



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR

MÁRCIO JOSÉ TEIXEIRA SFAIR

**EFEITOS DO EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO NA RECUPERAÇÃO DE
HEMISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL: MUDANÇAS NA REDE
PERINEURONAL E ACETILAÇÃO DE HISTONAS.**

Belém

2014

MÁRCIO JOSÉ TEIXEIRA SFAIR

**EFEITOS DO EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO NA RECUPERAÇÃO DE
HEMISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL: MUDANÇAS NA REDE
PERINEURONAL E ACETILAÇÃO DE HISTONAS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Carlomagno
Pacheco Bahia

Belém

2014

MÁRCIO JOSÉ TEIXEIRA SFAIR

EFEITOS DO EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO NA RECUPERAÇÃO DE
HEMISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL: MUDANÇAS NA REDE
PERINEURONAL E ACETILAÇÃO DE HISTONAS.

Dissertação de Mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Carlomagno

Pacheco Bahia

BANCA EXAMINADORA:

_____ - Orientador e Presidente da
Banca
Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

_____ - Co-orientador
Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
Instituto de Ciências da Saúde/ Universidade Federal do Pará

_____ - Avaliadora
Profa. Dra. Vania Castro Corrêa
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Pará

_____ – Avaliador
Prof. Dr. Ghislain Jean André Saunier
Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Pará

FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Fundação de Apoio a Pesquisa do Pará – FAPESPA

Universidade Federal do Pará – UFPA

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

DEDICATÓRIA

À todos que de alguma forma me ajudaram a trilhar esse caminho e em especial à Erick Batalha, que mesmo sem saber, me incentivou e me inspirou com seu exemplo de vida e vontade de viver.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, à Deus, pois Ele é minha fortaleza e nEle confio a minha vida.

Ao orientador Prof. Dr. Antônio Pereira, pela oportunidade, confiança, paciência e incentivo;

Ao co-orientador Prof. Dr. Carlomagno Bahia, pelos ensinamento frequentes no laboratório e incentivo em alcançar sempre os melhores resultados;

A todos os integrantes do Laboratório de Neuroplasticidade, professores e alunos, Otávio Folha, Soanne Quiara, Ketlin Castro, Klebson Rodrigues e em especial à Gisele Aguiar, Mario Santos e Rafael Cei.

À Caroline Brasil, pela paciência, amor e apoio nessa árdua caminhada.

À todos ao integrante do LNNE, em especial à Marcelo Cardoso, Celice Cordeiro e Rosana Lopes.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural, em especial ao Prof. Dr. Chubert Sena, pelo apoio, dicas e toda ajuda nos momentos decisivos.

À minha família, em especial aos meus pais, José e Ana, que sempre fizeram tudo para me proporcionar uma boa educação.

RESUMO

A prática regular de exercícios físicos previne e combate várias doenças ao longo do tempo, destacando-se como excelente ferramenta terapêutica para o tratamento de lesões no sistema nervoso central (SNC). Após uma transecção (completa ou incompleta/hemissecção) da medula espinhal, células gliais reativas secretam substâncias inibitórias à regeneração axonal como, por exemplo, as moléculas de proteoglicanas de sulfato de condroitina (PGSCs) que exercem papel importante na formação de uma barreira físico-química, chamada cicatriz glial, que impede o crescimento dos axônios danificados pela lesão. Pesquisas que envolvem modelo experimental de lesão da medula espinhal e reabilitação por exercício físico têm obtido promissores resultados. No entanto, os mecanismos fisiológicos e moleculares pelos quais promovem esses resultados positivos ainda são pouco conhecidos. O objetivo do presente trabalho foi analisar a recuperação da função motora da pata posterior após protocolo de exercício físico voluntário em modelo experimental de hemissecção da medula espinhal e investigar dois mecanismos moleculares envolvidos na recuperação funcional: a degradação de PGSCs nas redes perineuronais e acetilação de histonas. Para isso, vinte e quatro (24) ratos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* foram utilizados e separados em 3 grupos (controle, treinados e não treinados). Com exceção do grupo controle, todos os animais foram habituados a rodas de corridas e em seguida foram submetidos a uma cirurgia experimental de hemissecção da medula espinhal, na altura da 8ª vertebra torácica. Nossos resultados demonstraram que o exercício voluntário em rodas de corrida após lesão experimental da medula espinhal promoveu recuperação da função motora da pata posterior afetada, porém não observamos diferenças qualitativas na acetilação de histonas e degradação de PGSCs entre os grupos.

Palavras-chaves: Exercício voluntário, lesão medular, hemissecção, cicatriz glial, proteoglicanos de sulfato de condroitina, histonas.

ABSTRACT

Regular physical exercise prevents and combats various diseases over time, especially as a great therapeutic tool for the treatment of lesions in the central nervous system (CNS). After transection (complete or incomplete / hemisection) spinal cord reactive glial cells secrete substances inhibitory to axonal regeneration, for example, molecules of chondroitin sulfate proteoglycans (PGSCs) that play an important role in the formation of a physical barrier chemical, called glial scar, which prevents the growth of axons damaged by injury. Research involving experimental model of spinal cord injury and rehabilitation by exercise have obtained promising results. However, the physiological and molecular mechanisms by which promote these positive results are still poorly understood. The objective of this study was to analyze the recovery of motor function of the hind paw after voluntary exercise protocol in an experimental model of spinal cord hemisection and investigate two molecular mechanisms involved in functional recovery: the degradation of the PGSCs Perineuronal networks and histone acetylation. To do this, twenty-four (24) male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) mice were used and divided into 3 groups (control, trained and untrained). Except for the control group, all animals were accustomed to racing wheels and followed underwent an experimental surgery hemisection of the spinal cord at the time of the 8th thoracic vertebra. Our results showed that voluntary exercise on wheels racing after experimental spinal cord injury promoted recovery of motor function of the affected hind paw, but did not observe qualitative differences in histone acetylation and degradation PGSCs between groups.

Keywords: voluntary exercise, spinal cord injury, hemisection, glial scar, proteoglycans chondroitin sulfate histones.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
AVC	Acidente Vascular cerebral
BBB	Basso, Beattie, Bresnahan
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BWTT	Body Weight-supported Treadmill Training
C-4-S	Chondroitin-4-Sulfate
DPL	Dia Após Lesão
EEF	Estímulo Elétrico Funcional
GAGs	Glicosaminoglicanas
GFAP	Glial Fibrillary Astrocytes Protein
HA	Hialurona
HATs	Histona Acetiltransferase
HDATS	Histona Desacetilase
LME	Lesão da Medula Espinhal
LNP	Laboratório de Neuroplasticidade
MAG	Myelin Associated Glycoprotein
MEC	Matriz Extracelular
PGSCs	Proteoglicanas de Sulfato de Condroitina
RPNs	Redes Perineuronais
RB	Registro de Base
SNC	Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias medulares.....	15
Figura 2. Reconstruções histológicas de lesão do tipo Brown-Séquard....	16
Figura 3. Causa de Lesão da Medula Espinhal.....	17
Figura 4. Três tipos de modelos de LME.....	18
Figura 5. Marcação de fibronectina no epicentro da lesão por contusão... 19	
Figura 6. Micrografia do epicentro da lesão medular por compressão.....	19
Figura 7. Micrografia do epicentro da lesão medular por hemisseção.....	20
Figura 8. Diagrama das principais respostas fisiopatológicas durante as fases agudas e crônicas da LME.....	21
Figura 9. Patofisiologia da LME.....	21
Figura 10. Diagrama mostrando a cicatrização glial no local da LME.....	22
Figura11. Estrutura do Espaço extracelular.....	24
Figura 12. Redes Perineuronais no SNC.....	25
Figura 13. Rede perineuronal composta por várias subclasses de PGSC ao redor de corpos celulares e dendritos proximais de neurônio do SNC.....	26
Figura 14. Modificações em histonas regulam a transcrição.....	29
Figura 15. Desenho experimental.....	37
Figura 16. Análise qualitativa da recuperação motora da pata afetada.....	44
Figura 17. Imunomarcação para histona H4 acetiladas.....	46
Figura 18. Imunoblot para acetilação de histona H4.....	47
Figura 19. Marcação de PGSCs degradado.....	48
Figura 20. Imunomarcação com anti-corpo Anti-GFAP.....	49
Figura 21. Astrócitos na cicatriz glial.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais.....	36
Tabela 2: Dados do teste BBB.....	45

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. LESÃO DA MEDULA ESPINHAL	15
1.1 TIPOS DE LESÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS	17
1.1.1 Lesão por Contusão	18
1.1.2 Lesão por Compressão	19
1.1.3 Lesão por Transecção	19
1.2 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO MEDULAR	20
1.2.1 Cicatriz Glial	22
2 MATRIZ EXTRACELULAR, REDE PERINEURONAL E NEUROPLASTICIDADE	24
3 ACETILAÇÃO DE HISTONAS	28
4 EXERCÍCIO FÍSICO	31
4.1 Tipos de Exercícios Físicos	31
4.1.1 Exercício Forçado	32
4.1.2 Exercício Involuntário	32
4.1.3 Exercício Voluntário	32
JUSTIFICATIVA	34
OBJETIVOS	35
OBJETIVO GERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
MÉTODOS	36
ANIMAIS EXPERIMENTAIS	36
DESENHO EXPERIMENTAL	37
AMBIENTAÇÃO	37
PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	38
CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	38
ANÁLISE COMPORTAMENTAL	38
ANÁLISE POR IMUNOBLOTING.....	39
ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	41
RESULTADOS	43
DISCUSSÕES	51
CONCLUSÕES	55
PESPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	

INTRODUÇÃO

A prática regular de exercícios físicos, independentemente da intensidade ou do tipo (resistidos, aeróbicos ou anaeróbicos), resulta em vários benefícios à saúde, inclusive na prevenção de várias doenças crônicas (ABACI et al., 1999; ASTORINO et al., 2012; THOMPSON et al., 2007). Os efeitos mais conhecidos e comumente observados da prática de exercícios físicos são a diminuição de peso corporal, a melhoria da função cardiorrespiratória e o ganho ou manutenção da massa muscular (PELÁEZ, 2006).

Entretanto, os benefícios da atividade física vão além dos ganhos físicos convencionais. Vários estudos demonstram que o exercício também proporciona benefícios cognitivos e de memória (SUIJO, 2012), além de ajudar a combater a depressão (LIU et al., 2012). Também há evidências favoráveis ao uso do exercício físico como ferramenta terapêutica para melhorar o prognóstico de pacientes com lesões no sistema nervoso central (SNC), como em casos de reabilitação após acidente vascular cerebral (AVC) (HAYES et al., 2008; KE et al., 2011) e lesões da medula espinhal (LME) (ENGESSER-CESAR et al., 2007).

Nas lesões medulares, dependendo da extensão da lesão, pode haver redução significativa da atividade física e da massa muscular, bem como disfunção autonômica cardiovascular (HAGEN et al., 2012 apud MURPHY et al., 2013). Vários estudos avaliam o exercício físico como ferramenta terapêutica para a reabilitação de indivíduos com LME (ENGESSER-CESAR et al., 2007; HARKEMA et al., 2012; MURPHY et al., 2013). Porém, várias questões permanecem ainda sem esclarecimento, como por exemplo, o tipo mais adequado de exercício, a duração e a ocasião mais adequada para sua aplicação após o trauma.

O presente trabalho verificou a influência do exercício físico voluntário realizado em rodas de corrida na recuperação funcional de ratos após hemiseção experimental da medula espinhal. Para avaliar a recuperação locomotora, utilizamos a escala BBB (BASSO et al., 1995). Além disso, analisamos o perfil de resposta histopatológica associada com a terapia e dois possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos com a recuperação, a acetilação

de histonas H4 e a degradação de proteoglicanas de sulfato de condroitina presentes nas redes perineuronais.

1 LESÃO DA MEDULA ESPINHAL (LME)

A LME pode ocasionar uma série de disfunções sensoriais e motoras cuja abrangência (parcial ou total) depende da severidade e localização da lesão. Basta um trauma parcial da medula espinhal para provocar sequelas e incapacidades permanentes, como é o caso da síndrome de Brown-Séquard, frequentemente observada após hemissecção medular (MURPHY et al., 2013). Esses déficits motores e sensoriais ocorrem pela interrupção de vias descendentes e ascendentes formada por axônios de neurônios motores e sensoriais localizados na substância branca da medula espinhal, como mostra a figura 1.

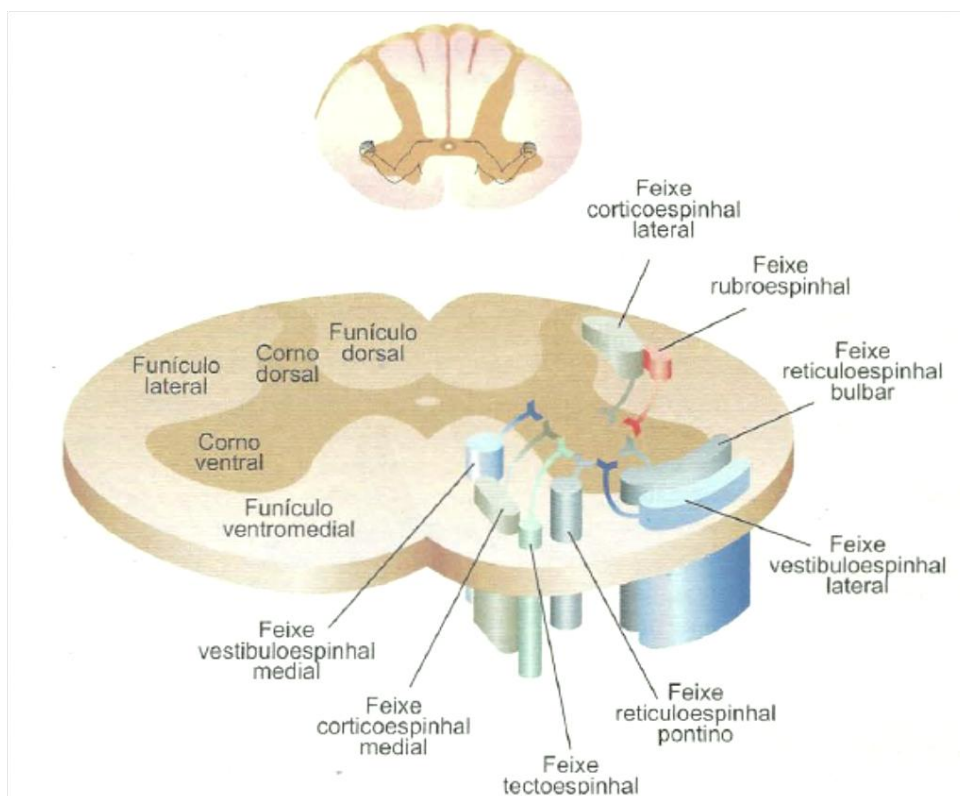


Figura 1: Vias medulares. Estruturas anômicas que alojam as vias descendentes dos tratos motores e as vias ascendentes que formam as vias sensoriais ocupam regiões específicas da substância branca medular. Na medula espinhal de humanos, o funículo lateral compreende os feixes corticoespinal lateral e rubroespinal, ambos componentes do subsistema motor lateral. Já em ratos esses tratos preservados, porém localizados no funículo dorsal. No funículo ventromedial ficam os demais feixes, componentes do subsistema medial (ou ventromedial). Adaptada de Lent (2ª ed., 2012).

As vias medulares são compostas por feixes distintos de axônios. Parte delas são responsáveis pela condução de informações sensoriais, localizadas principalmente no funículo dorsal. Outros feixes são responsáveis pela transmissão das informações motora e estão localizados principalmente nas regiões ventral e lateral da medula espinhal. Portanto, dependendo do local e da extensão da lesão na medula espinhal, é possível que a função motora fique mais comprometida do que a função sensorial ou vice-versa. Porém há caso na quais ambas as funções são drasticamente afetadas (Figura 2).

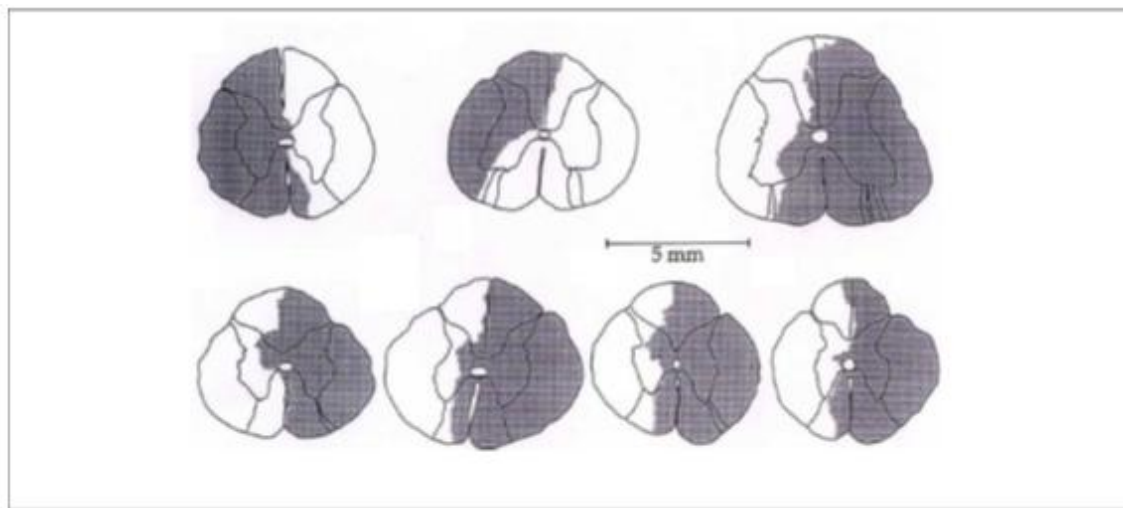


Figura 2: Reconstituições histológicas de lesão do tipo Brown-Séquard. Adaptado de Murphy et al (2013).

A maioria das lesões medulares, segundo a *National Spinal Cord Injury Statiscal Center*, é ocasionada por acidentes automobilísticos (figura 3). Corroborando com essa informação, os dados nacionais também demonstram a prevalência de lesões medulares por acidentes de trânsito no Brasil (MARTINS-PEREIRA; FERREIRA DE ARAÚJO, 2006). Por exemplo, do total de 293 pacientes com lesão medular atendidos no ano de 1997 na Rede Sarah de Hospitais do Aparelho Locomotor, 42,2% foram vítimas de acidentes de trânsito, 24% vítimas de disparos de arma de fogo, 12,4% de mergulhos em águas rasas, 11,6% de quedas e 9,5% de outras formas de tipos de acidentes ou violência (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Redução da Morbimortalidade por acidentes e Violências, 2001.). Mais de 50% dos casos

de lesão medular atendidos no SUS correspondem aos segmentos torácico e cervical (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Redução da Morbimortalidade por acidentes e Violências, 2001). Em relação à faixa etária, dados da Rede Sarah do ano 2003 indicam que dos 1.235 pacientes atendidos nos seus hospitais (Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Luiz, Salvador e Fortaleza e Brasília), 56% tinham idade entre 20 e 39 anos e 74% eram do sexo masculino (MARTINS-PEREIRA; FERREIRA DE ARAÚJO, 2006).

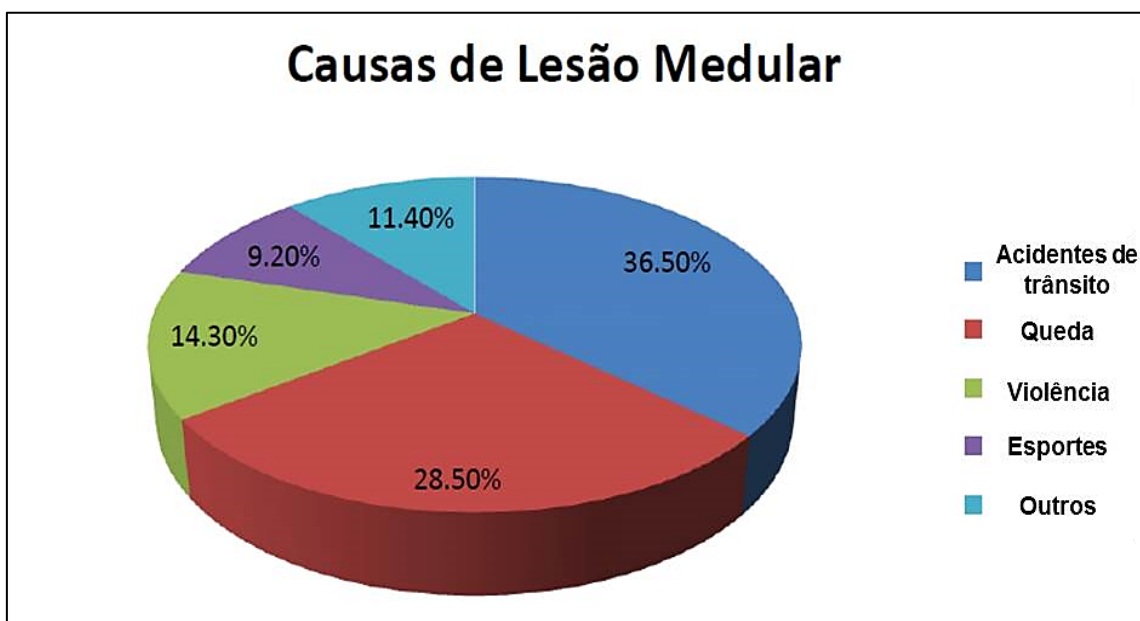


Figura 3: Causa de Lesão da Medula Espinhal: Dado catalogados nos Estados Unidos de 2010 a 2013 pela *National Spinal Cord Injury Statistical Center, Birmingham, Alabama*. Adaptado de *National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2013*.

1.1 TIPOS DE LESÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS.

Para melhor entendimento os processos histopatológicos e alterações comportamentais após a lesão da medula espinhal é necessário utilizar modelos animais experimentais. As lesões medulares podem ser classificadas em três tipos: transecção, contusão e compressão.

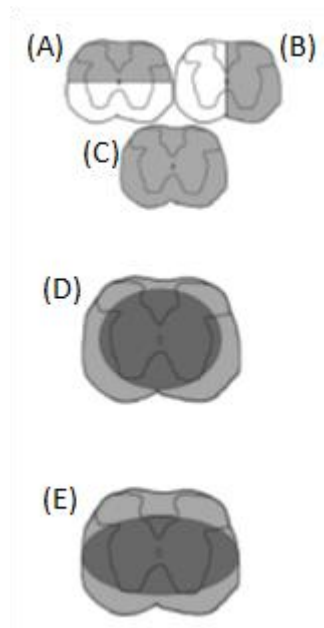


Figura 4: Três tipos de modelos de LME. Exemplos de lesões por transecção incluem hemissecções dorsal (A), hemissecções laterais (B), e transecção completa (C). Uma lesão por contusão (D) normalmente resulta em uma borda de substância branca poupada. Lesões por compressão (E) assemelham-se às lesões por contusões quanto à extensão da medula espinhal afetada. Adaptada de McDonough e Martínez-Cerdenó (2012).

1.1.1 Lesão por contusão

Lesões por contusão são produzidas pela ação de uma força focal na medula espinhal, mais comumente localizada na região dorsal. Em humanos, as características físicas associadas com esse modelo incluem a preservação da *pia mater*, a formação de cavitação na medula espinhal e uma complicação secundária, conhecida como sirigomelia. Experimentalmente, esse tipo de lesão é reproduzida através da queda controlada de um “peso” utilizando um aparato específico chamado de *Impactor* (e.g. *NYU Impactor*). Nesse modelo, o grau de lesão é controlado pela massa do objeto contusor e pela altura da queda (MCDONOUGH; MARTÍNEZ-CERDENÓ, 2012). O grau das lesões causadas por um *Impactor* podem ser classificadas como graves, moderadas (figura 5) e leves.

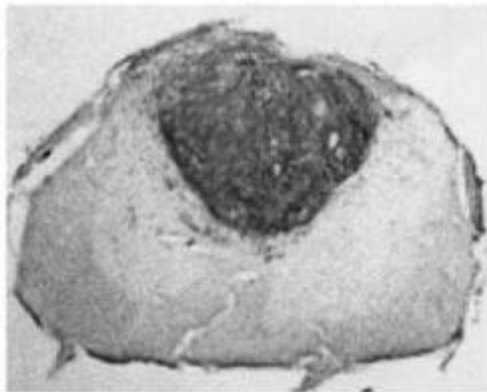


Figura 5: Marcação de fibronectina no epicentro da lesão por contusão. Regiões poupadas e lesionadas, distintas por marcação de fibronectina na medula espinhal de camundongos com lesão moderada causada por *impactor*. Adaptado de Engesser-Cesar et al.(2005).

1.1.2 Lesão por compressão

A lesão por compressão é semelhante à lesão por contusão em termos de características histopatológicas e prejuízos neurológicos decorrentes (Figura 6). No entanto, difere daquela no sentido de que a força contusiva pode ser aplicada tanto lateralmente quanto dorsalmente, dependendo do aparato usado. A lesão por compressão pode ser gerada usando o método *Plemel* de calibragem de forças de compressão, cliques de aneurisma (DONOUGH; MARTÍNEZ-CERDENÕ, 2012).

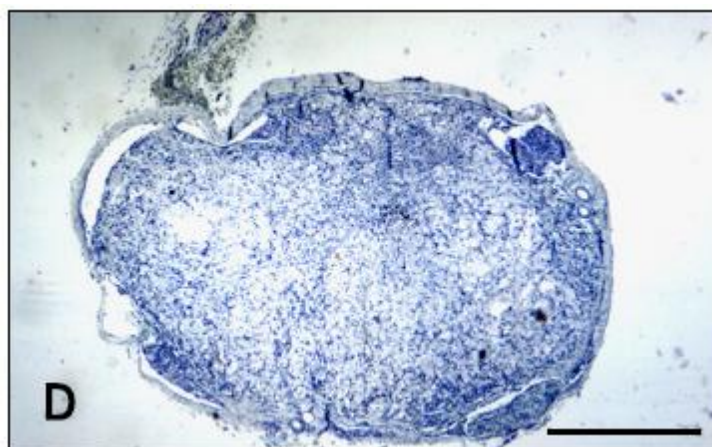


Figura 6: Micrografia do epicentro de lesão medular por compressão. Marcação com violeta de cresila após quatro semanas revelou completa perda de substância cinzenta e branca causada por um balão de compressão através de um cateter. Adaptado de Chung et al.(2013).

1.1.3 Lesão por transecção

A transecção medular pode ser completa ou parcial, incluindo a hemissecção (figura 7), em que apenas metade da medula espinhal é seccionada. As características histopatológicas da transecção incluem secção completa de axónios na área lesionada e a formação de uma cicatriz glial, produzida por astrócitos. As lesões por transecção são um modelo particularmente atraente em estudos interessados na dinâmica do crescimento axonal através da cicatriz glial (MCDONOUGH; MARTÍNEZ-CERDENÕ, 2012). Apesar de não ser tão comum casos clínicos de lesão medular por hemissecção, esse tipo de lesão é interessante em modelos experimentais, pois permite avaliar e comparar com o lado preservado, a evolução da recuperação motora do lado afetado, além de permitir e facilitar a aplicação de terapias de exercícios físicos.

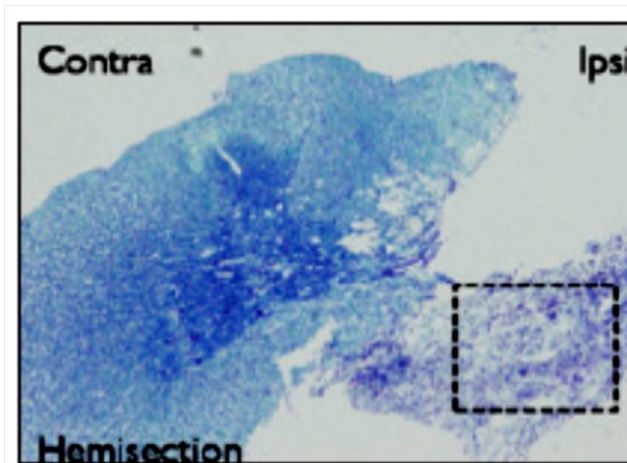


Figura 7: Micrografia de lesão medular por hemissecção: Marcação por violeta de cresila destacando áreas ipsi-lateral e contra lateral à lesão de medula espinhal de ratos. Adaptado de Cho et al. (2011).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO MEDULAR

A dinâmica da patofisiologia associada com a LME é mais bem descrita como bifásica (ROWLAND, 2008). A primeira fase da lesão, ou fase aguda, é decorrente do próprio trauma mecânico que atinge o tecido nervoso, além de vasos sanguíneos e outros tecidos, provocando edema, hemorragia, vasoconstrição e necrose (KWON et al., 2004; MOTHE; TATOR, 2012). Após a lesão inicial, o tecido nervoso responde com uma cadeia de processos secundários inter-relacionados que contribuem para agravar o dano, causando a lesão secundária, incluindo alterações na perfusão microvascular, geração de

radicais livres, peroxidação lipídica, morte celular por necrose/apoptose e desregulação da homeostase iônica (KWON et al., 2004) (Figura 8).

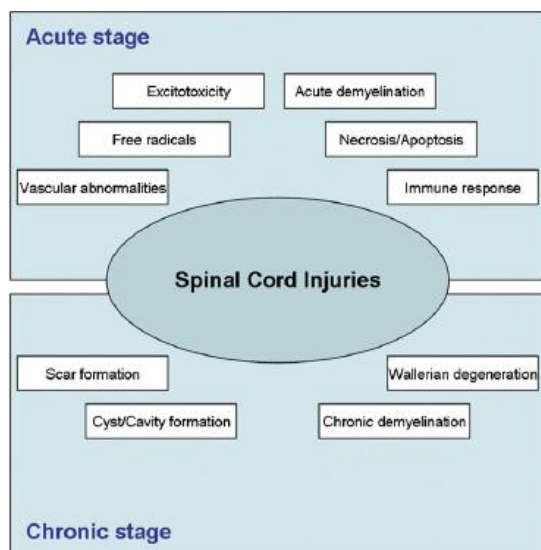


Figura 8: Diagrama das principais respostas fisiopatológicas durante as fases agudas e crônicas da LME. Adaptado de Mikhail et al (2012).

Durante essa segunda fase LME, a capacidade de regeneração axonal é diminuída pela formação da cicatriz glial no local da lesão que impede a regeneração, ou crescimento axonal e dificultando o restabelecimento de novas sinapses (figura 9).

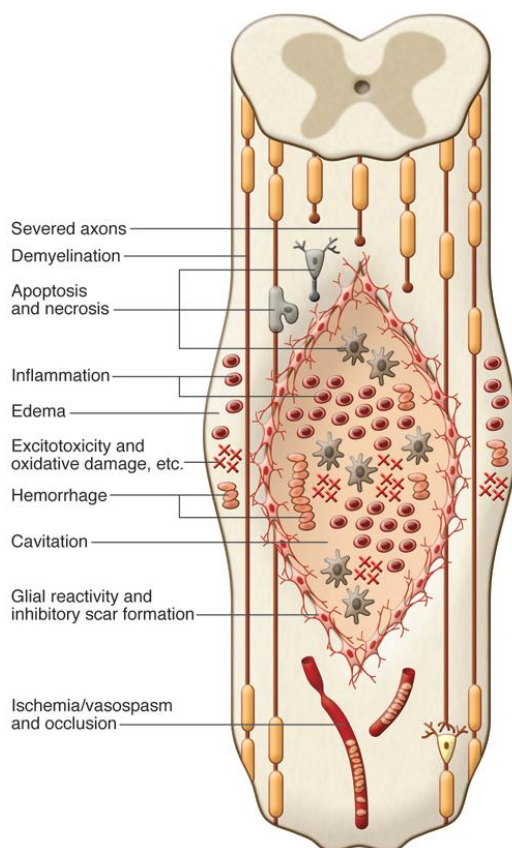


Figura 9: Patofisiologia da LME. O diagrama mostra uma composição de eventos patofisiológicos que ocorrem após uma LME, incluindo as fases aguda (ex: edema e hemorragia), subaguda (ex: inflamação), e a crônica (ex: cavitação).. Adaptado de Mothe e Tator (2012).

1.2.1 Cicatriz glial

Em seguida à lesão mecânica da medula, astrócitos ativados, macrófagos e outras células secretam na matriz extracelular proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSCs), e outras moléculas, formando a cicatriz glial (figura 10). A cicatriz glial cria uma barreira física e química inibitória prejudicial à regeneração axonal (MOTHE; TATOR, 2012). Um dos benefícios da cicatriz glial é isolar as regiões adjacentes ao epicentro da lesão. Quando a formação da cicatriz glial é inibida, o grau de cavitação do tecido nervoso adjacente à lesão aumenta (FAUKNER et al., 2004 apud HAGG et al., 2006).

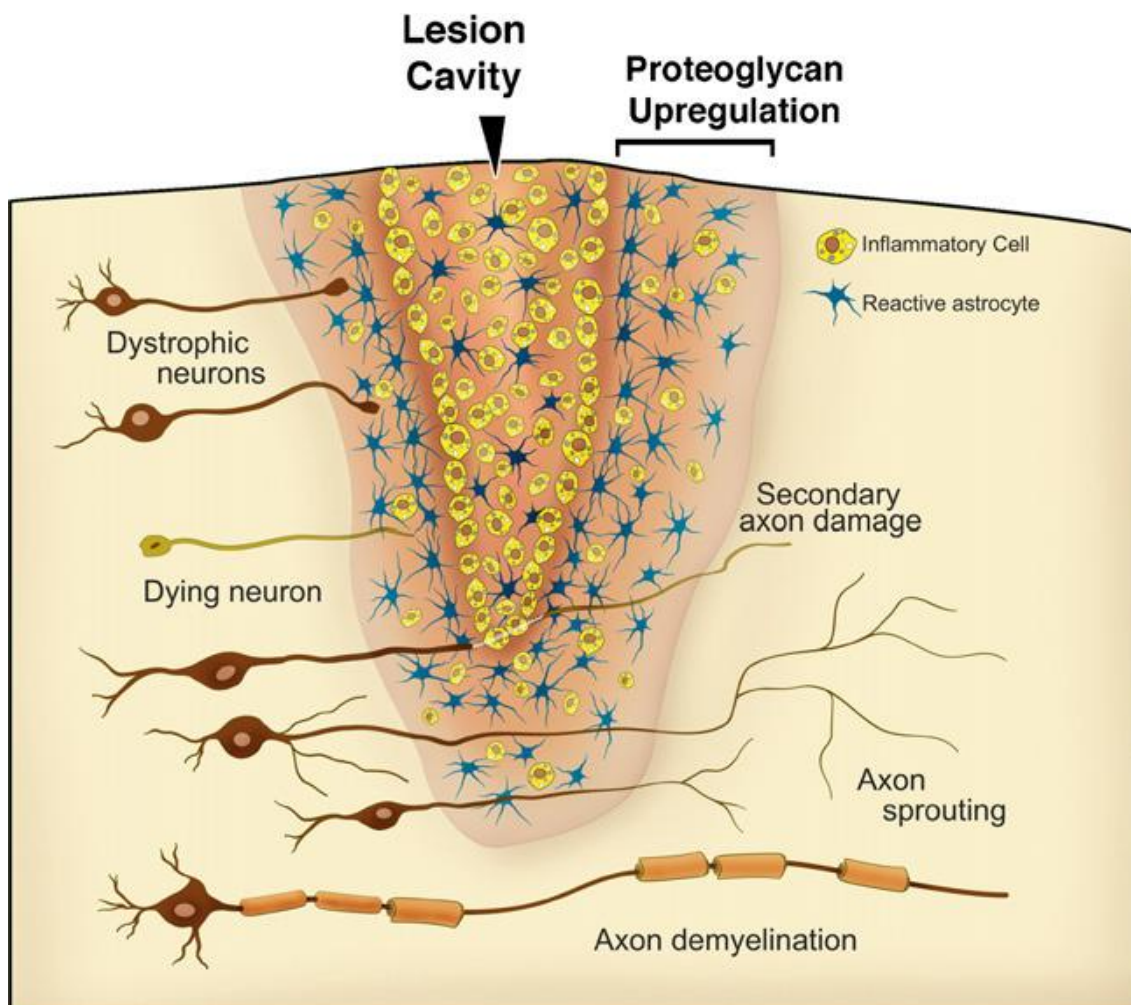


Figura 10: Diagrama mostrando a cicatrização glial no local da LME. A cavitação da lesão do sistema nervoso lesionado expande com uma interação de células inflamatórias

com os astrócitos reativos envolta e outras células glias reativas. Esta região da cicatriz glial está associada com uma alta ativação de moléculas inibidoras da matriz extracelular como, por exemplo proteoglicanos. Esta intensa resposta inflamatória leva à uma cascata de danos secundários aos axônios, como desmielinização dos axônios adjacentes. Adaptado de Fitch e Silver (2007).

O local da lesão na medula também é rico em moléculas inibitórias derivadas da bainha de mielina tais como NOGO-A, glicoproteína associada à mielina (MAG) e glicoproteína oligodendrocítica de mielina (OMpg), proteoglicano de sulfato de condroitina NG2 derivados de precursores de oligodendrócitos, e inibidores semaforinas em fibroblastos meníngeos (FAWCETT; ASHER, 1999 apud HAGG et al., 2006).

2 MATRIZ EXTRACELULAR, REDES PERINEURONAL E NEUROPLASTICIDADE

O espaço extracelular, que representa aproximadamente 20% do volume total de um cérebro adulto, possui uma matriz extracelular (MEC) altamente organizada (DITYATEV et al., 2010)(figura 11). Estudos anteriores tem mostrado que componentes da MEC são distribuídos de maneira heterogênea no sistema nervoso central (SNC), contribuindo assim para a quimioarquitetura de áreas corticais e regiões subcorticais (HOBOM et al., 1998).

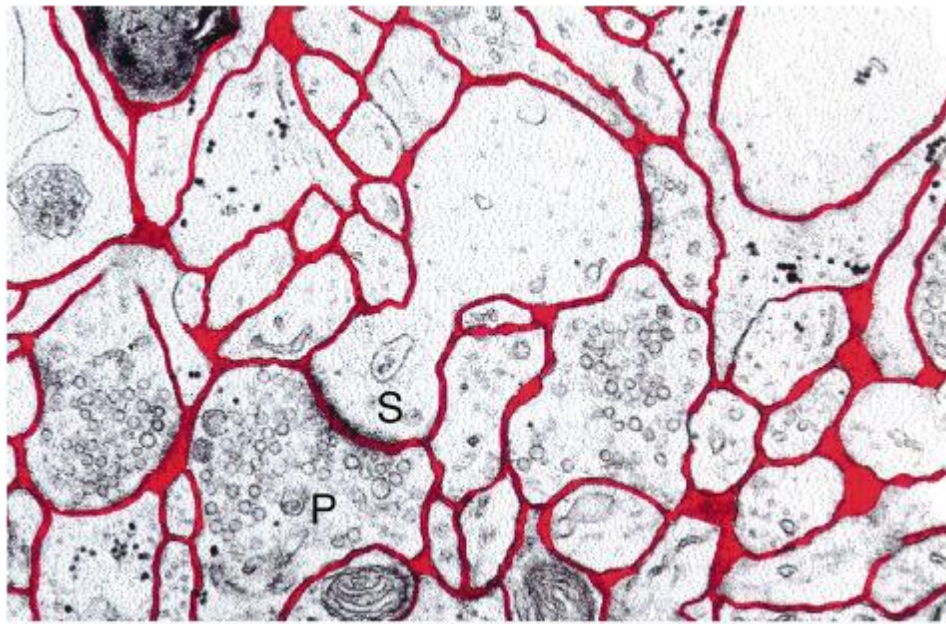


Figura 11: Estrutura do espaço extracelular. Eletromicrografia de uma região do córtex cerebral de rato, mostrando espinhas dendríticas proeminentes (S) e terminais pré-sinápticos (P). O espaço extracelular (EEC) está destacado em vermelho. Nota-se uma estrutura semelhante a uma esponja, múltiplas conectividades, superfícies celulares convexas simples e presença de “lagos” onde o espaço aumenta. O EEC é provavelmente reduzido em largura devido o procedimento de fixação. Barra de escala 1µm. Adaptado de Nicholson e Syková (1998).

A MEC do SNC difere da MEC de outros tecidos em relação as suas propriedades bioquímicas, sua composição molecular e a complexidade de suas funções (JONH et al., 2006). Os principais constituintes da MEC são glicosaminoglicanas (GAGs), tanto ligadas à proteínas, na forma de proteoglicanos, ou em estado livre na forma de ácido hialurônico, proteínas fibrosas (colágeno, elastina), glicoproteínas adesivas (fibronectina, laminina e tenascina) e uma grande variedade de fatores de crescimento e outras

moléculas secretadas, muitos dos quais se ligam por afinidade às GAGs ou outros componentes da matriz (GALTERY; FAWCETT, 2007).

A MEC do SNC pode também assumir a forma de uma malha pericelular, conhecida como rede perineuronal (RPN), que recobre os corpos celulares e dendritos proximais de algumas subpopulações de neurônios como mostra a Figura 12 (FOX; CATERSON, 2002).

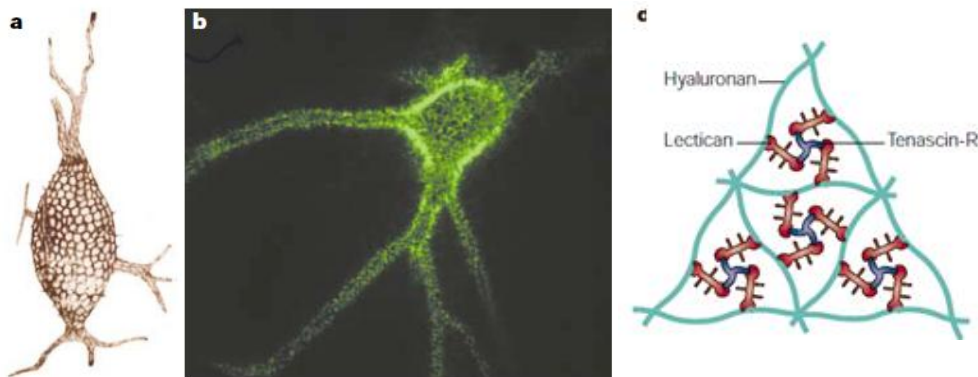


Figura 12: Redes Perineuronais no SNC. Em (a) Desenho de redes perineuronais por Ramón y Cajal. Em (b), fotomicrografia em microscopia confocal de rede perineuronal marcada com *Wisteria Floribunda Agglutinin* na região CA1 do hipocampo de camundongos. Em c; modelo hipotético do ECM no tecido nervoso. Moléculas da família dos proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSCs), tais como a aggrecan, versican, brevican e neurocan (vermelho), ligam-se à moléculas de ácido hialurônico (verde) e tenascina-R (azul) para formar um complexo ternário. Adaptado de Dityatev (2003).

A RPN é constituída por diversas macromoléculas, muitas dessas são proteoglicanas de sulfato de condroitina (PGSCs), que compõem três grandes classes: (i) as lecticanas, (ii) as proteoglicanas associadas a matriz e (iii) as proteoglicanas de superfície de célula, tais como as glicosaminoglicanas (GAGs), proteoglicanas de sulfato de heparan (PGSHs), moléculas de adesão celular e integrinas, glicoproteínas (tenascinas) e ácido hialurônico (AH) (FOX; CATERSON, 2002; RHODES; FAWCETT, 2004). As Glicoproteínas da matriz, tais como tenascina, ligam as PGSCs em todas as outras moléculas da MEC e as moléculas de superfície da membrana plasmática ligam-se às PGSCs por cadeias laterais, como mostra a figura 13.

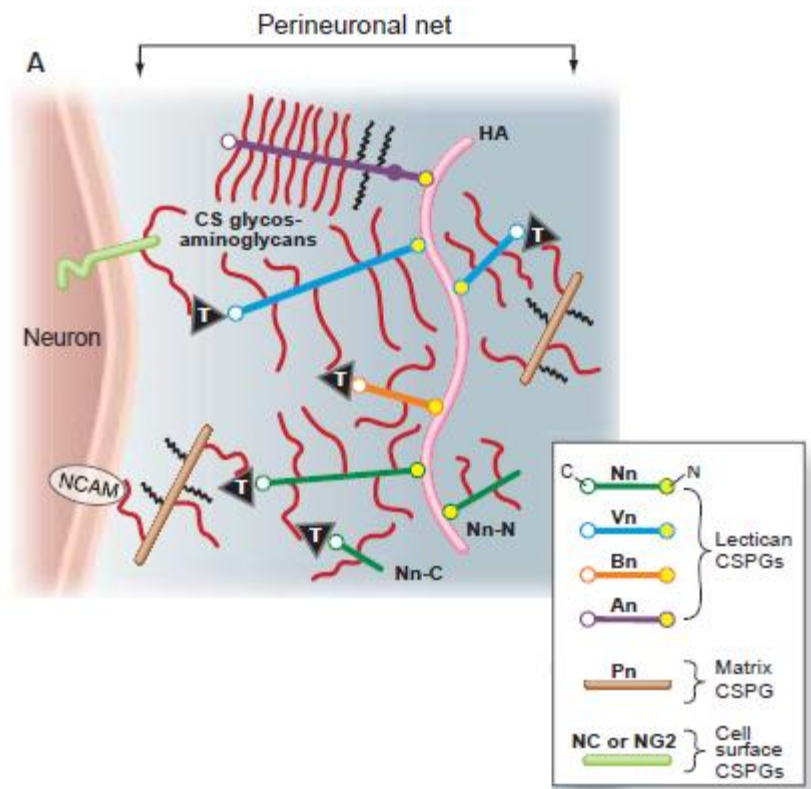


Figura 13: Rede perineuronal composta por várias subclasses de PGSC ao redor de corpos celulares e dendritos proximais de neurônio do SNC. Membros da subfamília lectican – neurocan (Nn), versican (Vn), brevican (Bn) e agrecan (An) – estão ligados não covalentemente à ácido hialurônico da matriz (AH, rosa), através de domínios de ligação globulares (círculos amarelos). Esta associação resulta em uma larga macromolécula agregada à rede perineuronal. Associações específicas não covalentes ocorrem entre domínios globulares carboxi-terminal (círculos brancos) de alguns lecticans (como neurocans e versicans) e a glicoproteína tenascina da matriz (T, triângulos). Tenascina, por sua vez, liga as CS glicosaminoglicanas (linhas vermelhas) no fosfacan (Pn) e outras lecticans, bem como PGSC de superfície celular como neuroglican C (NC) e NG2. Fosfacan pode também ligar-se a receptores de superfície celular tais como molécula de adesão celular (NCAM) através de cadeias de CS glicosaminoglicana.. Adaptado de Fox e Caterson (2006).

As RPNs são importantes na estabilização sináptica e seu amadurecimento marca o fim do período crítico em vários sistemas corticais.

Dentre os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSCs), a família das Lecticanas exercem papel central, pois são caracterizadas por uma modular composição de seus domínios globulares N- e C-terminal e uma região central variável, o que permite uma segregação de vários ligantes como o ácido hialurônico(AH), conhecido também como Hialurona, permitindo assim a construção de complexas redes carboidrato-proteína com AH que é o polissacarídeo de organização central da MEC neural, contribuindo desta forma para organização do espaço extracelular (MARGOLIS; MARGOLIS, 1994; IOZZO; MURDOCH, 1996; YAMAGUCHI, 2000 apud JONH et al., 2006). Esta família é compreendida por Aggrecana e Versicana que são membros

amplamente expressos no tecido nervoso e Neurocana e Brevicana que são moléculas especificamente neuronais. Todos esses proteoglicanos estão ligados à uma glicosaminoglicana chamada de Hialurona (HA) (DEEPA et al., 2006).

As PGSCs quando expressado em regiões com baixos níveis de moléculas de adesão, vários PGSCs (fosfacana, neurocana, versicana, agrecana e proteoglicanas NG2) podem atuar como barreiras para a migração de células e crescimento axonal, enquanto que em regiões com altos níveis de proteínas de adesão, PGSCs no tecido nervoso podem ainda atuar para manter certo limite enquanto permiti que seletivas extensões axonais prossigam (PIRES-NETO et al., 1999).

As moléculas de PGSC têm sua expressão acentuada durante a fase aguda da LME. Elas são produzidas por células reativas (como por exemplo, micróglias e astrócitos) e, conseqüentemente, desempenham função na formação da barreira molecular inibitória de crescimento axonal na área de lesão, formando uma barreira física à regeneração/crescimento dos axônios lesionados, denominada anteriormente como cicatriz glial (THURET et al., 2006).

Alguns estudos mostram que melhoras na função locomotora são frequentemente vistas em mamíferos com lesão incompleta ou mesmo lesão completa da medula espinhal após a prática regular de exercício físico durante a reabilitação (HACKEMA et al., 2012; JAKEMAN et al., 2011). Embora o exercício físico tenha se mostrado como uma terapia bastante promissora na recuperação da função motora, ainda falta elucidar os mecanismos celulares e moleculares pelo qual essas melhorias ocorrem.

Alguns estudos (YENGO et al., 2012; DORNBOS III; DING, 2012; HENEIMEIER et al., 2011) sugerem uma relação entre a prática de exercícios físicos e a produção das enzimas metaloproteinases, que são endopeptidases extracelulares dependentes de zinco e cálcio que são capazes de degradar a MEC (BUSS et al., 2007), outros estudos apontam que o exercício físico é capaz de promover adaptações epigenéticas, induzindo modificação de histonas e expressão de genes (MCGEE et al., 2009; 2011).

3 ACETILAÇÃO DE HISTONAS

Nas células eucariontes, a molécula de DNA enovela-se ao redor de núcleos proteicos, as histonas, para formar a estrutura denominada cromatina. A unidade funcional da cromatina é o nucleossomo, composto por uma sequência de 147 pares de bases nitrogenadas enroladas em aproximadamente 1,7 voltas em torno de um núcleo octamérico de proteínas histonas que inclui duas histonas H2A, duas H2B, duas H3 e duas H4 (MCGEE et al., 2011) (Figura 14).

Estudos recentes mostram que os nucleossomos apresentam comportamento dinâmico, e essa propriedade tem relação com a adição de grupos químicos às histonas como acetil e metil, o que permite, respectivamente, o alongamento e a condensação da cromatina, dessa forma facilita ou dificulta a expressão de genes e, conseqüentemente, a possibilidade de diferentes tipos de fenótipos (BARREIRO; SZNAJDER, 2013; EBERHARTER; BECKER, 2002; MCGEE et al., 2009). Mudanças epigenéticas são alterações reversíveis e herdáveis no genoma funcional e não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA. Tais modificações, ou marcas epigenéticas, incluem fosforilação mono-, di- e trimetilação e acetilação de histonas (MCGEE et al., 2009)

Essas modificações envolvem uma série de diferentes mudanças pós-translacional à regiões da cauda da molécula de DNA rica em lisina de histonas, em particular as histonas H3 e H4. Cada modificação tem como alvo diferentes resíduos de aminoácidos e podem ter efeitos diferenciados sobre a transcrição, em geral, a acetilação de lisina de histonas está relacionada com a ativação da transcrição, por ação da enzima Histona Acetiltransferase (HATs), ou seja, a acetilação de histona promove um alongamento da cromatina ou uma “abertura” para que haja a ativação de genes específicos, já a metilação de lisina com a repressão da transcrição, por ação da Histona Desacetilase (HDATs), neste caso a cromatina se condensa impedindo a ativação de genes (EBERHARTER; BECKER, 2002; MCGEE; HAGREAVES, 2011).

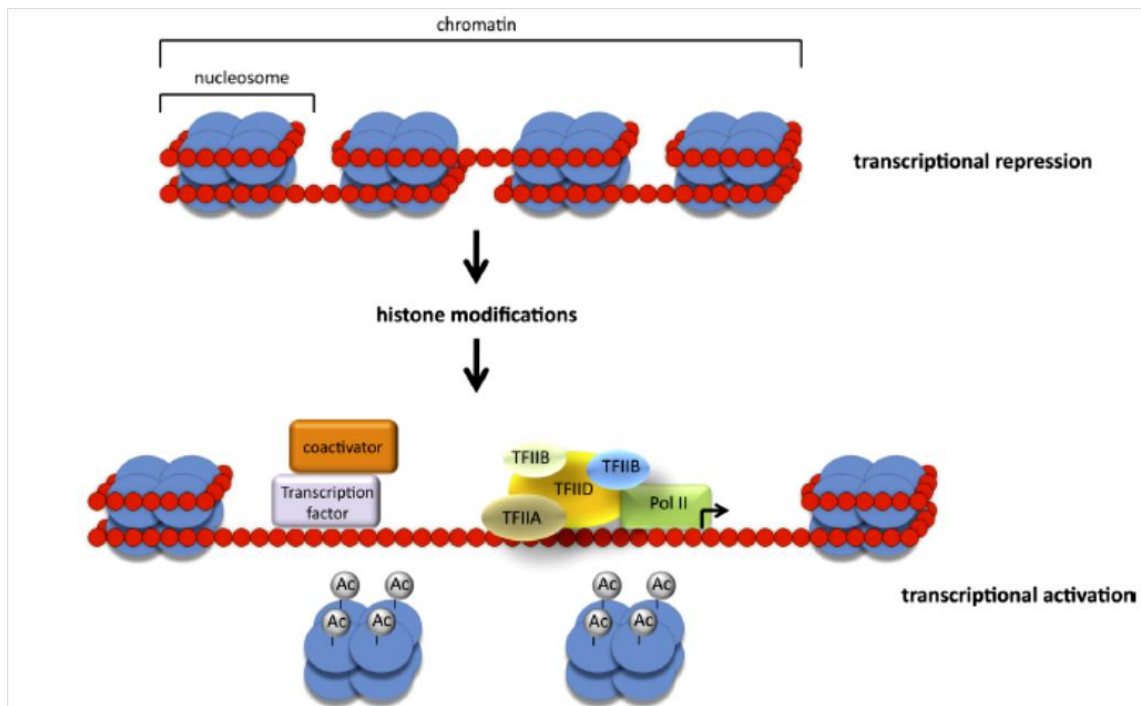


Figura 14: Modificações em histona regulam a transcrição. Histonas não modificadas (acima) resultam em forte interação com o DNA em gene promotor e regiões codificantes que medeiam a repressão transcricional. Acetilação de histonas (acima) é uma modificação que interrompe esta interação, expondo o gene promotor e as regiões codificantes para os reguladores transcricionais. Adaptado de McGee et al (2011).

As modificações das histonas são cuidadosamente controladas e apresentam alterações importantes, no caso da acetilação de histonas, altera o acesso de outras proteínas ao DNA facilitando a transcrição de genes. A acetilação, ou seja, a adição de um grupo acetil na cauda N-terminal da lisina desta proteína, tende a afrouxar a estrutura da cromatina devido a adição de tal grupo que remove a carga positiva da molécula, reduzindo a afinidade das caudas aos nucleossomos adjacentes, tornando a cromatina mais alongada que, por sua vez, passa a ser chamada de eucromatina (BARREIRO; SZNAJDER, 2013). Porém, a acetilação também regula interações proteína-proteína, assim os resíduos de acetil-lisina podem recrutar proteínas específicas à regiões da cromatina que foi modificado para continuar a ativar a transcrição (Figura 14) (MCGEE; HAGREAVES, 2011). As novas proteínas geradas a partir da acetilação determinam como e quando os genes serão expressos (BARREIRO; SZNAJDER, 2013; EBERHARTER; BECKER, 2002).

Alguns estudos demonstram grande importância da acetilação de histonas em situações adversas, como no caso de modelo experimental de

lesão medular em animais, onde se administrou um inibidor da HDATs, o ácido valproíco, favorecendo dessa forma a acetilação. Esses animais que receberam ácido valproíco demonstraram maior recuperação motora após a lesão, com menos cavitação no tecido lesionado e menor reação inflamatória (Lv et al., 2011; YU et al., 2012). Em outro estudo (GOMEZ-PINILLA, 2011), foi demonstrada uma estreita relação entre exercício voluntário, acetilação de histonas e produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*), uma importante molécula envolvida no aprendizado, memória e plasticidade sináptica. Nesse sentido, o exercício demonstra ser um ativador para acetilação de histonas, que por sua vez, é um mecanismo regulador de expressão gênica envolvido em adaptações fisiológicas benéficas exigidas ao organismo, inclusive na recuperação de animais lesionados.

4 EXERCÍCIO FÍSICO E LESÃO MEDULAR

É senso comum que prática regular de exercícios físicos promove inúmeros benefícios à saúde física e mental, combatendo e prevenindo várias enfermidades, inclusive em indivíduos que sofreram algum tipo de lesão no SNC.

Devido às sequelas neurológicas impostas por esse tipo de lesão, como mal comum está o déficit na função motora, o que ocasiona geralmente redução brusca na atividade física em pessoas acometidas, por exemplo, por lesão na medula espinhal e conseqüentemente provoca o surgimento de doenças hipocinéticas. Limitações da mobilidade aumentam os riscos ao surgimento de outras doenças crônicas evitáveis, como doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, câncer e depressão, com severos efeitos negativos sobre a qualidade de vida do paciente. Com isso, a prescrição de programas adequados de exercícios físicos regulares se faz necessária para melhorar o estado de saúde e a qualidade de vida dessas pessoas (BURR et al., 2012).

4.1 TIPOS DE EXERCÍCIOS FÍSICOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LME.

Clinicamente, para reabilitação de pacientes com problemas neurológicos existem várias estratégias terapêuticas que envolvem exercício físico. Podemos resumi-las em exercícios forçados, involuntários e voluntários e podem ser aplicadas nos mais variados meios como atividades em esteiras, bicicletas, piscinas, manipulações ou exercícios passivos, exercícios funcionais, eletroestimulação entre outros, porém para facilitar a compreensão e potencializar os benefícios dessas terapias, se faz necessário investigações e a reprodução de terapias de exercícios em modelos animais com problemas no SNC, neste caso, especificamente com LME. Na literatura encontramos muitos aparatos ou meios pelo qual os animais são submetidos ao exercício, contudo, assim como na terapia clínica, nos estudos experimentais o exercício pode ser dividido em três modos básicos: forçado, involuntário e voluntário (BATTISTUZZO et al., 2011; JAKEMA et al., 2010; KE et al., 2011).

4.1.1 Exercício forçado

Em estudos com modelo experimental de lesão incompleta, o tipo de exercício forçado geralmente é reproduzido por esteiras, equipamentos de suporte como BWTT (*body weight-supported treadmill training*) ou nado. Este tipo de exercício é o mais aplicado em experimentos, seguido do modo voluntário (BATTISTUZZO et al., 2011). Porém alguns estudos demonstram resultados poucos expressivos quando comparados com o modo voluntário, porém positivos. (JAKEMA et al., 2010; KE et al., 2011). Estes resultados são geralmente relacionados ao alto nível de estresse físico e comportamental ao qual os animais são submetidos.

4.1.2 Exercício involuntário

Em alguns programas de reabilitação e exercícios físicos, usam-se a Estimulação Elétrica Funcional (EEF) para estimular a musculatura paralisada (KE et al., 2011; MURPHY et al., 2013). Este modelo também apresenta resultados positivos (MURPHY et al., 2013).

4.1.3 Exercício voluntário

Estudos sobre LME têm revelado extensivo potencial para neuroplasticidade (anatômica, neuroquímica e fisiológica) que pode ser manipulada (aumentando ou diminuindo) por intervenções exógenas apropriadas (farmacológica, cirúrgica, atividade reabilitativa) (ROSSIGNOL et al., 2007). Nesse sentido, o exercício físico surge como uma promissora ferramenta na recuperação funcional e promotora de neuroplasticidade após a LME (HACKEMA et al., 2012; JAKEMAN et al., 2010).

Devido às várias opções e tipos de exercícios, alguns estudos experimentais preocupam-se em estabelecer qual tipo de exercício físico promove melhores resultados em casos de lesão no SNC (LEASURE; JONES, 2008). Estudos experimentais têm demonstrado prevalência, em relação à

recuperação funcional e preservação tecidual, de exercícios voluntários sobre exercícios forçados (KE et al., 2011; ENGESSER-CESAR C. et al., 2007).

Estratégias terapêuticas com exercício físico voluntário destacam-se em relação a outras terapias, como as farmacológicas e cirúrgicas, pelo fato de ser uma alternativa de baixo custo e de fácil aplicabilidade. No entanto, apesar de muitos estudos demonstrarem resultados positivos de recuperação motora e preservação do tecido nervoso após lesão com esse tipo de tratamento (KE et al., 2011; KRAJACIC et al., 2010; SIEGENTHALER et al., 2008), ainda faltam elucidar os mecanismos morfológicos, fisiológicos e moleculares pelo qual essas melhorias acontecem. No presente trabalho, propomos investigar as mudanças na MEC do tecido nervoso em modelo de lesão medular incompleta, as possíveis alterações epigenéticas, através a acetilação de histonas, e como são influenciadas pelo exercício físico voluntário em rodas de corrida, além da recuperação da função motora (MCGEE et al., 2009; MAHONEY et al., 2005).

JUSTIFICATIVA

Lesões na medula espinhal geralmente comprometem as funções motora e sensorial além de acarretar a déficits funcionais permanentes. Traumas mecânicos destacam-se como principal agente causador dessas enfermidades, desencadeando uma serie de reações adversas e inflamatórias no tecido nervoso da medula. A resposta do SNC ao dano sofrido induz a expressão de moléculas inibitórias à sua regeneração, entre elas se destacam os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSCs), principais substâncias encontradas na cicatriz glial, que atua como uma barreira físico-química contra o crescimento axonal e migração celular, impedindo assim a recuperação de funções comprometidas. Diante desse cenário, o exercício físico surge como uma terapia promissora, exercendo importante influência na recuperação funcional. Porém, dados sobre a influência da atividade física na matriz celular e quais mudanças provocadas por essa terapia na cicatriz glial ainda são escassos. Por outro lado, existem dados que apontam a influência da atividade física na acetilação de histonas, facilitando assim expressões de genes, visto que estudos demonstram que apenas uma única sessão de treino é capaz de alterar expressões gênicas, causando adaptações às novas condições impostas pela lesão. No presente estudo, propomos a realização de exercício físico voluntário em rodas de corrida para promover a recuperação da função motora e dessa forma compreender melhor os efeitos do exercício físico em novos protocolos, a sua influência na modulação da matriz extracelular e na modificação histona.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar a influência do exercício voluntário na recuperação motora, na matriz extracelular da cicatriz glial e na acetilação de histona para a potencialização da recuperação funcional em modelo experimental de lesão medular por hemissecção.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analisar a influencia do exercício físico voluntário na recuperação da função motora da pata posterior em modelo experimental de LME ;
- Analisar a influência do exercício físico voluntário nos proteoglicanos de sulfato de condroitina da cicatriz glial em modelo experimental de LME;
- Analisar a influência do exercício físico voluntário na acetilação das histonas na região de lesão em modelo experimental de LME.
- Analisar influência do exercício físico voluntário sob a atividade astrocitária na área de lesão em modelo experimental de LME;

METODOLOGIA

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 24 ratos (n=24), todos machos adultos da raça Wistar (pesando entre 250-300g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Pará (UFPA) e foram mantidos, durante os experimentos, no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neuroplasticidade do Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências da Saúde /UFPA, sob a supervisão do Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, e os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroplasticidade (LNP/HUJBB/ICS/UFPA). Todos os procedimentos experimentais foram realizados em obediência às normas sugeridas pela *Society for Neuroscience, National Institute of Health* (NIH, USA) e previamente analisados e aprovados sob o nº 188-13 pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE/UFPA).

Os animais foram divididos em grupos conforme mostra a tabela abaixo:

GRUPOS	EXPERIMENTO	NÚMERO DE ANIMAIS
A	<i>Animais exercitados após a LME: dividido em 2 grupos, com tempos de vida de 14 e 21 dias.</i>	10
B	<i>Animais não exercitados após a LME: dividido em 2 grupos, com tempos de vida de 14 e 21 dias.</i>	10
C	<i>Animais não lesionados e sedentários: animais não sofreram nenhum tipo de intervenção cirúrgica e treinamento.</i>	4
Total		24

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais. Distribuição dos animais nos grupos e tempos existentes.

DESENHO ESPERIMENTAL

Todos os animais, com exceção, do grupo controle (C), foram habituados em rodas de corrida por 3 semanas. Após o período de aclimação os grupos exercitados antes e após a lesão (A) e somente exercitado antes à lesão (B) foram submetidos à uma cirurgia de hemisseção da medular espinhal. Passados 7 dias de recuperação, os animais do grupo A voltaram para as gaiolas adaptadas com rodas de corrida e os animais do grupo B foram colocados em gaiolas padrão até completar 14 e 21 dias, como podemos visualizar na figura abaixo.

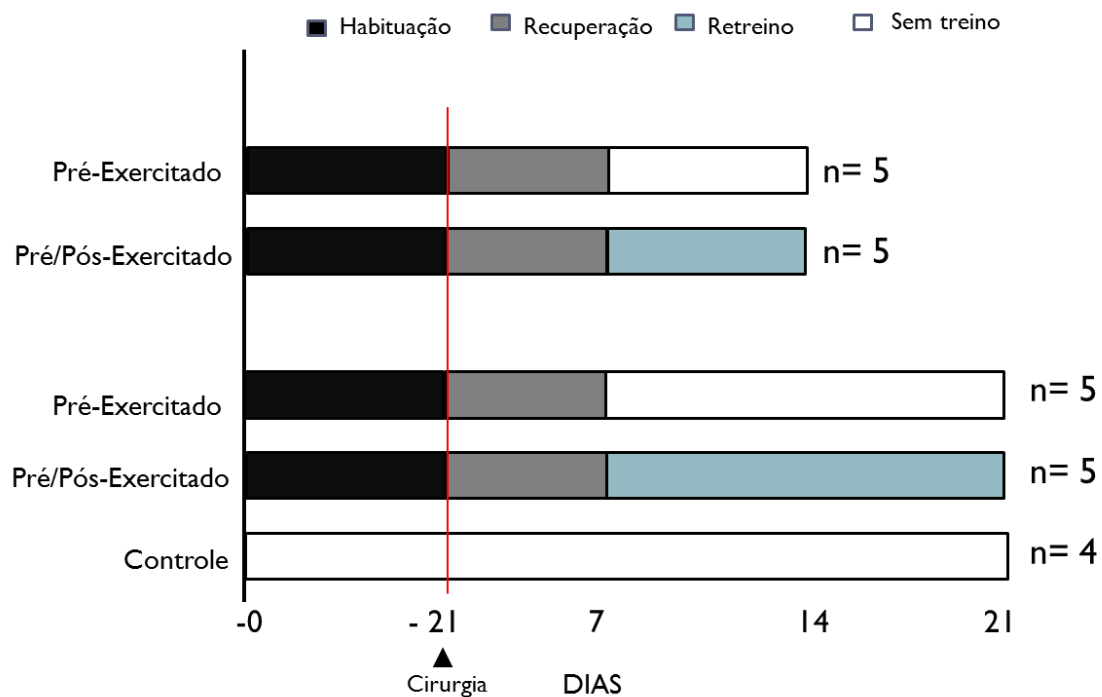


Figura 15: Desenho experimental. Representação gráfica da ordem cronológica dos procedimentos experimentais do trabalho

ACLIMATAÇÃO

Os animais foram aclimatados ao novo habitat (biotério do LNP) e habituados individualmente ao toque humano em gaiolas padrão, adaptadas com uma roda de corrida, por um período de três semanas. As rodas de corrida possuem 85 cm de circunferência por 10 cm de largura e são adaptadas com

um odômetro (modelo BRI 2, marca ECHOWELL®). Todos os animais, para serem incluídos no presente projeto tiveram que cumprir, em média, 50 metros percorridos na roda da gaiola por dia (ENGESSER-CESAR et al., 2007).

PROCEDIMENTO CIRURGICO.

Os animais foram devidamente anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (72mg/kg) e cloridrato de xilazina (9mg/kg), administrado por via intraperitoneal (IP). Após a supressão dos reflexos corneanos e de retirada da pata, os animais foram tricotomizados na região do dorso e, em seguida, o animal foi posicionado num aparato esterotáxico e recebeu a devida assepsia do dorso com álcool iodado.

Após incisão feita na região correspondente à coluna torácica e o afastamento do tecido muscular paravertebral, iniciou-se o procedimento de laminectomia com auxílio de um microalveolótomo. A laminectomia foi na oitava vértebra torácica (T8), onde realizaremos hemisseção da medula espinhal exposta. A lesão foi confirmada por visualização em microscópio cirúrgico. Em seguida, os músculos foram rebatidos e a pele do dorso suturada.

CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS.

Assim que os animais acordaram do estado anestésico, foram devolvidos às gaiolas individuais padrão e foram mantidos no biotério de experimentação do LNP. Todos os animais foram monitorados quanto à alimentação, consumo de água e função excretora. Passados 7 dias de recuperação pós-cirúrgico, os animais voltaram para as gaiolas individuais equipadas com uma roda de corrida onde permaneceram por mais 14 dias (Grupo A14 e B14) e 21 dias (Grupo A21 e B21), respectivamente.

ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os animais (n=4 de cada grupo) foram submetidos ao teste BBB (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995) que consiste em uma escala para analisar a recuperação motora das patas posteriores, atribuindo pontuações de

0 a 21 (Anexo A). A análise foi realizada da seguinte forma, primeiro cada animal é colocado em um capô aberto, onde pode explorar livremente, filmado por 3 minutos, posteriormente os vídeos foram analisados por um terceiro avaliador que atribuiu os pontos referentes a evolução da recuperação motora, esse avaliador não tem envolvimento com o desenvolvimento do trabalho. Os testes foram filmados (Sony Camcorder) antes da lesão e nos dias 3,7,14 e 21 depois da lesão e os filmes analisados *off line*. Os dados obtidos foram tratados pelo método estatístico ANOVA duas vias, pós teste Bonferroni. O gráfico e as análises estática foram desenvolvidas no programa *Graphpad Prism 5.0*.

ANÁLISE POR IMUNOBLOTTING

- Análise dos níveis de intensidade de acetilação das histonas:

Ao fim de cada experimento, analisamos os níveis de histonas acetiladas para avaliar a influência do exercício físico sobre a dinâmica da cromatina após uma hemiseção da medula espinhal. Para tal, alguns animais (n=4 de cada grupo) foram decapitados, com o auxílio de uma guilhotina (*Insigth*) e, em seguida, foi feita rapidamente a dissecação da medula espinhal.

Para detectar as Histonas H4, realizamos imunoblotting em gel de SDS-PAGE, usando anticorpos *Ac-Histone H4* (Santa Cruz, USA) que se ligam especificamente às histonas H4 acetilada em Serina 1, Lisina 5, Lisina 8, Lisina 12. O tecido nervo da medula espinhal, especificamente do epicentro da lesão, foram homogeneizados em solução de homogeneização para proteína (250 mmol/l sucrose; 1 mmol/l EDTA, 20 mmol/l imidazol; pH 7,2; 1 mmol/l 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride; 1 mmol/l benzamide; 10 mg/l leupeptin; 1 mg/l pepstatin A; 1 mg/l aprotinin; e 1 mg/l chymostatin), específica para preparo de purificado de proteínas totais. Após homogeneização, o material foi centrifugado à 1000 G durante 10 minutos. O sobrenadante desta centrifugação foi retirado do tubo *ependorf* e reservado. O precipitado foi suspenso em 3 vezes o volume inicial do preparo de solução de homogeneização e foi realizada nova centrifugação a 1000 G por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante das 2 centrifugações foram

misturados. Para que as mitocôndrias sejam separadas, o sobrenadante foi, então, centrifugado a 10.000 G por 20 minutos.

As concentrações das proteínas foram determinadas utilizando albumina bovina como padrão (BSA) (Bradford, 1976). Todos os extratos de proteínas foram solubilizados por aquecimento a 95°C durante 2 minutos em solução tampão de corrida de proteínas (15 g/l SDS; 10 mmol/l Tris-Cl pH 6,8; 6 g/l DTT; 60 ml/l glicerol). Cem microgramas dos homogenato de proteínas de membranas foram colocadas em poço de gel de SDS-PAGE (70g/l) e submetidas à eletroforese durante 90 minutos a uma tensão de 200 volts e corrente elétrica de 50 mA. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0.45µm de espessura (Milipore, Sigma Chemical Co. St. Louis-USA).

As membranas foram primeiramente bloqueadas com tampão salino TBS-T-Milk 5% contendo caseína (136,8 mmol/L NaCl; 74,5 mmol/L KCl; 24,8 mmol/L Tris base; pH=7,4; 0,5% (V/V) Tween 20; 50g/L leite em pó desnatado) e incubadas com anticorpo contra a proteína específica da Histonas H4 (anticorpo Ac- Histone H4, Santa Cruz-USA), na diluição sugerida pelo fabricante, durante 1 hora à temperatura ambiente em tampão TBS-T 3% de caseína (136,8 mmol/L NaCl; 74,5 mmol/L KCl; 24,8 mmol/L Tris base; pH=7,4; 0,5% (V/V) Tween 20; 30g/L leite em pó desnatado). Realizamos incubações sequenciais, com o anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG (H+L), para demonstrar a reatividade da fosfatase alcalina (diluição 1:1000).

Finalmente, o *imunoblotting* foi finalizado utilizando 75mg/ml de nitroblue tetrazolium chloride (NBT) e 50 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP) (ambos reagentes da Gibco-BRL- Life technologies, Rockvile - USA) em solução alcalina (100mmol/L NaCl; 5mmol/L MgCl₂; 100mmol/L tris base pH=9,5) por 5 minutos. Os controles consistiram na inibição competitiva dos anticorpos usados utilizando-se seu antígeno purificado (Thiemann et al., 1992).

As densitometrias dos *spots* foram realizadas por um sistema de captura de imagens (*scanner*) de alta resolução e um programa de computador (*Image J*) e o auxílio de grades aplicadas à imagem do *blot* para quantificar a intensidade da hibridização de cada *spot*. O *background* do sinal foi definido

como um valor médio das intensidades dos sinais de regiões representativas da membrana, externa às áreas dos spots.

ANALISE POR IMUNOHISTOQUIMICA

- Degradação de proteoglicanas de sulfato de condroitina.

Para marcação de proteoglicanas de sulfato de condroitina, os cortes a 60µm, foram lavados em solução PBS sob agitação constante por 5 minutos, imerso em tampão borato em temperatura constante de 65°C (0,2M; pH 9,0; ácido bórico da Nuclear®) e resfriadas, na mesma solução, em temperatura ambiente durante 20 minutos. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em PBS por 5 minutos e imersas em solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (Merck®) (1ml de peróxido de hidrogênio/100ml de metanol), inibindo-se, assim, a peroxidase endógena das células do tecido analisado. A partir daí, foi iniciado o processo imunohistoquímico propriamente dito, em que as secções foram novamente lavadas em PBS, dessa vez com Tween® (5 minutos) e em seguida incubadas em soro normal correspondente à reação de cada anticorpo, ambos em diluição de 10%, durante 1 hora. Após este período, as secções foram incubadas em anticorpo primário (anti-C-4-S, Millipore-USA), durante uma noite, de acordo com a diluição previamente mencionada.

No dia seguinte, as secções foram novamente lavadas (PBS/Tween, 5 minutos) e incubadas em anticorpo secundário biotilado por 2 horas. Após nova lavagem, foram incubadas em ABC (complexo avidina-biotina – Vector®, kit ABC Vectastain) por 2 horas. Em seguida, segue nova lavagem e revelação. O cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas.

- Analise de astrócitos:

Para a marcação de astrócitos, utilizamos imunohistoquímica usando o anticorpo *anti- glial fibrillary astrocytes protein* (anticorpo anti-GFAP – Sigma) e

foi avaliada de forma quantitativa, na borda da lesão, e de forma quantitativa com contagem do número de células marcadas com o auxílio de um microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse 50i) com objetiva de 40X e gradícula de área 0.0625 mm^2 acoplada às lentes oculares. Para esta análise, foram utilizadas 3 secções com espessura de $60 \mu\text{m}$ da medula de cada animal experimental, com contagem de 6 campos por secção, e 5 animais para cada grupo experimental. Imagens mais detalhadas do tecido nervoso foram obtidas com uma câmara digital (Moticam 2500) acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Eclipse 50i).

RESULTADOS

Os resultados a seguir são referentes somente aos animais com dos grupos Controle (C21), Pré/Pós exercitado (A21) e Pré exercitado (B21) todos com sobrevida de 21 dias após lesão experimental incompleta (hemissecção) da medula espinhal.

MODELO EXPERIMENTAL DE HEMISSECÇÃO

O modelo experimental de hemissecção da medula espinhal utilizado neste trabalho provocou déficits motores em todos os animais submetidos a cirurgia para lesão da medula espinhal e já relatado por outros trabalhos (ONIFER; RABCHEVSKY; SCHEFF, 2007), viabilizando assim o uso do modelo experimental neste projeto e a aplicabilidade do protocolo de exercício voluntário em rodas de corrida como terapia para recuperação funcional de patas posteriores após lesão da medula espinhal

EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO E RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA DAS PATAS POSTERIORES AFETADAS POR LESÃO NA MEDULA ESPINHAL.

Através do Teste BBB, conseguimos registrar a evolução da recuperação motora das patas posteriores dos animais lesionados e realizar a análise dos dados de forma qualitativa. De acordo com nossos dados (Tabela 2), todos os animais dos três grupos (Controle, Pré/Pós-exercitado e Pré-exercitado) receberam a mesma pontuação durante o Registro de Base (RB), antes da lesão. Três dias após a lesão, nossos resultados demonstram que houve um déficit da função motora semelhante entre os animais dos grupos experimentais de lesão da medula espinhal submetido ao protocolo de exercício físico voluntário em rodinhas de corrida (Pré/Pós-exercitado: A21; e Pré-exercitado: B21) e a partir desse ponto houve diferença significativa em relação ao grupo Controle. No 7º dia após a lesão, ou seja, durante a recuperação dos animais de ambos os grupos, em gaiolas padrões, houve uma

discreta e semelhante recuperação espontânea da função motora nos dois grupos. Ao 14º dia após a lesão, observamos uma melhora acentuada da função motora nos animais do grupo A21 (Pré/Pós-exercitado) em comparação com os animais do grupo B21 (Pré-exercitado), essa diferença se mostrou significativa ao 14º dia, tornando-se mais evidente no 21º dia após a lesão, como mostra a Figura 16.

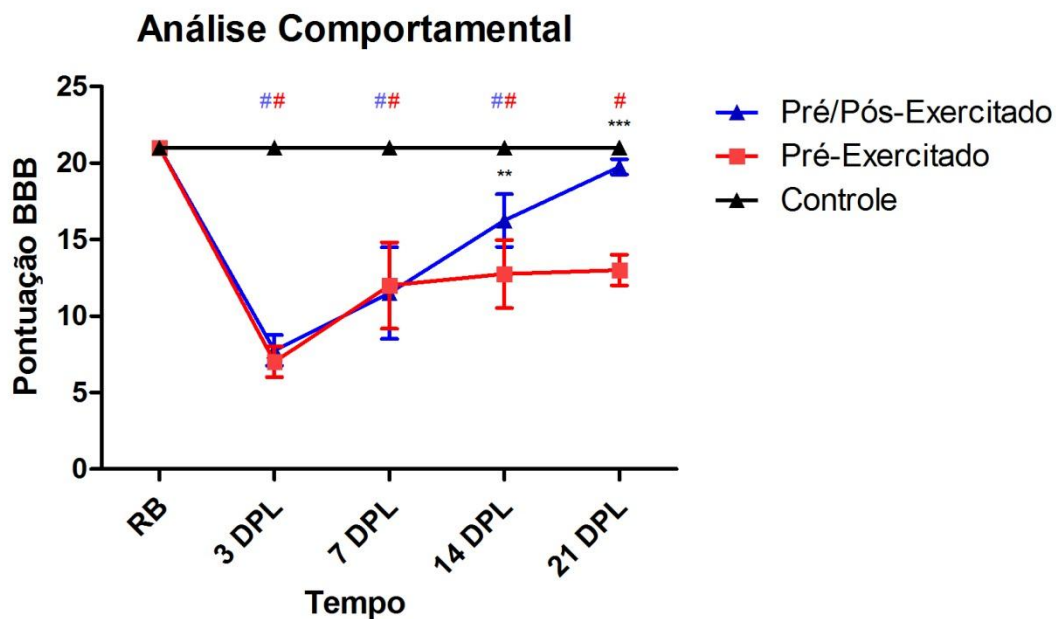


Figura 16: Análise qualitativa da recuperação motora da pata afetada. Resultado do desempenho funcional da pata posterior afetada pela lesão da medula espinhal durante a realização do Teste BBB. Comparação entre grupos experimentais realizada por ANOVA duas vias, **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e #($p < 0,001$).

Esse dados corroboram com resultados de estudos prévios (ENGESSER-CESAR et al., 2005; 2007) que demonstraram recuperação motora acentuada de animais submetidos a lesão moderada da medula espinhal por contusão e tratados com exercício voluntario em rodas de corridas.

TESTE BBB - DADOS BRUTOS						
Pré/Pós-Exercitado	Pata Posterior Direita					
Animais	Baseline	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
R1	21	9	15	16	20	
R2	21	6	9	14	19	
R4	21	8	9	17	20	
R7	21	8	13	18	19	
Média	21	7,75	11,5	16,25	19,5	
Desvio padrão	0	1,258306	3	1,707825	0,57735	
Pré-Exercitado	Pata Posterior Direita					
Animais	Baseline	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
R1	21	9	16	16	16	
R4	21	7	10	12	12	
R5	21	8	12	12	14	
R6	21	6	10	11	12	
Média	21	7,5	12	12,75	13,5	
Desvio padrão	0	1,290994	2,828427	2,217356	1,914854	
Controle	Pata Posterior Direita					
Animais	Baseline	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
R1	21	21	21	21	21	
R2	21	21	21	21	21	
R3	21	21	21	21	21	
R4	21	21	21	21	21	
Média	21	21	21	21	21	
Desvio padrão	0	0	0	0	0	

Tabela 2: Dados do teste BBB: Registro das pontuações atribuídas aos animais de acordo com a evolução da recuperação motora da pata posterior direita.

O EFEITO EPIGENÉTICO DO EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO APÓS LESÃO DA MEDULA ESPINHAL: ACETILAÇÃO DE HISTONAS H4.

Estudos recentes realizados com animais submetidos à atividade física em esteira sugerem que o exercício é capaz de promover acetilação de Histonas H3 e H4, pois apresentaram aumentos de enzimas HATs e HDATs em tempos diferentes (ELSNER et al., 2011; LOVATEL et al., 2013). Entretanto nossos resultados qualitativos sugerem que em nosso modelo experimental de lesão na medula espinhal e exercício físico voluntário não houve aumento na acetilação de histonas H4 na área de lesão analisadas tanto por método imunohistoquímico (Figura 17) quanto por análise molecular usando-se a técnica de *Western Blotting* (Figura 18).

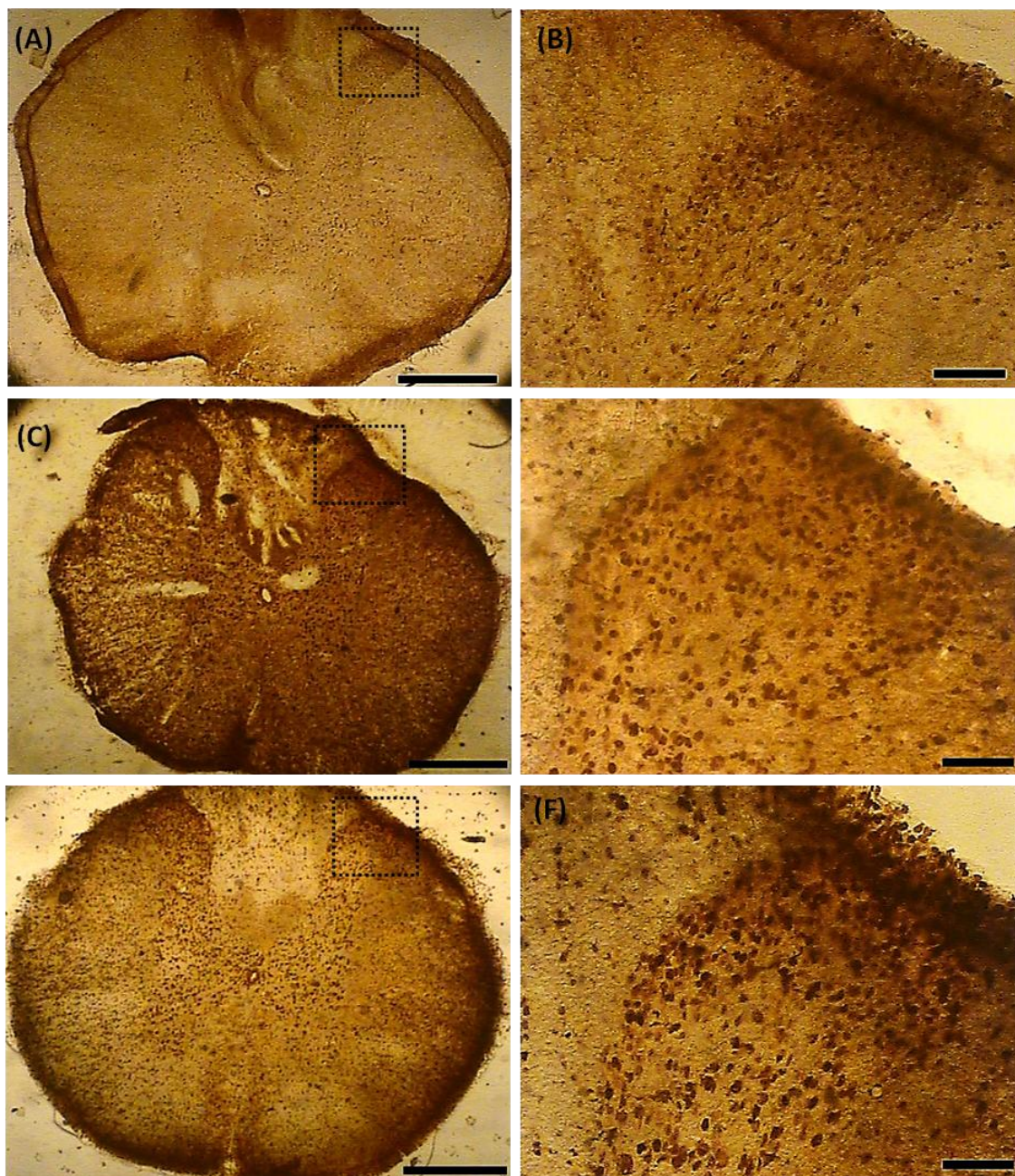


Figura 17: Imunomarcção para histonas H4 acetiladas. Secções transversais de medula espinhal da região imediatamente posterior à área de lesão (ACE) e aumento do corno dorsal direito (B,D,F). A e B: grupo Controle; C,D grupo A21 (Pré/Pós-exercitado); E e F grupo B21 (Pré-exercitado). Barra de Escala: 500µm coluna da esquerda; 100µm coluna da direita.

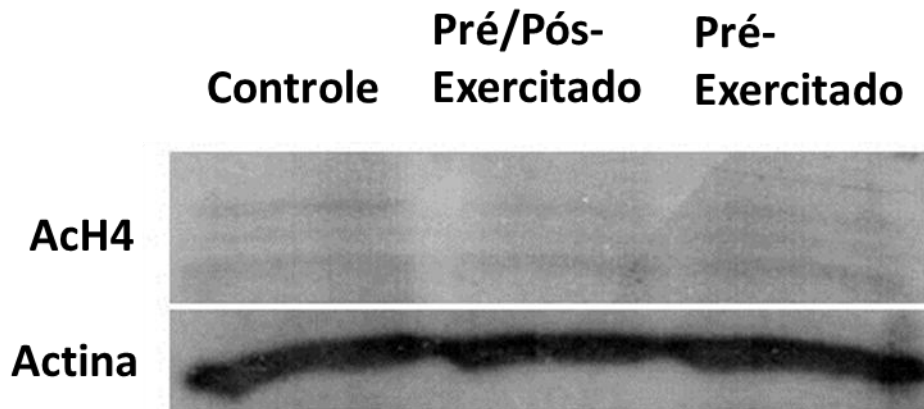


Figura 18: Imunoblot para acetilação de histona H4. Através da técnica de *Western Blotting*, observamos que qualitativamente não há diferenças de intensidades das bandas entre os grupos controle, A21 (Pré/Pós-exercitado) e B21 (Pré-exercitado).

EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO E DEGRADAÇÃO DE PGSC.

Para avaliarmos a possível degradação de PGSC por influencia do exercício físico voluntário, utilizamos a técnica de imunohistoquímica para proteoglicano de sulfato de condroitina (PGSC) degradado marcado pelo anticorpo monoclonal anti-C-4-S (Millipore-USA) em secções transversais de medula espinhal no segmento imediatamente posterior à lesão. De acordo com nossos resultados histológicos, não houve diferença na intensidade de imunomarcacão nas secções histológicas entre os grupos estudados (Figura 19).

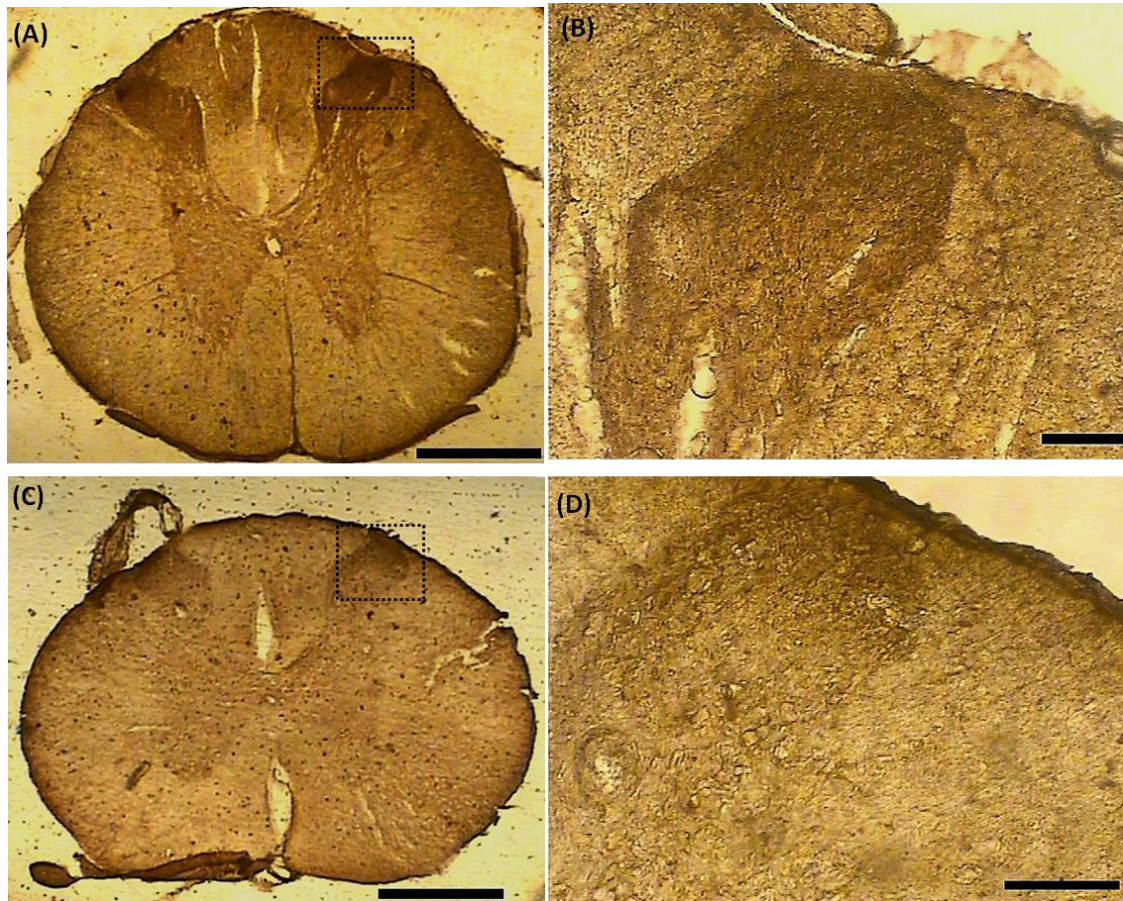


Figura 19: Imunoarcação de PGSCs degradado. Secções transversais de medula espinhal em região imediatamente posterior à área de lesão (A,C) e magnificação do corno dorsal direito (B,D). A e B: grupo A21; C e D: grupo B21. Barra de escala: 500 μ m coluna da esquerda; 100 μ m coluna da direita.

REAÇÃO ASTROCITARIAS APÓS EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL.

De acordo com a análise qualitativa de nossos resultados histológicos para células anti-GFAP positivas, constatamos que em secções caudais da medula espinhal imediatamente após à lesão, aparentemente os tecidos analisados demonstram pouca ou nenhuma diferença em relação a imunomarcção de astrócitos (figura 20, A e C), mesmo quando realizamos a magnificação dos cortes para visualizar os cornos dorsal posteriores (figura 20, B e D) não observamos diferenças de imunomarcção.

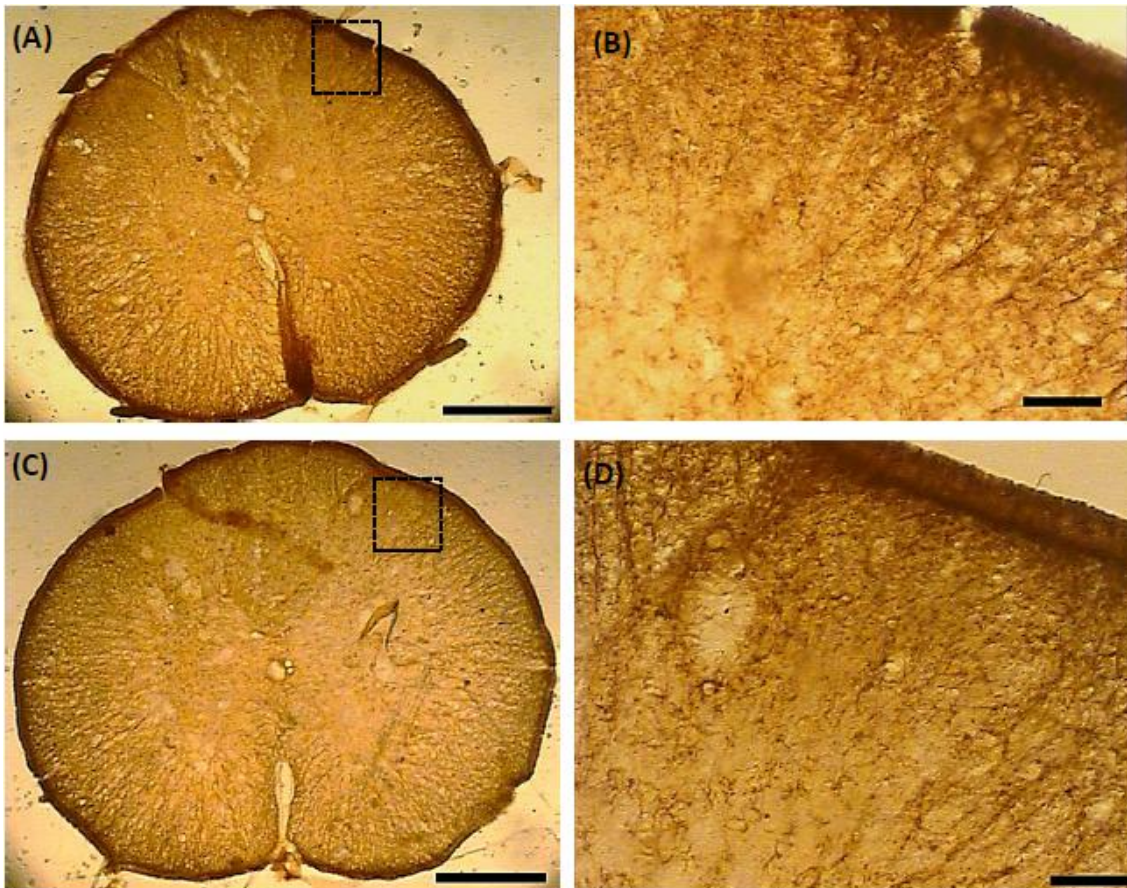


Figura 20. Imunomarcção com anti-corpo Anti-GFAP. Astrocitos imunomarcados em secções transversais da medula espinhal em região imediatamente posterior à área de lesão (A, C) e magnificação do corno dorsal direito (B,D). A e B: grupo A21; C e D: grupo B21. Barra de escala: 500 μ m coluna da esquerda; 100 μ m coluna da direita.

Entretanto, ao analisar os astrócitos imunomarcados na área de lesão, percebemos algumas diferenças morfológicas: os astrócitos do grupo A21 apresentaram morfologia hipertrofiada, processos celulares (ramificações) mais densos e mais longos (Figura 21).

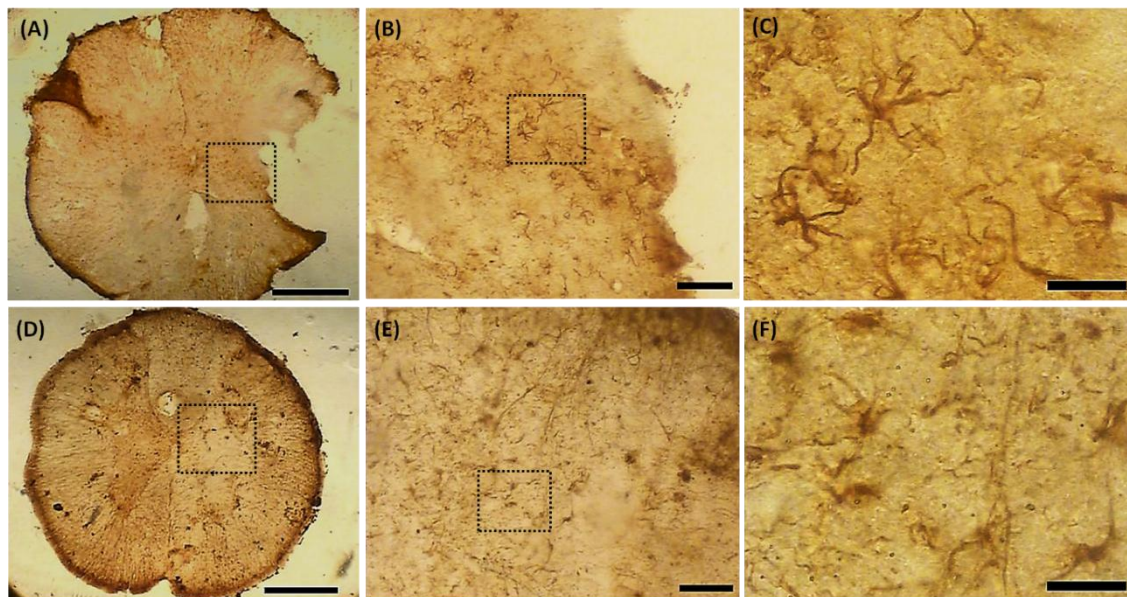


Figura 21: Astrócitos na Cicatriz Glial. Secções transversais da medula espinhal imunomarcado com anticorpo anti-GFAP demonstrando a área de lesão no grupo A21 (A) e no grupo B21 (B). A formação da cicatriz, glial com presença abundante de astrócitos, no grupo A21 (B) e B21 (E). Diferentes morfologias de ramificações dos astrócitos entre o grupo A21 (C) B21 (F). Barra de escala: 500μm coluna da esquerda; 100μm coluna da direita

DISCUSSÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente trabalho, realizamos modelo experimental de lesão da medula espinhal (hemissecção) em ratos adultos jovens com o objetivo de avaliar os efeitos terapêuticos celulares e moleculares de exercício físico voluntário (em rodas de corrida) na recuperação da função motora das patas posteriores afetadas. Para isto, investigamos dois possíveis mecanismos moleculares envolvidos: 1) a degradação de PGSCs e 2) acetilação de histonas, eventos moleculares estes que estão relacionados à neuroplasticidade e recuperação funcional em diferentes modelos experimentais de lesão do SNC (ver VERSLEGGERS et al., 2012; ELSNER et al., 2011).

RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA PROMOVIDA PELO EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO EM RODAS DE CORRIDA.

De acordo com os resultados obtidos em nossos experimentos utilizando-se o teste BBB, demonstramos que o exercício físico voluntário foi eficaz como terapia para recuperação da função motora em modelo experimental de lesão medular. O grupo de animais que praticou exercício antes e após a lesão (A21) apresentou resultados significativamente melhores da função motora da pata posterior quando comparado com o grupo que praticou exercício apenas antes da lesão (B21). Nossos resultados corroboram com outros trabalhos que utilizaram o exercício como terapia para recuperação funcional após lesão da medula espinhal (BATTISTUZZO et al., 2011; ENGESESSER-CESAR et al, 2005, 2007).

Apesar do grupo B21 ter demonstrado discreta recuperação da função motora (Ver Figura 16), essa recuperação alcançou platô sete dias após lesão da medula espinhal e não evoluiu mais, enquanto que o platô alcançado pelo grupo A21 aproximou-se da função motora normal demonstrada pelo grupo controle. Talvez esses resultados se expliquem pelo fato de que o exercício de corrida em rodinhas fortaleça grupamento musculares e conseqüentemente os

animais apresentaram melhor desempenho nos teste de campo aberto (ENGESSER-CESAR et al, 2005)

Embora os mecanismos celulares e moleculares pelo qual se obtenham melhoras funcionais em modelo experimental de lesão da medula espinhal não sejam totalmente esclarecidos, algumas hipóteses podem justificar tais resultados por influência do exercício: a produção de fatores neuroprotetores como BDNF (KE et al., 2011); adaptações epigenéticas envolvendo acetilação de histonas H3 e H4 (GOMEZ-PINILLA et al 2011; MCGEE and HARGREAVES, 2011) e modulação de elementos da MEC por ação de metaloproteinases (DORNBOS III and DING, 2012, RULLMAN et al., 2009). Com os resultados obtidos podemos sugerir que a acetilação de histona H4 não é influenciada por exercício voluntário crônico e que a modulação das redes perineuronais por efeito do exercício não ocorre em regiões próximas à lesão, entretanto o exercício voluntário em rodas de corrida interferiu na morfologia de astrócitos presentes na lesão.

O EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO EM RODAS DE CORRIDA NÃO PROMOVEU MAIOR ACETILAÇÃO DE HISTONAS H4.

Para investigarmos um dos possíveis mecanismos que promovem a recuperação funcional da pata posterior afetada pela lesão na medula espinhal encontrada em nosso Teste BBB, avaliamos a acetilação de histonas H4, percebemos que não houve diferença significativa entre os grupos estudados, este resultado obtido se semelha com o estudo feito por Gomez-Pinilla (2011) e Abel (2013), que não encontraram variação nos níveis de acetilação de histonas H4 em grupos experimentais exercitados de forma crônica quando comparados com animais sedentários. Nestes mesmos trabalhos foi demonstrado que nos animais exercitados, houve aumento significativo nos níveis de acetilação em histonas H3 quando comparados a grupos sedentários. No entanto, Elsner (2011) sugerem que o exercício físico promove acetilação tanto nas histonas H3 quanto nas histonas H4, pois estes autores identificaram aumento das atividades de HATs para H3 e H4 após exercício agudo em esteiras.

Diante das evidências de nossos resultados, nossa hipótese é que diferentes tipos de exercício físico podem induzir a acetilação de diferentes tipos de histonas. Nossa hipótese é que os efeitos epigenéticos do exercício físico voluntário crônico não promove a acetilação de histonas H4, mas pode induzir a acetilação de histonas H3, por exemplo. Entretanto, em nossos resultados de marcação de histonas H4 por *western blotting*, observamos que em ambos os grupos experimentais (A21 e B21) submetidos ao protocolo de exercício físico voluntário houve mais de uma banda de histona H4 marcada (ver Figura 18). Essas bandas marcadas torna razoável levantar a hipótese de que pode ter acontecido acetilação de histonas em diferentes quantidades gerando, portanto, histonas H4 com diferentes pesos moleculares, o que nos leva a pensar que pode haver acetilação de histonas em diferentes quantidades e em vários períodos após a terapia por exercício físico voluntário.

DEGRADAÇÃO DE PROTEOGLICANAS DE SULFATO DE CONDROITINA DEGRADADAS DA CICATRIZ GLIAL POR INDUÇÃO DO EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO.

De acordo com nossos resultados, tanto no grupo A21 quanto no grupo B21, não observamos a presença de PGSCs degradada na região imediatamente caudal à áreas de lesão através da utilização de técnica de imunohistoquímica para marcação no tecido nervoso. Apesar de haver estudos anteriores que demonstraram que o exercício físico influencia na produção de metaloproteinases (enzimas que degradam PGSC), como as MMP-9 e MMP-2 que são capazes de degradar toda a MEC (ver RULLMAN et al., 2009) e que estão relacionadas com a plasticidade e reparo do SNC (VERSLEGGERS et al., 2012), não conseguimos constatar que o exercício voluntário em rodas de corrida em modelo experimental de hemiseção da medula espinhal proporcione alguma mudança nas estruturas das redes perineuronais de neurônios na região imediatamente rostral à área de lesão. Podemos sugerir que a modulação das redes perineuronais por efeito do exercício voluntário em rodas de corrida pode ser menos extenso e mais local à lesão.

ANÁLISE DA FORMAÇÃO ASTROCITÁRIA NO SÍTIO DA LESÃO

Não observamos diferenças significativas em relação à imunomarcagem de astrócitos no sítio da lesão entre os grupos estudados. Entretanto, observamos que qualitativamente é possível afirmar que houve diferença na morfologia dos astrócitos entre os grupos controle, A21 e B21. Para o grupo que praticou atividade física voluntária antes e após a lesão, os astrócitos marcados na região da medula espinhal imediatamente rostral à área de lesão apresentaram morfologias hipertrofiadas, com processos mais densos e mais ramificados (ver Figura 21). Esses achados corroboram resultados recentes encontradas por Saur (2014), em que comparam a morfologia de astrócitos do hipocampo de ratos exercitados com sedentários e a morfologia dos astrócitos nos animais exercitados apresentou-se com menor quantidade de ramificações, portanto mais simples do ponto de vista geométrico.

As funções dos astrócitos reativos não estão ainda totalmente compreendidas. Sabe-se que estão ligadas tanto à fenômenos benéficos quanto fenômenos prejudiciais ao tecido nervoso, como formação da cicatriz glial que ao mesmo tempo representa um limite físico contra o aumento da área lesionada mas também representa uma barreira física à regeneração axonal (FAUKNER et al., 2004 apud HAGG et al., 2006)). Entretanto, podemos atribuir essas mudanças de morfologias como consequência do aumento do metabolismo astroglial em decorrências ao aumento de exigências fisiológicas (SAUR et al., 2014). Nesse sentido, podemos sugerir que a própria LME, por si só, já implica em novas exigências metabólicas às células entorno da lesão a fim de restabelecer a homeostase, portanto, a prática de exercício implica em uma demanda energética ainda maior e dessa forma exige ainda mais de células responsáveis pela manutenção da homeostase como os astrócitos.

CONCLUSÃO

- O exercício físico voluntário foi capaz de promover melhora da função motora das patas posteriores afetadas por lesão experimental da medula espinhal (hemissecção) em ratos da linhagem *Wistar*;
- Não observamos evidências de degradação de PGSCs na região próximo à área de lesão animais submetidos ao exercício físico voluntário em modelo experimental de LME;
- Não observamos diferença de intensidade de acetilação de histonas H4 em animais submetidos a exercício voluntario em modelo experimental de LME;

PESPECTIVAS

- Realizaremos Imunoflorescencia e Western Blotting para observar e quantificar a presença de PGSCs degradado na área de lesão.
- Quantificar a acetilação de H4.
- Analisar a morfologia fina dos astrócitos na área de lesão.

REFERENCIAS

ABACI et al. Effect of Diabetes Mellitus on Formation of Coronary Collateral Vessels. **Journal of American Heart Association – Circulation**. v.99, p. 2239-42, 1999.

ABEL; RISSMAN. Running-Induced Epigenetic And Gene Expression Changes In The Adolescent Brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 31, p. 382-90, 2013.

ASTORINO; ALLEN; ROBERSON; JURANCICH. Effect of High-Intensity Interval Training On Cardiovascular Function, VO₂max, And Muscular Force. **The Journal of Strength and Conditioning research**. v. 26, n. 1, p. 138-45, 2012.

BAHIA et al. Spatiotemporal Distribution of Proteoglycans in the Developing Rat's Barrel Field and the Effects of Early Deafferentation. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 510, p.145–57, 2008.

BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. **Journal of Neurotrauma**. v. 12, n. 1, 1995.

BARREIRO; SZNAJDER. Epigenetic Regulation Of Muscle Phenotype and Adaptation: A Potential Role In Copd Muscle Dysfunction. **Journal Applied Physiology**, 2013, No prelo.

BATTISTUZZO; CALLISTER; CALLISTER; GALEAI. A Systematic Review of Exercise Training To Promote Locomotor Recovery in Animal Models of Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, p. 1600-13, 2012.

BURR; SHEPHARD; ZEHR. Physical Activity After Stroke and Spinal Cord Injury: Evidence-based recommendations on clearance for physical activity and

exercise. **Canadian Family Physician: Le Médecin de famille canadien**. v. 58,p. 1236-39, 2012.

BUSS et al. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors In Human Traumatic Spinal Cord Injury. **BioMed Central Neurology**, v. 7, n. 17, 2007.

BRASIL. Ministerio da Saúde. Política Nacional de Redução da Morbimortalidade por acidentes e Violências. Rio Grande do Sul, 2001. Disponível em:< <http://www.mp.rs.gov.br/infancia/legislacao/id3072.htm> >.Acesso em 07/04/2013.

CÉLIO; SPREAFICO; DE BIASI; VITELLARO-ZUCCARELLO. Perineuronal Nets: past and present. **Trends in Neuroscience**. v. 21, n. 12, p.510–15, 1998.

CHO et al. The Effect of Minocycline on Motor Neuron Recovery and Neuropathic Pain in a Rat Model of Spinal Cord Injury. **Journal Korean Neurosurgical Society**. v. 49. p. 83-91, 2011.

CHUNG et al. Improved rat spinal cord injury model using spinal cord compression by percutaneous method. **Journal of Veterinary Science**. v.14, n. 3, p. 329-35, 2013.

DEEPA et al. Composition of Perineuronal Net Extracellular Matrix in Rat Brain. A Different Disaccharide Composition for The Net-Associated Proteoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17789–800, 2006.

DITYATEV; SCHACHNER. Extracellular Matrix Molecules and Synaptic Plasticity. **Nature**, v. 4, p. 456-68, 2003.

DITYATEV; SCHACHNER. The Extracellular Matrix and Synapses. **Cell Tissue Res**. v. 326, p. 647-54, 2006.

DITYATEV; SCHACHNER; SEIDENBECHER. Compartmentalization From The Outside: The Extracellular Matrix And Functional Microdomains In The Brain. **Trends in Neurosciences**. v.33, n.11, p. 503-12, 2010.

DORNBOS III; DING. Mechanisms of Neuronal Damage and Neuroprotection Underlying Ischemia/Reperfusion Injury after Physical Exercise. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 247-62, 2012.

EBERHARTER; BECKER. Histone Acetylation: A switch between repressive a permissive chromatin. **European Molecular Biology Organization reports**, v. 3, n. 3, p. 224-9, 2002.

ELSNER et al. Effect Of Different Exercise Protocols On Histone Acetyltransferases And Histone Deacetylase Activities In Rat Hippocampus. **Neuroscience**, v 192, p. 580-7, 2011.

ENGESSER-CESAR et al. Wheel Running Following Spinal Cord Injury Improves Locomotor Recovery and Stimulates Serotonergic Fiber Growth. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 1931–9, 2007.

ENGESSER-CESAR et al. Voluntary Wheel Running Improves Recovery from a Moderate Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 1. p. 157–71, 2005.

FITCH; SILVER. CNS Injury, Glial Scars, and Inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. **Experimental Neurology**. v. 209, p. 294–301, 2008.

FOX; CATERSON. Freeing the Brain from the Perineuronal Net. **Science**. v. 298, p. 1187-9, 2002.

GALTERY; FAWCETT. The Role of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Regeneration and Plasticity in the Central Nervous System. **Brain Research Reviews**. v. 54, p. 1-18, 2007.

GOMEZ-PINILLA et al. Exercise Impacts Brain-Derived Neurotrophic Factor Plasticity By Engaging Mechanisms Of Epigenetic Regulation. **European Journal Neuroscience**. v. 33. n. 3, p. 383-90, 2011.

HAGG; OUDEGA. Degenerative and Spontaneous Regenerative Processes after Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**. v. 23, n 3/4, p. 264-80, 2006.

HAMBLY; MARTIN. Anaesthesia For Chronic Spinal Cord Lesions. **Anaesthesia**, n. 53, p. 273-89, 1998.

HARKEMA et al. Locomotor Training: As a Treatment of Spinal Cord Injury and in the Progression of Neurologic Rehabilitation. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 93, p. 1588-97, 2012.

HAYES et al. Forced, Not Voluntary, Exercise Effectively Induces Neuroprotection In Stroke. **Acta Neuropathologica**. v. 115, p. 289-96, 2008.

HENEIMEIER et al. Expression of Extracellular Matrix Components and Related Growth Factors In Human Tendon and Muscle After Acute Exercise. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, 2011.

HOBOHM; HARTIG; BRAUER; BRUCKNER. Low Expression of Extracellular Matrix Components In Rat Brain Stem Regions Containing Modulatory Aminergic Neurons. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. v. 15, p. 135-42, 1998.

JAKEMAN; HOSCHOUER; BASSO. Injured Mice at the Gym: Review, results and considerations for combining chondroitinase and locomotor exercise to enhance recovery after spinal cord injury. **Brain Research Bulletin**. v. 84, p. 317-26, 2011.

JOHN et al. Brevican-Containing Perineuronal Nets of Extracellular Matrix In Dissociated Hippocampal Primary Cultures. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 31, p. 774-84, 2006.

KRAJACIC et al. Training-Induced Plasticity in Rats With Cervical Spinal Cord Injury: Effects and side effects. **Behavioural Brain Research**. v. 214, p. 323-31, 2010.

KE et al. The Effects of Voluntary, Involuntary, and Forced Exercises on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Motor Function Recovery: A Rat Brain Ischemia Model. **Plos one**. v. 6, n. 2, 2011.

KWON et al. Pathophysiology and Pharmacologic Treatment of Acute Spinal Cord Injury. **The Spine Journal**. v. 4, p. 451-64, 2004.

LEASURE; JONES. Forced and Voluntary Exercise Differentially Affect Brain and Behavior. **Neuroscience**. v. 156, p. 456-65, 2008.

LIU et al. Swimming Exercise Ameliorates Depression-Like Behaviors Induced By Prenatal Exposure to Glucocorticoids In Rats. **Neuroscience Letters**. v. 524, p. 119-23, 2012.

LOVATEL et al., Treadmill Exercise Induces Age-Related Changes In Aversive Memory, Neuroinflammatory And Epigenetic Processes In The Rat Hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 101, p. 94-102, 2013.

LV et al. Valproic Acid Improves Outcome After Rodent Spinal Cord Injury: Potential roles of histone deacetylase inhibition. **Brain Research**, v.1396, p. 60-68, 2011.

MAHONEY et al. Analysis of Global mRNA Expression In Human Skeletal Muscle During Recovery From Endurance Exercise. **The FASEB Journal**, 2005.

MARCON et al., Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 18, n. 1, p. 26-30, 2010.

MARTINS-PEREIRA; FERREIRA DE ARAÚJO. Enfrentamento e Reabilitação de Portadores de Lesão Medular e Seus Cuidadores. **Psico**, v. 37, n. 1, pp. 37-45, 2006.

MEKHAIL et al. Oligodendrocyte-Protection and Remyelination Post-Spinal Cord Injuries: A review. **Progress in Neurobiology**. v. 96, p. 322–39, 2012.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER – NSCISC.
Disponível em:<
https://www.nscisc.uab.edu/PublicDocuments/fact_figures_docs/Facts%202013.pdf> Acesso em: 12/04/2013.

MOTHE; TATOR. Advances in Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v.122, n. 11, 2012.

MURPHY et al. Exercise Pressor Reflex Function Following Acute Hemi-section of the Spinal Cord in Cats. **Frontiers in Physiology: Exercise Physiology**. v. 4, n. 3, 2013.

MCDONOUGH; MARTÍNEZ-CERDEÑO. Endogenous Proliferation after Spinal Cord Injury in Animal Models. **Stem Cells International**, v. 2012.

MCGEE; FAIRLIE; GARNHAM; HARGRAEVES. Exercise-induced Histone Modifications in Human Skeletal Muscle. **The journal of Physiology**. v. 587, n. 24, p. 5951-58, 2009.

MCGEE; HARGREAVES. Histone Modifications and Exercise Adaptations. **Journal of Applied of Physiology**, v. 110, p. 258-63, 2011.

NICHOLSON; SIKOVÁ. Extracellular Space Structure Revealed by Diffusion Analysis. **Trends Neuroscience**. v. 21, n. 5, p. 207-15, 1998.

ONIFER; RABCHEVSKY; SCHEFF. Rat Model of Traumatic Spinal Cord Injury to Assess Motor Recovery. **ILAR Journal**. v. 48, n. 4, p. 385-95, 2007.

PELÁEZ. Sarcopenia en Ancianos. **Endocrinología y Nutrición**. v. 53, n. 5, p. 335-44, 2006.

PEREIRA; JESUS. Epidemiologia do Traumatismo Raquimedular: Epidemiology of spinal injury in Aracaju. A prospective series. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**. n. 22, n. 2, p. 26-31, 2011.

PIRES-NETO; BRAGA-DE-SOUZA; LENT. Extracellular Matrix Molecules Play Diverse Roles in the Growth and Guidance of Central Nervous System Axons. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 32, n. 5, p. 633-38, 1999.

PIZZORUSSO et al. Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. **Science**, v. 298, p. 1248-51, 2002.

RHODES; FAWCETT. Chondroitin Sulphate Proteoglycans: Preventing plasticity or protecting the CNS? **Journal of Anatomy**. v. 204, p. 33-48, 2004.

SAUR et al., Physical Exercise Increases GFAP Expression And Induces Morphological Changes In Hippocampal Astrocytes. **Brain Structure and Function**. v. 219, p. 293-302, 2014.

SIEGENTHALER; BERCHTOLD; COTMAN; KEIRSTEAD. Voluntary Running Attenuates Age-related Deficits Following SCI. **Experimental Neurology**. v. 210, p. 207-16, 2008.

SUIJO K. et al. Resistance Exercise Enhances Cognitive Function in Mouse. **International Journal of Sports Medicine**, 2012.

SHU et al. The Glucose Oxidase-DAB-nickel Method in Peroxidase Histochemistry of the Nervous System. **Neuroscience Letter**. v. 85, n. 2, p. 169-71, 1988.

ROSSIGNOL; SCHWAB; SCHWARTZ; FEHLINGS. Spinal Cord Injury: Time to Move?. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 44, p. 11782-92, 2007.

ROWLAND; HAWRYLUK; KWON; FEHLINGS. Current Status of Acute Spinal Cord Injury Pathophysiology and Emerging Therapies: Promise on the horizon. **Neurosurgical Focus**, v. 25, n. 5, 2008.

RULLMAN et al. Endurance Exercise Activates Matrix Metalloproteinases In Human Skeletal Muscle. **Journal Applied Physiology**. v. 106. p. 804-12, 2009.

THOMPSON et al. Exercise and Acute Cardiovascular Events: Placing the risks into perspective. **Official Journal of the American College of Sports Medicine**. v. 115, p. 2358-68, 2007.

THURET; MOON; GAGE. Therapeutic Interventions After Spinal Cord Injury. **Nature**. v. 7, p. 628-43, 2006.

VERSLEGERS; LEMMENS; HOVE; MOONS. Matrix Metalloproteinase-2 And -9 As Promising Benefactors In Development, Plasticity And Repair Of The Nervous System. **Progress in Neurobiology**. v. 105, p. 60-78, 2013.

YENGO; ZIMMERMAN; MCCORMICK; THOMAS. Exercise Training Post-MI Favorably Modifies Heart Extracellular Matrix in the Rat. **Official Journal of the American College of Sports Medicine**. p. 1005-12, 2012.

YU et al. The Neuroprotective Effect of Treatment of Valproic Acid in Acute Spinal Cord Injury. **Journal Korean Neurosurgical Society**. v. 51, p. 191-8, 2012.

ZHANG et al., Role of Matrix Metalloproteinases and Therapeutic Benefits of Their Inhibition in Spinal Cord Injury. **Neurotherapeutics**. v. 8, n. 2, 2011.

ANEXOS

ANEXO A: Tabela de pontuações e características do teste BBB.

Definições operacionais de categorias e atributos da escala BBB de avaliação funcional			
PONTUAÇÃO	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS	PONTUAÇÃO	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.	11	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.	12	Passo plantar com suporte de piso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra	13	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.
3	Movimento extenso de duas articulações.	14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.	15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.	16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.	17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior	18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso.	19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.	20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.	21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.