionalidade do intestino e bexiga, bem como maior tendência à infecções do trato urinário (Eckert *et al.*, 2017; Ludwig *et al.*, 2017).

A função da bexiga depende do sistema nervoso central e periférico para a coordenação das fases de armazenamento e micção. A fisiopatologia da disfunção vesical pode ser descrita como uma alteração no reflexo da micção. Postula-se que se desenvolve um novo circuito reflexo espinal que é mediado pelas fibras C como resposta à reorganização das conexões sinápticas na medula. Isso é responsável pelo desenvolvimento da hiperatividade neurogênica do detrusor. Vários hormônios neurotróficos afetam as alterações morfológicas e fisiológicas dos neurônios aferentes da bexiga, levando à disfunção neuropática da bexiga (Hamid *et al.*, 2018).

No nosso estudo, realizamos uma avaliação morfológica e tecidual da parede da bexiga de cada grupo. O grupo TMT demonstrou um perfil de parede semelhante ao grupo SHAM, demonstrando que o exercício pode ter influenciado na regulação da atividade imunológica local, com menor infiltrado inflamatório, e nos eventos de remodelamento muscular, efetivando o retorno funcional da bexiga.

Após a LME, a disúria a longo prazo e a retenção de urina levam à hipertrofia da parede da bexiga com uma alta proporção de colágeno para músculo (Ren *et al.*, 2023). Sendo assim, a espessura da bexiga está relacionada com a recuperação da função da bexiga, e que o mecanismo pode causar alterações na atividade eferente alterada da fibra C na expressão de alguns receptores de proteínas (Wada *et al.*, 2022).

Há ainda uma correlação importante, descrita na literatura, que entra em congruência com os nossos resultados. Otzel e colaboradores (2021), abordaram que a atrofia do músculo esquelético, que é uma marca registrada da lesão grave da medula espinal, é precipitada pelo

insulto neural e pela paralisia, e fatores, incluindo inflamação sistêmica, podem levar a perda de massa muscular. Sendo assim, infecções como, a do trato urinário, poderia intensificar os déficits oriundos da lesão medular, sendo necessário um foco importante em terapias que impactam na modulação da atividade vesical.

Este dado é importante inclusive no reflexo clínico em humanos, uma vez que o não retorno funcional, devido à atividade inflamatória e modulação tecidual, pode levar o paciente ao uso crônico de cateterismo vesical, sendo este um fator de risco importante para infecções do trato urinário, gerando internações de repetição e impactando da qualidade de vida dos pacientes (Ward *et al.*, 2016; Kinner *et al.*, 2019). Sendo assim, o exercício não somente está relacionado e demonstra alta importância com o retorno locomotor e sensitivo, como também das funções autônomas.

5.3 Exercício na regeneração nervosa, plasticidade e sobrevida celular

Nossos resultados funcionais combinados aos achados morfológicos nos levam a crer na importância da modulação do exercício na regeneração nervosa, plasticidade e sobrevida celular. O grupo TMT obteve bons resultados funcionais de modo a relacionar que o estímulo sensorial e proprioceptivo gerado por esse treino pode ter desencadeado uma reorganização e plasticidade envolvendo os circuitos neuronais de comando cortical, assim como foi observado no estudo de van den Brand e colaboradores de 2012.

Este trabalho mostra a capacidade de remodelação de projeções de tratos corticais e a promoção de extensiva plasticidade e recuperação locomotora, contribuindo significativamente para o controle do movimento voluntário, a partir do uso de um protocolo de reabilitação. Além disso, o exercício pós-lesão regula positivamente a produção de fatores neurotróficos e diminui as proteínas caspases na medula espinal (Cobianchi *et al.*, 2017), sugerindo um efeito positivo na sobrevivência e regeneração dos neurônios, em consonância com uma melhor modulação do microambiente inflamatório. Essa melhor organização pós-lesão e diminuição do espalhamento da área lesional foi possível de ser averiguada e confirmada pelos dados da microtomografia, onde o grupo TMT demonstrou melhor organização de substância cinzenta e menor extensão da área da lesão.

As análises morfológicas da quantidade do número de fibras mostraram resultados interessantes no grupo TMT. A análise da razão G evidenciou maior número de fibras nos intervalos de 0,6-0,7 e de 0,7- 0,8 e áreas de axônio maiores em relação ao grupo SCI. Esses resultados corroboram dados da literatura que mostram os benefícios da atividade física ao

promover sobrevivência neuronal e resistência do SNC a lesões com diminuição da formação de radicais livres (Carro *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2022). A introdução de um protocolo com treinamento em esteira, na fase aguda da lesão, com modulação da intensidade e volume do exercício de acordo com a fase clínica, melhorou a regeneração e o padrão de mielinização e funcionalidade das fibras nervosas (Massoto *et al.*, 2020).

Além disso, a terapia escolhida promoveu um controle motor mais refinado com provável reorganização de tratos motores, conforme visualizada na microscopia de varredura, bem como a diminuição do espalhamento da lesão, rostral e caudal, segundo visualizado na microtomografia. Esse achado provavelmente é devido a influência do exercício em regular o microambiente inflamatório, via modulação de citocinas, como visto no tópico anterior (Cobianchi *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2021).

Sendo assim, esta estratégia é promissora em auxiliar no processo regenerativo de lesões nervosas centrais, podendo ser um foco terapêutico pertinente e trazer benefícios para pacientes com lesões medulares.

6. Conclusões

- Para a aceleração da recuperação funcional e melhor regeneração/preservação tecidual, é necessário que seja adequada a intensidade do exercício de acordo com a janela temporal após a lesão, tendo um efeito positivo quando iniciado na fase aguda (7 dias após a lesão). Essa perspectiva pode ser visualizada com o retorno funcional motor e sensitivo.
- Os testes funcionais, na ENMG, na avaliação de preservação muscular, demonstrando-se eficiente para antecipar a recuperação motora dos animais e promover um maior controle motor.
- A terapia utilizada possui um importante efeito imunomodulatório, diante da análise do comportamento inflamatório, vide ELISA, microtomografia e microscopia de varredura. Isso demonstra o efeito neuroprotetor e antiinflamatório na terapia utilizada.
- A estratégia testada foi capaz de aumentar a quantidade o número de fibras mielínicas e da razão G, otimizando a regeneração nervosa e a plasticidade.

Referências

- ÆSØY, Mathias S. *et al.* Epidemiology of persistent Iatrogenic Spinal cord injuries in Western Norway. **Brain And Behavior**, V. 6, N. 10, P. E00522, 2016.
- ALKA K, MOHAMMAD G, KOWLURU RA. Regulation of serine palmitoyl-transferase and Rac1-Nox2 signaling in diabetic retinopathy. **Sci Rep**. 2022 Oct 6;12(1):16740. doi: 10.1038/s41598-022-20243-2. PMID: 36202842; PMCID: PMC9537524.
- AHUJA, Akash *et al.* Functional role of ginseng-derived compounds in cancer. **Journal Of Ginseng Research**, V. 42, N. 3, P. 248-254, 2018.
- ANJUM A, YAZID MD, FAUZI Daud M, et al. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. **Int J Mol Sci**. 2020 Oct 13;21(20):7533. doi: 10.3390/ijms21207533. PMID: 33066029; PMCID: PMC7589539.
- ANWAR MA, AL SHEHABI TS, EID AH Inflamogênese da lesão medular secundária. *Frente. Célula. Neurosci*. 2016; 10:98 . DOI: 10.3389/FNCEL.2016.00098
- BASSO, D. Michele *et al.* Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. **Cell Reports**, V. 43, N. 2, 2006.
- BEAUMONT, Eric *et al.* Passive exercise and fetal spinal cord transplant both help to restore motoneuronal properties after spinal cord transection in rats. **Muscle & nerve: official journal of the american association of electrodiagnostic medicine**, V. 29, N. 2, P. 234-242, 2004.
- BOATO F., ROSENBERGER K., NELISSEN S., GEBOES L., PETERS EM, NITSCH R., HENDRIX S. A ausência de il-1 β afeta positivamente o resultado neurológico, o desenvolvimento de lesões e a plasticidade axonal após lesão medular. **J. Neuroinflamação**. 2013; 10 :792. DOI: 10.1186/1742-2094-10-6.
- BRAZG G, Fahey M, Holleran CL, Connolly M, Woodward J, Hennessy PW, Schmit BD, Hornby TG. Effects of Training Intensity on Locomotor Performance in Individuals With Chronic Spinal Cord Injury: A Randomized Crossover Study. **Neurorehabil Neural Repair**. 2017 Oct-Nov;31(10-11):944-954. doi: 10.1177/1545968317731538. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29081250; PMCID: PMC5729047.
- BUEHNER, J.J., Forrest, G.F., Schmidt-Read, M., White, S., Tansey, K., Basso, M. (2012) Relationship Between ASIA Examination and Functional Outcomes in the NeuroRecovery Network Locomotor Training Program. **Arch Phys Med Rehabil**. 2012; 93:1530-40.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci*. 2001 Aug 1;21(15):5678-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-15-05678.2001. PMID: 11466439; PMCID: PMC6762673.

- CHEN GL, SUN K, LIU XZ, TONG KL, CHEN ZJ, YU L, CHEN NN, LIU SY. Inhibiting tau protein improves the recovery of spinal cord injury in rats by alleviating neuroinflammation and oxidative stress. **Neural Regen Res**. 2023 AUG;18(8):1834-1840. DOI: 10.4103/1673-5374.363183. PMID: 36751813; PMCID: PMC10154485.
- CHOI JW, Jo SW, Kim DE, Paik IY, Balakrishnan R. Aerobic exercise attenuates LPS-induced cognitive dysfunction by reducing oxidative stress, glial activation, and neuroinflammation. **Redox Biol**. 2024 May;71:103101. doi: 10.1016/j.redox.2024.103101. Epub 2024 Feb 22. PMID: 38408409; PMCID: PMC10904279.
- CHOMIAK, TAYLOR; HU, BIN. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. **Plos One**, V. 4, N. 11, P. E7754, 2009.
- CLAXTON, ANDREW R. *et al*. Predictors of hospital mortality and mechanical ventilation in patients with cervical spinal cord injury. **Canadian Journal Of Anaesthesia**, V. 45, P. 144-149, 1998.
- CLIFFORD T, FINKEL Z, RODRIGUEZ B, JOSEPH A, CAI L. CURRENT advancements in spinal cord injury research-glia scar formation and neural regeneration. **Cells**. 2023 MAR 9;12(6):853. DOI: 10.3390/CELLS12060853. PMID: 36980193; PMCID: PMC10046908.
- COBIANCHI S, Arbat-Plana A, Lopez-Alvarez VM, Navarro X. Neuroprotective Effects of Exercise Treatments After Injury: The Dual Role of Neurotrophic Factors. **Curr Neuropharmacol**. 2017;15(4):495-518. doi: 10.2174/1570159X14666160330105132. PMID: 27026050; PMCID: PMC5543672.
- COLBERT LH, VISSER M., SIMONSICK EM, TRACY RP, NEWMAN AB, KRITCHEVSKY SB, PAHOR M., TAAFFE DR, BRACH J., RUBIN S., HARRIS TB. Atividade física, exercício e marcadores inflamatórios em idosos: resultados do estudo de saúde, envelhecimento e composição corporal. **Geléia. Geriatria. Soc**. 2004; 52 (7):1098–1104.
- COLLAZOS-CASTRO, Jorge E.; LÓPEZ-DOLADO, Elisa; NIETO-SAMPEDRO, Manuel. Locomotor deficits and adaptive mechanisms after thoracic spinal cord contusion in the adult rat. **Journal of Neurotrauma**, V. 23, N. 1, P. 1-17, 2006.
- COURTINE, Gregoire *et al*. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. **Nature Medicine**, V. 14, N. 1, P. 69-74, 2008.
- DE ALMEIDA, Fernanda Martins *et al*. Molecular approaches for spinal cord injury treatment. **Neural Regeneration Research**, V. 18, N. 1, P. 23-30, 2023.
- DENG J, Meng F, Gao J, Zhang K, Liu Z, Li M, Liu X, Li J, Wang Y, Zhang L, Tang P. Early-phase rotator training impairs tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. **Heliyon**. 2023 Jul 12;9(7):e18158. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18158. PMID: 37519672;

PMCID: PMC10372239.

DIPENTA JM, JOHNSON JG, MURPHY RJ. Células Assassinas Naturais E Treinamento Físico Em Idosos: Uma Revisão. *Pode. J. Appl. Fisiol.* 2004; **29** (4):419–443.

DISABATO DJ, QUAN N, GODBOUT JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016;**139**(Suppl 2):136–153.

DUAN R, QU M, YUAN Y, LIN M, LIU T, HUANG W, GAO J, ZHANG M, YU X. Clinical Benefit of Rehabilitation Training in Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Spine* (Phila Pa 1976). 2021 Mar 15;46(6):E398-E410. doi: 10.1097/BRS.0000000000003789. PMID: 33620185.

DUMONT, RANDALL J. *et al.* Acute spinal cord injury, part i: pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, V. 24, N. 5, P. 254-264, 2001.

DUPONT Versteegden, Esther E. Et Al. Exercise-Induced Gene Expression In Soleus Muscle Is Dependent On Time After Spinal Cord Injury In Rats. *Muscle & Nerve: Official Journal Of The American Association Of Electrodiagnostic Medicine*, V. 29, N. 1, P. 73-81, 2004.

DURÇO DFPA, Pestana FM, Oliveira JT, Ramalho BDS, Souza LM, Cardoso FS, da Silva ICT, Marques SA, Domingues RC, Pereira CC, Borges CP, de Almeida FM, Baptista LS, Martinez AMB. Grafts of human adipose-derived stem cells into a biodegradable poly (acid lactic) conduit enhances sciatic nerve regeneration. *Brain Res.* 2020 Nov 15;1747:147026. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147026. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32750328.

ECKERT MJ, Martin MJ. Trauma: Spinal Cord Injury. *Surg Clin North Am.* 2017 Oct;97(5):1031-1045. doi: 10.1016/j.suc.2017.06.008. PMID: 28958356.

EDGERTON, V. REGGIE *et al.* Rehabilitative therapies after spinal cord injury. *Journal Of Neurotrauma*, V. 23, N. 3-4, P. 560-570, 2006.

ELI I, LERNER DP, GHOGAWALA Z. Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurol Clin.* 2021 May;39(2):471-488. doi: 10.1016/j.ncl.2021.02.004. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33896529.

ENDO, Teruaki *et al.* Early exercise in spinal cord injured rats induces allodynia through trkb signaling. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, V. 381, N. 3, P. 339-344, 2009.

FEBBRAIO MA, PEDERSEN BK. Interleucina-6 derivada do músculo: mecanismos de ativação e possíveis papéis biológicos. *Faseb J.* 2002; **16** (11):1335–1347.

FEHLINGS, Michael G.; VAWDA, Reaz. Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials. **Neurotherapeutics**, V. 8, N. 4, P. 704-720, 2011.

GARCIA E, AGUILAR-CEVALLOS J, SILVA-GARCIA R, IBARRA A. Ativação De Citocinas E Fatores De Crescimento In Vivo E In Vitro Após Lesão Medular. **Mediat Inflamm**. 2016; **2016** :9476020.

GAUDET, Andrew D. *et al.* Spinal cord injury in rats disrupts the circadian system. **Eneuro**, V. 5, N. 6, 2018.

GAZULA, Valeswara-Rao *et al.* Effects of limb exercise after spinal cord injury on motor neuron dendrite structure. **Journal of Comparative Neurology**, V. 476, N. 2, P. 130-145, 2004.

GENSEL, John C. *et al.* Toll-like receptors and dectin-1, a c-type lectin receptor, trigger divergent functions in cns macrophages. **Journal of Neuroscience**, V. 35, N. 27, P. 9966-9976, 2015.

GÓMARA-TOLDRÀ, Natàlia; SLIWINSKI, Martha; DIJKERS, Marcel P. Physical therapy after spinal cord injury: a systematic review of treatments focused on participation. **The journal of spinal cord medicine**, V. 37, N. 4, P. 371-379, 2014.

GÓMEZ-PINILLA, Fernando *et al.* Voluntary exercise induces a bdnf-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **Journal of Neurophysiology**, V. 88, N. 5, P. 2187-2195, 2002.

HAGG, Theo; OUDEGA, Martin. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, V. 23, N. 3-4, P. 263-280, 2006.

HAMID R, AVERBECK MA, CHIANG H, GARCIA A, AL MOUSA RT, OH SJ, PATEL A, PLATA M, DEL POPOLO G. Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury. **World J Urol**. 2018 OCT;36(10):1517-1527. DOI: 10.1007/S00345-018-2301-Z. EPUB 2018 MAY 11. PMID: 29752515.

HARKEMA, Susan J. *et al.* Human lumbosacral spinal cord interprets loading during stepping. **Journal of Neurophysiology**, V. 77, N. 2, P. 797-811, 1997.

HEJRATI, Nader, AND Michael G FEHLINGS. "commentary on "hemodynamic management of acute spinal cord injury"." **Neurospine** VOL. 18,1: 15-16, 2021.

HELLENBRAND DJ, QUINN CM, PIPER ZJ, MOREHOUSE CN, FIXEL JA, HANNA AS. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. **J Neuroinflammation**. 2021 DEC 7;18(1):284. DOI: 10.1186/S12974-021-02337-2. PMID: 34876174; PMCID: PMC8653609.

HESSE, S. *et al.* Treadmill training with partial body weight support compared with physiotherapy in nonambulatory hemiparetic patients. **Stroke**, V. 26, N. 6, P. 976-981, 1995.

HOULE, John D.; CÔTÉ, Marie-Pascale. Axon regeneration and exercise-dependent plasticity

after spinal cord injury. **Annals of The New York Academy of Sciences**, V. 1279, N. 1, P. 154-163, 2013.

HOULE, John D.; TESSLER, Alan. Repair of chronic spinal cord injury. **Experimental Neurology**, V. 182, N. 2, P. 247-260, 2003.

HUTCHINSON, Karen J. *et al.* Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. **Brain**, V. 127, N. 6, P. 1403-1414, 2004.

ILHA, Jocemar *et al.* Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, V. 22, N. 4, P. 355-366, 2008.

ILHA, Jocemar *et al.* The beneficial effects of treadmill step training on activity-dependent synaptic and cellular plasticity markers after complete spinal cord injury. **Neurochemical Research**, V. 36, P. 1046-1055, 2011.

JAMES SL, THEADOM A, ELLENBOGEN RG, BANNICK MS, MONTJOY-VENNING W, LUCCHESI LR, *et al.* Carga global, regional e nacional de lesão cerebral traumática e lesão medular, 1990–2016: uma análise sistemática para o Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol**. 2019; 18 :56–87. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30415-0.

JIANG B, *et al.* Prevalence, incidence, and external causes of traumatic spinal cord injury in China: a nationally representative cross-sectional survey. **Front. Neurol**. 2021;12:784647. doi: 10.3389/fneur.2021.784647.

JONES, ROSS A. *et al.* Nmj-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure–function relationships at the neuromuscular junction. **Open Biology**, V. 6, N. 12, P. 160240, 2016.

JUNG, Sun-Young; SEO, Tae-Beom; KIM, Dae-Young. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, V. 12, N. 4, P. 284, 2016.

JUNG, Sun-Young; SEO, Tae-Beom; KIM, Dae-Young. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. **Journal Of Exercise Rehabilitation**, V. 12, N. 4, P. 284, 2016.

KAMADA, Nobuhiko *et al.* Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in th1-dominant chronic colitis through excess production of il-12 and il-23 in response to bacteria. **The Journal of Immunology**, V. 175, N. 10, P. 6900-6908, 2005.

KEMI, Ole Johan *et al.* Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. **Journal of applied physiology**, v. 93, n. 4, p. 1301-1309, 2002.

KINNEAR N, BARNETT D, O'CALLAGHAN M, HORSELL K, GANI J, HENNESSEY D.

The impact of catheter-based bladder drainage method on urinary tract infection risk in spinal cord injury and neurogenic bladder: a systematic review. **NeuroUrol Urodyn.** 2020 FEB;39(2):854-862. DOI: 10.1002/NAU.24253. EPUB 2019 DEC 17. PMID: 31845396.

Kobravi HR, Moghimi A, Khodadadi Z. Effect of Treadmill Training Protocols on Locomotion Recovery in Spinalized Rats. *J Med Signals Sens.* 2017 Jan-Mar;7(1):53-57. PMID: 28487834; PMCID: PMC5394807.

KONDRATSKAYA, Elena *et al.* Locomotor central pattern generator excitability states and serotonin sensitivity after spontaneous recovery from a neonatal lumbar spinal cord injury. **BRAIN RESEARCH**, V. 1708, P. 10-19, 2019.

KWIECIEN, Jacek M. *et al.* Prolonged inflammation leads to ongoing damage after spinal cord injury. **PLoS one**, v. 15, n. 3, p. e0226584, 2020.

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, 2014.

LI, Leyang *et al.* Remnant neuromuscular junctions in denervated muscles contribute to functional recovery in delayed peripheral nerve repair. **Neural Regeneration Research**, V. 15, N. 4, P. 731-738, 2020.

LI, Yun *et al.* Delayed microglial depletion after spinal cord injury reduces chronic inflammation and neurodegeneration in the brain and improves neurological recovery in male mice. **Theranostics**, V. 10, N. 25, P. 11376, 2020.

LI, Yun *et al.* Impairment of autophagy after spinal cord injury potentiates neuroinflammation and motor function deficit in mice. **Theranostics**, V. 12, N. 12, P. 5364, 2022.

LIAO, Chien-Fu *et al.* Effects of swimming exercise on nerve regeneration in a rat sciatic nerve transection model. **Biomedicine**, V. 7, N. 1, 2017.

LIU Z, YAO X, JIANG W, LI W, ZHU S, LIAO C, ZOU L, DING R, CHEN J. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF-kappaB signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury. **J Neuroinflamm.** 2020;17:90.

LUDWIG PE, PATIL AA, CHAMCZUK AJ, AGRAWAL DK. Terapia hormonal em lesão traumática da medula espinhal. **Sou. J. Trad. Res.** 2017; 9 :3881–3895.

MACHADO, Angelo B. M.. Neuroanatomia funcional. 2 São Paulo: **Atheneu Editora**, 2007, 363 p.

MARQUES, M. R. *et al.* Locomotor training promotes time-dependent functional recovery after experimental spinal cord contusion. **Neuroscience**, V. 392, P. 258-269, 2018.

MARQUES, Suelen Adriani *et al.* A simple, inexpensive and easily reproducible model of

spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. **Journal of Neuroscience Methods**, V. 177, N. 1, P. 183-193, 2009.

MARTINEZ, A.M.B.; ALLODI, S.; UZIEL, D. Neuroanatomia Essencial. 1ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2014.

MARTINEZ, ANA; ALLODI, SILVANA; UZIEL, DANIELA. Neuroanatomia Essencial. **Grupo Gen-Ltc**, 2000.

Martinez SA, Nguyen ND, Bailey E, Doyle-Green D, Hauser HA, Handrakis JP, Knezevic S, Marett C, Weinman J, Romero AF, Santiago TM, Yang AH, Yung L, Asselin PK, Weir JP, Kornfeld SD, Bauman WA, Spungen AM, Harel NY. Multimodal cortical and subcortical exercise compared with treadmill training for spinal cord injury. *PLoS One*. 2018 Aug 9;13(8):e0202130. doi: 10.1371/journal.pone.0202130. PMID: 30092092; PMCID: PMC6084979.

MASSOTO, Tamires Braga *et al.* Mesenchymal stem cells and treadmill training enhance function and promote tissue preservation after spinal cord injury. **Brain Research**, V. 1726, P. 146494, 2020.

MERRITT CH, TAYLOR MA, YELTON CJ, RAY SK. Impacto econômico das lesões traumáticas da medula espinhal nos Estados Unidos. **Neuroimunologia Neuroinflam.** 2019.

METZ, Gerlinde A.; WHISHAW, Ian Q. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. **Jove (Journal of Visualized Experiments)**, N. 28, P. E1204, 2009.

MIETTO, Bruno Siqueira *et al.* Neurotrauma and inflammation: cns and pns responses. **Mediators of Inflammation**, V. 2015, 2015.

MISHRA MK, YONG VW. Células mieloides – alvos de medicamentos na esclerose múltipla. **NAT. REV.** V. 12 :539–551, 2016.

MU, Lianwei *et al.* Treadmill exercise reduces neuroinflammation, glial cell activation and improves synaptic transmission in the prefrontal cortex in 3× Tg-AD mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12655, 2022.

NORENBERG, Michael D.; SMITH, Jon; MARCILLO, Alex. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **Journal of Neurotrauma**, V. 21, N. 4, P. 429-440, 2004.

O'CONNOR, Mark J. Targeting the dna damage response in cancer. **Molecular Cell**, V. 60, N. 4, P. 547-560, 2015.

OKADA, Seiji *et al.* Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. **Neuroscience research**, v. 126, p. 39-43, 2018.

PETERSEN AM, PEDERSEN BK o efeito antiinflamatório do exercício. **J. Appl. Fisiol.** V. 98 (4):1154–1162. 2005.

POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, V. 53, P. 167-177, 2014.

DOS SANTOS RAMALHO, Bruna et al. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous or intraperitoneal routes is a viable alternative to spinal cord injury treatment in mice. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 6, p. 1046-1053, 2018.

REIER, Paul J. *et al.* Spinal cord: repair and rehabilitation. **ELS**, 2009.

REN, JIE *et al.* Schwann cell-derived exosomes containing mfg-e8 modify macrophage/microglial polarization for attenuating inflammation via the socs3/stat3 pathway after spinal cord injury. **Cell Death & Disease**, V. 14, N. 1, P. 70, 2023.

RONSYN, Mark W. *et al.* Can cell therapy heal a spinal cord injury?. **Spinal Cord**, V. 46, N. 8, P. 532-539, 2008.

ROUANET, Carolina *et al.* Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, V. 75, P. 387-393, 2017.

SANTOS, ACR; LAURINDO, RP; PESTANA, FM; HERINGER, LS; CANEDO, NHS; MARTINEZ, AMB; MARQUES, SA. Exercise Volume Can Modulate The Regenerative Response To Spinal Cord Injury In Mice. 2024. **Neurotrauma Reports** (aprovado para publicação).

SARAH. Rede SARAH de hospitais de reabilitação associação das pioneiras sociais. Neuroreabilitação em lesão medular. Disponível em:<https://www.sarah.br/especialidades/neuroreabilitacao-em-lesao-medular/> Acesso em 21 Maio 2024.

SAYYAH, Mansour *et al.* Activation of BDNF-and VEGF-mediated neuroprotection by treadmill exercise training in experimental stroke. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 6, p. 1843-1853, 2022.

SCHWAB, Jan M. *et al.* Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. **Progress In Neurobiology**, V. 78, N. 2, P. 91-116, 2006.

SEKHON, Lali HS; FEHLINGS, Michael G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine**, V. 26, N. 24S, P. S2-S12, 2001.

SEZER, Nebahat; AKKUŞ, Selami; UĞURLU, Fatma Gülçin. Chronic Complications Of Spinal Cord Injury. **World Journal Of Orthopedics**, V. 6, N. 1, P. 24, 2015.

SKINNER, R. D. *et al.* Effects of exercise and fetal spinal cord implants on the h-reflex in chronically spinalized adult rats. **Brain Research**, V. 729, N. 1, P. 127-131, 1996.

CENTER, NSCIS. Spinal cord injury (SCI) 2016 facts and figures at a glance. **J Spinal Cord Med**, v. 39, n. 4, p. 493-4, 2016.

STEENBERG, Adam et al. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 2, p. E433-E437, 2003.

STERNER, Robert C.; STERNER, Rosalie M. Immune response following traumatic spinal cord injury: Pathophysiology and therapies. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 1084101, 2023.

SUTOR, Tommy W. et al. The effects of exercise and activity-based physical therapy on bone after spinal cord injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 608, 2022.

TAETZSCH, Thomas; VALDEZ, Gregorio. NmJ maintenance and repair in aging. **Current Opinion in Physiology**, V. 4, P. 57-64, 2018.

TANG, Dan et al. Treadmill training improves respiratory function in rats after spinal cord injury by inhibiting the HMGB1/TLR-4/NF- κ B signaling pathway. **Neuroscience Letters**, v. 782, p. 136686, 2022.

TATOR, Charles H.; FEHLINGS, Michael G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **Journal of neurosurgery**, v. 75, n. 1, p. 15-26, 1991.

TAYLOR, Elizabeth C. et al. Acute traumatic spinal cord injury. **Advanced Emergency Nursing Journal**, v. 44, n. 4, p. 272-280, 2022.

TENA B, ESCOBAR B, ARGUIS MJ, et al. Reproducibility of Electronic Von Frey and Von Frey monofilaments testing. **Clin J Pain**. 2012 May;28(4):318-23. doi: 10.1097/AJP.0b013e31822f0092. PMID: 22001670.

THURET, Sandrine; MOON, Lawrence DF; GAGE, Fred H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nature Reviews Neuroscience**, V. 7, N. 8, P. 628-643, 2006.

TRIMBLE, Mark H.; KUKULKA, Carl G.; BEHRMAN, Andrea L. The effect of treadmill gait training on low-frequency depression of the soleus h-reflex: comparison of a spinal cord injured man to normal subjects. **Neuroscience Letters**, V. 246, N. 3, P. 186-188, 1998.

VAN DEN BRAND, Rubia *et al.* Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. **Science**, V. 336, N. 6085, P. 1182-1185, 2012.

WADA, Naoki *et al.* Current knowledge and novel frontiers in lower urinary tract dysfunction after spinal cord injury: Basic research perspectives. **Urological science**, v. 33, n. 3, p. 101-113, 2022.

WARD, P. J. *et al.* Training-Induced Functional Gains following SCI. **Neural Plasticity**, v. 2016, n. 1, p. 4307694, 2016.

YIU, Glenn; HE, Zhigang. Glial inhibition of CNS axon regeneration. **Nature Reviews**

Neuroscience, V. 7, N. 8, P. 617-627, 2006.

YONG, Heather YF *et al.* The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system. **Cellular & molecular immunology**, v. 16, n. 6, p. 540-546, 2019.

YUE, John K. *et al.* Vasopressor support in managing acute spinal cord injury: current knowledge. **Journal of neurosurgical sciences**, v. 63, n. 3, p. 308-317, 2017.

ZHANG, Wei *et al.* Implantation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with the neurotrophin-3 gene and pretreated with retinoic acid in completely transected spinal cord. **Brain research**, v. 1359, p. 256-271, 2010.

ZIPSER, Carl M. *et al.* Cell-based and stem-cell-based treatments for spinal cord injury: evidence from clinical trials. **The Lancet Neurology**, v. 21, n. 7, p. 659-670, 2022.

Apêndice

1 - Artigo de revisão publicado na Neural Regeneration Research

Review

NEURAL REGENERATION RESEARCH
www.nrronline.org

Molecular approaches for spinal cord injury treatment

Fernanda Martins de Almeida^{1,2}, Suelen Adriani Marques^{1,3}, Anne Caroline Rodrigues dos Santos^{1,3}, Caio Andrade Prins¹,
Felipe Soares dos Santos Cardoso³, Luiza dos Santos Heringer¹, Henrique Rocha Mendonça⁴, Ana Maria Blanco Martinez^{1,*}<https://doi.org/10.4103/1673-5374.344830>

Date of submission: November 29, 2021

Date of decision: January 27, 2022

Date of acceptance: February 24, 2022

Date of web publication: April 25, 2022

From the Contents

Pharmacological Treatments for Spinal Cord Injury	24
Dopamine, Atropine, Norepinephrine, Mialofrine, Glutensamide Blood-Perfusion Controlling Drugs	24
Methylprednisolone, Tirzadad, Minocycline: Anti- Inflammatory Compounds	24
Propofolol, Riluzole, 4-Aminopyridine: Voltage-Gated Cation Channel Antagonists	24
Baclofen: Inhibitory Neurotransmission Stimulation	24
Leukocyte Common Antigen Related Phosphatase Related Peptide, NogoA Neutralizing Antibody, Elexzumab: Inhibitors of Growth Cone Collapse	24
Phosphatase and Tensin Homolog Antagonist Peptide 2 and 4, Bisphosphonates, TTK2: Promoters of Axonal Growth Intrinsic Properties	24
Enzymes	25
Growth and Neurotrophic Factors	25
Purines	27

Abstract

Injuries to the spinal cord result in permanent disabilities that limit daily life activities. The main reasons for these poor outcomes are the limited regenerative capacity of central neurons and the inhibitory milieu that is established upon traumatic injuries. Despite decades of research, there is still no efficient treatment for spinal cord injury. Many strategies are tested in preclinical studies that focus on ameliorating the functional outcomes after spinal cord injury. Among these, molecular compounds are currently being used for neurological recovery, with promising results. These molecules target the axon collapsed growth cone, the inhibitory microenvironment, the survival of neurons and glial cells, and the re-establishment of lost connections. In this review we focused on molecules that are being used, either in preclinical or clinical studies, to treat spinal cord injuries, such as drugs, growth and neurotrophic factors, enzymes, and purines. The mechanisms of action of these molecules are discussed, considering traumatic spinal cord injury in rodents and humans.

Key Words: axonal regeneration; drugs; enzymes; growth factors; molecular therapy; neurotrophic factors; purines; spinal cord injury

Introduction

The central nervous system (CNS) responds differently to injuries when compared to the peripheral nervous system. In contrast to peripheral nerves, the central axons do not efficiently and adequately regenerate after lesion.

Spinal cord injury (SCI) occurs as a consequence of abrupt or sustained trauma to the spinal cord and represents a serious clinical condition. The extent of damage depends on the intensity of the trauma which directly interferes with the patient's prognosis (Kucicova et al., 2014). SCI results in devastating social, physical, and financial burdens for patients and families. Recent studies have reported that the incidence of SCI worldwide has ranged between 10.4 and 83 cases per million per year (Singh et al., 2014; Hejrati and Fehlings, 2021).

The primary mechanical trauma results in neuroglial cell death and axonal damage and, consequently, alteration in the network required for sensorimotor function. Following this initial insult, a secondary injury cascade is initiated, which is characterized by inflammatory cell infiltration, vascular effects such as hemorrhage, ischemia and edema, ionic imbalance, glutamate release, and excitotoxicity, free radical formation, and cytokine release, which generates further neuroglial cell death and aggravates neurological deficits and outcomes (Iator and Fehlings, 1991; Bareyre and Schwab, 2003; Rowland et al., 2008; Hejrati and Fehlings, 2021).

The difficulty in regeneration is mainly attributed to the microenvironment of the injured spinal cord (Kamada et al., 2005; Yiu and He, 2006). The proximal stumps of the injured nerve fibers are exposed to the inhibitory molecules of the reactive glial environment. The recruitment of inflammatory cells and astrocytes leads to the formation of a glial scar, usually accompanied by cavities filled with chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs). Other inhibitory molecules are Nogo, myelin-associated glycoprotein (MAG) and, oligodendrocyte myelin glycoprotein, components of the central myelin that

also interfere in the regeneration of axons. Furthermore, after axonal injury, there is also a decrease in trophic factors supply, due to intrinsic neuronal changes such as atrophy and cell death (Kamada et al., 2005; Yiu and He, 2006).

In an attempt to optimize functional restoration of the lesioned CNS, numerous neuroprotective and neuroregenerative therapeutic approaches are emerging, such as cell therapy, which has shown favorable results with the use of different cell types such as pre-differentiated embryonic stem cells (Marques et al., 2010), dental pulp cells (de Almeida et al., 2011) and mesenchymal cells (Čížková et al., 2006; de Almeida et al., 2015; Ramalho et al., 2018). On the other hand, there is a wide range of molecular compounds that are currently being used for neurological recovery, with promising results.

The goal of molecular therapeutic intervention consists of promoting axonal regeneration and sprouting, protection of neurons from cell death, and enhancement of nerve fiber conduction (Thuret et al., 2006). It is important to note that sprouting of afferent fibers in the thoracolumbar spinal cord can contribute to some conditions such as autonomic dysreflexia (Rabchevsky, 2006).

Although most research aims at motor functional recovery as a major outcome, we acknowledge other comorbidities, such as neuropathic pain and neurogenic urinary tract dysfunction, as neglected SCI related conditions, gaining attention and being evaluated as treatment goals (Anderson, 2004; Hunt et al., 2021; Morse et al., 2021; Wang et al., 2021). There are a variety of molecules that can be used to either attenuate the damage caused by the secondary injury or to stimulate regeneration and restore lost connections and functions that occur in the spinal cord after injury. In this review, we will discuss some molecular compounds that have been used after SCI and provide a summary of these strategies.

¹Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Anatomia Patológica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ²Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ³Instituto de Biologia, Departamento de Neurobiologia, Laboratório de Regeneração Neural e Função, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Laboratório Integrado de Morfologia, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade NUPEM, Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – SBFS, Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, Brazil

*Correspondence to: Ana Maria Blanco Martinez, MD, PhD, anamartinez@hucff.ufrj.br

<https://orcid.org/0000-0002-0821-5730> (Ana Maria Blanco Martinez)

Funding: This work was supported by CAPES, Faperj and CNPq, as well as "National Institute of Science and Technology for Regenerative Medicine", CNPq, Brazil (to AMBM).

How to cite this article: de Almeida FM, Marques SA, dos Santos ACR, Prins CA, dos Santos Cardoso FS, dos Santos Heringer L, Mendonça HR, Martinez AMB (2023) Molecular approaches for spinal cord injury treatment. *Neural Regen Res* 18(1):23-30.



Search Strategy and Selection Criteria

We included data from pre-clinical experimental studies and human clinical trials registered in clinicaltrials.gov in this narrative review. All these studies cited in the current review have been performed in the last twenty years (2001–2021). They were searched on the PubMed database using the following keywords or terms: regeneration, SCI, pharmacological, drugs, fibroblast growth factor (FGF) and SCI, brain derived neurotrophic factor (BDNF) and SCI, nerve growth factor (NGF) and SCI, epidermal growth factor (EGF) and SCI, ciliary neurotrophic factor (CNTF) and SCI, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and SCI, platelet-derived growth factor (PDGF) and SCI, guanosine, adenosine, inosine, purines, chondroitinase, and sialidase.

Pharmacological Treatments for Spinal Cord Injury

A drug can be defined as any chemical substance, except for a nutrient or an essential dietary ingredient, which when administered to a living organism produces a biological effect. Thus, the pathophysiological processes elicited by SCI are theoretically possible to be targeted by pharmacological interventions. Despite decades of scientific studies, no drug tested so far has achieved clinically satisfactory results in phase III clinical trials making preclinical studies of pharmacological treatments to improve neurological function a priority in this research field. A selection of drugs that are currently employed for different pathophysiological aspects of SCI or that are being studied with promising results in both preclinical and clinical trials are listed below.

Dopamine, Atropine, Norepinephrine, Midodrine, Glibenclamide: Blood-Perfusion Controlling Drugs

The neurogenic shock that follows SCI enhances the hypoxic damage caused by traumatic-induced vascular rupture. To minimize this condition, vasopressin and cardiac stimulant drugs such as dopamine, norepinephrine, the muscarinic antagonist atropine, and the α 1-adrenergic agonist midodrine are of utility in the acute clinical management of SCI patients (Marikandaya et al., 2012). Additionally, prevention of further lesion of SC microvasculature by the employment of the sulfonylurea receptor 1 channel antagonist glibenclamide prevents progressive necrosis and improves neurological status after SCI in rats (Simard et al., 2007). Thus, a phase I/II clinical trial that analyzes the safety and efficacy of its oral administration over the first 3 days after the injury has been conducted, with results expected for 2022 (Minnema et al., 2019).

Methylprednisolone, Tirilazad, Minocycline: Anti-Inflammatory Compounds

The most traditional drug clinically employed to treat the secondary injury cascade after SCI is methylprednisolone (MP). Being used since NACIS trials' results in the 1980s, it is a synthetic glucocorticoid agonist, suitable to be employed after acute SCI at an early stage due to its anti-inflammatory and neuroprotective effects, acting mainly in the prevention of lipid peroxidation (Hall, 2011). However, these clinical trials revealed modest functional recovery, associated with severe adverse effects concerning immunodepression, leading to recurrent infections, discouraging its use (Cristante et al., 2012). Due to the side effects revealed by the aforementioned clinical trials, drug designers were encouraged to develop medications with the protective effects of MP but without its adverse events. Among these, emerged tirilazad, a non-glucocorticoid steroid with anti-inflammatory and antioxidant properties. Although safe for human use, clinical trials revealed less effectiveness than MP (Bains and Hall, 2012), pushing scientists towards the evaluation of other classes of anti-inflammatory drugs. Minocycline is a clinically available anti-inflammatory compound that inhibits neuroinflammation and neurodegeneration through retinoic acid signaling (Clemens et al., 2018). Preclinically, it has been shown to inhibit the secondary expansion of the lesioned site, reducing autonomic dysreflexia (Squair et al., 2018). Although no severe adverse effect was related to its use, a phase II clinical trial employing minocycline during the first week after SCI revealed only a non-significant tendency of the improved neurological score (Casha et al., 2012).

Pregabalin, Riluzole, 4-Aminopyridine: Voltage-Gated Cation Channels Antagonists

Originally developed for epilepsy treatment, gabapentinoids and riluzole present interesting properties for spinal cord (SC) neuroprotection. Riluzole-driven blockade of voltage-gated sodium channels reduces both glutamate release and excitotoxicity after SCI in animal models (Cifra et al., 2013). Preliminary analyses revealed improved motor scores with no serious side effects when employed to patients during the first 2 weeks after SCI (Grossman et al., 2014). Also reducing glutamate-induced excitotoxicity, gabapentinoids, such as pregabalin, are α 2- δ 2 voltage-gated calcium channel subunit blockers that reduce microglial activation, through down-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), impairing the secretion of the pro-inflammatory cytokines interleukin 1 (IL 1), interleukin 6 (IL 6), tumor necrosis factor α , and prostaglandins (Ha et al., 2011). This anti-

inflammatory effect results in decreased apoptosis and improved locomotor function with reduced mechanical hypersensitivity and tactile allodynia, promoting neuroprotection and neural regeneration after SCI in rodents (Tedeschi et al., 2016). An observational cohort study analyzing data from the European Multi-centre Study about SCI revealed that gabapentinoids treatment within 1 month post-injury significantly improved motor recovery of SCI patients (Warner et al., 2017). On the other hand, inhibitors of the voltage-gated potassium channels, such as 4-aminopyridine, facilitate action potential conduction within demyelinated fibers after SCI in guinea pigs (McBride et al., 2007). Treatment of chronically diplegic patients after SCI with 4-aminopyridine resulted in improved locomotion, bladder, and anal sphincters control, somatosensory and erectile functions, but, unfortunately, also led to adverse events such as seizures (Grijalva et al., 2010).

Baclofen: Inhibitory Neurotransmission Stimulation

Beyond being useful to treat spasticity after SCI, the GABAB receptor agonist has shown both neuroregenerative and neuroprotective actions after SCI. Hilton and co-workers showed that oral baclofen treatment after SCI promotes axonal regeneration and/or sprouting, converting pre-synaptic sites into growth cones, through Munc13 down-regulation (Hilton et al., 2022). Moreover, acute baclofen treatment promoted white matter sparing, decreased microglial/macrophage content, modulated the cytokine milieu, and enhanced locomotor function and bladder control after SCI in mice (de Sousa et al., 2021). Its use within the first 4 weeks after SCI, besides proven safety, revealed sensory and motor improvements of SCI patients (Cragg et al., 2019).

Leukocyte Common Antigen Related Phosphatase Related Peptides, NogoA Neutralizing Antibody, Elezanumab: Inhibitors of Growth Cone Collapse

The SCI site remodeling is a challenge to axonal growth. The pro-inflammatory and neurotoxic epicenter is isolated from normal SC parenchyma by the glial scar, sparing the surrounding neural tissue. Conversely, scar-forming astrocytes secrete CSPG, which impairs axonal elongation (Yuan and He, 2013). So, drugs that target these inhibitors are being tested for SC repair. Leukocyte common antigen related phosphatase (LAR) was identified as a CSPG receptor that, once activated, induces growth cone collapse. Its systemic blockade with LAR-targeting peptides allowed serotonergic regeneration and locomotor partial recovery in animal models (Fisher et al., 2011). Clinical trials employing LAR-targeting peptides were not conducted yet.

Additionally, degenerating myelin sheath after SCI exposes MAG, oligodendrocyte myelin glycoprotein, and Nogo-A, which also impair axonal remodeling and functional recovery (Lee et al., 2010). Thus, the blockade of the myelin inhibitors through intrathecal administration of the fragment crystallizable fraction of Nogo receptor 1 results in regeneration and/or sprouting of corticospinal fibers and behavioral improvements, both in mouse and non-humans' primates (Li et al., 2004; Wang et al., 2020). Due to these results, a phase II clinical trial employing intrathecal NogoA neutralizing antibody administration has been conducted for SCI patients, revealing non-significant improvements in neurological symptoms (Kucher et al., 2018). Another inhibitory molecule of the remodeled SCI site, repulsive guidance molecule A (RGMA), is up-regulated in several cell types, where it signals through neogenin receptors, inhibiting axonal elongation (Mothe et al., 2017). Application of elezanumab, an anti-RGMA monoclonal antibody, promotes neuroprotection, neuroplasticity, and functional recovery following a thoracic hemicompression of SC in non-human primates (Jacobson et al., 2021). Inspired by these promising preclinical results, a phase II clinical trial is currently recruiting volunteers (NCT04295538). Finally, RGMA, myelin proteins, and CSPG activate RhoA in growth cones, in such a way that RhoA acts as an intraneuronal hub to different inhibitory molecules of the extracellular milieu, signaling growth cone collapse (Wu and Xu, 2016). More recently, it was shown that both C3 transferase and Y27632 treatments inhibit RhoA and Rho-dependent kinase, respectively, promoting axonal regeneration and recovery of hindlimb function after SCI in rodents (Dergham et al., 2002). This approach was translated to clinical trials, where VX 210, a cell permeable derivative of C3 transferase, was employed. Although it gave promising results in phase I and II clinical trials, it did not reach the pre-defined efficacy endpoint in phase III (Fehlings et al., 2021).

Phosphatase and Tensin Homolog Antagonist Peptide 2 and 4, Bisperoxovanadium, TTK21: Promoters of Axonal Growth Intrinsic Properties

Combinatorial treatments stimulating the intrinsic growth capacity of CNS axons were the only approaches that have achieved both full-length regeneration and partial functional recovery within the lesioned CNS so far (De Lima et al., 2017). Phosphatase and tensin homolog (PTEN) is an enzyme that mediates the dephosphorylation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) targets, such as protein kinase B. Protein kinase B signaling pathway leads to mammalian target of rapamycin and S6 kinase activation, promoting protein



synthesis and axonal elongation. PTEN systemic inhibition, with antagonist peptides PAP2 and PAP4, promotes serotonergic and corticospinal tract regeneration beyond lesion site, and locomotor function recovery in SCI animal models (Ohtake et al., 2014). Similarly, systemic treatment with the non-specific PTEN inhibitor, bisperoxovanadium, promoted tissue sparing and functional forelimb recovery after cervical spinal cord lesion in mice (Walker et al., 2012). Although bisperoxovanadium theoretically has a potential negative influence on cancer prevention due to cell growth stimulation, its blockade of phosphatase activity impairs cell cycle progression required for cancer cell development (Scrivens et al., 2003). Thus, PTEN inhibition seems a promising target for future clinical trials for SC repair. Besides, protein synthesis-dependent axonal elongation requires genes to be transcribed within the neuronal nuclei. Transcription machinery access to the genes requires chromatin remodeling, which is accomplished by post-translational modifications of histones or DNA itself. Delivery of TTK21, an activator of cAMP response element-binding protein/P300 after SCI, increased acetylation of dorsal root ganglia neurons' histones and promoted regeneration and sprouting of axons within the rodent's SC, along with both sensory and motor improvements in behavioral assays (Hutson et al., 2019). The safety of histone acetylation promoters, such as valproic acid, is well known due to their use in the treatment of other pathologies in humans, such as epilepsy, encouraging clinical trials employing histone acetylation enhancers.

Therefore, besides the drugs available for SCI repair, several novel targets are being studied, aiming for the development of novel drugs that would eventually be able to modify other aspects of SCI pathophysiology. The combinatorial treatment with different drugs or with different regenerative therapies may have additive effects to overcome the inhibitory environment of the injured SC. **Figure 1** exemplifies selected aforementioned drugs and their mechanisms of action.

Enzymes

Chondroitinase

After SCI, the physical barriers formed by the glial scars and the chemical substances secreted by them are great hurdles that inhibit the growth of central nervous system axons. The glial scar is composed of several components, of which CSPG is the most abundant (Zhang et al., 2013b). CSPG is the most prevalent extracellular matrix component secreted by astrocytes (Zhang et al., 2013a). Its inhibitory effects are accomplished by acting on oligodendrocytes and neurons, where they impair remyelination and axonal growth, respectively. CSPG signals through different receptors, such as IAR, protein tyrosine phosphatase σ (PTP σ) and NgR 1, 2, and 3 (Sapieha et al., 2005; Schwab and Strittmatter, 2014; Lang et al., 2015; Dyck et al., 2018, 2019). Early suppression of CSPG secretion from reactive astrocytes can reduce their inhibitory effect on nerve fiber regeneration (Zhang et al., 2013b). Therefore, focusing on early suppression of CSPG production by astrocytes may reduce their inhibitory effect on post-injury axonal regeneration (Profyris et al., 2004).

Chondroitinase ABC (ChABC) has been shown to promote regeneration of axons through the glial scar (Yick et al., 2003). ChABC is obtained from the bacteria *Proteus vulgaris* and acts by degrading the glycosaminoglycan side chains of CSPGs. Degradation of CSPG with the use of ChABC removes the inhibition of regeneration from the glial scar (**Figure 2**) (Raspa et al., 2019). It has been reported that ChABC treatment after SCI reintegrates postsynaptic activity below the lesion site and promotes functional recovery of locomotor and proprioceptive behaviors in rats (Bradbury et al., 2002; Mahajan, 2018). Besides, ChABC infusion enhances recovery after experimental nigrostriatal lesions and in several animal models of SCI (Mountney et al., 2010). These promising results in animal models strongly drive the initiation of human tests (Mahajan, 2018).

In addition to acting individually, ChABC has been tested in combination with other pro-regenerative therapies as a potential treatment for SCI. Among them is the combination with enteric neural stem cells, bone marrow mesenchymal stem cells, hyperbaric oxygen therapy, treadmill rehabilitation, GDNF, and other enzymes, like sialidase (García-Allas et al., 2009; Zhang et al., 2013a; Shinozaki et al., 2016; Liu et al., 2018; Levans et al., 2021).

Sialidases

These enzymes are glycosidases responsible for the removal of sialic acid (Sias) residues (desialylation) from glycan portions of either glycoproteins or glycolipids (Yuan et al., 2020). The Sias are a family of 9-carbon containing acidic monosaccharides found on both N- and O-linked glycans of either glycoproteins or glycolipids. Sias is involved in many biological processes, such as regulating cellular interactions in controlling activation, differentiation, transformation, and migration of cells (Mountney et al., 2013).

The hydrolytic removal of Sias (desialylation) from glycoproteins or glycolipids takes part in the regulation of various physiological and pathological pathways (Mountney et al., 2010). Desialylation of glycoconjugates influences cell signaling, adhesion, apoptosis, receptor activation, phagocytosis, cell migration, cell transformation, differentiation, migration, and neurogenesis. Therefore, sialidases regulate many cellular processes in both physiological and pathological conditions by removing Sias from glycoconjugates (Yang et al., 2006).

The microenvironment of SCI is highly inhibitory for axonal regeneration. Endogenous inhibitors, including those on residual myelin, for example, MAG, contribute to regeneration failure. MAG binds to various neuronal receptors

to inhibit axonal outgrowth, including Nogo receptors (NgR1 and NgR2), PirB, β 1-integrin, and sialoglycans (Vyas et al., 2005; Mehta et al., 2007). Some neurons respond to MAG primarily via sialoglycans, whereas others use NgRs and other receptors. Gangliosides are the most abundant sialoglycans on nerve cells. MAG inhibition of axonal outgrowth in some neurons is reversed by treatment with sialidase, an enzyme that hydrolyzes sialic acids and eliminates MAG-sialoglycan binding (**Figure 2**) (Vyas et al., 2002). Sialidase treatment enhances recovery after spinal cord contusion in the rat (Mountney et al., 2010). Therefore, sialidase emerges as a potential biological drug for the recovery of axons, validating sialoglycans as therapeutic targets for the treatment of SCI.

Another important therapy, in addition to sialidase, is the use of polysialic acid (PSA). PSA is a natural, biodegradable, and negatively charged polysaccharide mainly attached to the neural cell adhesion molecule (Saini et al., 2016; Zhang et al., 2018). Several studies report its importance concerning its therapeutic possibility. Among the advantages discussed above, it is known that PSA decreases tumor necrosis factor- α and IL-6 release by inhibiting ionized calcium-binding adapter molecule 1, microglia/macrophage activation, and reduces apoptosis-associated caspase-3 protein expression. In addition, PSA inhibits axonal demyelination and glial fibrillary acidic protein expression, increases neurofilament 200 expression, and improves the functional outcome (Mehanna et al., 2010; Zhang et al., 2018). Therefore, PSA also stimulates regeneration in the central nervous system after SCI (Saini et al., 2016).

In conclusion, among axonal regeneration inhibitor-targeted experimental therapies, two bacterial enzymes have emerged as potential drugs to treat SCI. ChABC cleaves inhibitory CSPGs and sialidase cleaves sialoglycan receptors for MAG (Yick et al., 2003; Mountney et al., 2013). Therefore, including the combination of such therapies can favor a better axonal regeneration, reflecting in potential functional recovery after SCI (Bradbury et al., 2002; Mountney et al., 2013).

Growth and Neurotrophic Factors

Growth factors and neurotrophic factors are secreted biomolecules that are present in the nervous system during development and throughout adult life; they promote neuronal cells development, differentiation and survival, neurite outgrowth, synaptic plasticity, and neurotransmission, influencing the topography of axonal projections during development and regeneration. Growth factors can be produced by many different tissues; most neurotrophic factors belong to one of the three families: (A) neurotrophins (NGF, BDNF, NT3, and NT4), (B) glial cell-line derived neurotrophic factor family ligands (GDNF, Neurturin, Artemin, Persephin), and (C) neuropoietic cytokines (CNTF, leukemia inhibitory factor (LIF), IL6, and others). In general, growth factors and neurotrophic factors exert their trophic effects by signaling through tyrosine kinases receptors, which activates distinct cell signaling pathways as PI3K/AKT/mTOR, PKC, RAS/MAPK, and Jak-STAT, as seen in **Figure 3**, although the cellular responses elicited by them often overlap.

Fibroblast growth factor

When discovered, FGF was an unknown protein extracted from the cow's pituitary gland and was named NIH-LH-88 (Armelin, 1973). It seemed to have a highly specific activity, turning resting-state 3T3 fibroblast lineage into a mitotic state (Armelin, 1973), and later its name was changed to "fibroblast growth factor" (Gospodarowicz, 1974). Nowadays, FGF is better described as a protein family composed of 23 trophic factors which exert a wide variety of effects such as proliferation, differentiation, migration, chemotaxis, neurogenesis, and axonal growth. Among these proteins, the basic fibroblast growth factor (bFGF or FGF2) emerges as a potential treatment in the medical regenerative field (Itoh and Ornitz, 2008).

FGF2 promotes mitogenic activity, stem cell-state steadiness, and cell survival (Ding et al., 2010; Mossahebi-Mohammadi et al., 2020). These are relevant properties for foreseeing a novel treatment for SCI. Using a thoracic spinal cord transection model in C57BL/6J mice, Huang and colleagues observed, 12 weeks after injury, increased density of axons and better-spared tissue after intravenous injection of human umbilical cord-derived stem cells overexpressing bFGF (bFGF-MSCs) as compared to vehicle administered control mice and to umbilical cord-derived stem cells without bFGF overexpression animals (Huang et al., 2021). After 60 days in Sprague-Dawley rats of a contusive model of SCI, similar results were noticed with allotransplantation of AAV-transfected neural stem cells carrying the bFGF gene inside the lesion's epicenter. It was also observed more spared neurons, axonal growth, and discrete astrogliosis in the bFGF treated group compared to its controls (Zhu et al., 2021). Studies evidence that to exert its regenerative functions, bFGF binds to its transmembrane receptor deflagrating PI3K/Akt/mTOR, RAS/MAPK, and PLC γ (**Figure 3**) pathways (Zhou et al., 2018; Cai et al., 2021).

bFGF similar drugs were synthesized and membranes with drug-delivering scaffolds are being developed as possible treatments to spinal cord injuries (Zhou et al., 2018; Edamura et al., 2020; Imagama et al., 2020). Despite these promising results, bFGF research is still in the pre-clinical stage.

Platelet-derived growth factor

PDGF was initially identified as having a growth-promoting activity in platelets, being later verified its production by many varieties of cell types, such as glial

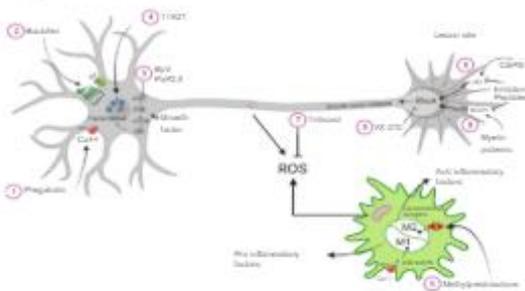


Figure 1 | Mechanisms of action of drugs after spinal cord injury.
(1) Pregabalin blocks calcium influx both in neurons and in microglia/macrophage, reducing calcium-activated proteases and calcium-dependent Caspase-3 activation and neuronal apoptosis. Besides, it reduces microglia/macrophage p38 MAPK activation and M1-related secretome. (2) Baclofen activates GABAB receptors, hyperpolarizing the neuron that switches its axonal phenotype to a growth competent state. (3) PTEN inhibits release the blockade of the growth factor stimulation of PI3K-mTOR-S6 induction of protein synthesis and axon growth. (4) TTK21 activates the Histone Acetylase cAMP response element-binding protein (CBP)/p300, facilitating the transcription machinery access to regenerative-related genes. (5) LAR antagonists impair growth cone collapse, via decreased RhoA activation. (6) MP activates glucocorticoid receptors in microglia/macrophage, polarizing the inflammatory response to the M2 profile. (7) Tirilazad promotes ROS scavenging, preserving spinal cord tissue. (8) NG21 antagonists impair growth cone collapse, via decreased RhoA activation. (9) VX-210 inhibits RhoA activation directly, impairing growth cone collapse. cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; CBP/p300, element-binding protein p300; GABAB, gamma-aminobutyric acid B receptor; LAR: leukocyte common antigen related phosphatase; M1: macrophage 1; M2: macrophage 2; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MP: methylprednisolone; mTOR: mammalian target of rapamycin; NG21: Nogo receptor 1; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PTEN: phosphatase and tensin homolog; RhoA: Ras homolog family member A; ROS: reactive oxygen species; S6: ribosomal S6 kinase; TTK21: N-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-propoxy-benzamide; VX-210: Rho inhibitor VX-210.

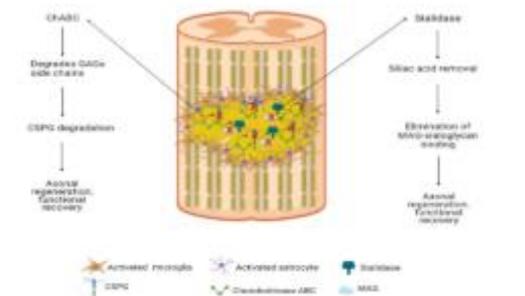


Figure 2 | Role of enzymes after spinal cord injury.
After spinal cord injury, a glial scar is formed at the injury site and CSPG is secreted by reactive astrocytes. The ChABC degrades the side chains of GAGs and, therefore, CSPG degradation occurs. The blocking of the CSPG enables axonal regeneration. Regarding sulfatase, its activity is to remove sulfate acid, promoting the elimination of MAG-sialoglycan binding. The blocking MAG allows axonal regeneration. These are strategies to allow functional recovery after spinal cord injury. CSPG: Chondroitin sulphate proteoglycan; GAGs: glycosaminoglycans; MAG: myelin associated glycoprotein.

cells and neural progenitors. There are four different PDGF genes (PDGF A-D) that encode the five dimeric proteins (PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, and -DD). They bind with different affinities to one of the three tyrosine kinase receptors (PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$, and PDGFR- $\beta\beta$) and signal by various intracellular pathways associated with cell division and growth, including the PI3K/AKT/mTOR pathway, RAS/MAPK, and STAT families, besides PLC- γ activation as seen in **Figure 3** (Andrae et al., 2008).

In an experimental study, PDGF protects against blood-spinal cord barrier disruption after SCI by remodeling the neurovascular units, upregulating tight and adherens junctions, and promoting autophagic flux activation (Ye et al., 2021). The blood-spinal cord barrier plays a vital role in SCI recovery, thus its preservation can reduce other degenerative events such as loss of microvasculature, infiltration of blood-derived macrophages, neuroinflammation, oxidative stress, glial scar formation, and cell death.

Inflammatory response and M1 or M2 subtype polarization of macrophages/microglia are essential to glial scar formation. M2 macrophages can secrete PDGFB acting on PDGFR β to promote PDGFR β pericytes migration, in both *in vivo* and *in vitro* conditions, to form the fibrotic core of the glial scar around the spinal lesion (Li et al., 2021a). PDGF-AA can influence the oligodendrocyte precursor cells to migrate and differentiate into oligodendroglial cells, increasing myelination and improving functional recovery (Yao et al., 2017).

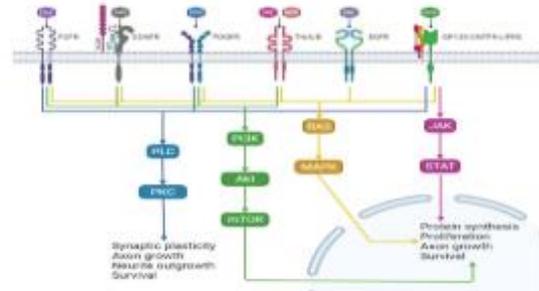


Figure 3 | Schematic representation of the components of growth and neurotrophic factors signaling pathway.

Most of them exert their trophic effects through tyrosine kinases receptors classical activation. The FGFR (bFGF), PDGFR (PDGF), TRKA (NGF), TRKB (BDNF), and EGFR (EGF) dimerization triggers many intracellular signaling pathways, including the Ras-MAPK, the PI3K, AKT/mTOR, and PLC- γ dependent pathway. However, GFR1 and CNTFR1, which bind to GDNF and CNTF respectively, need to form a complex multisubunit receptors system to signal. GDNF can be signaled by GDNF-GFR1-RET signaling complex (canonical way), or by GDNF-GFR1-NCAM complex (alternative pathway) and activate AKT/mTOR and MAPK pathway. CNTF can signal by a heterotrimeric receptor [CNTFR1-30-LIFR3] activating JAK/STAT pathway and other signaling ways. TRKs activation by these factors can promote neuronal survival, synaptic plasticity, neurite outgrowth, axon growth, protein synthesis, and cell proliferation. AKT: Ak strain transforming; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; CNTF: ciliary neurotrophic factor; CNTFR1: ciliary neurotrophic factor receptor $\alpha 1$; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; FGFR: fibroblast growth factor receptor; GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor; GFR1: GDNF family receptor $\alpha 1$; Gp130: glycoprotein 130; JAK: janus kinase; LIFR3: leukemia inhibitory factor receptor 3; MAPK: mitogen-activated protein kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; NCAM: neural cell adhesion molecule; NGF: nerve growth factor; PDGF: platelet-derived growth factor; PDGFR: platelet-derived growth factor receptor; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PLC- γ : phospholipase C gamma; Ras: rat sarcoma virus; RET: rearranged during transfection; STAT: signal transducer and activator of transcription; TRKA/B: tyrosine kinase receptor A/B; bFGF: fibroblast growth factor beta.

Additionally, PDGF can promote motor neurons survival, reduce scar tissue, improve the remyelination and promote SCI recovery when administered locally or subcutaneously (Guo et al., 2019; Ye et al., 2021), or when secreted by different genetically modified cells (Plemel et al., 2011; Yao et al., 2017). These results suggest that PDGF administration may be a promising treatment for acute SCI.

Epidermal growth factor

Previously known as urogastrone, EGF presents regenerative properties, is already used as a treatment for diabetic skin ulcers (Berlanga et al., 2013). In preclinical studies, it is being evaluated as a potential therapy for SCI, but the literature is still inconclusive, facing contradictory results about its therapeutic efficiency. Some studies indicate that EGF promotes neurogenesis, diminishes oxidative stress and apoptosis after SCI in mice (Öztürk et al., 2018; Xue et al., 2020). One research demonstrated that EGF+FGF treatment is less effective than FGF+EGF+GDNF treatment to enhance axonal growth across the lesion site (Anderson et al., 2018). Despite these beneficial results, some studies show that EGF may hamper central nervous system regeneration by facilitating blood-brain barrier disruption and enhancing astroglia after injury (Wu et al., 2010). One study observed a reduction of NF- κ B and MAPK levels within astrocytes nuclei and, because of that, secondary complications were diminished after SCI by blocking EGF receptors with PD168393 experimental drug (Li et al., 2021b). At the moment, no published clinical trials use EGF as a treatment for SCI.

Glial cell line-derived neurotrophic factor

GDNF was first described in glial cells but is also expressed in neurons, astrocytes, oligodendrocytes, Schwann cells, and skeletal muscle fibers. GDNF binds to tyrosine kinase receptors, forming a GDNF-GFR1 family receptor alpha-1 (GFR1) binary complex, then assembly with co-receptor tyrosine kinase rearranged during transfection (RET), forming the GDNF-GFR1-RET ternary complex domains that signal through the activation of RAS/MAPK, PI3K/Akt/mTOR pathway and Jun N-terminal kinases-mediated-transcription (Chen et al., 2009). The GDNF-GFR1 complex can also signal through a neural cell adhesion molecule (Figure 3), with a lower affinity, in an independent manner (Zhang et al., 2009). GDNF expression is higher during CNS development, being reduced in healthy adults. However, SCI promotes its immediate up-regulation, mainly in microglia and macrophages, which sustain its enhanced expression during four weeks (Satake et al., 2000).



GDNF contributes to astrogliosis modification by glial fibrillary acidic protein and CSPGs down-regulation, resulting in secondary damage reduction and robust axonal regeneration in adult rats (Deng et al., 2011; Anderson et al., 2018). Also, it stimulates the myelination (Zhang et al., 2009) and exerts chemoattractive effects on axonal regrowth (Anderson et al., 2018), being involved in neuronal survival and formation and maturation of the neuromuscular synapse during development and disease (Deng et al., 2011; Anderson et al., 2018).

Since GDNF does not cross the blood-spinal cord barrier, it demands local administration or conjugating GDNF with other molecules, such as viral proteins, antibodies, or genetically modified cells that secrete GDNF, overcoming this limitation. Combining GDNF administration and SC transplantation has been proposed as a possible strategy to promote axonal regeneration and myelin formation after SCI (Deng et al., 2011), and the combination of GDNF with other neurotrophic factors enhances its therapeutic capability (Anderson et al., 2018).

Nerve growth factor

After its isolation and identification in 1953 by Rita Levi Montalcini, Viktor Hamburger, and Stanley Cohen, NGF revealed its protagonist role among trophic factors in regeneration after SCI (Sharma, 2007). The presence or absence of NGF in the CNS microenvironment, or even its precursor form, proNGF, is responsible for intricate molecular mechanisms, which will lead to neuronal survival or apoptosis via TrkA or low-affinity NGF receptor (LNGFR/p75NTR), respectively. Succinctly, NGF will either induce transcription factor activity such as NF- κ B, CREB, ELK1, and regulator factor bcl2, which are involved in cell survival or will induce c-Jun/c-Fos AP-1 apoptotic activity. To induce cell survival or cell death, NGF and proNGF propagate signal amplification downstream RAS/MAPK or PI3K/Akt/mTOR pathways (Figure 3) which have also been implicated in other trophic factor mechanisms and axonal regeneration (Lee et al., 2001; Freeman et al., 2004).

Experimental studies indicate that NGF released from neural progenitor cells transplanted inside the cerebral cortex of an organotypic model promoted axonal growth similar to a corticospinal tract (Kamei et al., 2007). Neuron survival, axonal growth, decreased apoptosis, spared parenchyma, reduced formation of cavities, reduced astrogliosis, and better motor function recovery were seen in murine models after SCI when treated with different NGF delivering methods (Song et al., 2021; Xia et al., 2021). Preclinical studies have shown encouraging results. Therefore, NGF is one of a few trophic factors being already studied in a clinical trial. In one study, 46 patients with motor and sensory functions were hampered by lumbar intervertebral disk herniation (Chen-yang et al., 2021). In this research, the group of patients treated with intramuscular methylcobalamin-NGF injection presented, weeks after the decompression surgery, better neurological outcomes compared with the group that underwent decompression surgery followed by just methylcobalamin intramuscular injection.

Brain-derived neurotrophic factor

BDNF is another extensively studied neurotrophin. Like NGF, BDNF has neuronal survival and axonal elongation properties, also participating in neural plasticity, memory formation, and cognitive processing. BDNF binds to TrkB and LNGFR/p75NTR (Figure 3), promoting a signaling pathway similar to NGF (Huang and Reichardt, 2001; Yamada and Nabeshima, 2003; Kowiański et al., 2018). Struder and Rojas Vegas (2008) observed that resting paraplegic athletes with thoracic SCI have high venous blood BDNF concentration and, after exercising, this concentration rises even more (Rojas Vega et al., 2008). They hypothesize that these enhanced BDNF levels would promote the preservation of the spinal cord or compensatory plasticity, leading to functional recovery. Although there are diverse preclinical studies in the literature evidencing BDNF benefits, there is no clinical trial using it.

Ciliary neurotrophic factor

CNTF release is enhanced after SCI by invading Schwann cells, local astrocytes, and muscle fibers and maintains survival and differentiation of various neuronal and nonneuronal cell types. CNTF is a glycoprotein that belongs to the IL-6 family, and its heterotrimeric receptor is composed of the CNTF receptor alpha (CNTFR α), glycoprotein-130 (gp130), and the leukemia inhibitory factor receptor (LIFR β , also known as CD118). The CNTF/CNTFR α complex subsequently binds to gp130 and LIFR β , and this heterodimerization activates the JAK/STATs pathway, RAS/MAPK, and PLC γ (Figure 3), which promote diverse gene transcription regulation (Chen et al., 2009; Pasquin et al., 2015).

Alternative activation of IL6R α /gp130/LIFR β tripartite receptor by high CNTF concentration might contribute to the extreme weight loss observed in humans and animals upon CNTF systemic administration (Sleeman et al., 2000). On the other hand, local administration of CNTF does not show side effects and can promote motor neuron survival, protect neurons in the red nucleus, promote axonal regeneration, increase sensory and motor neuron survival, enhance tissue sparing, modulate astrocytic and microglial activity in the vicinity of the injury, increase the survival and differentiation of adult oligodendrocyte precursor cells, enhance remyelination, and improve functional outcomes (Ye et al., 2004; Cao et al., 2010). Besides, CNTF influences neuroinflammation by macrophage chemoattraction by reactive astrocytes. CNTF can regulate the reactive astrocyte polarization from A1

(neurotoxic) to the A2 (neuroprotective) phenotype and promote A2-type reactive astrogliosis by activating the STAT3 signaling pathway. Also, STAT3 might be essential for glial scar formation and astrocytic neuroprotective profile after SCI (Zhang et al., 2021).

Purines

In the field of CNS injuries treatments, molecular therapies have shown promising results in regeneration, neuroprotection, and other effects. Nowadays, it is widely known that purines nucleosides, such as adenosine, adenosine's metabolic subproducts inosine and guanosine, exert more biological effects than only those related to the nucleic acid constitution and cell energy metabolism (Ribeiro et al., 2016). Here we review the contribution of purines on SCI treatment (Figure 4).

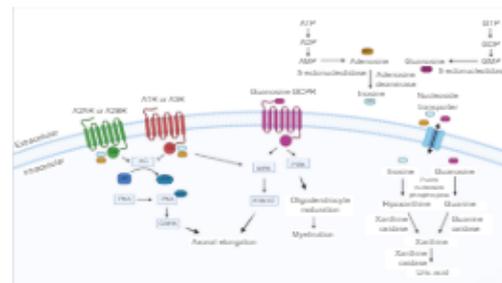


Figure 4 | Schematic representation of purine's receptors and functions.

Degradation pathway of adenosine/inosine and guanosine, both extracellularly and intracellularly. Both pathways have uric acid as the final metabolite. Regarding the receptors, here we show the four GPCR ARs, with the Gs and Gi proteins, stimulating and inhibiting the AC, after the binding of adenosine and inosine. We also show the GPCR for guanosine and its binding site. AC: Adenylyl cyclase; ARs: adenosine receptors; GPCR: G coupled protein receptor; Gi: G inhibition (adenylyl cyclase); Gs: G stimulating (adenylyl cyclase).

Adenosine

Over the years, since the discovery of the functions of adenosine, some researchers observed that adenosine could regulate the formation of cAMP (Ribeiro et al., 2016). This regulation is mediated through its interaction with four G protein-coupled receptors: A2AR e A2BR composed of a Gs unit, stimulating adenylyl cyclase and enhancing the level of cAMP; and A1R and A3R, composed of a Gi unit, inhibiting adenylyl cyclase and decreasing the level of cAMP. The four adenosine receptors (ARs) share a common structure, which crosses the plasma membrane seven times and is linked by three intracellular and three extracellular loops (Ribeiro et al., 2016; Borea et al., 2018). The concentration of adenosine, both intracellularly and extracellularly, is regulated by nucleoside transporters, which are located in the cellular membrane (Borea et al., 2018). Regarding the expression of ARs in the spinal cord, A1 and A2A receptors are most prevalent within the spinal cord. The A1R is highly expressed and was shown to inhibit neurotransmitter release. In stressful excitotoxic conditions after an SCI, this inhibition can promote neuroprotection, and reduction of the secondary damage. The A2AR is mainly expressed in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia, and they mediate many functions, including attenuation of glial reactivity, blood-brain barrier permeability, uptake of GABA by astrocytes, and immunomodulation of microglia (Ribeiro et al., 2016; Borea et al., 2018).

Although adenosine has a potential pharmacological activity, it has a fast metabolism and clearance from the bloodstream, due to its short half-life (< 1 second), reducing its beneficial therapeutic effects (Gaudin et al., 2014; Borea et al., 2018). Thus, to bypass adenosine's short half-life, Gaudin et al. (2014) used the squalenylacetic acid linked to the amino group of adenosine (SQAd) that spontaneously forms nanoparticles, promoting a controlled liberation of this nucleoside, in a contusive SCI model. SQAd animals had no visible traumatic area on the spinal cord 72 hours post-injury, resulting in an improvement of hindlimb function, extending to almost complete recovery, 28 days after injury. They also showed that the SQAd treatment attenuated the degenerative impact on small- and medium-size nerve fibers. These results are probably due to the improvement in the microcirculation, leading to secondary parenchyma neuroprotection (Gaudin et al., 2014). A recent study, using 5 days administration of synthesized adenosine analog COA-CI, in the acute phase of a contusive SCI model, showed a decrease in the volume of the cavity, 1 month after the injury, and also an improvement in motor function in the Basso, Beattie and Bresnahan score and inclined plane test, due to the effect of the COA-CI on suppressing the neuronal apoptosis around the injured site (Sakamoto et al., 2021). In conclusion, using the SQAd and the COA-CI enhanced the potential of adenosine after SCI and improved the recovery of function, mainly due to the neuroprotective effects of adenosine in the spinal cord. No clinical trials are being conducted with adenosines.

Inosine

The deamination of adenosine by the action of adenosine deaminase results

Review



- Deng LX, Hu J, Liu N, Wang X, Smith GM, Wen X, Xu XM (2011) GDNF reverses the inhibitory properties of reactive astrocytes allowing robust axonal regeneration through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury. *Exp Neurol* 229:238.
- Dergham F, Elezani B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 22:6570-6577.
- Ding VM, Ling L, Natarajan S, Yap MG, Cool SM, Choo AB (2010) FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPSC cells through activated PI3-K/GSK3 β signaling. *J Cell Physiol* 225:417-428.
- Doyle C, Cristofaro V, Sullivan MP, Adam RM (2018) Inosine-A multifunctional treatment for complications of neurologic injury. *Cell Physiol Biochem* 49:2293-2303.
- Dyck S, Kataria H, Alzadah A, Santhosh KT, Lang B, Silver J, Karimi-Abdolrazzaki S (2018) Perturbing chondroitin sulfate proteoglycan signaling through LAR and PTPs receptors promotes a beneficial inflammatory response following spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 15:1-26.
- Dyck S, Kataria H, Akbari-Kelachayeh K, Silver J, Karimi-Abdolrazzaki S (2019) LAR and PTPs receptors are negative regulators of oligodendrogenesis and oligodendrocyte integrity in spinal cord injury. *Glia* 67:125-145.
- Edamura K, Takahashi Y, Fujii A, Masuhiro Y, Narita T, Seki M, Asano K (2020) Recombinant canine basic fibroblast growth factor-induced differentiation of canine bone marrow mesenchymal stem cells into voltage- and glutamate-responsive neuron-like cells. *Regen Ther* 15:121-128.
- Fehlings MG, Chen Y, Aarabi B, Ahmad F, Anderson KD, Dumont T, Fourmy DR, Harrop JS, Kim KD, Kwon BK (2021) A randomized controlled trial of local delivery of a Rho inhibitor (VX-210) in patients with acute traumatic cervical spinal cord injury. *J Neurotrauma* 38:2065-2072.
- Fisher D, Xing B, Dill J, Li H, Hoang HH, Zhao Z, Yang XL, Bachoo R, Cannon S, Longo FM (2011) Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. *J Neurosci* 31:14051-14066.
- Freeman RS, Burch RL, Crowder RJ, Lomb DJ, Schoell MC, Straub JA, Xie L (2004) NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand? *Prog Brain Res* 146:111-126.
- García-Allas G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW (2009) Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci* 12:1145-1151.
- Gaudin A, Yemisci M, Eragci H, Lepatre-Mouelhi S, Turkoglu OF, Dönmez-Demir B, Caban S, Sarigon MF, Garcia-Argote S, Pieters G (2014) Squalenoyl adenosine nanoparticles provide neuroprotection after stroke and spinal cord injury. *Nat Nanotechnol* 9:1054-1062.
- Gospodarowicz D (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249:123-127.
- Grijalva I, García-Pérez A, Díaz J, Aguilar S, Mino D, Santiago-Rodríguez E, Guizar-Sahagún G, Castañeda-Hernández G, Maldonado-Julian H, Madrazo I (2010) High doses of 4-aminopyridine improve functionality in chronic complete spinal cord injury patients with MRI evidence of cord continuity. *Arch Med Res* 41:567-575.
- Grossman RG, Fehlings MG, Frankowski RF, Burau KD, Chow DS, Tator C, Teng A, Toups EG, Harrop JS, Aarabi B (2014) A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 31:239-255.
- Guo XY, Duan FX, Chen J, Wang Y, Wang R, Shen L, Qi Q, Jiang ZQ, Zhu AX, Xi J (2019) Subcutaneous administration of PDGF-AA improves the functional recovery after spinal cord injury. *Front Neurosci* 13:6.
- Ha KY, Carragee E, Cheng I, Kwon SE, Kim YH (2011) Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats: biochemical analysis and effect on glial cells. *J Korean Med Sci* 26:404-411.
- Hall ED (2011) Antioxidant therapies for acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 8:152-167.
- Haskó G, Sitkovsky MV, Szabo C (2004) Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci* 25:152-157.
- Hajrati N, Fehlings MG (2021) A review of emerging neuroprotective and neuroregenerative therapies in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Pharmacol* 60:331-340.
- Hilton BJ, Husch A, Schaffran B, Lin TC, Burnside ER, Dupraz S, Schelski M, Kim J, Müller JA, Schoch S (2022) An active vesicle priming machinery suppresses axon regeneration upon adult CNS injury. *Neuron* 110:51-69.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huang F, Gao T, Wang W, Wang L, Xie Y, Tai C, Liu S, Cui Y, Wang B (2021) Engineered basic fibroblast growth factor-overexpressing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve the proliferation and neuronal differentiation of endogenous neural stem cells and functional recovery of spinal cord injury by activating the PI3K-Akt-GSK-3 β signaling pathway. *Stem Cell Res Ther* 12:468.
- Hunt C, Moman R, Peterson A, Wilson R, Covington S, Mustafa R, Murad MH, Hooten WM (2021) Prevalence of chronic pain after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Reg Anesth Pain Med* 46:328-336.
- Hutson TH, Katho C, Palmisano I, Bartholdi K, Hervera A, De Virgiliis F, McLachlan E, Zhou L, Kong Q, Barraud Q (2019) Cbp-dependent histone acetylation mediates axon regeneration induced by environmental enrichment in rodent spinal cord injury models. *Sci Transl Med* 11:eaaaw2064.
- Imagawa S, Ogino R, Ueno S, Murayama N, Takemoto N, Shimmyo Y, Kadoshima T, Tamura S, Kuroda M, Matsuyama Y (2020) Systemic treatment with a novel basic fibroblast growth factor mimic small-molecule compound boosts functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 15:e0236050.
- Itoh N, Omizt DM (2008) Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn* 237:18-27.
- Jacobson PB, Goody R, Lawrence M, Mueller BK, Zhang X, Hooker BA, Pfeleger K, Ziemann A, Locke C, Barraud Q (2021) Elezanumab, a human anti-RGMA monoclonal antibody, promotes neuroprotection, neuroplasticity, and neurorecovery following a thoracic hemicompression spinal cord injury in non-human primates. *Neurobiol Dis* 155:105385.
- Jevans B, James ND, Burnside E, McCann CJ, Thapar N, Bradbury EJ, Burns AJ (2021) Combined treatment with enteric neural stem cells and chondroitinase ABC reduces spinal cord lesion pathology. *Stem Cell Res Ther* 12:10.
- Jiang S, Khan M, Lu Y, Wang J, Buttigieg J, Werstliak ES, Ciccarelli R, Caciagli F, Rathbone MP (2003) Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *Neuroreport* 14:2463-2467.
- Jiang S, Bendjelloul F, Ballarín P, D'Alimonte I, Nargi E, Jiang C, Huang X, Rathbone MP (2007) Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. *Purinergic Signal* 3:411-421.
- Jiang S, Fischione G, Gulliani P, Romano S, Caciagli F, Dilorio P (2008) Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27:673-680.
- Kamada T, Koda M, Dezawa M, Yoshinaga K, Hashimoto M, Koshizuka S, Nishio Y, Moriya H, Yamazaki M (2005) Transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells promotes axonal regeneration and functional recovery after complete transection of adult rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:37-45.
- Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, Hamasaki T, Nakanishi K, Sakai N, Ochi M (2007) BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures. *Spine* 32:1272-1278.
- Kim D, Zai L, Liang P, Schaffling C, Ahlborn D, Benowitz LI (2013) Inosine enhances axon sprouting and motor recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 8:e81948.
- Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Wałkow M, Steliga A, Moryś J (2018) BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 38:579-593.
- Kuchler K, Johns D, Maier D, Abel R, Badke A, Baron H, Thietje R, Casha S, Meindl R, Gomez-Manilla B (2018) First-in-man intrathecal application of neurite growth-promoting anti-Nogo-A antibodies in acute spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 32:578-589.
- Kurikova M, Ledecy V, Liptak T, Madari A, Grulova I, Slovinska L, Nagyova M, Cizkova D (2014) Oral administration of inosine promotes recovery after experimental spinal cord injury in rat. *Neuro Sci* 35:1785-1791.
- Lang BT, Cragg JM, DePaul MA, Tran AP, Xu K, Dyck SM, Madalena KM, Brown BP, Wang YL, Li S (2015) Modulation of the proteoglycan receptor PTPs promotes recovery after spinal cord injury. *Nature* 518:404-408.
- Lee JK, Geoffroy CG, Chan AF, Tolentino KE, Crawford MJ, Leal MA, Kang B, Zheng B (2010) Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron* 66:663-670.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.
- Li S, Liu BP, Budel S, Li M, Ji B, Walus L, Li W, Jirik A, Rabacchi S, Choi E, Worley D, Sah DW, Pepinsky B, Lee D, Reiton J, Strittmatter SM (2004) Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci* 24:10511-10520.
- Li Z, Zheng M, Yu S, Yao F, Luo Y, Liu Y, Tian D, Cheng L, Jing J (2021a) M2 macrophages promote PDGFR β pericytes migration after spinal cord injury in mice via PDGFR β /PDGFR β pathway. *Front Pharmacol* 12:745.
- Li ZW, Zhao JJ, Li SY, Cao TT, Wang Y, Guo Y, Xi GJ (2021b) Blocking the EGFR/p38/NF- κ B signaling pathway alleviates disruption of BSC8 and subsequent inflammation after spinal cord injury. *Neurochem Int* 150:105190.
- Liu F, You SW, Yao LP, Liu HL, Jiao XY, Shi M, Zhao QB, Ju G (2006) Secondary degeneration reduced by inosine after spinal cord injury in rats. *Spinal Cord* 44:421-426.
- Liu X, Wang J, Li G, Lv H (2018) Effect of combined chondroitinase ABC and hyperbaric oxygen therapy in a rat model of spinal cord injury. *Mol Med Rep* 18:25-30.
- Mahajan R (2018) Chondroitinase ABC enzyme: a potential treatment option for spinal cord injury. *Int J Appl Basic Med Res* 8:203.
- Markandaya M, Stein DM, Menaker J (2012) Acute treatment options for spinal cord injury. *Curr Treat Options Neurol* 14:175-187.
- Marques SA, Almeida FM, Fernandes AM, dos Santos Souza C, CadThe DV, Rehen SK, Martinez AM (2010) Proliferated embryonic stem cells promote functional recovery after spinal cord compressive injury. *Brain Res* 1349:115-128.
- McBride J, Smith D, Byrn S, Borgans R, Shi R (2007) 4-Aminopyridine derivatives enhance impulse conduction in guinea-pig spinal cord following traumatic injury. *Neuroscience* 148:44-52.
- Mehanna A, Jakovcević I, Acar A, Xiao M, Loers G, Rougon G, Irintchev A, Schachner M (2010) Polysialic acid glycomimetic promotes functional recovery and plasticity after spinal cord injury in mice. *Mol Ther* 18:34-43.
- Mehta NR, Lopez PH, Vyas AA, Schnaar RL (2007) Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem* 282:27875-27886.
- Minnema AJ, Mehta A, Bolding WW, Schwab J, Simard JM, Farhad HF (2019) SCING—Spinal Cord Injury Neuroprotection with Glyburide: a pilot, open-label, multicentre, prospective evaluation of oral glyburide in patients with acute traumatic spinal cord injury in the USA. *BMI Open* 9:e031329.
- Morse LR, Field-Fote EC, Contreras-Vidal J, Noble-Haeusslein LJ, Rodrick M, Group SW, Shields RK, Sofroniew M, Wudlick R, Zanca JM (2021) Meeting proceedings for SCI 2020: launching a decade of disruption in spinal cord injury research. *J Neurotrauma* 38:1251-1266.

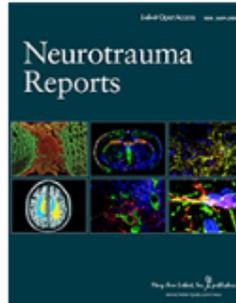


- Mossahabi-Mohammadi M, Qian M, Zhang JS, Li X (2020) FGF signaling pathway: a key regulator of stem cell pluripotency. *Front Cell Dev Biol* 8:79.
- Mothe AJ, Tassew NG, Shabanzadeh AP, Penheiro R, Vigouroux RJ, Huang L, Grinnell C, Cui YF, Fung E, Monnier PP (2017) RGMa inhibition with human monoclonal antibodies promotes regeneration, plasticity and repair, and attenuates neuropathic pain after spinal cord injury. *Sci Rep* 7:10529.
- Mountney A, Zahner MR, Lorenzini I, Oudega M, Schramm LP, Schnaar RL (2010) Sialidase enhances recovery from spinal cord contusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11561-11566.
- Mountney A, Zahner MR, Sturgill ER, Riley CJ, Aston JW, Oudega M, Schramm LP, Hurtado A, Schnaar RL (2013) Sialidase, chondroitinase ABC, and combination therapy after spinal cord contusion injury. *J Neurotrauma* 30:183-190.
- Ohtake Y, Park D, Abdul-Muneer PM, Li H, Xu B, Sharma K, Smith GM, Seiber ME, Li S (2014) The effect of systemic PTEN antagonist peptides on axon growth and functional recovery after spinal cord injury. *Biomaterials* 35:4610-4626.
- Ozturk AM, Sobzileni MC, Sevgili E, Dagci T, Ozyalcin H, Armanog G (2018) Epidermal growth factor regulates apoptosis and oxidative stress in a rat model of spinal cord injury. *Injury* 49:1038-1045.
- Pasquin S, Sharma M, Gauchat JF (2015) Ciliary neurotrophic factor (CNTF): new facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:507-515.
- Piemel JR, Chojnacki A, Sparling JS, Liu J, Planet W, Duncan GJ, Park SE, Weiss S, Tetzlaff W (2011) Platelet-derived growth factor-responsive neural precursors give rise to myelinating oligodendrocytes after transplantation into the spinal cords of contused rats and dysmyelinated mice. *Glia* 59:1891-1910.
- Proflyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petrotos S (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 15:415-436.
- Rabchevsky AG (2005) Segmental organization of spinal reflexes mediating autonomic dysreflexia after spinal cord injury. *Prog Brain Res* 152:265-274.
- Ramalho BDS, Almeida FM, Sales CM, de Lima S, Martinez AMB (2018) Injection of bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous or intraperitoneal routes is a viable alternative to spinal cord injury treatment in mice. *Neural Regen Res* 13:1046-1053.
- Raspa A, Bolla E, Casconca C, Gelain F (2019) Feasible stabilization of chondroitinaseabc enables reduced astrogliosis in a chronic model of spinal cord injury. *CNS Neurosci Ther* 25:86-100.
- Rathbone M, Pilutti L, Caciagli F, Jiang S (2008) Neurotrophic effects of extracellular guanosine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27:666-672.
- Ribeiro FV, Kapelli S, Miranda-Lourenco C, Tanqueiro SR, Fonseca-Gomes J, Diógenes MJ, Ribeiro JA, Sebastião AM (2016) Purinucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology* 104:226-242.
- Rojas Vega S, Abel T, Lindschulter R, Holmann W, Bloch W, Strüder HK (2008) Impact of exercise on neuroplasticity-related proteins in spinal cord injured humans. *Neuroscience* 153:1064-1070.
- Rowland JW, Hawrylyk GW, Kwon B, Fehlings MG (2008) Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus* 25:E2.
- Saini V, Lutz D, Kataria H, Kaur G, Schachner M, Loers G (2016) The polysialic acid mimetics 5-nonyloxytryptamine and vinorelbine facilitate nervous system repair. *Sci Rep* 6:26927.
- Sakamoto I, Hirai N, Hayashi N, Okabe N, Nakamura-Maruyama E, Tsukamoto I, Hasegawa T, Miyamoto O (2021) The protective effect and mechanism of CDA-CI in acute phase after spinal cord injury. *Neurosci Res* 170:114-121.
- Sapich PS, Duplant L, Uetani N, Joly S, Tremblay ML, Kennedy TE, Di Polo A (2005) Receptor protein tyrosine phosphatase sigma inhibits axon regrowth in the adult injured CNS. *Mol Cell Neurosci* 28:625-635.
- Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H, Iwata H, Adachi K, Kiuchi K (2000) Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) following traumatic spinal cord injury. *Neuroreport* 11:3877-3881.
- Schwab ME, Strittmatter SM (2014) Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Curr Opin Neurobiol* 27:53-60.
- Scrivens PJ, Alaoui-Jamali MA, Giannini G, Wang T, Loignon M, Battist G, Sandor VA (2003) Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues. *Mol Cancer Ther* 2:1053-1059.
- Sharma HS (2007) A select combination of neurotrophins enhances neuroprotection and functional recovery following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci* 1122:95-111.
- Shinozaki M, Iwanami A, Fujiyoshi K, Tashiro S, Kitamura K, Shibata S, Fujita H, Nakamura M, Okano H (2016) Combined treatment with chondroitinase ABC and treadmill rehabilitation for chronic severe spinal cord injury in adult rats. *Neurosci Res* 113:37-47.
- Simard JM, Tsymbalyuk O, Ivanov A, Ivanova S, Bhatta S, Geng Z, Woo SK, Gerzanich V (2007) Endothelial sulfonylurea receptor 1-regulated NC-Ca-ATP channels mediate progressive hemorrhagic necrosis following spinal cord injury. *J Clin Invest* 117:2105-2113.
- Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG (2014) Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol* 6:309-331.
- Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (2000) The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74:265-272.
- Song X, Xu Y, Wu J, Shao H, Gao J, Feng X, Gu J (2021) A sandwich structured drug delivery composite membrane for improved recovery after spinal cord injury under long-term controlled release. *Colloids Surf B Biointerfaces* 199:111529.
- Squair JW, Ruiz L, Phillips AA, Zheng MM, Sarafis ZK, Sachdeva R, Gopaul R, Liu J, Tetzlaff W, West CR (2018) Minoxidil reduces the severity of autonomic dysreflexia after experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma* 35:2861-2871.
- Tator CH, Fehlings MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75:15-26.
- Tedeschi A, Dupraz S, Laskowski CJ, Xue J, Ulas T, Beyer M, Schultze JL, Bradke F (2016) The calcium channel subunit $\alpha 2\delta 2$ suppresses axon regeneration in the adult CNS. *Neuron* 92:419-434.
- Thuret S, Moon LD, Gage FH (2006) Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 7:628-643.
- Vincenzi F, Pasquini S, Borea PA, Varani K (2020) Targeting adenosine receptors: a potential pharmacological avenue for acute and chronic pain. *Int J Mol Sci* 21:8710.
- Vyas AA, Patel HV, Fromholt SE, Heffer-Laue M, Vyas KA, Dang J, Schachner M, Schnaar RL (2002) Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8412-8417.
- Vyas AA, Blikt O, Paulson JC, Schnaar RL (2005) Potent glycan inhibitors of myelin-associated glycoprotein enhance axon outgrowth in vitro. *J Biol Chem* 280:16305-16310.
- Walker CL, Walker MJ, Liu NK, Risberg EC, Gao X, Chen J, Xu XM (2012) Systemic bisperoxovanadium activates Akt/mTOR, reduces autophagy, and enhances recovery following cervical spinal cord injury. *PLoS One* 7:e30012.
- Wang X, Zhou T, Maynard GD, Terse PS, Cafferty WB, Kocsis JD, Strittmatter SM (2020) Nogo receptor decoy promotes recovery and corticospinal growth in non-human primate spinal cord injury. *Brain* 143:1697-1713.
- Wang YZ, Wu CC, Wang XQ (2021) Bibliometric study of pain after spinal cord injury. *Neural Plast* 2021:6634644.
- Warner FM, Cragg JJ, Zurzeler CR, Röhrich F, Weidner N, Saur M, Maier DD, Schulz C, Sites E, Curt A (2017) Early administration of gabapentinoids improves motor recovery after human spinal cord injury. *Cell Rep* 18:1614-1618.
- Welshinda AA, Kaur M, Greene K, Zhai Y, Amato EP (2016) The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A2A receptor with a unique signaling bias. *Cell Signal* 28:553-560.
- Wu H, Mahmood A, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Zhou D, Chopp M (2010) Attenuation of astrogliosis and modulation of endothelial growth factor receptor in lipid rats by simvastatin after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 113:591-597.
- Wu X, Xu XM (2016) RhoA/Rho kinase in spinal cord injury. *Neural Regen Res* 11:23-27.
- Xia N, Gao Z, Hu H, Li D, Zhang C, Mei X, Wu C (2021) Nerve growth factor loaded macrophage-derived nanovesicles for inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury. *J Biomater Appl* 36:276-288.
- Xue W, Zhao Y, Xiao Z, Wu X, Ma D, Han J, Li X, Xue X, Yang Y, Fang Y, Fan C, Liu S, Xu B, Han S, Chen B, Zhang H, Fan Y, Liu W, Dong Q, Dai J (2020) Epidermal growth factor receptor-extracellular-regulated kinase blockade upregulates TRIM32 signaling cascade and promotes neurogenesis after spinal cord injury. *Stem Cells* 38:118-133.
- Yamada K, Nabeshima T (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91:267-270.
- Yang LJ, Lorenzini I, Vajn K, Mountney A, Schramm LP, Schnaar RL (2006) Sialidase enhances spinal axon outgrowth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11057-11062.
- Yao ZF, Wang Y, Lin YH, Wu Y, Zhu AX, Wang R, Shen L, Xi J, Qi Q, Jiang ZQ, Li HZ, Hu JG (2017) Transplantation of PDGF-AA-overexpressing oligodendrocyte precursor cells promotes recovery in rat following spinal cord injury. *Front Cell Neurosci* 11:79.
- Ye J, Cao L, Cui R, Huang A, Yan Z, Lu C, Hu C (2004) The effects of ciliary neurotrophic factor on neurological function and glial activity following contusive spinal cord injury in the rats. *Brain Res* 997:30-39.
- Ye LX, An NC, Huang P, Li DH, Zhang ZL, Ji H, Li H, Chen DQ, Wu YQ, Xiao J, Xu K, Li XX, Zhang HY (2021) Exogenous platelet-derived growth factor improves neurovascular unit recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 16:765-771.
- Yick LW, Cheung PT, So KF, Wu W (2003) Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC. *Exp Neurol* 182:160-168.
- Yiu G, He Z (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7:617-627.
- Yuan L, Zhao Y, Sun XL (2020) Sialidase substrates for Sialidase assays-activity, specificity, quantification and inhibition. *Glycoconj J* 37:513-531.
- Yuan YM, He C (2013) The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull* 29:421-435.
- Zhang C, He X, Li H, Wang G (2013a) Chondroitinase ABC plus bone marrow mesenchymal stem cells for repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res* 8:965.
- Zhang L, Ma Z, Smith GM, Wen X, Pressman Y, Wood PM, Xu XM (2009) GDNF-enhanced axonal regeneration and myelination following spinal cord injury is mediated by primary effects on neurons. *Glia* 57:1178-1191.
- Zhang S, Wang XJ, Li WS, Xu XL, Hu JB, Kang XQ, Qi J, Ying XY, You J, Du YZ (2018) Polycaprolactone/polysialic acid hybrid, multifunctional nanofiber scaffolds for treatment of spinal cord injury. *Acta Biomater* 77:15-27.
- Zhang T, Shen Y, Lu L, Fan Z, Huo W (2013b) Effect of chondroitinase ABC on axonal myelination and glial scar after spinal cord injury in rats. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 27:145-150.
- Zhang Y, Meng T, Chen J, Zhang Y, Kang J, Li X, Yu G, Tian L, Jin Z, Dong H, Zhang X, Ning B (2021) miR-21a-5p promotes inflammation following traumatic spinal cord injury through upregulation of neurotoxic reactive astrocyte (A1) polarization by inhibiting the CNTF/STAT3/Nrf2 pathway. *Int J Biol Sci* 17:2795-2810.
- Zhou Y, Wang Z, Li J, Li X, Xiao J (2018) Fibroblast growth factors in the management of spinal cord injury. *J Cell Mol Med* 22:25-37.
- Zhu S, Ying Y, Ye J, Chen M, Wu Q, Dou H, Ni W, Xu H, Xu J (2021) AAV2-mediated and hypoxia response element-directed expression of bFGF in neural stem cells showed therapeutic effects on spinal cord injury in rats. *Cell Death Dis* 12:274.

C-Editors: Zhao M, Zhao L, Qiu Y, T-Editor: Jia Y

2 - Artigo publicado na Neurotrauma Reports

Neurotrauma Reports



**EXERCISE VOLUME CAN MODULATE THE REGENERATIVE
RESPONSE TO SPINAL CORD INJURY IN MICE**

Journal:	<i>Neurotrauma Reports</i>
Manuscript ID:	NEUR-2024-0023.R2
Manuscript Type:	Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santos, Anne; Federal University of Rio de Janeiro, Pathological Anatomy Laurindo, Renata; Federal University of Rio de Janeiro Pestana, Fernanda; Federal University of Rio de Janeiro, Pathological Anatomy Heringer, Luiza; Federal University of Rio de Janeiro, Pathological Anatomy Canedo, Nathalie ; Federal University of Rio de Janeiro Martinez, Ana ; Federal University of Rio de Janeiro, Pathological Anatomy MARQUES, SUELEN; Federal Fluminense University, Neurobiology
Keywords:	NEUROPLASTICITY, REGENERATION, REHABILITATION, TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY, ELECTROPHYSIOLOGY
Manuscript Keywords (Search Terms):	Spinal Cord Injury, Exercise, Nerve regeneration, Functional recovery, Morphological assessment

SCHOLARONE™
Manuscripts