UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

PLASTICIDADE INDUZIDA POR TREINAMENTO LOCOMOTOR NA MEDULA ESPINAL INTACTA EM RATOS: CORRELATOS MORFOLÓGICOS

ANA CARLA LIMA NUNES

- NATAL -
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

PLASTICIDADE INDUZIDA POR TREINAMENTO LOCOMOTOR NA MEDULA ESPINAL INTACTA EM RATOS: CORRELATOS MORFOLÓGICOS

ANA CARLA LIMA NUNES

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.
Orientadora: Profa. Dra. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa
Co-orientador: Marco Aurélio M. Freire

- NATAL -
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia:
Prof. Ricardo Oliveira Guerra

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Plasticidade Induzida por treinamento locomotor na Medula Espinal Intacta em Ratos: Correlatos Morfológicos

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa (Orientadora)
Departamento de Morfologia – Centro de Biociências – UFRN – Presidente.

Profª. Drª. Raquel Simoni Pires
Departamento de Fisioterapia – Centro de Ciências da Saúde – UNICID

Prof. Dr. Jeferson de Souza Cavalcante
Departamento de Fisiologia – Centro de Biociências – UFRN

Aprovada em 02/07/2009

"Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz."

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amor, persistência e força que me proporcionou para seguir em busca dos meus objetivos, pelas oportunidades, pelas pessoas que colocou em meu caminho e pela capacidade de transformar as dificuldades em aprendizado.

À minha orientadora Miriam Stela Maris de Oliveira Costa pela acolhida, paciência e ensinamentos. Uma profissional a quem admiro e respeito, pela sua inteligência e experiência, me transmitindo tranquilidade nos momentos de ansiedade. Obrigada!

Aos meus pais, Maria do Carmo e Valter pelo amor, exemplo, apoio e união, elementos que são a base da minha formação pessoal e profissional. Amo vocês!

Às minhas irmãs Tarcia e Tercia, e ao meu irmão postiço Alexandre, pelo apoio e carinho.

Ao pesquisador Marco Aurélio Freire pelos ensinamentos, paciência, discussões científicas, idéias e amizade, que junto com Joanilson foram importantes para o amadurecimento e realização desse estudo.

Ao professor John Fontenele Araújo pelas idéias, ensinamentos e disponibilidade. Aproveito para agradecer ao Breno e Fabiano por me disponibilizarem os animais possibilitando a realização do nosso estudo.

Ao professor Jeferson Cavalcante pelas conversas, sugestões e pensamento positivo contagiante.

A professora Raquel Simoni Pires pela valiosa contribuição, integrando a plasticidade neural e os conhecimentos fisioterapêuticos.

A professora Belmira Andrade da Costa pelas sugestões e disponibilidade em ajudar com sua enorme experiência imunohistoquimica.

Ao professor Jamilson Brasileiro pelas idéias iniciais e paciência, profissional que admiro e me espelho.

Às minhas amigas e amigos que me proporcionaram o sentimento de amizade verdadeira, colaborando, mesmo que de forma indireta, na elaboração desta pesquisa, principalmente Roberta Gadelha, Natália Nascimento, Denise Meira, Rubia Freitas, Renata Zilar e Amanda Cavalcante.

Às meninas do apartamento 101, Renata Meira, Rafaela Pedrosa, Paula Regina, Nícia Farias e Juliana Meira, pela amizade construída, confidências, alegrias e tristezas compartilhadas, garanto que aprendi muito com cada uma delas.

A todos os componentes do Labneuro, Rovena Engelberth, Joacil Germano, André Pontes, Janaína Borda, Kátia Gouveia, Francimar Santos pela amizade, conversas informais, apoio e descontração. De forma especial, agradeço ao meus companheiros de madrugada Renata Duarte, Twyla Barros e Leandro Freitas pela ajuda, perfusões, contagens infinitas, brincadeiras e amizade. Muito Obrigada!

À Regina Celi pelo auxílio no laboratório, dicas e broncas que me ajudaram a amadurecer meu conhecimento prático.

A Edílson por manter nosso ambiente sempre limpo e pelo bom humor de todas as manhãs.

Ao departamento de Morfologia pelo espaço físico, material e todo suporte técnico utilizado na realização deste trabalho.

Ao IINN-ELS pelo suporte técnico.

À CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
1.1 ANATOMIA DA MEDULA ESPINAL	16
1.2 QUIMIOARQUITETURA DA MEDULA ESPINAL	23
1.3 HABILIDADES MOTORAS E PLASTICIDADE DA MEDULA ESPINAL	27
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. SUJEITOS	38
3.2. DESENHO EXPERIMENTAL	38
3.3. PERFUSÃO	40
3.4 MICROTOMIA E PROCESSAMENTO DO TECIDO	41
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	44
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 ARTIGO – Expressão do gene imediato Egr1 e Substância P na medula espinal após treinamento locomotor de ratos adultos	56
6 CONCLUSÃO	85
ANEXOS	87
ANEXO 1 – Preparação de Manuscritos – Brain Research	88

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach – Acetilcolina

AchE – Acetilcolinesterase

AMPA - α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate

CCK – Colecistoquinina

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene calcitonina

CPG – Gerador central de padrão

ChAT – Colina Acetiltransferase

5-HT – Serotonina

DA – Dopamina

DAB – 3,3', 4,4'-tetrahidrocloreto-diaminobenzidina

DP – Distância percorrida

EF – Exercício físico

Egr1 – Gene 1 de resposta recente ao crescimento

ENK – Encefalina

GABA – Ácido γ- aminobutírico

GAD – Ácido glutâmico descarboxilase

IL – Interleucina

LTP – Potenciação de longo prazo

MLR – Região locomotora mesencefálica

MM – Média de massa

NMDA – 2R- 2-(methylaminico) succinic acid

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NPY – Neuropeptídeo Y

SP – Substância P

SS – Somatostatina

VM – Velocidade média

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Desenho esquemático de secções transversais de diferentes níveis da medula espinal, com a representação da distribuição das lâminas (I-X)	17/18
Figura 2 – Diagrama esquemático mostrando as áreas locomotoras e vias do tronco encefálico e níveis da medula	28
Figura 3 – Roda de atividade motorizada	34
Figura 4 – Contador manual	34
Figura 5 – Fotografia da medula espinal completa e da porção lombossacral	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Resumo dos dados referentes aos grupos experimentais	35
Tabela 2 – Especificações técnicas das substâncias utilizadas na imunohistoquímica	39

RESUMO

A locomoção é uma das mais importantes capacidades desenvolvidas pelos animais, cujo aperfeiçoamento é dependente de vários centros neurais, incluindo a medula espinal. Esta atividade promove várias modificações espinais que a possibilita se adaptar e aperfeiçoar suas conexões. Este trabalho teve por objetivo observar as alterações morfológicas ocorridas na medula espinal após o treinamento locomotor de ratos intactos. Para isso foram utilizados ratos Wistar machos, os quais foram submetidos ao treinamento locomotor na roda de atividade em protocolos de 1, 3 e 7 dias (30min/dia), e os resultados foram comparados aos de um grupo controle, não submetido ao exercício. Cortes coronais de 40 µm da medula espinal lombossacral foram submetidos a técnicas imunohistoquimicas anti-Egr1, anti-NMDA e anti-SP, para caracterizarmos a plasticidade espinal quanto a essas substâncias. Células imunorreativas a Egr1 estavam aumentadas em todas as lâminas, intensamente nas regiões mais ativadas pela locomoção, lâminas IV-X dos níveis L4-S3. Todas as secções observadas expressaram imunorreatividade a NMDA. A análise da SP no corno dorsal espinal resultou em ausência de variações significantes deste neuropeptídeo relacionadas com a locomoção. Diante dos resultados, sugerimos que o treinamento locomotor proporciona plasticidade sináptica semelhante a LTP em todas as lâminas da medula espinal, em intensidades diferenciadas. No entanto, esse processo parece não ter a participação da SP no corno dorsal espinal. Este trabalho vem contribuir para a consolidação e caracterização da plasticidade sináptica na medula espinal.

Palavras-Chave: medula espinal, plasticidade sináptica, treinamento locomotor, Egr1, LTP, substância P, NMDA.

ABSTRACT

The locomotion is one of the most important capabilities developed by the animals, whose improvement is dependent on several neural centers, including the spinal cord. This activity promotes a lot of spinal modifications that enable it to adapt and improve their connections. This study aimed to observe the morphological changes occurring in the spinal cord after locomotor training in intact rats. For that we used male Wistar rats, which were submitted to locomotor training in wheel activity in protocols 1, 3 and 7 days (30min/day), and the results were compared to a control group not subjected to exercise. Coronal sections of 40 µm of the lumbosacral spinal cord were subjected to immunohistochemical techniques anti-Egr1, anti-NMDA and anti-SP, to characterize the spinal plasticity related to these substances. Egr1-immunoreactive cells were increased in all laminas, essentially in those more intensely activated by locomotion, laminas IV-X levels L4-S3. All observed sections expressed NMDA-immunoreactivity. Analysis of SP in the spinal dorsal horn resulted no significant variations of this neuropeptide related to locomotion. The results suggest that locomotor training provides synaptic plasticity similar to LTP in all laminas of the lumbosacral spinal cord, in different intensities. However, the SP appears do not participate of this process in the spinal dorsal horn. This work will contribute for consolidating and characterization of synaptic plasticity in the spinal cord.

Key words: spinal cord, synaptic plasticity, locomotor training, Egr1, LTP, substance P, NMDA.

1 INTRODUÇÃO

A medula espinal tradicionalmente é vista como um sistema de programação rígida, que simplesmente responde rapidamente e de forma estereotipada a entradas aferentes dos receptores sensoriais na periferia ou aos comandos descendentes do cérebro. Tradicionalmente acreditava-se que as conexões entrada-saída de curta latência representariam a capacidade plena da medula espinal.

Plasticidade dependente de atividade, definida como modificação persistente do sistema nervoso central (SNC) resultante de experiências passadas e que afeta o comportamento futuro, sempre foi considerada uma capacidade supra-espinal. Desempenhos motores complexos, habilidades padrões, como andar, e habilidades especiais, tais como dançar ou tocar piano, que são adquiridas com a prática, e assim refletem os efeitos persistentes da atividade, são geralmente interpretadas como resultante de plasticidade supra-espinal, que simplesmente usa as capacidades fixas da medula espinal. Entretanto, observações clínicas e experimentais indicam que a medula espinal, como outras partes do SNC, mostra plasticidade neuronal e sináptica dependente de atividade, ou seja, que entradas da periferia ou do cérebro podem causar modificações duradouras na medula espinal, afetando o seu desempenho a posteriori [1,2].

Evidências importantes da capacidade plástica da medula espinal emergiram a partir de experimentos com gatos espinais crônicos usando paradigmas de treinamento locomotor com registro eletromiográfico e análise cinemática. Como resultado desses experimentos tornou-se evidente que a habilidade para aprender e desempenhar com sucesso uma tarefa locomotora é dependente da prática repetitiva e parece ser específica para a tarefa testada [3,4].

Pelo fato de os animais espinais funcionalmente recuperados não mostrarem qualquer evidência de regeneração de vias descendentes ou mostrarem alterações mínimas nas propriedades dos músculos esqueléticos [5,6] que expliquem as características da recuperação, o comportamento funcional exibido por estes animais deve ser mediado pela plasticidade em vias espinais existentes. Esta plasticidade pode ocorrer em quaisquer das muitas regiões ou tipos celulares, tais como motoneurônios, neurônios pré-motores do gerador de padrão, e/ou tipos celulares não neuronais. Poderia haver

alterações anatômicas de conexões sinápticas, zonas ativas de sinapses aumentadas, sensibilidades alteradas de receptores de neurotransmissores, ou produção alterada de neurotransmissores.

Diversas estratégias estão sendo estudadas buscando favorecer a recuperação funcional da medula espinal. Dentre elas, o treinamento da marcha vem se destacando na medida em que proporciona melhora da qualidade da marcha de animais e/ou humanos pós-lesão de medula espinal [1,3,4,7,8,9]. No entanto, os mecanismos intrínsecos à melhora da funcionalidade do indivíduo ainda não estão suficientemente esclarecidos.

Diante disso, neste trabalho investigamos as mudanças morfológicas que ocorrem na medula espinal intacta de um animal adulto submetido a treinamento físico, durante períodos de tempo diferenciados. Através da caracterização neuroquímica da medula espinal nas diversas condições pudemos inferir as bases da plasticidade medular relacionada ao exercício, colaborando para a compreensão das terapêuticas existentes bem como para o desenvolvimento de novas terapêuticas.

A compreensão dos fenômenos químicos subjacentes à plasticidade espinal induzida por atividade pode contribuir para a consolidação do treinamento da marcha como meio de reabilitação, bem como para o desenvolvimento de terapêuticas inovadoras para pacientes com lesão da medula espinal.

1.1 ANATOMIA DA MEDULA ESPINAL

A medula espinal é considerada componente do sistema nervoso central, pelo fato de estar contida no canal vertebral, onde ocupa os dois terços superiores, protegida pelo estojo ósseo da coluna vertebral e pelos envoltórios meníngeos e seus espaços, bem como pela sua estrutura de substância cinzenta e substância branca. Por ser o segmento mais caudal e pelo fato de estar conectada aos pares de nervos espinais que a ligam ao corpo, foi por longo tempo tratada como simples estação intermediária entre o cérebro e a periferia, além de um centro reflexo [10,11,12].

Na medula espinal, a substância cinzenta é disposta centralmente, formada de corpos celulares, circundada pela substância branca, composta de

feixes de fibras mielinizadas. Em cada metade da medula espinal, a substância branca é convencionalmente dividida em funículos dorsal, lateral e ventral e a substância cinzenta é dividida em cornos dorsal, lateral e ventral, e uma região centro-mediana circundando o canal central (substância cinzenta central). A configuração da substância cinzenta e sua relação com a substância branca variam nos diferentes níveis rostrocaudais, sendo que no nível lombossacral, existe relativamente menos substância branca que nos níveis superiores, com cornos anterior e posterior maciços [13, 14].

Na substância cinzenta da medula espinal podemos encontrar grande número de neurônios de variadas formas e tamanhos. Como resultado dos trabalhos de Rexed, baseado em estudos citoarquitetônicos (Golgi) e conectividade[15,16], hoje tem-se amplamente aceita uma organização citoarquitetônica da substância cinzenta da medula espinal em 10 lâminas nomeadas por numeros romanos no sentido dorsoventral. Além do arranjo laminar no plano coronal (animais quadrúpedes) ou transversal (primatas humanos e não-humanos), algumas lâminas formam colunas no sentido rostrocaudal. Embora seja baseado em estudo realizado em gato, a padronização foi estendida para as demais espécies de mamíferos, inclusive humanos, notando-se algumas pequenas diferenças interespecíficas. A maioria das lâminas está presente em todos os níveis espinais, exceto a lâmina VI que está ausente entre T4 e L2 [14].

A lâmina I é uma fina camada que cobre a superfície do corno posterior e contém células pequenas e médias, orientadas paralelamente à superfície convexa do corno posterior, compreendendo axônios desmielinizados, pequenos dendritos e botões sinápticos. Algumas poucas células grandes, alongadas mediolateralmente podem ser vistas em cada secção [17]. Segundo Zhang *et al* [18], nesta lâmina foram identificadas células de morfologia distintas: células com soma fusiforme e árvores dendriticas longitudinais, células piramidais com soma triangular e três principais origens dendríticas, e células multipolares com soma multi-angular e quatro ou mais árvores dendríticas. Eles também associaram estas distintas morfologias celulares e distribuição longitudinal a prováveis diferenças em seus papéis funcionais. As células na lâmina I respondem especificamente a estímulos nociceptivos e térmicos, e suas fibras contribuem para o trato espinotalâmico contralateral, além de

imunorreatividade para substância P (SP), encefalina (ENK), somatostatina (SS) e serotonina (5-HT) [13].

A lâmina II forma uma faixa bem delimitada, coberta dorsal e dorsolateralmente pela lâmina I, enquanto que na sua borda medial está o funículo posterior. Esta lâmina é composta de muitas células pequenas, correspondendo à substância gelatinosa de Rolando. Embora presente em todos os níveis espinais, é mais intensa nas intumescências espinais. Possui neurônios redondos ou alongados com seu eixo orientado radialmente à superfície da lâmina e corpos celulares fusiformes e grandes, dando origem a ricas árvores dendríticas. Estas células mostram-se pobres em retículo endoplasmático granular, que está correlacionado com a precariedade dos corpos de Nissl ao microscópio óptico [19].

Uma característica marcante é a presença de numerosos e pequenos axônios desmielinizados que correm paralelamente ao eixo da medula, ou perpendicular a este eixo. Mais profundamente, alguns axônios mielinizados passam na lâmina II, especialmente na sua metade medial. As fibras aferentes para a lâmina II são derivadas do fascículo dorsolateral, do funículo posterior e partes adjacentes do funículo lateral. Dela também partem axônios para o fascículo dorsolateral. Esta região ainda contém altas concentrações de substância P, que é uma substância de importante papel excitatório na transmissão central de impulsos relacionados com a dor [13,14].

Observações fisiológicas e morfológicas indicam que os corpos celulares de neurônios nociceptivos e termoceptivos tendem a se localizar na lâmina I e zona externa da lâmina II, enquanto que neurônios mecanoceptivos estão localizados na zona interna da lâmina II [20].

A lâmina III forma uma faixa que atravessa o corno posterior, paralelamente às lâminas I e II. As células mostram maior variação de tamanho, sendo, em geral, maiores que as da lâmina II. Esses neurônios possuem grande núcleo, com relação ao citoplasma, e pequena quantidade de substância de Nissl.

Na lâmina III, parecem existir dois tipos de neurônios: o primeiro possui assimetria dendrítica, com ramificações dorsais mais desenvolvidas. O segundo tipo é caracterizado por árvores dendríticas radiais e pequeno pericário. Em ambos os casos, os axônios são grandes, mas parecem se

ramificar inteiramente na substância cinzenta, sendo identificados como interneurônios transmissores de impulsos de fibras aferentes para células de origem de tratos sensoriais [17,21].

A camada mais larga do corno posterior é a lâmina IV. Suas células variam de tamanho e formato, podendo ser arredondadas, triangulares ou multipolares, com citoplasmas mais abundantes que das células da lâmina III. Seus dendritos têm espinhas bem desenvolvidas, que promovem o contato sináptico com grandes fibras aferentes. Torna-se contínua com a lâmina IV contralateral na comissura dorsal nos níveis lombar e sacral, e com o final da área X, nos níveis torácico e cervical. Nas regiões torácica e lombar superior, esta lâmina é interrompida pelas células da coluna de Clarke, que respondem a estímulos cutâneos e proprioceptivos. Os neurônios desta lâmina respondem a estímulos mecânicos de baixa intensidade. Neurônios das lâminas III e IV constituem o núcleo sensitivo próprio. Estas células contribuem com fibras para o trato espinotalâmico [21].

A lâmina V atravessa o colo do corno posterior, que é dividido em medial e lateral, exceto na região torácica. As lâminas V e VI são citologicamente semelhantes e muitas vezes são consideradas uma única entidade. Na lâmina V, as células têm tamanhos e formatos variáveis. As fibras da raiz dorsal fazem sinapse com os dendritos das células da lâmina V na substância gelatinosa, e fibras supra-segmentais descendentes fazem sinapse dentro da lâmina V. Os neurônios dessa lâmina contribuem com fibras para o trato espinotalâmico [21, 22].

A base do corno posterior é formada pela lâmina VI, que está presente apenas nas intumescências da medula. De T4 a L2, a lâmina V forma um limite dorsal com a lâmina VII. Na sua região medial existem células médias e pequenas. Na região lateral, as células têm formato triangular ou estrelado. Aferentes musculares da raiz dorsal terminam na região medial, enquanto vias descendentes se projetam para células na região lateral. As células da lâmina VI ao nível da intumescência cervical compõem o núcleo centrobasal, dando origem ao trato espinocerebelar rostral [17].

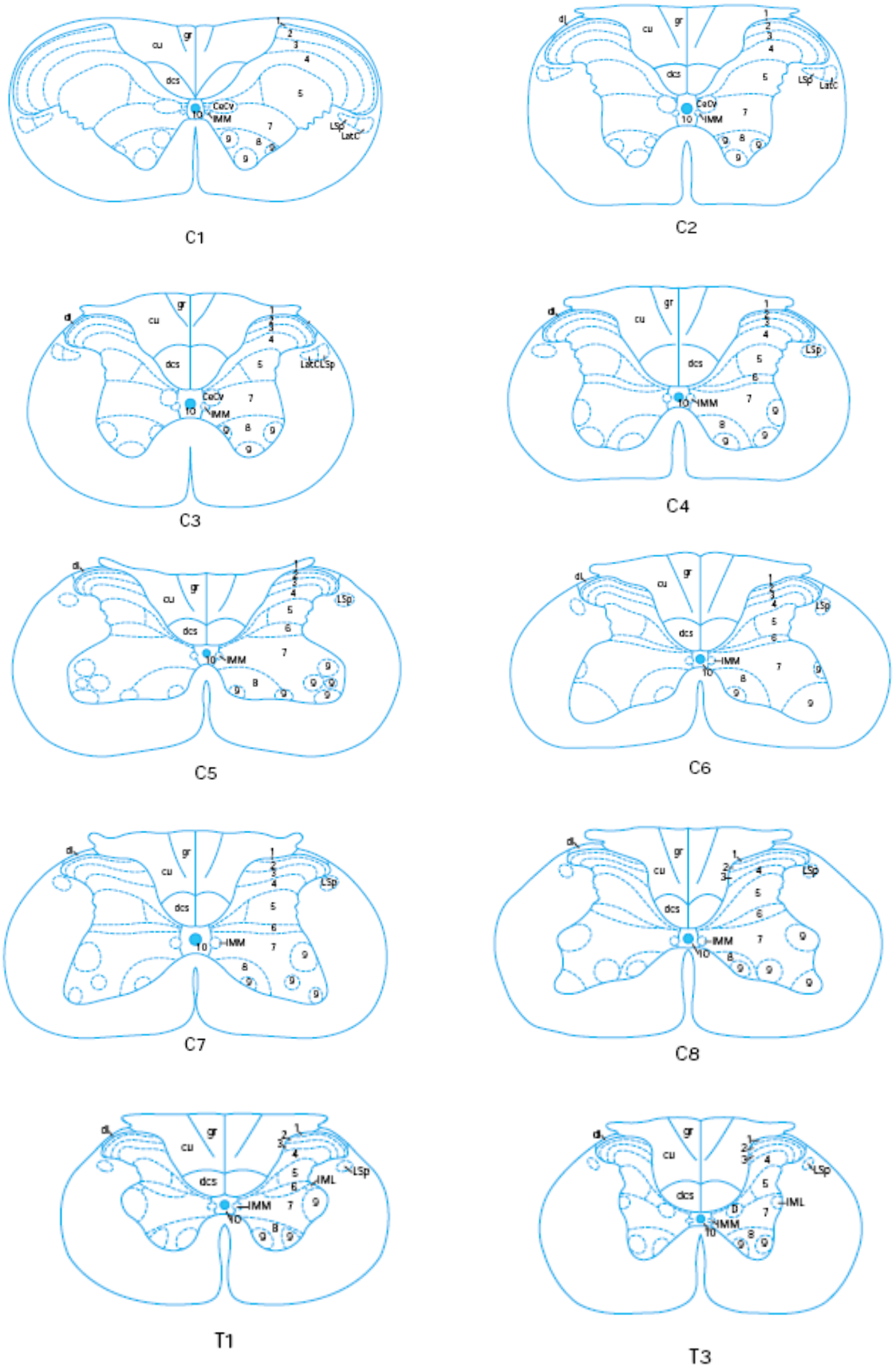


Figura 1. Desenho esquemático de secções transversas de diferentes níveis da medula espinal, com a representação da distribuição das lâminas (I-X) [23].

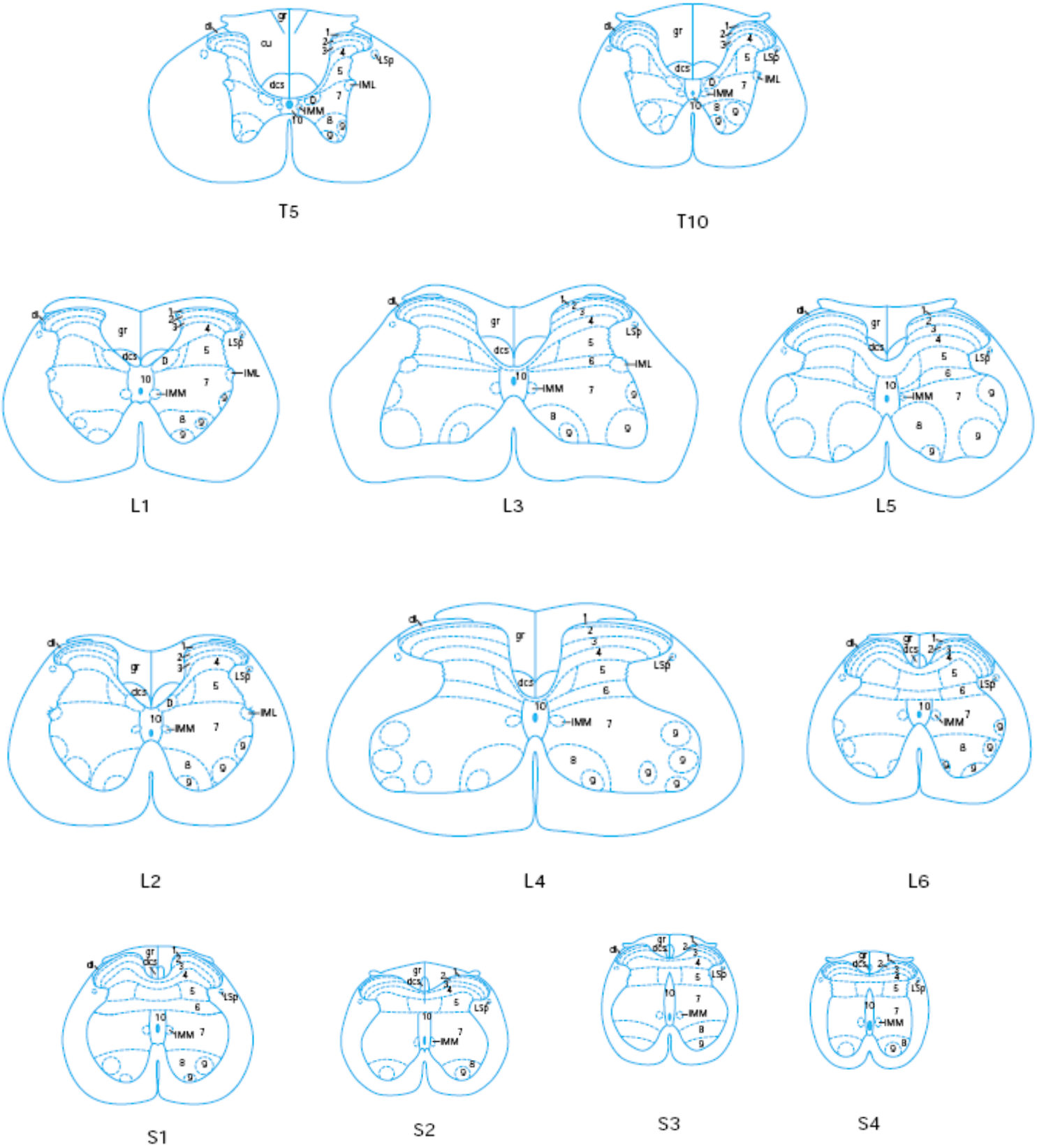


Figura 1 (continuação). Desenho esquemático de secções transversas de diferentes níveis da medula espinal com a representação da distribuição das lâminas (I-X) [23].

A lâmina VII ocupa uma grande região heterogênea anterior às lâminas V e VI, conhecida também como zona intermédia. Nas intumescências cervical e lombar, a lâmina VII se estende lateral e ventralmente no corno ventral e contém grupos de células da lâmina IX. Na região torácica ela ocupa a zona intermédia e base do corno ventral. Esta lâmina tem uma aparência razoavelmente homogênea, constituída em sua maioria por interneurônios. Possui colunas de células bem definidas como núcleo dorsal de Clarke, núcleo intermediolateral, presente nos seguimentos de T1-L3 (com neurônios simpáticos pré-ganglionares) e L6-S1 (neurônios parassimpáticos pré-ganglionares) e núcleo intermédio medial, presente em todos os níveis. Também possui fibras que ascendem no trato espinocerebelar anterior [17,24].

A lâmina VIII corresponde a uma zona na base do corno ventral. Ao nível das intumescências, esta lâmina ocupa apenas a região medial do corno ventral. Nos outros níveis, cruza o corno anterior. As células têm tamanho e formato variados, mas em sua maioria são triangulares ou estelares, e com grande quantidade de citoplasma. É uma região de terminação de tratos espinais descendentes, como vestibuloespinal, reticuloespinal pontino e tectoespinal.

A lâmina IX contém distintos grupos de neurônios motores somáticos. É formado de células grandes e multipolares, com grande núcleo central e axônios que contribuem para a raiz dorsal. Existem diversas classificações morfológicas relacionadas às células encontradas nessa lâmina. Uma importante característica dos dendritos dos neurônios motores é a tendência de se juntarem em regiões mais densas, sugerindo importante papel na execução de programas motores. O corno ventral é formado por motoneurônios alfa e gama, e interneurônios , como as células de Renshaw que exercem influência inibitória nos motoneurônios[17].

Existe uma coluna motora medial que inerva os músculos longos e curtos, inseridos no esqueleto axial e, um grupo de células nucleares laterais, que inervam todos os músculos do corpo, exceto a musculatura axial.

A área X é uma região ao redor do canal central que contém células menores e mais condensadas que na lâmina VII. Essas são piramidais, estelares e fusiformes, e muitas respondem a estímulos nocivos. Há um

possível envolvimento das células da área X na transmissão de nocicepção visceral [17].

Na substância branca, o funículo posterior é composto predominantemente de fibras radiculares dorsais. Grande quantidade de fibras mielinizadas da raiz dorsal penetra no funículo posterior medial, onde se bifurcam em ramos ascendentes longos e descendentes curtos. Nas regiões cervical e torácica superior, o funículo posterior é dividido em fascículos grácil e cuneiforme. O fascículo grácil está presente em todos os níveis espinais e contém os ramos ascendentes longos de fibras provenientes das raízes sacrais, lombares e das seis torácicas inferiores.

As fibras ascendentes longas nas colunas posteriores conduzem impulsos relacionados com tato, pressão e cinestesia, através da capacidade discriminativa gerada por esta sensação. Essas colunas também contém grupos 1a de aferentes de fusos musculares, que geralmente ascendem, terminando no núcleo dorsal de Clarke[17].

Os tratos descendentes espinais estão relacionados aos movimentos somáticos, à inervação visceral, à modificação do tônus muscular, aos reflexos segmentares e à transmissão central de impulsos sensitivos. O maior desses tratos tem origem no córtex cerebral e todos os outros tratos espinais descendentes tem origem em massas celulares localizadas nos três segmentos do tronco cerebral [17].

1.2 QUIMIOARQUITETURA DA MEDULA ESPINAL

O uso de técnicas histoquímicas, imuno-histoquímicas, auto-radiografia para receptor, hibridização in situ, e outras, permitiu identificar na medula espinal uma variedade de neurotransmissores e neuromoduladores, acrescentando informações sobre os mecanismos de neurotransmissão, levando a um maior conhecimento da organização anatômica e funcional da medula espinal [25,26,27].

A Acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor muito importante na medula espinal e, geralmente, é identificada indiretamente através de procedimentos histoquímicos pela ação da enzima hidrolizante da ACh, acetilcolinesterase (AChE), ou por métodos imunohistoquímicos com o uso de anticorpo contra a

enzima sintetizadora da ACh, colina acetiltransferase (ChAT). ChAT é considerado o marcador mais confiável de neurônios colinérgicos na medida em que marca apenas neurônios que sintetizam ACh, enquanto a AChE está presente em neurônios que utilizam ACh como neurotransmissor (neurônios colinérgicos) e em neurônios que recebem estímulos colinérgicos [14].

Os principais neurônios colinérgicos na medula espinal são os grandes motoneurônios α, que usam ACh como transmissor na junção neuromuscular perifericamente e, na sinapse de colaterais com células de Renshaw, centralmente, sendo mediada por receptores nicotínicos em ambos locais. Uma outra grande coleção de neurônios colinérgicos espinais está na coluna intermediolateral ao nível toracolombar, formada por neurônios simpáticos pré-ganglionares que se projetam para neurônios noradrenérgicos nos gânglios pré ou paravertebrais [14,28,29]. Também podemos encontrar receptores colinérgicos muscarínicos na medula espinal, particularmente abundantes nas lâminas II e IX. Receptores muscarínicos do tipo M1 são predominantemente encontrados na lâmina II, enquanto M1 e M2 estão em densidades significantes nas colunas dos neurônios motores do corno anterior [30]. Além do bem estabelecido papel da Ach no desempenho motor, ambos os receptores muscarínicos e nicotínicos parecem mediar efeitos antinociceptivos [31].

Através de estudos imuno-histoquimicos contra a enzima de síntese ou contra os neurotransmissores, a inervação monoaminérgica da medula espinal é bem conhecida. As fibras noradrenérgicas no corno anterior derivam do lócus coeruleus e subcoeruleus, enquanto que as terminações no corno posterior se originam de neurônios localizados na porção lateral do tegmento pontobulbar. Cerca de 70% dos neurônios noradrenérgicos coeruleoespinal do gato exibem também imunorreatividade a encefalina, e 20% possuem imunorreatividade a neuropeptídeo Y. As fibras noradrenérgicas terminam preferencialmente nas camadas profundas do corno posterior, na coluna intermediolateral, na região de neurônios motores e na lâmina X, ao redor do canal central, sugerindo que essas fibras exercem uma influência direta nas sinapses convencionais de neurônios motores somáticos e autônomos, e podem modular a atividade dos neurônios do corno posterior através de sinapses não convencionais [14,26,27] . O significado clínico da inervação noradrenérgica é indicado pelo achado de que

a ativação de receptores alfa-2-adrenérgicos no corno dorsal induz analgesia em humanos e animais experimentais.

A influência dopaminérgica direta vinda das vias diencefaloespinais chega principalmente na coluna intermediolateral e, menos abundantemente, na lâmina superficial do corno dorsal e lâmina X [14, 32]. Acredita-se também que parte dos estímulos dopaminérgicos provêm de aferentes periféricos primários.

Existem evidências de vias aferentes catecolaminérgicas do tronco encefálico para a medula espinal que utilizam adrenalina como neurotransmissor, terminando preferencialmente na coluna intermediolateral, na lâmina superficial do corno posterior, na substância cinzenta intermédia e na lâmina X. Estes estímulos podem influenciar diretamente nos neurônios motores autônomos colinérgicos e contribuir para a modulação do processamento nociceptivo na medula espinal.

A inervação serotonérgica da medula espinal vem principalmente dos núcleos pálido, magno e obscuro da rafe, com a maioria das fibras descendo pelo funículo lateral e terminando nas lâminas I e II, na coluna intermediolateral e na região dos neurônios motores primários [32]. A densa inervação serotonérgica pericelular nos neurônios motores primários sugere um importante papel da serotonina (5-HT) no controle das funções motoras, especialmente reflexos e atividade locomotora. Ao mesmo tempo que a inervação serotonérgica das lâminas superficiais do corno posterior favorece a idéia do envolvimento da 5-HT no processamento da informação sensorial, particularmente nocicepção [14]. A ativação de receptores 5-HT produz eventos fisiológicos múltiplos, uma vez que famílias de receptores 5-HT ativam ou inibem sistemas de segundos mensageiros [26,27].

Glutamato e o aspartato são os dois principais transmissores excitatórios do sistema nervoso central que possuem importância na organização funcional da medula espinal. Glutamato foi detectado nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, onde é co-localizado com substância P (SP), e nas fibras aferentes terminando na lâmina superficial do corno posterior, mais especificamente na substância gelatinosa e nos terminais gliais na coluna de Clarke. Estudos revelaram imunorreatividade ao glutamato e ao aspartato nas lâminas I a III [14, 33].

Acredita-se que a glicina seja o maior transmissor inibitório na medula espinal, com evidências que as células de Renshaw são glicinérgicas. Estas células se projetam principalmente para neurônios motores α, mas também para interneurônios 1a, que inibem neurônios motores, e outras células de Renshaw. Recentes estudos mostram projeções glicinérgicas da região ventromedial do tronco encefálico para os neurônios motores. Em humanos, a glicina é encontrada no corno anterior [14,34].

O ácido γ- aminobutírico (GABA) também é um importante transmissor inibitório, bastante associado a inibição pré-sinaptica na medula espinal. Estudos imunohistoquímicos com anticorpos contra GABA ou contra sua enzima sintetizadora ácido glutâmico descarboxilase (GAD) revelaram presença de células GABAérgicas em todas as regiões da medula espinal exceto na lâmina IX, sugerindo a natureza multifuncional desses neurônios. Existem também fibras GABAérgicas que chegam da região ventromedial do tronco-encefálico e fazem sinapse com os neurônios motores, caracterizando um poderoso efeito inibitório desses neurônios, antagonicamente à facilitação bulboespinal serotonérgica [14,35,36].

Uma ampla variedade de neuropeptídeos estão presentes em toda medula espinal. A lista inclui SP, somatostatina (SS), ENK, colecistoquinina (CCK), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), neuropeptídeo Y (NPY), ocitocina, peptídeos opióides e outros [25,26,27].

Dentre eles encontramos fibras imunorreativas a SP em todas as lâminas da medula espinal, sendo particularmente abundante na lâmina I e porção interna da lâmina II. Devido a sua presença marcante no corno posterior, atribui-se um importante papel à SP na transmissão e/ou modulação da informação nociva (dor). Nessas regiões também existe encefalina (ENK), sugerindo que estes neurônios podem liberar um ou outro peptídeo dependendo de suas condições fisiológicas. Acredita-se ainda que a SP esteja envolvida na modulação dos neurônios motores autonômicos e somáticos [14,37].

A medula espinal é um dos maiores locais de ação dos peptídeos opióides. As encefalinas encontram-se mais densamente concentradas na região externa da lâmina II, e em menor quantidade nas lâminas IV, VII e VIII. A lâmina X e a coluna intermédiolateral também recebem uma densa inervação

ENK. Algumas fibras positivas a ENK também estão presentes na lâmina IX, relacionando-se com neurônios motores.

Com uma distribuição parecida com a da SP, a CCK está presente em todas as lâminas da medula espinal, com uma maior inervação das lâminas VII e VIII, o que nos dá indicação de modulação de neurônios específicos dessa região, incluindo interneurônios, neurônios proprioespinais e neurônios de grande projeção envolvidos no controle da musculatura axial.

Peptídeos relacionados ao gene calcitonina (CGRP) são encontrados nas lâminas I a IV do corno posterior, lâmina X, coluna intermediolateral da medula espinal e no núcleo parassimpático sacral, sendo mais abundante nas lâminas I e II e muito escassos no corno anterior [38].

Também presente em todas as lâminas da medula espinal, destacamos o neuropeptídeo Y, estando mais densamente concentrado na lâmina I, zona externa da lâmina II e na coluna intermediolateral, assim como em fibras noradrenérgicas descendentes do tronco encefálico. Encontrada em áreas mais restritas, fibras imunorreativas a somatostatina estão nas três lâminas superficiais do corno posterior, lâmina X e núcleo autônomo sacral, formando um retículo longitudinal na zona interna da lâmina II [14,38].

1.3 HABILIDADES MOTOTRAS E PLASTICIDADE DA MEDULA ESPINAL

Habilidade motora pode ser descrita como um comportamento adaptativo adquirido com a prática, ou seja, essas habilidades são resultados de uma série de modificações no sistema nervoso central que ocorrem com o treinamento.

As pesquisas que buscam compreender os mecanismos da plasticidade focalizam modelos simples como, por exemplo, a adaptação ao reflexo vestíbulo-ocular ou o condicionamento de piscar dos olhos [39,40]. Por esta visão, a medula espinal parece ter vantagens, na medida em que apresenta uma circuito neuronal relativamente simples e acessível, responsável por uma série de comportamentos simples e que o curso de sua aquisição pode ser estudado de forma isolada. Porém, apesar dessas importantes vantagens a medula espinal recebeu pouca atenção na exploração da aquisição de habilidades [41].

Inicialmente pensava-se que essas modificações eram restritas a locais determinados no SNC, especialmente regiões supra-espinais como córtex e cerebelo. Por um longo período, a medula espinal foi considerada um grande e bem protegido nervo [11,12]. No século XIX, a medula foi reconhecida como uma estação de passagem entre o cérebro e a periferia, além de ponto de partida de alguns reflexos simples. No século XX, ela foi assumida como responsável por uma série de comportamentos estereotipados como a locomoção.

No entanto, já existem evidências que a medula espinal possui a capacidade de se reorganizar e modificar suas funções para se adaptar a mudanças internas e externas, através de alterações neuro-anatômicas, neuro-químicas e funcionais, com indícios que este processo envolve mecanismos atividade-dependente que podem melhorar a recuperação da marcha na ausência de estímulos supra-espinais [42].

Estudos demonstraram a presença de neurogênese na medula espinal adulta, mas eles sugeriram que a neurogênese não ocorre espontaneamente, ou seja, precisa de um fator estimulador. Experimentos com gatos espinais usando treinamento locomotor crônico sugere que a habilidade para aprender e o sucesso da performance da tarefa motora é dependente da prática repetitiva e parece ser específico para a tarefa testada [3,4,43].

A plasticidade da medula espinal subjacente à recuperação induzida pela atividade física depende claramente do padrão de atividade aferente, eferente e interneuronal que ocorre durante o treinamento. Parece ser apropriado um nível mínimo de entrada sensorial a um determinado tempo [44]. A importância da entrada sensorial é evidente em pintos com hemissecção da medula espinal, em que o treinamento para andar é muito mais efetivo do que o treinamento para nadar, mesmo os comportamentos sendo muito similares [45,46]. A diferença é atribuída à entrada sensorial fásica que ocorre durante a marcha – a entrada produzida pelo contato da pata e a excitação de receptores proprioceptivos e cutâneos associados. Quando entrada sensorial comparável é fornecida durante treinamento de nadar, o desempenho melhora acentuadamente. Estimulação elétrica funcional, sensorial e motora, pode também contribuir para a plasticidade da medula espinal e alteração periférica, e pode desta forma melhorar o desempenho [47,48,49].

Edgerton et al [42] ressaltam que os mecanismos intrínsecos da plasticidade relacionada ao aumento de treinamento locomotor não são bem entendidos, mas está claro que o estado fisiológico da medula pode ser afetado por processos atividade-dependentes, que podem influenciar a habilidade para o aprendizado e o desempenho específico do comportamento motor.

Como em outras regiões do SNC, a plasticidade na medula espinal envolve tanto mecanismos sinápticos como neuronais, por exemplo, a potenciação de longo prazo (LTP), que implica em modificações na morfologia neuronal e propriedades elétricas e alterações na liberação de neurotransmissores, é afetada por fatores de crescimento e está associada com ativação de genes [1,41,50,51,52,53].

A potenciação a longo prazo se refere ao fenômeno de melhora da eficácia sináptica dependente de atividade, que serve como um importante modelo dos mecanismos responsáveis pelas modificações das respostas no cérebro provocadas pela experiência. Este fenômeno foi inicialmente observado na camada de células granulares do giro denteado no hipocampo de coelhos através da estimulação elétrica repetitiva axonal no ramo perfurante [54].

Existem evidências de que a LTP é um fenômeno fisiológica e bioquimicamente de múltiplas fases, sendo categorizadas em LTP1, LTP2 e LTP3, seguindo uma ordem de persistência [55]. Todas essas formas de LTP foram observadas no hipocampo e induzidas pela estimulação elétrica de alta freqüência nos axônios pré-sinápticos, resultando num padrão de liberação de glutamato que ativa os receptores NMDA pós-sinápticos proporcionando o influxo inicial de cálcio que é essencial para a indução da LTP.

A LTP1 é induzida por protocolos mais fracos de estímulos, degrada rapidamente e independe da síntese protéica, sendo mantida pela modificação de proteínas pré-existentes através da fosforilação. A LTP2 tem uma duração intermediária, caracterizada pela síntese de novas proteínas, mas independe da transcrição de gene. Dessa forma, a tradução da proteína ocorre através de um mRNA pré-existente, gerando uma limitação no processo e deixando dúvidas quanto a possibilidade da existência dessa fase independente da LTP3. A fase mais tardia da LTP (LTP3) é definida como a mais persistente e

dependente tanto da síntese protéica quanto da transcrição de gene, resultando de um forte protocolo de indução [56].

O Egr1 foi observado como o primeiro gene a ter sua expressão aumentada no giro denteado de ratos onde foi induzida a LTP [57]. Abraham et al [58] ressaltaram que a duração da LTP no giro dentado de ratos acordados varia de acordo com o número de trens de pulso (estimulação elétrica). O Egr1 é induzido em neurônios após estimulação extracelular por substâncias tróficas e neurotransmissores, dentre eles o glutamato, bem como seus agonistas específicos, que ativam diversas classes de receptores de glutamato, como kainato, NMDA e AMPA. Beckmann et al [59] destacaram o aumento da atividade do Egr1 no córtex cerebral e hipocampo de ratos ao realizar a administração de NMDA e kainato. No entanto, um pré-tratamento com um antagonista do receptor NMDA (MK-801) não afetou a expressão dos genes imediatos (incluindo Egr1) no sistema límbico, sugerindo que a interação de Egr1 com os receptores de glutamato dependerá da região do sistema nervoso central observada [60]. Knapska e Kaczmarek [61] ressaltaram que a LTP difere quanto a sua localização, paradigmas de estimulação e propriedades farmacológicas.

Wisden et al [62] demonstraram que os genes imediatos podem ser diferentemente ativados no SNC e realizaram estimulação elétrica em fibras sensoriais, resultando em aumento da expressão de Egr1 nos neurônios da medula espinal, enquanto o bloqueio do receptor NMDA não teve efeito sobre os genes imediatos. Liang e Jones [63] observaram a presença de LTP na medula espinal através da expressão do gene Egr1 ao ser submetida a estimulação elétrica, sugerindo a existência de plasticidade sináptica nessa região. No entanto, a caracterização dessas modificações sinápticas na medula e a sua possível relação com a LTP ainda não está clara, além da inexistência de estudos medulares funcionais com este objetivo.

A locomoção em mamíferos é controlada por redes de neurônios espinais constituindo o gerador central de padrão (CPG), e pode ser iniciada por vias que se originam no tronco encefálico e descem para a medula espinal. A região locomotora mesencefálica (MLR) e o hipotálamo lateral projetam neurônios retículo-espinais através da medula espinal para ativar o CPG locomotor (figura 2). Uma variedade neuroquímica, incluindo NMDA,

noradrenalina, 5-HT, dopamina e agonistas colinérgicos podem desencadear atividade rítmica com um padrão semelhante ao locomotor, nos dando informações sobre o fenótipo transmissor dessas vias descendentes locomotoras. Estudos com estimulação elétrica da MLR, a locomoção fictícia das patas traseiras de ratos foram bloqueadas pela infusão de antagonista para receptor NMDA na região lombar da medula espinal . A estimulação de MLR produz potencial de ação pós-sináptico em motoneurônios por meio de vias mielinizadas, através de interneurônios espinais produzindo potenciais de comando locomotor [64].

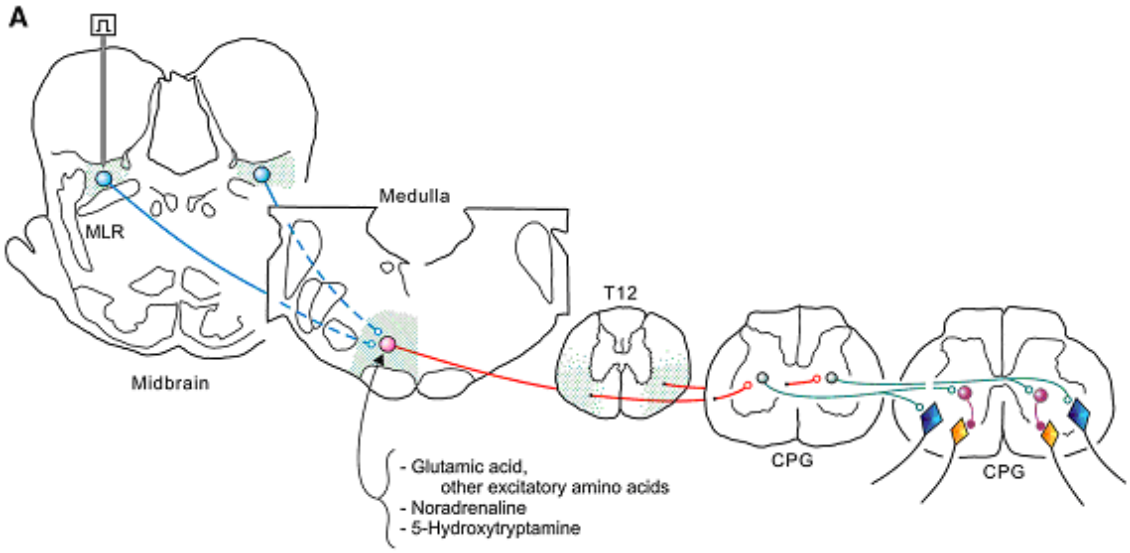


Figura 2 – Diagrama esquemático mostrando as áreas locomotoras e vias do tronco encefálico e níveis da medula, onde os círculos azuis representam neurônios da MLR e os círculos vermelos representam neurônios retículo-espinais das vias locomotoras. Os neurotransmissores que podem estar presentes nas vias estão indicados. A nível espinal, células excitatórias (verde) e inibitórias (roxo) representam neurônios do CPG. Os motoneurônios são mostrados nas cores azul e laranja [64].

O papel de neurotransmissores na neuroplasticidade espinal pode ser evidenciado por estudos farmacológicos. Na medula espinal de roedor neonatal, a locomoção pode ser ativada por aplicação de diferentes neurotransmissores, tais como agonista glutamatérgico (NMDA), 5-HT, ou dopamina, resultando em uma saída motora rítmica [65,66,67]. Estes padrões

lembram de perto a ativação dos músculos dos membros posteriores durante a locomoção no rato adulto intacto [68].

Estes dados mostraram um papel significante para estes sistemas de neurotransmissores em facilitar a atividade locomotora e assim sugere que estes agentes podem ser úteis para induzir a locomoção em animais espinais. De fato, o agonista alfa-2-noradrenérgico clonidina induz o andar precoce (dentro de uma semana pós-injúria) em gatos espinais adultos não treinados [69]. O agonista glutamatérgico NMDA tem um efeito positivo dramático sobre a locomoção em estágios tardios (meses após a injúria) em gatos espinais crônicos. Este efeito é bloqueado pelo antagonista de NMDA Ap5 [70], o que demonstra que a ativação de receptores NMDA pode desempenhar um papel na facilitação da deambulação [71]. A administração de 5-HT, seu precursor 5-hidroxitriptófano (5-HTP), ou os agonistas de 5-HT quipazina e m-clorofenilpiperazina (m-CPP), são também eficazes em promover locomoção em gatos espinais [72,73] e ratos [74], mesmo considerando-se que os axônios serotoninérgicos são eliminados por uma secção espinal completa.

Uma lesão completa da medula espinal, seguida de treinamento para andar ou ficar de pé, pode mudar significantemente o estado fisiológico e bioquímico dos múltiplos sistemas de neurotransmissores-neuromoduladores, desta forma alterando as propriedades farmacológicas das vias sensório-motoras que geram locomoção e postura [75]. Dados farmacológicos e bioquímicos mostram que alterações adaptativas relacionadas a tarefas específicas ocorrem nos circuitos neuronais de gatos espinais treinados para ficar de pé ou andar [44,53,75,76].

Outro neurotransmissor envolvido diretamente na transmissão inibitória sináptica na medula espinal é o óxido nítrico (NO). Acredita-se que o NO aumenta a inibição glicinérgica, enquanto aumenta simultaneamente potenciais inibitórios GABAérgicos, além de ter efeito nas propriedades das membranas neurais, podendo essas funções serem resultados de influências metamodulatórias de sistemas descendentes aminérgicos [77]. Existem evidências que o NO está envolvido em diversas funções espinais. Estes efeitos incluem a regulação das funções cardiovascular e a mediação da nocicepção. O NO é sintetizado pela óxido nítrico sintetase (NOS) em regiões pré e pós-sinápticas. Isto aumenta a produção do segundo mensageiro cGMP

por ativar a guanilil ciclase solúvel que está frequentemente localizada em células adjacentes [78]. A NOS também possui a capacidade de redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato (NADPH), que é usada no método de detecção histoquímica das estruturas produtoras de NO neuronal. A NOS neuronal (nNOS) foi previamente encontrada no corno dorsal da medula espinal e nos neurônios simpáticos pré-ganglionares [79,80].

Evidências sugerem que a produção de NO pode ser regulada pela SP, proveniente das fibras aferentes sensoriais e descendentes supra-espinais [81].. A SP é um neuropeptídeo que atua como estimulante da liberação de interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator neurotrófico. No SNC, participa de várias respostas comportamentais e na regulação da sobrevivência neuronal e degeneração, bem como regulando as funções cardiovascular e respiratória. Na medula espinal, a SP participa da neurotransmissão da dor e estímulos nociceptivos, modulando também reflexos autonômicos [82,83]. Apresenta-se intensamente nas lâminas I e zona externa da lâmina II. Nas demais lâminas do corno dorsal e ventral apresenta imunorreatividade dispersa. É interessante que nem toda imunorreatividade a SP nas lâminas superficiais do corno dorsal é de origem sensorial. Muitos sistemas descendentes contendo SP vão do tronco encefálico para o corno ventral, e alguns podem terminar nas lâminas superficiais do corno dorsal [84,85].

A relação da SP com a locomoção foi estabelecida através da aplicação de SP em segmentos lombossacrais da medula espinal de ratos recém-nascidos. Durante a locomoção fictícia, a SP aumenta tanto a freqüência quanto a duração das salvas de atividade neuronal, estabelecendo um ritmo para a locomoção [86].

A SP também vem sendo associada a potenciação de longo-prazo (LTP) no corno dorsal da medula espinal. A ativação de receptores de SP parece ser necessária para a indução de LTP no corno dorsal através da estimulação de fibras C, representando, possivelmente, mecanismos de sensibilização central e hiperalgesia [50,87]. Segundo Ikeda et al [88], a LTP nos neurônios da lâmina I requer um aumento do Ca^{2+} nos neurônios pós-sinápticos durante a estimulação de alta freqüência pela ativação dos receptores de neurokinina 1, receptores NMDA e canais de cálcio voltagem-dependentes, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares.

Ainda são poucos os estudos em torno das alterações da SP no corno dorsal da medula espinal durante o treinamento locomotor e a possibilidade de associação com a LTP. Considerando as diversas funções dos neuropeptídeos na plasticidade neural, torna-se necessário observar suas alterações em diversas situações a que o organismo pode ser exposto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo mensurar a neuroplasticidade da medula espinal, relacionada ao treinamento locomotor realizado em protocolos diferenciados, através da observação das mudanças morfológicas medulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a expressão imuno-histoquímica de SP, NMDA e Egr1 em ratos sedentários, e em grupos de ratos que realizaram protocolos diferenciados de atividade locomotora.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUJEITOS

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos, com 35-40 dias de idade, provenientes de colônia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Foi utilizado o mínimo possível de espécimes, sem comprometimento da validade dos resultados, considerando-se a variabilidade esperada nas respostas biológicas em mamíferos, os testes estatísticos a serem utilizados e o nível de significância estabelecido. Além disso, foram tomados todos os cuidados no sentido de evitar dor e sofrimento aos animais durante os procedimentos experimentais, seguindo as normas estabelecidas pelo National Research Council of the National Academy, publicadas no livro "Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research". Uma versão em formato pdf está disponível gratuitamente no site da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) – http://www.sbnec.gov.br/links (http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/chaps.html). O estudo foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, parecer nº 042/2008.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram colocados em gaiolas, com água e ração disponíveis continuamente, e mantidos em ciclo claro-escuro ambiental em sala com temperatura controlada. Dos 28 animais, três foram utilizados para o ajustamento dos protocolos imunohistoquímicos. Após 3 dias para adaptação, os animais foram distribuídos nos grupos controle (C, n=6), exercício físico 1 (EF1, n=6), exercício físico 3 (EF3, n=7) e exercício físico 7 (EF7, n=6).

Os animais do grupo controle (C) foram colocados durante três dias em uma roda de atividade (fabricada em aço inoxidável, acrílico e borracha antiderrapante, com diâmetro de 30 cm e largura 12 cm, motorizada – Figura 3), travada, por 30 min, ou seja, não realizaram atividade física. Os demais animais foram distribuídos em três grupos experimentais que realizaram treinamento locomotor. Durante três dias estes animais permaneceram 30 min

na roda travada, com o objetivo de adaptação do animal ao ambiente experimental.

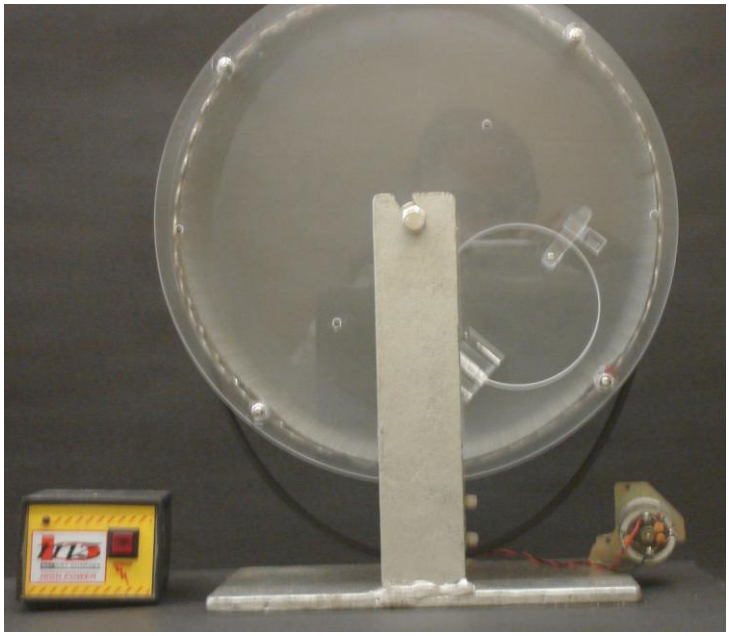


Figura 3 – Roda de atividade motorizada.

O grupo EF1 realizou corrida na roda de atividade por 30 min, durante 1 dia. O grupo EF3 realizou corrida na roda de atividade por 30 min/dia, durante 3 dias. E os animais do grupo EF7 correram por 30 min/dia, durante sete dias. Todos os animais correram a uma velocidade imposta pela roda de atividade, mas que pôde ser influenciada pelo desempenho de cada sujeito experimental. A velocidade inicial foi 9,4 m/min (média), de acordo com a maioria dos estudos sobre treinamento locomotor. A progressão da velocidade ocorreu de forma aleatória de acordo com o aprendizado motor do animal.

Figura 4 – Contador manual.

Para o registro fidedigno da velocidade desenvolvida por cada animal, as rotações foram contadas através de um contador manual (figura 4). Posteriormente foi calculada a distância percorrida [DP= nº de voltas x perímetro da roda (2πR, onde o Raio é de 0,15m)] e a velocidade real de cada treino (DP/30 min, dada em m/min). Ao ser verificada a homogeneidade da amostra, foi calculada a velocidade média de cada rato, a média dessas velocidades por grupo estudado (VM) e a média da massa (MM), dados que estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 – Resumo dos dados referentes aos grupos experimentais, destacando a média de massa (MM) e a velocidade média (VM) de cada grupo.

GRUPO	N	MM (g)	VM (m/min)
Controle	5*	84,69	0
EF1	5*	90,55	9,27
EF3	7	96,27	12,83
EF7	6	107,03	15,52
TOTAL	23	289,10	37,62

* 1 animal do grupo controle e 1 animal do grupo EF1 foram perdidos por complicações na perfusão.

3.3 PERFUSÃO

Ao final dos procedimentos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados por via intramuscular com uma mistura de cloridrato de ketamina (0,1ml/100g) e xilazina (0,01 ml/100g) e submetidos à perfusão transcardíaca, de acordo com a técnica descrita a seguir: Certificada a anestesia, pela constatação da ausência de reflexos musculares e corneanos, os animais são posicionados em decúbito dorsal, tendo os membros imobilizados. Faz-se uma incisão a partir do processo xifóide para os lados contornando o gradil costal, depois ampliando-se de cada lado para cima, na direção da cabeça do úmero. Em seguida desinsere-se o diafragma, de

modo a expor completamente o coração na cavidade torácica. Insere-se uma agulha ligada através de um cateter a uma bomba peristáltica (Cole-Parmer) no ápice do ventrículo esquerdo, em direção à artéria aorta ascendente. Em seguida, faz-se uma pequena incisão no átrio direito e liga-se a bomba. Por este procedimento, são impulsionados 300 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000ml de solução salina) durante aproximadamente 05 minutos. Em seguida, são bombeados 700ml de solução fixadora à base de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, passando-se metade desta solução a um fluxo de 6,0 ml por minuto e a outra metade a 3,0 ml por minuto. Todo o procedimento dura, no total, em torno de 30 minutos.

3.4 MICROTOMIA E PROCESSAMENTO DO TECIDO

Após a perfusão, as medulas espinais foram cuidadosamente removidas do canal vertebral e fotografadas. A seguir as medulas foram seccionadas ao nível da 9º costela, originando 2 blocos – o primeiro composto pelas regiões cervical e torácica, e o segundo, e que representa o interesse deste estudo, composto pela região lombossacral (figura 5), os quais foram acondicionados em frascos contendo sacarose 30% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4) por 24 a 72 horas, que antecedem a microtomia. Neste trabalho estudamos a região lombar da medula espinal.

Para a microtomia, o bloco da região lombossacral foi envolvido em meio para congelamento de tecido (Leica Instruments, Heidelberger), congelado por gelo seco e seccionados no plano coronal a 40 μm de espessura em um micrótomo horizontal de deslizamento. As secções obtidas foram recolhidas em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e armazenadas nesta solução divididas em sete compartimentos para serem submetidas aos procedimentos imunohistoquímicos.

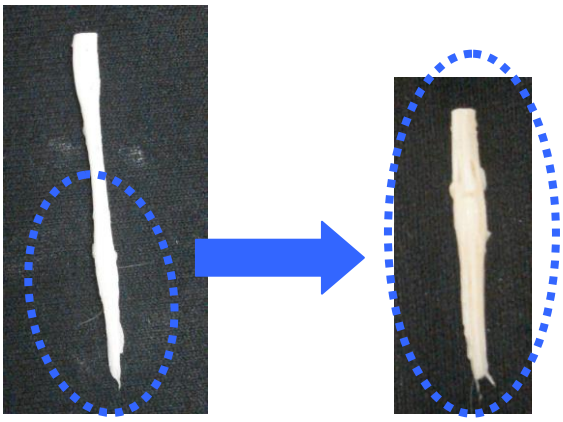


Figura 5 – Fotografia da medula espinal completa do rato, do lado esquerdo. Medula lombossacral seccionada e ampliada, do lado direito.

Secções alternadas compondo uma série de cada região medular (compartimento 1) foram montadas em lâminas de vidro e coradas através da técnica de Nissl, usando o corante thionina, segundo o protocolo descrito a seguir:

Os cortes montados foram desidratados e diafanizados, passando por uma bateria de álcoois de graduação crescente – 70%, 95% (2) 100% (2), seguido de xilol (2). Em seguida foram rehidratados passando pela mesma bateria em sentido inverso, acrescentando-se álcool 50% e água destilada. Os cortes foram mergulhados por 20 segundos no corante thionina, depois lavados rapidamente em água destilada e levados à desidratação passando por uma nova bateria de álcoois de graduação crescente – 50%, 70%, 95% (2), 95%+ácido acético, 10% (3) e por último xilol (2). Por último foram montadas as lamínulas sobre os cortes.

As demais séries foram submetidas a imuno-histoquímica para identificar as seguintes substâncias neuroativas em corpos celulares ou terminais: receptor NMDA (sub-unidade R1), SP e Egr1 (Tabela 2).

Foram utilizados os anticorpos contra cada uma das substâncias, utilizando-se o protocolo ABC, conforme descrição a seguir:

1. Os cortes foram submetidos a três (3) lavagens, durante 5 minutos em solução de leite desnatado e tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (50 g/1000 ml), em agitador orbital.

2. As secções foram colocadas em contato com o soro normal do animal em que foi obtido o anticorpo secundário 2% diluído em Triton X-100 (Sigma Company – USA) a 0,4%, durante 1h.

3. Após a retirada do soro normal, os cortes foram incubados em anticorpo primário diluído em Triton X-100 (Sigma Company – USA) a 0,4%, durante 18 a 24 horas, à temperatura ambiente, em rotor. A diluição do anticorpo primário foi específica para cada um deles.

4. Logo após seguem-se 3 lavagens em solução de leite desnatado e tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (50g/1l), de 5 minutos cada.

5. Em seguida, os cortes entram em contato com a solução contendo o anticorpo secundário diluído (1:200 a 1:1000) em Triton X-100 (Sigma Company – USA) a 0,4%, durante 120 minutos, à temperatura ambiente, em rotor.

6. Ao final deste período, segue-se novamente 3 lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, de 5 minutos cada.

7. As secções serão coradas colocadas em contato com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC elite – Vector Labs., Burlingame, CA, USA) a uma diluição 1:100 em Triton X-100 (Sigma Company – USA) a 0,4% contendo NaCl. Os cortes ficam nesta solução durante 120 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação lenta em rotor.

8. Segue-se ao fim deste período, 3 lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 ,de 5 minutos cada.

9. Segue-se a reação final colocando-se os cortes em um meio contendo H_2O_2 a 0,03% como substrato para a peroxidase e a 3,3', 4,4'-tetrahidrocloreto-diaminobenzidina (DAB – Sigma Company, St Louis, MO, USA), como cromógeno.

10. Logo após, seguem-se novamente 3 lavagens, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, de 5 minutos cada.

11. Os cortes foram montados em lâmina de vidro previamente gelatinizadas e postas a secar à temperatura ambiente.

12. Após a secagem, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em solução de tetróxido de ósmio a 0,05% para intensificação da reação, seguindo-se a desidratação e diafanização dos cortes, seguindo-se a

montagem das lamínulas, ficando as lâminas prontas para serem examinadas ao microscópio óptico.

Tabela 2 – Especificações técnicas das substâncias utilizadas na imunohistoquímica.

Antígeno	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Soro normal
Egr1	Anti-Egr1 obtido em coelho [1:100], Santa Cruz Biotechnology, USA	Anti-coelho obtido em cabra [1:1000] Jackson Labs, Westgrove, PA, USA	Cabra [1:50]
SP	Anti-SP obtido em cobaia [1:1000] – Península Labs – USA	Anti-cobaia obtido em cabra [1:1000] Jackson Labs, Westgrove, PA, USA	Cabra [1:50]
NMDA	Anti- receptor NMDA obtido em coelho, [1:200] Proteimax, Brasil	Anti-coelho obtido em cabra [1:1000] Jackson Labs, Westgrove, PA, USA	Cabra [1:50]

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

As secções montadas em lâminas foram analisadas através de microscópio óptico (Olympus BX41) em campo claro. As imagens digitais foram obtidas através do acoplamento de uma câmera de vídeo ao microscópio e conectada a um computador e foram utilizadas para a documentação dos resultados.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neurônios imunorreativos foram contados e expressão imuno-histoquímica em terminais foi mensurada por contagem de pixels, usando o programa Abobe Photoshop. Os corpos celulares imunorreativos foram quantificados através do software Neurolucida. Após testada a homogeneidade dos dados, foram obtidos os valores médios de cada grupo e submetidos ao teste de análise de variância ANOVA *One Way*. A análise dos dados foi

realizada através do programa SPSS 15.0 (*Statistical Package for the Social Science*) atribuindo-se o nível de significância de 5%.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Wolpaw JR, Tennissen AM. Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. Annu Rev Neurosci 2001; 24:807-43.

2. Lapointe NP, Ung R-V, Guertin PA. Plasticity in sublesionally located neurons following spinal cord injury. J Neurophysiol 2007; 98:2497-500.

3. De Leon RD, Hodgson JA, Roy RR, Edgerton VR. Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats. J Neurophysiol 1998; 79:1329–40.

4. De Leon RD, Hodgson JA, Roy RR, Edgerton VR. Full weight-bearing hindlimb standing following stand training in the adult spinal cat. J Neurophysiol 1998; 80:83–91.

5. Roy RR, Talmadge RJ, Hodgson JA, Zhong H, Baldwin KM, Edgerton VR. Training effects on soleus of cats spinal cord transected (T12-13) as adults. Muscle Nerve 1998; 21:63-71.

6. Roy RR, Monke SR, Allen DL, Edgerton VR. Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. J Appl Physiol 1999; 87:634-642.

7. De Leon RD, Hodgson JA, Roy RR, Edgerton VR. Retention of hindlimb stepping ability in adult spinal cats after the cessation of step training. J Neurophysiol 1999; 81:85-94.

8. Edgerton VR, de Leon RG, Tillakaratne N, Recktenwald MR, Hodgson JA, Roy RR. Use-dependent plasticity in spinal stepping and standing. Adv. Neurol. 1997; 72:233–47.

9. Werner C, Von Frankenberg S, Treig T, Konrad M, Hesse S. Treadmill training with partial body weight support and an electromechanical gait trainer for restoration of gait in subacute stroke patients. Stroke 2002; 33:2895-901.

10. Neuburger M. Experiments on the reflex mechanism. In: Neuberger M, Clarke E, editors. The Historical Development of Experimental Brain and Spinal Cord Physiology before Flourens. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press; 1981. pp. 237–46.

11. Clarke E, Jacyna LS. Nineteenth-Century Origins of Neuroscientific Concepts. Berkeley: Univ Calif Press; 1987. pp.287- 99.

12. Clarke E, O'Malley CD. The Human Brain and Spinal Cord. San Francisco: Norman; 1996.

*Referências obedecendo às Normas de Vancouver, exigência do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia.

13. Carpenter MB. Core text of neuroanatomy. International edition: Williams & Wilkins; 1991.pp.65-75.

14. Parent A. Carpenter's Human Neuroanatomy. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. pp. 125-137.

15. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. J Comp Neurol 1952; 96:415-96.

16. Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. J Comp Neurol 1954; 100:297-400.

17. Grant G, Robertson B, Koerber HR, Ribeiro-da-Silva A, Tracey D. Peripheral nervous system ans spinal cord. In Paxinos G, editor. The rat Nervous System. Elsevier. San Diego. California; 2004. pp.112-154.

18. Zhang ET, Han ZC, Craig AD. Morphological classes of Spinothalamic lamina I neurons in the cat. J Comp Neurol 1996; 367, 537-49.

19. Woodbury CJ, Ritter AM, Koerker HR. On the problem of lamination in the superficial dorsal horn of mammals: a reappraisal of the substantia gelatinosa in postnatal life. J Comp Neurol 2000; 417, 88-102.

20. Light AR, Willcockson HH. Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo whole cell, tight seal configuration: Properties and opioid responses. J Neurophysiol 1999; 82. 3316-26.

21. Scheibel ME, Scheibel AB. Terminal axon patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. Brain Res 1968; 9:32-58.

22. Mannen H. Reconstruction of axonal trajectory of individual neurons in the spinal cord using Golgi-stained serial sections.J Comp Neurol 1975; 159:357-74.

23. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier. San Diego. Califórnia; 2007.

24. Sato H, Ohkawa T, Uchino Y, Wilson V. Excitatory connections between neurons of the central cervical nucleus and vestibular neurons in the cat. Exp Brain Res 1997; 115, 381-86.

25. Todd AJ, Spike RC. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. Prog Neurobiol 1993; 41:609-45.

26. Coggeshall RE, Carlton SM. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. Brain Res Rev 1997; 24:28-66.

27. Budai D. Neurotransmitters and receptors in the dorsal horn of the spinal cord. Acta Biol 2000; 44:21-38.

28. Aquilonius SA, Eckerman SA, Gillberg PG. Topographic localization of choline acetyltransferase within the human spinal cord and a comparison with some other species. Brain Res 1981; 211:329-40.

29. Kása P. The cholinergic systems in brain and spinal cord. Prog Neurobiol 1986; 26:211-72.

30. Woolf NJ. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. Prog Neurobiol 1991; 37:475-524.

31. Pan HL, Chen SR, Eisenach JC. Intrathecal clonidine alleviates allodynia in neurophatic rats: Interactions with spinal muscarinic and nicotinic receptors. Anesthesiol 1999; 90:509-14.

32. Lindvall O, Björklund A. Dopamine and norepinephrine-containing neuron systems: Their anatomy in the rat brain. In: Emson PC ed. Chemical Neuroanatomy. New York: Raven Press;1983. pp. 229-56.

33. Urban L, Thompson SW, Dray A. Modulation of spinal excitability: Cooperation between neurokinin and excitatory amino acido neurotransmitters. Trends Neurosci 1994; 17:432-38.

34. Van den Pol AN, Görcs T. Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. J Neurosci 1988; 8:472-92.

35. Magoul R, Onteniente B, Geffard M. Anatomical distribution and ultrastructural organization of the GABAergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. Neuroscience 1987; 20:1001-09.

36. Todd AJ, McKenzie J. GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. Neuroscience 1989; 31:799-806.

37. Ribeiro-da-Silva A, Pioro EP, Cuello AC. Substance P- and enkephalin-like immunoreactivities are colocalized in certain neurons of the substantia gelatinosa of the rat rat spinal cord: an ultrastructural double-labeling study. J Neurosci 1991; 11:1068-80.

38. Yu LC, Zheng EM, Lundenberg T. Calcitonin gene-related peptide 8-37 inhibits the evoked discharge frequency of wide dynamic range neurons in the dorsal of the spinal cord in rats. Regul Pept 1999; 83:21-24.

39. Cohen, T.E., Kaplan, S.W., Kandel, E.R. & Hawkins, R.D. A simplified preparation for relating cellular events to behavior: mechanisms contributing to habituation, dishabituation, and sensitization of the Aplysia gill-withdrawal reflex. J Neurosci 1997; 17, 2886–99.

40. Vaynman S, Gomez-Pinilla F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. Neurorehabil Neural Repair 2005; 19, 283–95.

41. Wolpaw JR. Spinal cord plasticity in acquisition and maintenance of motor skills. Acta Physiol. 2007; 189: 155-69.

42. Edgerton VR, Tillakaratne NJK, Bidgee AJ, de Leon RG, Roy RR. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. Annu Rev Neurosci 2004; 27:145–67.

43. Lovely RG, Gregor RJ, Roy RR, Edgerton VR. Effects of training on the recovery of full-weight-bearing stepping in the adult spinal cat. Exp Neurol 1986; 92, 421–35.

44. Rossignol S, Bouyer LJG. Locomoter compensation to peripheral nerve lesions in the cat. In: Patterson MM, Grau JW, editors. Spinal Cord Plasticity: Alterations in Reflex Function. Boston: Kluwer Acad; 2001.

45. Muir GD, Steeves JD. Phasic cutaneous input facilitates locomotor recovery after spinal cord injury in the chick. J Neurophysiol 1995; 74:358-68.

46. Muir GD. Locomotor plasticity after spinal injury in the chick. J Neurotrauma 1999; 16:705-10.

47. Peckham PH, Creasey GH. Neural prostheses: clinical application of functional electrical stimulation in spinal cord injury. Paraplegia 1992; 30:96-101.

48. Muir GD, Steeves JD. Sensorimotor stimulation to improve locomotor recovery after spinal cord injury. Trends Neurosci 1997; 20:72-7.

49. Stein RB. Functional electrical stimulation after spinal cord injury. J Neurotraum 1999; 16:713-717.

50. Liu, X, Sandkuhler, J. Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. J Neurophysiol 1997; 78,1973–82.

51. Inglis FM, Zuckerman KE, Kalb RG. Experience-dependent development of spinal motor neurons. Neuron 2000; 26, 299–305.

52. Mendell LM, Munson JB, Arvanian VL. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. J Physiol 2001; 533.1, 91–7.

53. Tillakaratne NJK, De Leon RD, Hoang TX, Roy RR, Edgerton VR, Tobin AJ. Use-dependent modulation of inhibitory capacity in the feline lumbar spinal cord. J Neurosci 2002; 15:22:3130–43.

54. Lomo T. The discovery of long-term potentiation. Phil Trans R Soc Lond 2003; 358, 617-20.

55. Abraham WC, Otani S. Macromolecules and the maintenance of long-term potentiation. In: Morrell, F, editor. Kindling and Synaptic Plasticity. Birkhauser, Boston; 1991.pp.92-109.

56. Raymond CR. LTP forms 1,2 and 3: different mechanisms for the 'long' in long-term potentiation. Trends Neurosci 2007; 30 (4),167-75.

57. Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. Nature 1989; 340, 474–76.

58. Abraham WC, Mason SE, Demmer J, Williams M, Richardson CL, Tate WP, Lawlor PA, Dragunow M. Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. Neurosciene 1993; 56 (3), 717-27.

59. Beckmann AM, Davidson MS, Goodenough S, Wilce PA. Differential expression of EGR1-like DNA-binding activities in the naïve rat brain and after excitatory stimulation. J Neurochem 1997; 69, 2227-37.

60. Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M. Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: affects of NMDA receptor antagonist MK-801. Eur J Neurosci 1993; 5,933-43.

61. Knapska E, Kaczmarek L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr1/NGFI-A/Krox24/TIS8/Zenk? Prog Neurobiol 2004; 74: 183-211.

62. Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TVP, Hunt SP. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. Neuron 1990; 4 (4), 603-14.

63. Liang F, Jones EG. Developmental and stimulus-specific expression of the immediate-early gene zif268 in rat spinal cord. Brain Res 1996; 729: 246-52.

64. Jordan LM, Liu J, Redlund PB, Akay T, Pearson KG. Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. Brain Res Rev 2008; 57, 183-91.

65. Kiehn O, Kjaerullf O. Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates. Ann NY Acad Sci 1998; 860:110-29.

66. Kudo N, Nishimaru H. Reorganization of locomotor activity during development in the prenatal rat. Ann NY Acad Sci 1998; 860:306-17.

67. Schmidt BJ, Hochman S, MacLean JN. NMDA receptor mediated oscillatory properties: potential role in rhythm generation in the mammalian spinal cord. Ann NY Acad Sci 1998; 860:189-202.

68. Roy RR, Hutchison DL, Pierotti DJ, Hodgson JA, Edgerton VR. EMG patterns of rat ankle extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming. J Appl Physiol 1991; 70: 2522-29.

69. Chau C, Barbeau H, Rossignol S. Early locomotor training with clonidine in spinal cats. J Neurophysiol 1998; 79:392-409.

70. Giroux N, Chau C, Barbeau H, Reader TA, Rossignol S. Effects of intrathecal glutamatergic drugs on locomotion. II. NMDA and AP-5 in intact and late spinal cats. J Neurophysiol 2003; 90:1027-45.

71. Chau C, Giroux N, Barbeau H, Jordan L, Rossignol S. Effects of intrathecal glutamatergic drugs on locomotion I. NMDA in short-term spinal cats. J Neurophysiol 2002; 88:3032-45.

72. Barbeau H, Rossignol S. The effects of serotonergic drugs on the locomotor pattern and on cutaneous reflexes of the adult chronic spinal cat. Brain Res 1990; 514:55-67.

73. Barbeau H, Rossignol S. Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. Brain Res 1991; 546:250-260.

74. Kim D, Murray M, Simansky KJ. The serotonergic 5-HT(2C) agonist m-chlorophenylpiperazine increases weight-supported locomotion without development of tolerance in rats with spinal transections. Exp Neurol 2001; 169:496-500.

75. De Leon RD, Tamaki H, Hodgson JA, Roy RR, Edgerton VR. Hindlimb locomotor and postural training modulates glycinergic inhibition in the spinal cord of the adult cat. J Neurophysiol 1999; 82:359-369.

76. Tillakaratne NJ, Mouria M, Ziv NB, Roy RR, Edgerton VR, Tobin AJ. Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD(67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transaction. J Neurosci Res 2000; 60:219-30.

77. McLean DL, Sillar KT. Metamodulation of a spinal locomotor network by nitric oxide. J Neurosci 2004; 24:9561–71.

78. Vincent SR. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. Prog Neurobiol 1994; 42:129-160.

79. Zhang X, Verge V, Wiesenfeldhallin Z, Ju G, Bredt D, Snyder SH, Hokfelt T. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. J Comp Neurol 1993; 335, 563–75.

80. Reuss MH, Reuss S. Nitric oxide synthase neurons in the rodent spinal cord: distribution, relation to substance P fibers, and effects of dorsal rhizotomy. J Chem Neuroanat 2001; 21:181-96.

81. Aimar P, Pasti L, Carmignoto G, Merighi A. Nitric oxide-producing islet cells modulate the release of sensory neuropeptides in the rat substantia gelatinosa. J Neurosci 1998; 18, 10375–388.

82. Maggi CA. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. Regul Pept 2000; 93:53–64.

83. O'Connor TM, O'Connel J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. Journal of Cellular Physiology 2004; 201:167–180.

84. Littlewood NK, Todd AJ, Spike RC, Watt C, Shehab SAS. The types of neurons in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. Neurosci 1995; 66, 597-608.

85. Ribeiro-da-Silva A, Hokfelt T. Neuroanatomical localisation of substance P in the CNS and sensory neurons. Neuropeptides 2000; 34, 256-71.

86. Barthe JY, Clarac F. Modulation of the spinal network for locomotion by substance P in the neonatal rats. Exp Brain Res 1997; 115: 485-492.

87. Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. Synaptic plasticity in the spinal dorsal horn. Neurosci Res 2009; 64:133-136.

88. Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. Science 2003; 299: 1237-40.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO –

(A ser submetido a revista Brain Research)

EXPRESSÃO DO GENE IMEDIATO EGR1 e SP NA MEDULA ESPINAL APÓS TREINAMENTO LOCOMOTOR DE RATOS ADULTOS.

Ana Carla L. Nunes[1*], Renata B. Duarte[1], Twyla B. Sousa, Marco Aurélio M. Freire[2], Miriam Stela Maris O. Costa[1]

[1]Departamento de Morfologia/Laboratório de Neuroanatomia – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970, Natal-RN, Brasil.

[2]Instituto Internacional de Neurociências de Natal Edmond e Lily Safra (IINN-ELS)

*Correspondência: Ana Carla L. Nunes (telefone: +55 84 8872 3833 – email: aclnunes@gmail.com)

Article: 17 páginas, 4 figuras, 1 tabela.

Resumo

O Egr1 é um gene imediato cuja expressão tem se mostrado aumentada na potenciação de longo prazo (LTP), bem como na persistência desse processo no hipocampo de ratos. Na medula espinal, a expressão de Egr1 apresenta-se aumentada no corno dorsal após estimulação elétrica de alta freqüência. A SP também vem sendo associada à potenciação de longo-prazo (LTP) no corno dorsal da medula espinal. Pesquisas demonstrando a ativação desse gene na medula espinal e a sua relação com a LTP nessa região ainda são raras. Nesse trabalho buscamos associar funcionalidade com mecanismos plásticos, observando a expressão de Egr1 e SP, através de técnica imunohistoquímica, na medula lombossacral após o treinamento locomotor de ratos adultos. A expressão de Egr1 mostrou-se aumentada nas secções da medula espinal de ratos submetidos ao treinamento locomotor, com maior intensidade nas lâminas de IV a X, e nos níveis L3 – S4 ($p<0,05$). A expressão de SP em terminais mostrou-se inalterada após os protocolos aplicados. Sugerimos que o treino da locomoção ativa mecanismos semelhantes a LTP, caracterizando a plasticidade sináptica na região, e que a variação de protocolos de treinamento influencia a expressão desse gene. No entanto, este processo parece não ter influência direta da SP, caracterizando um processo de plasticidade que difere dos demais desencadeados por estímulos nociceptivos.

Scope: 5 (Sensory and Motor Systems)

Palavras chave: EGR1, potenciação de longo prazo (LTP), treinamento locomotor, medula espinal, plasticidade medular, NMDA, SP.

Abstract

Immediate early gene Egr1 has been shown to have increased expression in long term potentiation (LTP), as well as increased persistence of this process in the hippocampus of rats. Egr1 expression in the spinal cord was increased in the dorsal horn after high frequency electrical stimulation. The Substance P (SP) has also been associated with LTP in the dorsal horn of the spinal cord. Research demonstrating the activation of this gene in the spinal cord and its relationship with LTP is still scarce. This study aims to associate functionality with mechanisms of plasticity using the immunohistochemistry technique to observe Egr1 expression in the sacrolumbar spinal cord after locomotor training in adult rats. Increased Egr1 expression was found in the spinal cord sections belonging to rats submitted to locomotor training, results being more pronounced in laminae IV and X as well as in L3 – S4 levels ($p<0.05$). The SP expression in terminals was shown to be unchanged after the protocols applied. Results suggest that locomotor training activates mechanisms similar to LTP, thus characterizing the synaptic plasticity in the region, and also point to the fact that variations in training protocol influence the expression of this gene. However, this does not seem to have direct influence of SP, showing a process of plasticity that differs from the other triggered by nociceptive stimuli.

Section: 5. Sensory and motor systems
Senior Editor: James F. Baker (Chicago, IL, USA)
Associate Editors: Joan S. Baizer (Buffalo, NY, USA)

Keywords: Early growth response gene (Egr1); immediate early gene; locomotion; long-term potentiation; neural plasticity; NMDA; SP; spinal cord.

1. Introdução

O gene Egr1 (gene de resposta precoce ao crescimento 1) é membro de uma família Egr1, caracterizada pela presença de três proteínas zinc-fingers e outras proteínas DNA-ligantes, que juntas participam da regulação da expressão de genes alvo, importantes para os efeitos a longo prazo no crescimento e diferenciação celular (Sheng and Greenberg, 1990; O`Donovan et al, 1999). O Egr1 recebeu diversas denominações (zif268, NGFI-A, Krox-24, TIS8), na medida em que foi identificado em diferentes laboratórios.

Inicialmente este gene foi definido por sua rápida expressão em diferentes tecidos, como cérebro, pulmão e gânglio cervical superior, após exposição desses tecidos a NGF (fator de crescimento neural) (Milbrandt, 1987). O Egr1 é induzido em neurônios após estimulação extracelular por substâncias tróficas e neurotransmissores, dentre eles o glutamato, bem como seus agonistas específicos, que ativam diversas classes de receptores glutamatérgicos, como kainato, NMDA e AMPA. Beckmann et al (1997) destacaram o aumento da atividade do Egr1 no córtex cerebral e hipocampo de ratos após a administração de NMDA e kainato. No entanto, um pré-tratamento com um antagonista do receptor NMDA (MK-801) não afetou a expressão dos genes imediatos (incluindo Egr1) no sistema límbico, sugerindo que a interação de Egr1 com os receptores de glutamato depende da região do sistema nervoso central observada (Gass et al, 1993).

Devido a essa interação entre Egr1 e os fatores de transcrição desencadeando a expressão de genes de resposta tardia, deve-se considerar um importante papel funcional deste gene no contexto da plasticidade e do aprendizado (Kaczmarek, 2000).

A expressão de Egr1 apresentou-se aumentada após indução da potenciação de longo prazo (LTP) no giro denteado de ratos, superando a expressão dos demais genes imediatos pesquisados, c-Fos, c-jun e jun-B (Cole et al, 1989). A LTP originalmente foi induzida na camada de células granulares do giro denteado no hipocampo de coelhos através da estimulação elétrica repetitiva axonal no ramo perfurante, e se trata de uma melhora da eficácia sináptica (Lomo, 2003). Existem evidências que a LTP é um fenômeno que envolve múltiplas fases fisiológicas e bioquímicas, sendo categorizadas em LTP1, LTP2 e LTP3, seguindo uma ordem de persistência (Abraham and Otani, 1991).

Abraham et al (1993) observaram uma correlação positiva entre a expressão de Egr1 e a estabilização ou manutenção da LTP no giro denteado de ratos, ao modificar o fornecimento de trens de pulso elétrico.

Na medula espinal, a estimulação de fibras sensoriais resultou no aumento do mRNA de Egr1 (Wisden et al, 1990). Liang e Jones (1996) aplicaram estimulação elétrica de alta freqüência nos nervos ulnar e mediano de ratos anestesiados, semelhante a estimulação utilizada para induzir LTP, e observaram um aumento na expressão de Egr1 no corno dorsal, ressaltando a possível atuação desse gene na plasticidade da medula espinal.

As aferências sensoriais chegam ao corno dorsal da medula espinal trazendo as informações periféricas. A substância P (SP) é a mais abundante taquicinina presente na medula espinal dos mamíferos, apresentando-se intensamente na lâmina I e zona externa da lâmina II. Nas demais lâminas do corno dorsal e ventral apresenta imunorreatividade dispersa. É interessante que nem toda imunorreatividade a SP nas lâminas superficiais do corno dorsal é de origem sensorial. Muitos sistemas descendentes contendo SP vão do tronco encefálico para o corno ventral, e alguns podem terminar nas lâminas superficiais do corno dorsal (Littlewood et al, 1995, Ribeiro-da-Silva e Hokfelt, 2000).

A SP também vem sendo associada a potenciação de longo-prazo (LTP) no corno dorsal da medula espinal. A ativação de receptores de SP parece ser necessária para a indução de LTP no corno dorsal através da estimulação de fibras C, representando, possivelmente, mecanismos de sensibilização central e hiperalgesia (Ikeda, Kiritoshi, Murase, 2009, Liu, Sandkuhler, 1997).

A plasticidade da medula espinal vem sendo bastante estudada devido a sua importância na aquisição de habilidades motoras e, ao mesmo tempo, a facilidade de estudar o comportamento de forma isolada. No entanto, estudos relatando LTP na medula espinal ainda são escassos. É importante a pesquisa do gene Egr1 nessa região devido a sua relação com a LTP e aprendizado. Considerando que a medula espinal é uma região imprescindível para o aprendizado de uma série de habilidades motoras, torna-se interessante buscar a relação da plasticidade sináptica com comportamentos específicos, como a locomoção.

A interação do CPG, vias descendentes supra-espinais e vias aferentes sensoriais é fundamental para a geração e controle da locomoção, no entanto,

o papel exercido por cada um desses fatores ainda não é suficientemente esclarecido. Para Edgerton et al (2008), os circuitos espinais respondem de forma diferente dependendo das condições a que estão submetidos. O treinamento da locomoção em animais espinais melhora a qualidade da marcha, aumenta a habilidade de suporte de peso do corpo e recuperação da pisada, bem como promove adaptação a velocidade na esteira, sugerindo mudanças plásticas na medula do gato (Rossignol et al, 2002). Em humanos, o treino da marcha constitui um importante meio de manutenção e recuperação da saúde e da qualidade de vida (Finch et al, 1991). Entretanto os mecanismos intrínsecos a essa plasticidade ainda não são claros.

No presente estudo, buscamos associar funcionalidade com mecanismos plásticos, observando a expressão de Egr1, receptor NMDA e SP na medula lombossacral ao realizar o treinamento locomotor de ratos adultos. Traçando um perfil do comportamento desse gene e da SP relacionado ao protocolo proposto, visamos o melhor entendimento dos eventos intrínsecos à plasticidade promovida por esta atividade.

2. Resultados

A imunohistoquimica para Egr1 revelou uma imunorreatividade basal (grupo controle – C) dispersa nas secções da medula espinal pesquisadas, L1/L2, L3/L4, L5/L6, S1/S2, S3/S4. Cada corte medular foi dividido em regiões para facilitar a análise. As células imunorreativas das lâminas I,II e III (lâminas superficiais do corno dorsal) foram representadas por pontos verdes, nas lâminas IV,V e VI (lâminas profundas do corno dorsal) as células foram representadas por pontos cor de rosa, enquanto nas demais lâminas (VII, VIII, IX e X – corno ventral) as células foram representadas por pontos amarelos. Ainda considerando os animais controle, também podemos observar uma predominância de células expressando Egr1 na região superficial do corno dorsal. A Fig. 1 contém esquemas representativos dos quatro grupos experimentais presentes no estudo, em cada secção avaliada.

Na região de L1/L2, o grupo submetido a 1 dia de treino locomotor (EF1) apresentou aumento da expressão de Egr1 em todas as lâminas, sendo mais pronunciado nas lâminas profundas do corno dorsal e corno ventral (IV – X; $p<0,05$). Os animais submetidos a 3 dias de treino (EF3) mostraram aumento na ativação de Egr1 quando comparados ao grupo C, embora com uma menor ativação que a observada em EF1 ($p<0,05$). No grupo de treinamento mais tardio (EF7), observamos um aumento das células imunorreativas semelhante aos do grupo EF1 ($p<0,05$; Fig. 2A).

Tal padrão imunorreativo se repete para todas as lâminas a nível L3/L4 (Fig. 2B) e para as lâminas de IV a X, nos níveis L5/L6, S1/S2 e S3/S4. As lâminas superficiais (I, II e III) mostraram uma tendência ao aumento na expressão desse gene imediato, embora não tenham apresentado variação estatisticamente significante ($p>0,05$), nos níveis de L1/L2, L3/L4, S3/S4, em animais que realizaram 1 dia de treinamento locomotor. Nos demais níveis estudados (L5/L6, S1/S2) a imunorreatividade foi inalterada ou sofreu um leve decrescimo. Após realizar treinamento locomotor por 3 e 7 dias, as secções medulares apresentaram manutenção ou leve redução do padrão imunohistoquimico encontrado no grupo C, exceto a nível de L3/L4 onde a redução na expressão de Egr1 foi mais intensa comparada ao controle ($p=0,08$) (Fig. 2C, D, E). É importante lembrar que em todos os níveis pôde-se

notar forte presença de receptores NMDA, em todos os grupos pesquisados (dados não ilustrados).

As diferenças da expressão de EGR1 nos cornos dorsal e ventral com a progressão do treinamento são claramente observadas qualitativamente (Fig. 3).

A análise quantitativa da imurreatividade a SP nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal a partir da mensuração dos pixels nas imagens binarizadas (Fig. 4) mostrou a inexistência de variação estatisticamente significante ($p>0,05$) entre os grupos experimentais e controle, em todos os níveis examinados, não apresentando um padrão regular de comportamento (Fig. 5).

De forma mais clara, na figura 6 podemos observar a variação da quantidade de células imunorreativas em cada nível estudado, L1/L2, L3/L4, L5/L6, S1/S2, S3/S4, de acordo com o tempo de treinamento definido pelo grupo ao qual o animal pertence. Todos os níveis seguem um padrão de aumento de expressão após 1 dia de treinamento, uma diminuição após 3 dias de locomoção e um novo aumento após 7 dias (Fig. 6A). Em contrapartida, a variação de SP na mesma região é muito discreta em todos os níveis analisados, apresentando aumento ou diminuição de forma aleatória nos níveis pesquisados, como podemos observar na fig 6B.

3. Discussão

No presente estudo observamos um aumento da expressão de Egr1 nas secções da medula espinal de ratos submetidos ao treinamento locomotor, com maior intensidade nas lâminas de IV a X, e nos níveis L3 – S4.

A expressão de Egr1 pode ser induzida, de forma rápida e transitória, por moléculas sinalizadoras externas como neurotransmissores e fatores de crescimento, que se ligam a receptores de glutamato e ativam uma cascata de eventos, levando a expressão deste gene. Vale ressaltar que a expressão de Egr1 não é dependente de síntese protéica, no entanto acredita-se que ele funcione como terceiro mensageiro na seqüência de etapas desde a despolarização pós-sinaptica até respostas adaptativas de genes, como o que ocorre na LTP (Abraham et al, 1992).

A locomoção em mamíferos é controlada por redes de neurônios espinais que constituem o gerador central de padrão (CPG), podendo ser iniciada por certas vias que se originam no tronco encefálico e descem pela medula espinal. A região mesencefálica locomotora (MLR) e o hipotálamo lateral projetam fibras que chegam à medula espinal para ativar o CPG (Noga et al, 2003). Vários progressos têm sido realizados no estudo dos neurotransmissores e moduladores envolvidos no controle da locomoção, mostrando uma variedade neuroquímica incluindo NMDA, noradrenalina, serotonina, dopamina e agonistas colinérgicos como capazes de estimular a atividade rítmica semelhante ao padrão locomotor (Jordan and Schmidt, 2002). Dentre eles, o envolvimento de aminoácidos excitatórios na iniciação da locomoção tem sido sugerido. A estimulação da MLR produz um potencial de ação pós-sináptico (PSP) nos motoneurônios através de vias mielinizadas, com alta velocidade de condução nervosa, indicando a forte possibilidade desse estímulo ser mediado por vias descendentes glutamatérgicas, a mesma via estando envolvida tanto na iniciação da locomoção quanto na produção do PSP (Shefchyk e Jordan, 1985, Noga et al, 2003). Os PSPs são produzidos pelos mesmos interneurônios que geram o potencial do comando locomotor nos motoneurônios.

Relacionando a locomoção e a expressão de Egr1 na medula espinal após o treino locomotor encontrada no nosso trabalho, podemos destacar a presença e ativação dessas vias glutamatérgicas, já que a expressão de EGR1 pode ser

estimulada através da ativação de diversas classes de receptores de glutamato (NMDA, AMPA) pela liberação de glutamato e agonistas específicos. Através de imunohistoquimica pudemos observar grande presença de receptores NMDA nas secções analisadas. A liberação de aminoácidos excitatórios e peptídeos pelos terminais pré-sinápticos, o aumento da sensibilidade dos receptores de glutamato e a ativação dos sistemas de segundo mensageiro são etapas consideradas importantes para o desenvolvimento da LTP (Sandkuhler, 2007), além de o Egr1 ter sido relatado como o primeiro gene a ser expresso no giro denteado após estimulação da LTP (Cole et al, 1989).

A estimulação elétrica da MLR parece ativar mais de uma população de neurônios espinais, na medida em que as áreas de potenciais foram distribuídas entre as lâminas VI – X da medula espinal lombossacral (Noga et al 1995). De uma forma geral, acredita-se que os interneurônios relacionados com a iniciação da locomoção são mais numerosos entre os níveis L3 – S1. As regiões que mostraram maior potencial de ação encontram-se entre L4 – L6 no gato (Noga et al, 1995). Nesses animais, observaram-se potenciais positivos no corno dorsal dos segmentos espinais de L4 – L7, especialmente nas lâminas III e IV. Através da análise dos potenciais de ação, constatou-se a presença de neurônios envolvidos com a atividade motora rítmica nas lâminas VII, VIII e X (Noga et al, 1995, Noga et al, 2003). Através deste estudo, os autores propõem que a estimulação da MLR produz uma descarga descendente que ativa interneurônios na zona intermediária e corno ventral dos segmentos lombossacrais da medula espinal, principalmente em nível de L4 – L6, sendo responsáveis pela iniciação e/ou manutenção da locomoção.

Buscando localizar os neurônios espinais ativados pela locomoção através da imunohistoquimica para Fos em gatos, Daí et al (2005) encontraram células marcadas nas lâminas III e IV do corno dorsal (marcação mais leve) e lâminas VII, VIII e X da região intermediária e corno ventral, após locomoção fictícia, sendo mais numerosas de L5 – L7.

A ativação de Egr1 encontrada no nosso trabalho corrobora em parte os dados dos estudos anteriormente citados, uma vez que o aumento das células imunorreativas nas lâminas superficiais (mesmo que leve) ocorreu principalmente a nível L1 – L4. No entanto, um forte aumento na expressão deste gene (estatísticamente significante) ocorreu nas lâminas IV – X, nos

níveis lombossacrais, sendo mais intenso de L3 – S4. Tais achados refletem a forte ativação de interneurônios e motoneurônios durante a locomoção, bem como mostra a presença de modificações sinápticas que proporcionam a ativação do Egr1 e, possivelmente, de uma cadeia de mecanismos intrínsecos englobados no contexto da plasticidade sináptica.

O papel dos estímulos aferentes na locomoção é uma área muito explorada, mas que ainda tem muitas lacunas a serem esclarecidas. Em estudos com animais espinais, foi detectada uma rede espinal especializada (CPG) que pode gerar o ritmo da locomoção (Dietz, 2003, Hultborn, Nielsen, 2007). Para Edgerton et al (2008), o controle essencial nesses casos deve ser realizado pelos aferentes do movimento dos membros posteriores, transmitindo a cinemática e a cinética desses membros. No entanto, como se dá a participação das aferências sensoriais durante a locomoção de animais em que o sistema neuromotor está intacto ainda não está claro.

Wisden et al (1990) realizaram estimulação de fibras sensoriais resultando num aumento do mRNA de Egr1 em neurônios da medula espinal. No nosso estudo observamos um alto nível basal de células imunorreativas a Egr1 nas lâminas superficiais do corno dorsal e um leve aumento nessa expressão após o treino locomotor, especialmente nos níveis de L1-L4. Esta região é responsável pela transmissão dos estímulos aferentes. Esses resultados se mostram parcialmente diferentes dos encontrados por Liang e Jones (1996) que, ao fornecerem estímulo elétrico de alta freqüência aos nervos periféricos das patas dianteiras de ratos, observaram um aumento na expressão de Egr1 somente em nível do corno dorsal.

A expressão de genes imediatos, especialmente Egr1, nas lâminas superficiais possivelmente se deve ao potencial de ação excitatório desenvolvido pela estimulação sensorial. A estimulação elétrica de alta freqüência vem sendo muito utilizada para estimular vias nociceptivas, especialmente pelas fibras A e C (Yoshimura e Jessel, 1990, Kim et al, 2003). Na locomoção, vias sensoriais de tato e proprioceptivas são estimuladas, desenvolvendo potenciais de ação excitatórios (EPSPs) que promovem um feedback sensorial modulando o movimento (Buschges e El Manira, 1998). As vias sensoriais utilizam glutamato ou aminoácidos relacionados como transmissor das sinapses nesta região, ativando seus receptores pós-sinapticamente (Yoshimura e Jessel, 1990). Por

outro lado, podem existir algumas justificativas para as discordâncias de intensidade e localização. Inicialmente pelo fato de nosso trabalho ser realizado através da análise de uma atividade funcional, a locomoção, que requer ativação não só de vias aferentes como também estímulos supra-espinais e CPG, como mencionado anteriormente, proporcionando a ativação de células nas diversas lâminas envolvidas na locomoção. Outro fator é a utilização de animais intactos e acordados, desencadeando uma cascata de eventos em condições fisiológicas, o que talvez minimize o papel da estimulação aferente, além da expressão basal de Egr1 no corno dorsal observada no nosso estudo ser bem pronunciada, enquanto Liang e Jones (1996) relataram quase ausência de expressão de Egr1 na medula espinal de ratos adultos.

Dessa forma, apesar de não termos utilizado um protocolo de estimulação elétrica semelhante ao utilizado para induzir LTP no hipocampo (Cole et al, 1989), considerando a relação da LTP com o aprendizado, o aumento na expressão de Egr1 e as vias que chegam a medula espinal e o circuito neural nessa região, sugerimos que o treino da locomoção ativa mecanismos semelhantes à LTP, caracterizando a plasticidade sináptica na região.

É importante observar a diferença na quantidade de células imunorreativas a Egr1 nos protocolos de treinamento utilizados. Essa expressão obedeceu a um padrão em quase todos os níveis estudados, respondendo com um grande aumento em resposta ao primeiro dia de treinamento, menor aumento da expressão com três dias de treinamento e novo aumento semelhante a primeiro após sete dias de treinamento (veja Fig. 4).

O protocolo de estimulação que vai gerar LTP (número de dias e de trens de pulso) é um dos fatores que influenciam o tipo de LTP que será desencadeada. Outros fatores envolvidos são a idade do animal e a presença de anestesia. Abraham et al (1993) aplicaram diversos protocolos de estimulação elétrica caracterizando os tipos 1, 2 e 3 da LTP. Nesse estudo, os autores puderam constatar uma alta correlação do Egr1 com a persistência da LTP. Abraham et al (1991) propuseram que há uma expressão genética crítica pela LTP3, mas não na LTP2. A expressão de Egr1 mostra-se aumentada relacionada a LTP2 e LTP3, embora pareça ser mais importante na indução da LTP3, enquanto a expressão da proteína Egr1 evidenciou uma maior imunorreatividade nos dois

primeiros dias de estimulação, menor aumento no terceiro dia e novo aumento semelhante ao primeiro no quinto dia de estimulação (Abraham et al, 1993). Raymond (2007) resume os tipos de potenciação, destacando a modificação de proteínas pré-existentes pela fosforilação na LTP1, a síntese de novas proteínas a partir de mRNA já existentes nos dendritos durante a LTP2 e transcrição de gene na LTP3.

Estes dados corroboram nossos achados, o que nos leva a propor que um dos mecanismos plásticos intrínsecos aos benefícios do treinamento locomotor pode ser a LTP, e que dependendo da forma com que este é realizado, pode proporcionar diversos tipos de LTP.

O papel da SP na indução da LTP também tem sido proposto (Sandkuhler, 2007), mas não na manutenção, sugerindo que este processo ocorre mediado pelas fibras aferentes C e representando o mecanismo da hiperalgesia (Liu, Sandkuhler, 1997, Svendsen et al, 1999). No entanto, a variação da quantidade de terminais imunorreativos a SP, 1 hora após o treinamento locomotor, não foi significativa. É interessante observar que as vias sensoriais envolvidas na locomoção diferem daquelas envolvidas na transmissão nociceptiva, uma vez que pode-se observar ativação especialmente das lâminas III e IV do corno dorsal e pequena ativação das lâminas I e II durante a locomoção (Daí et al, 2005), enquanto os estímulos nocivos são transmitidos principalmente pelas lâminas I e II, região de concentração de SP (Brown et al, 1995, Ribeiro-da-Silva, Hokfelt, 2000). Buschges e El Manira (1998) destacaram a importância do feedback sensorial para a locomoção, enfatizando alterações na eficácia das vias reflexas através de estímulos proprioceptivos.

Barthe e Clarac (1997) observaram que, ao aplicar SP em segmentos da medula lombossacral de ratos recém nascidos, esse peptídeo mostrou capacidade de modular o ritmo locomotor do animal. Considerando os achados aqui relatados, podemos sugerir que a SP pode influenciar no padrão locomotor do animal, no entanto, a recíproca parece não ser verdadeira. Os mecanismos sensoriais importantes para o treinamento locomotor parecem não ativar, de forma significante, a liberação de SP no corno dorsal espinal, sugerindo que a plasticidade sináptica envolvida no treinamento locomotor não está diretamente ligada a liberação de SP.

Podemos destacar também a importância das aferências sensoriais na locomoção de animais intactos e do treinamento da atividade específica para se obter o aprendizado motor, observando a ativação de redes neurais próprias da locomoção quando esta é treinada, assim como, a não interferência de neurotransmissores relacionados coma transmissão das demais informações, como a SP. Esses dados confirmam achados de experimentos com gatos espinais usando treinamento locomotor crônico que sugerem que a habilidade para aprender e o sucesso da performance da tarefa motora é dependente da prática repetitiva e parece ser específico para a tarefa testada (De Leon et al, 1998).

A capacidade plástica da medula espinal é uma área que vem sendo bastante estudada, entretanto os mecanismos intrínsecos a este processo ainda são fonte de muita curiosidade e descobertas. O estudo da LTP na medula espinal e a investigação da sua indução através do comportamento é uma importante fonte de entendimento das modificações proporcionadas pela funcionalidade. No contexto do presente estudo, torna-se necessária necessária a investigação dos receptores glutamatérgicos mais envolvidos e o grau de persistência da LTP desencadeada pelos variados protocolos, assim como a observação da liberação de SP no momento da indução da LTP com a finalidade de entender a complexidade desse mecanismo na medula espinal e caracterizar melhor a relação da SP com a LTP.

Procedimentos Experimentais

Vinte e oito (28) ratos Wistar machos (35-40 dias de idade) provenientes da colônia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal/RN – Brasil) foram utilizados neste estudo. Os animais foram colocados em gaiolas aos pares com água e comida disponíveis continuamente, e mantidos em ciclo claro-escuro ambiental em sala com temperatura controlada. Os cuidados na manutenção e uso dos animais experimentais seguiram as normas estabelecidas pelo National Research Council of the National Academy, publicadas no “Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research” da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. A pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Rio Grande do Norte (Natal/RN – Brasil) com parecer nº 042/2008.

Dos 28 animais, 3 foram utilizados para o ajustamento dos protocolos imunohistoquímicos. Após 3 dias para adaptação, os animais foram distribuídos nos grupos controle (C, n=6), exercício físico 1 (EF1, n=6), exercício físico 3 (EF3, n=7) e exercício físico 7 (EF7, n=6).

Os animais do grupo controle (C) foram colocados durante 3 dias em uma roda de atividade (fabricada em aço inoxidável, acrílico e borracha antiderrapante, com diâmetro de 30cm e largura 12cm, motorizada), travada, por 30 min, ou seja, não realizaram atividade física. Os demais animais foram distribuídos em três grupos experimentais que realizaram treinamento locomotor. Durante três dias estes animais permaneceram 30 min na roda travada, com o objetivo de adaptação do animal ao ambiente experimental.

O grupo EF1 realizou corrida na roda de atividade por 30 min, durante 1 dia. O grupo EF3 realizou corrida na roda de atividade por 30 min/dia, durante 3 dias. E os animais do grupo EF7 correram por 30 min/dia, durante 7 dias. Todos os animais correram a uma velocidade imposta pela roda de atividade, mas que pôde ser influenciada pelo desempenho de cada sujeito experimental. Para o registro fidedigno da velocidade desenvolvida por cada animal, as rotações foram contadas através de um contador manual. Posteriormente foi calculada a distância percorrida [DP= nº de voltas x perímetro da roda ($2\pi R$, onde o Raio é de 0,15m)] e a velocidade real de cada treino (DP/30 min, dada em m/min). Ao ser verificada a homogeneidade da amostra, foi calculada a velocidade média

de cada rato, a média dessas velocidades por grupo estudado (VM) e a média da massa (MM) (veja tabela 1 para detalhes).

Ao final dos procedimentos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados por via intramuscular com uma mistura de cloridrato de ketamina (0,1 ml/100g) e xilazina (0,01 ml/100g) e submetidos a perfusão transcardíaca, com 300 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina (Parinex, Hipolabor, 2 ml/1000 ml de solução salina) durante aproximadamente 05 minutos. Em seguida, foram bombeados 700 ml de solução fixadora à base de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

As medulas espinais foram cuidadosamente removidas do canal vertebral e seccionadas no nível da 9º costela, originando 2 blocos – o primeiro composto pelas regiões cervical e torácica, e o segundo, e que representa o interesse deste estudo, composto pela região lombossacral, os quais foram acondicionados em frascos contendo sacarose 30% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4) por 24 a 72 horas. Para a microtomia, o bloco da região lombosssacral foi envolvido em meio para congelamento de tecido (Leica Instruments, Heidelberger), congelado por gelo seco e seccionados no plano coronal a 40 μm de espessura em um micrótomo horizontal de deslizamento. As secções obtidas foram recolhidas em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e armazenadas nesta solução divididas em compartimentos para serem submetidas aos procedimentos imunohistoquímicos.

Cortes de compartimentos diferentes em solução foram incubados no anticorpo primário, coelho anti-Egr1 (1:100 - Santa Cruz Biotechnology - USA), coelho anti-receptor NMDA (1:200 – sub-unidade R1 – Proteimax - Brasil) e cobaia anti-SP (1:1000 – Península Labs. – USA), diluído em Triton X-100 a 0,4%, durante 18 a 24 horas. Esta etapa aconteceu após os cortes serem colocados em contato com o soro normal de cabra 2% diluído em Triton X-100 a 0,4%, durante 1h. Então, as secções foram incubadas em solução contendo o anticorpo secundário, cabra anti-coelho (1:1000 - Jackson Labs, Westgrove, PA, USA) e cabra anti-cobaia (1:1000 - Jackson Labs, Westgrove, PA, USA) diluído em Triton X-100 (Sigma Company – USA) a 0,4%, durante 120 minutos. Os cortes foram colocados em contato com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, Vector Labs., Burlingame, CA, USA) a uma diluição

1:100 em Triton X-100 a 0,4% contendo NaCl, permanecendo nesta solução por 120 minutos. Seguiu-se a reação final colocando-se os cortes em um meio contendo H_2O_2 a 0,03% como substrato para a peroxidase e a 3,3', 4,4'-tetrahidrocloreto-diaminobenzidina (DAB – Sigma Company, St Louis, MO, USA), como cromógeno. As secções foram lavadas (3X5min) numa solução de leite desnatado a 5% e tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (50g/1l) entre uma etapa e outra e ao final do procedimento.

As secções montadas em lâminas de vidro foram analisadas através de microscópio óptico (Olympus BX41) em campo claro. As imagens digitais foram obtidas através do acoplamento de uma câmera de vídeo ao microscópio e conectada a um computador e foram utilizadas para a documentação dos resultados. Neurônios imunorreativos foram quantificados através do software *Neurolucida* (MicroBrightField Inc. – USA). Para terminais imunorreativos, as fotografias foram binarizadas e realizada a contagem de pixels, buscando estimar a imunorreatividade a SP na região pesquisada (Vilaplana, Lavialle, 1999). Após testada a homogeneidade dos dados, foram obtidos os valores médios de cada grupo e submetidos ao teste de análise de variância ANOVA *One Way*. A análise dos dados foi realizada através do programa SPSS 15.0 (*Statistical Package for the Social Science*) atribuindo-se o nível de significância de 5%.

Referências de Literatura

Abraham, W.C., Mason, S.E., Demmer, J., Williams, M., Richardson, C.L., Tate, W.P., Lawlor, P.A., Dragunow, M., 1993. Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. Neurosci. 56, 717-727.

Abraham, W.C., Dragunow, M., Tate, W.P., 1992. The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. Mol Neurobiol. 5, 297-314.

Abraham, W.C., Otani, S., 1991. Macromolecules and the maintenance of long-term potentiation. In: Morrell, F. (Ed.), Kindling and Synaptic Plasticity. Birkhauser, Boston, pp. 92-109.

Barthe JY, Clarac F., 1997. Modulation of the spinal network for locomotion by substance P in the neonatal rat. Exp Brain Res 115,485-492.

Beckmann, A.M., Davidson, M.S., Goodenough, S., Wilce, P.A., 1997. Differential expression of EGR1-like DNA-binding activities in the naïve rat brain and after excitatory stimulation. J. Neurochem. 69, 2227-2237.

Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Manty PW, Basbaum AI., 1995. Morphological characterization of substance P receptor-immunorreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. J Comp Neurol 356,327-344.

Buschges, A., El Manira, A., 1998. Sensory pathways and their modulation in the control of locomotion. Current Opinion Neurobiol. 8, 733-739.

Cole, A.J., Saffen, D.W., araban, J.M., Worley, P.F.,1989 Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation . Nature. 340, 474-476.

Dai, X., Noga, B.R., Douglas, J.R., Jordan, L.M., 2005. Localization of spinal neurons activated during locomotion using the c-fos immunohistochemical method. J. Neurophysiol. 93, 3442-3452.

De Leon RD, Hodgson JA, Roy RR, Edgerton VR., 1998. Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats. J Neurophysiol 79,1329–40.

Dietz, V., 2003. Spinal cord pattern generators for locomotion. Clin. Neurophysiol. 114, 1379-1389.

Edgerton, V.R., Courtine, G., Gerasimenko, Y.P., Lavrov, I., Ichiyama, R.M., Fong, A.J., Cai, L.L., Otoshi, C.K., Tillakaratne, N.J.K., Burdick, J.W., Roy, R.R., 2008. Training locomotor networks. Brain Res. Rev. 57, 241-254.

Finch, L., Barbeau, H., Arsenault, B., 1991. Influence of body weight support of normal human gait: development of a gait retraining strategy. Phys. Ther. 71, 842-855.

Gass, P., Herdegen, T. Bravo, R., Kiessling, M., 1993. Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: affects of NMDA receptor antagonist MK-801. Eur. J. Neurosci. 5,933-943.

Hultborn, H., Nielsen, J.B., 2007. Spinal control of locomotion – from cat to man. Acta Physiol. 189, 111-121.

Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K., 2009. Synaptic plasticity in the spinal dorsal horn. Neurosci Res 64,133-136.

Jordan, L.M., Schmict, B.J., 2002. Propriospinal neurons involved in the control of locomotion: potential target for repair strategies? Prog. Brain Res. 137, 125-139.

Kaczmarek, L., 2000. Gene expression in learning processes. Acta Neuro-biol. Exp. 60, 419-424.

Kim, D.K., Jung, S.J., Kim, S.J., Kwak, J., Kim, J., 2003. Dependence of long-term potentiation on the interval between A- and C- responses of the spinal dorsal horn neurons in rats. Neurosci. Lett. 348, 33-36.

Liang, F., Jones, E.G., 1996. Developmental and stimulus-specific expression of the immediate-early gene zif268 in rat spinal cord. Brain Res. 729, 246-252.

Littlewood NK, Todd AJ, Spike RC, Watt C, Shehab SAS., 1995. The types of neurons in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. Neurosci 66, 597-608.

Liu X, Sandkuhler J., 1997. Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. J Neurophysiol 78,1973–82.

Lomo, T., 2003. The discovery of long-term potentiation. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 358, 617-620.

Milbrandt, J., 1987. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible

transcriptional regulatory factor. Science 238, 797–799.

Noga, B.R., Fortier, P.A., Kriellaars, D.J., Dai, X., Detillieux, G.R., Jordan, L.M., 1995. Field potential mapping of neurons in the lumbar spinal cord activated following stimulation of the mesencephalic locomotion region. J. Neurosci. 15, Issue 3, 2203-2217.

Noga, B.R., Kriellaars, D.J., Brownstone, R.M., Jordan, L.M., 2003. Mechanism for activation of locomotor centers in the spinal cord by stimulation of the mesencephalic locomotor region. J. Neurophysiol. 90, 1464-1478.

O´Donovan, K.J. Yourtellotte, W.G. 1999. Milbrandt, J. Baraban, J.M. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. Trends Neurisci. 22, 167-173.

Raymond, C.R., 2007. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the 'long' in long-term potentiation. Trends Neuroci. 30, 167-175.

Ribeiro-da-Silva A, Hokfelt T., 2000.Neuroanatomical localisation of substance P in the CNS and sensory neurons. Neuropeptidies 34, 256-271.

Rossignol, S., Bouyer L., Barthelemy, D., Langlet, C., Leblond, H., 2002. Recovery of locomotion in the cat following spinal cord lesions. Brain Res Rev, 40,257-266.

Sandkuhler J., 2007. Understanding LTP in pain pathways. Mol Pain 3,9.

Shefchyk, S.J., Jordan, L.M., 1985. Excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in alpha-motoneurons produced during fictive locomotion by stimulation of the mesencephalic locomotion region. J. Neurophysiol. 53, 1345-1355.

Sheng, M., Greenberg, M.E. 1990.The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. Neuron. 4, 477-485.

Svendsen F, Rygh LJ, Gjerstad J, Fiska A, Hole K, Tjolsen A. Recording of long-term potentiation in single dorsal horn neurons in vivo in the rat. Brain Res Pro 1999; 4:165-172.

Vilaplana, J., Lavialle, M., 1999. A method to quantify glial fibrillary acidic protein immunoreactivity on the suprachiasmatic nucleus. J. Neurosci. Methods 88, 181-187.

Wisden, W., Errington, M.L., Williams, S., Dunne, S.B., Waters, C., Hitchcock, D., Evans, G., Bliss, T.V.P., Hunt, S.P., 1990. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. Neuron. 4, 603-614.

Yoshimura, M., Jessel, T., 1990. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord. J. Physiology. 430, 315-335.

Legendas

Figura 1. Representação esquemática da distribuição das células imunorreativas a Egr1, nos níveis estudados (L1/L2, L3/L4, L5/L6, S1/S2, S3/S4 – vertical), nos grupos C, EF1, EF3, EF7 dispostos na horizontal. As células foram divididas quanto a localização, onde pontos verdes representam as células das lâminas I, II e III; pontos rosa referem-se às células das lâminas IV, V e VI; pontos amarelos representam células das lâminas VII, VIII, IX e X, estimadas no software Neurolucida.

Figura 2. Representação gráfica das células imunorreativas a Egr1 nas lâminas da medula espinal , L1/L2 (A), L3/L4 (B), L5/L6 (C), S1/S2 (D), S3/S4 (E), onde a coluna de linhas horizontais refere-se ao grupo C, a coluna preta representa EF1, a coluna branca é o EF3 e a coluna de linhas verticais refere-se a EF7.

Figura 3. Fotografia das secções da medula espinal. A, B, C, D representam o corno dorsal dos grupos C, EF1, EF3, EF7, respectivamente. E, F, G, H referem-se ao corno ventral dos grupos C, EF1, EF3, EF7, respectivamente.

Figura 4. Fotografias binarizadas das secções espinais estudadas (L1/L2, L3/L4, L5/L6, S1/S2, S3/S4) nos grupos experimentais (C, EF1, EF3, EF7).

Figura 5. Contagem de pixels referente aos terminais imunorreativos a SP nos níveis espinais estudados (L1/L2, L3/L4, L5/L6, S1/S2, S3/S4), de acordo com o treinamento realizado: C (coluna com linhas verticais), EF1 (coluna branca), EF3 (coluna preta), EF7 (coluna com linhas horizontais).

Figura 6. Variação de Egr1 (6A) e de SP (6B) nas células das lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal de ratos adultos de acordo com a quantidade de treinamento locomotor (C, EF1, EF3, EF7).

Tabela 1 - Resumo dos dados referentes aos grupos experimentais, destacando a média de massa (MM) e a velocidade média (VM) de cada grupo.

* 1 animal do grupo controle e 1 animal do grupo EF1 foram perdidos por complicações na perfusão.

Figuras

Figura 1

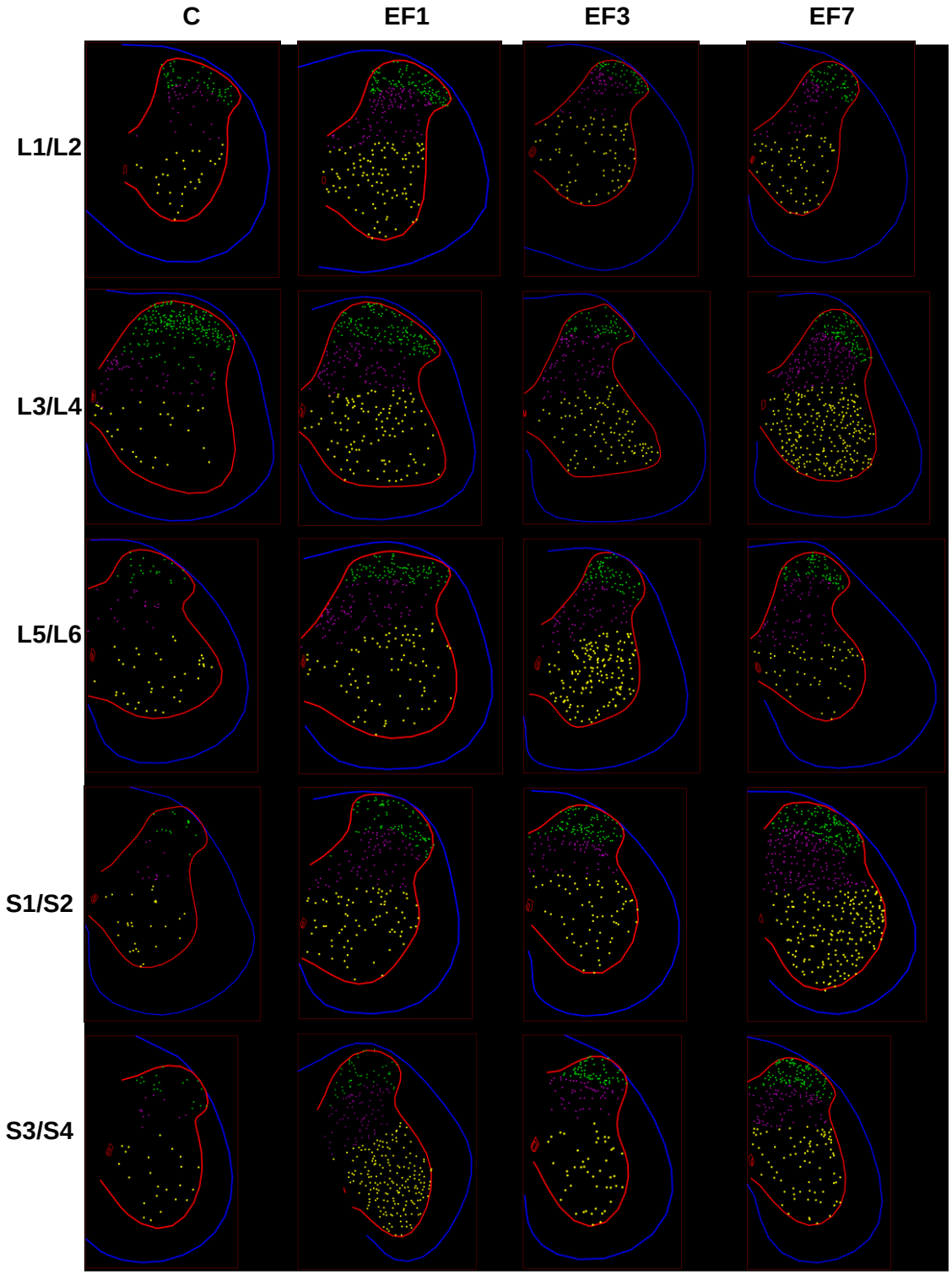


Figura 2

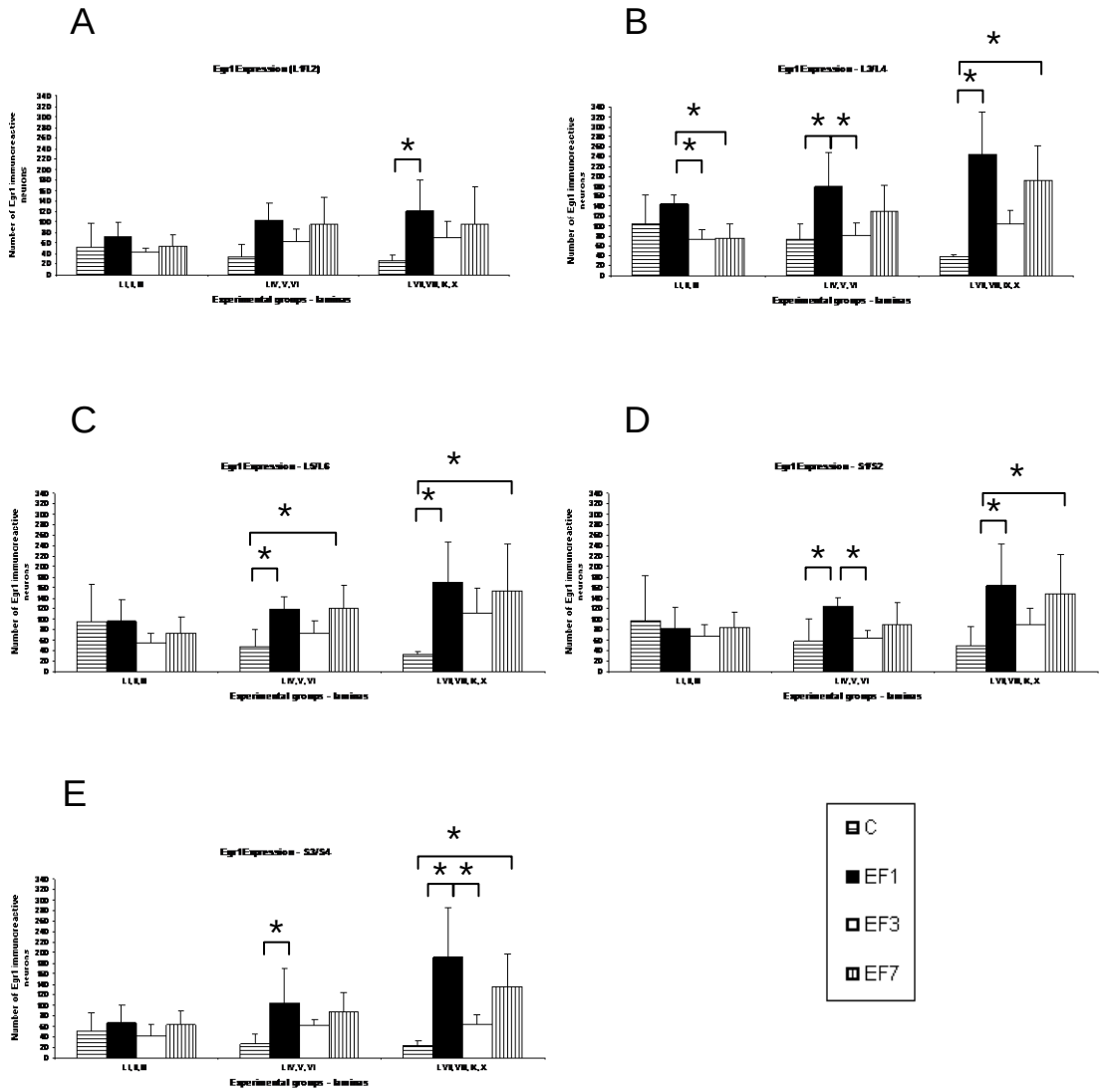

A
B
C
D
E
Egr1 Expression (L1/L2)
Egr1 Expression - L3/L4
Egr1 Expression - L5/L6
Egr1 Expression - S1/S2
Egr1 Expression - S3/S4
Number of Egr1 immunoreactive neurons
Experimental groups - laminas
L I, II, III
L IV, V, VI
L VII, VIII, IX, X
C
EF1
EF3
EF7

Figura 3

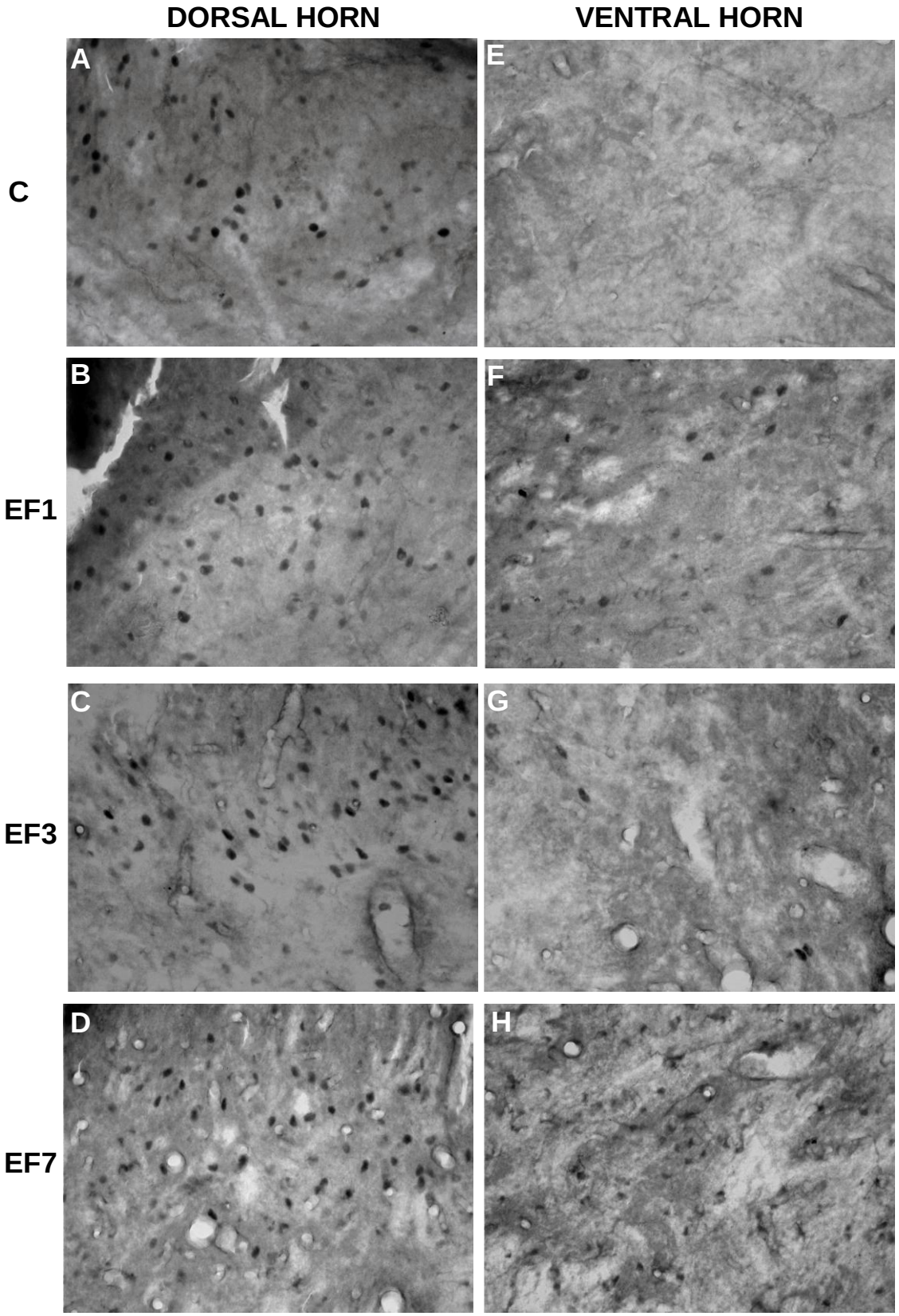


Figura 4

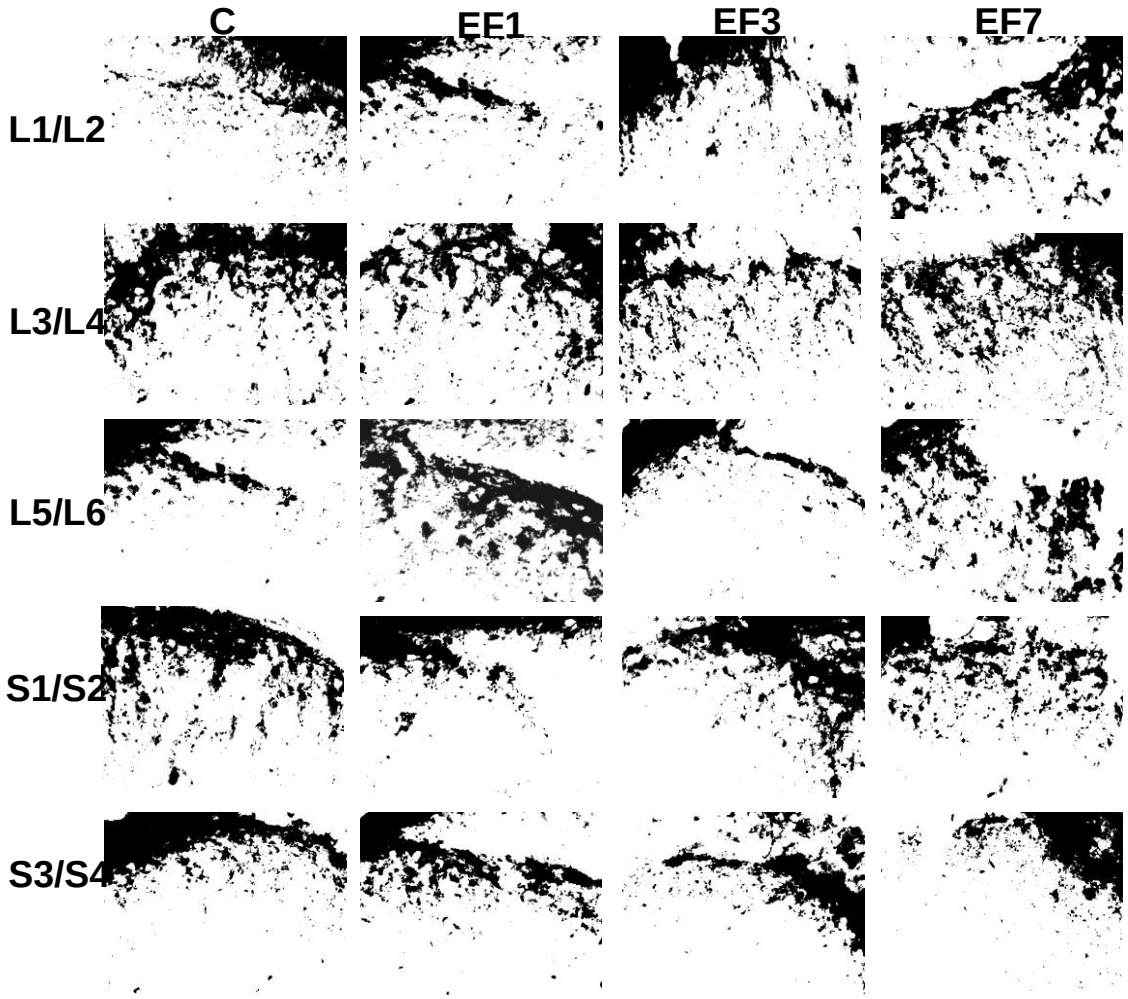


Figura 5

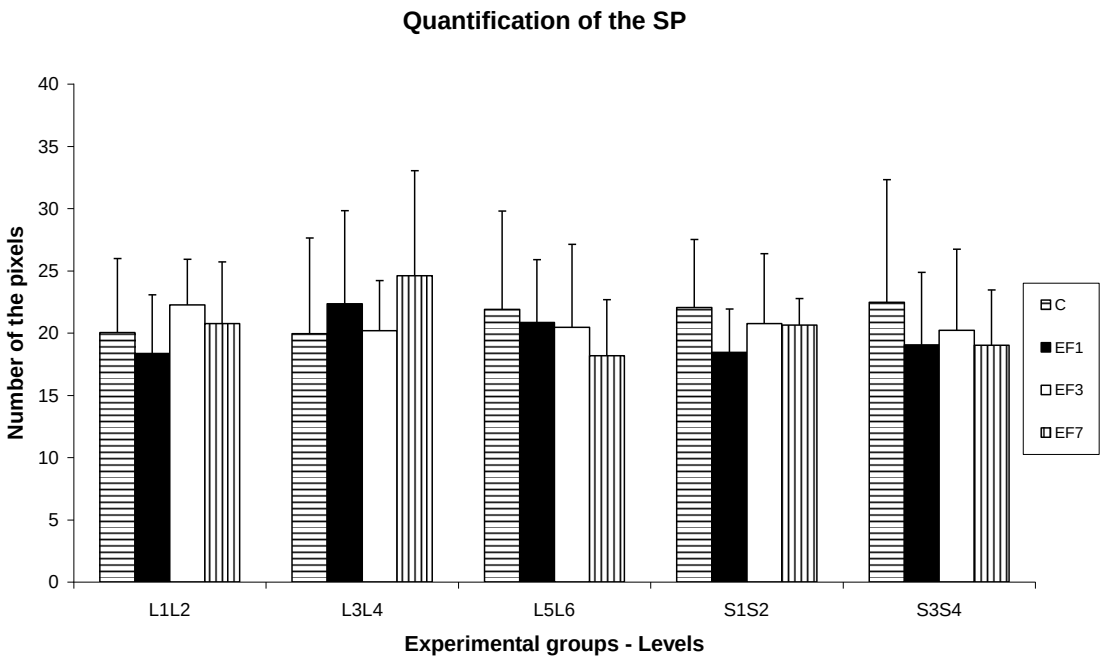
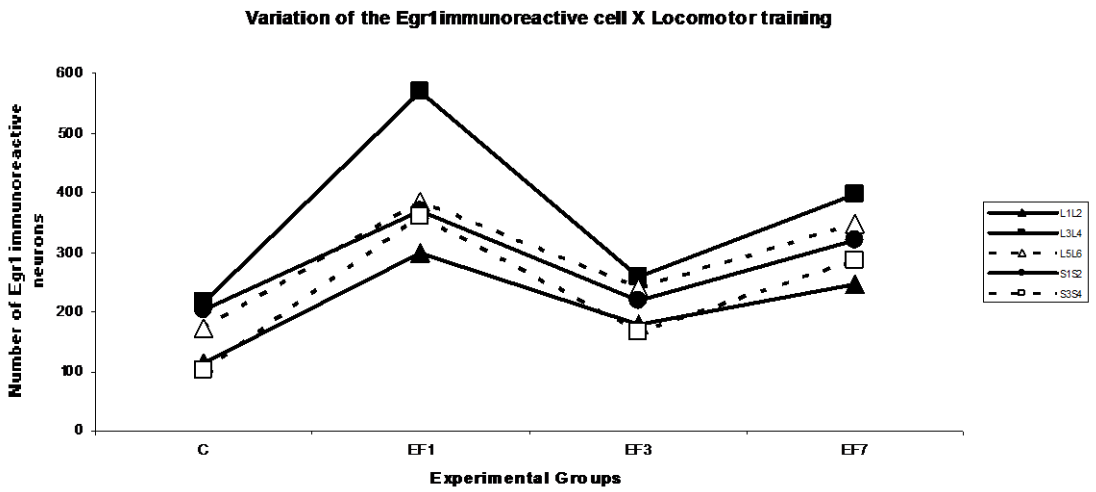

Quantification of the SP
Number of the pixels
40
35
30
25
20
15
10
5
0
L1L2
L3L4
L5L6
S1S2
S3S4
Experimental groups - Levels
C
EF1
EF3
EF7

Figura 6

A


Variation of the Egr1 immunoreactive cell X Locomotor training
Number of Egr1 immunoreactive neurons
600
500
400
300
200
100
0
C
EF1
EF3
EF7
Experimental Groups
L1L2
L3L4
L5L6
S1S2
S3S4

B

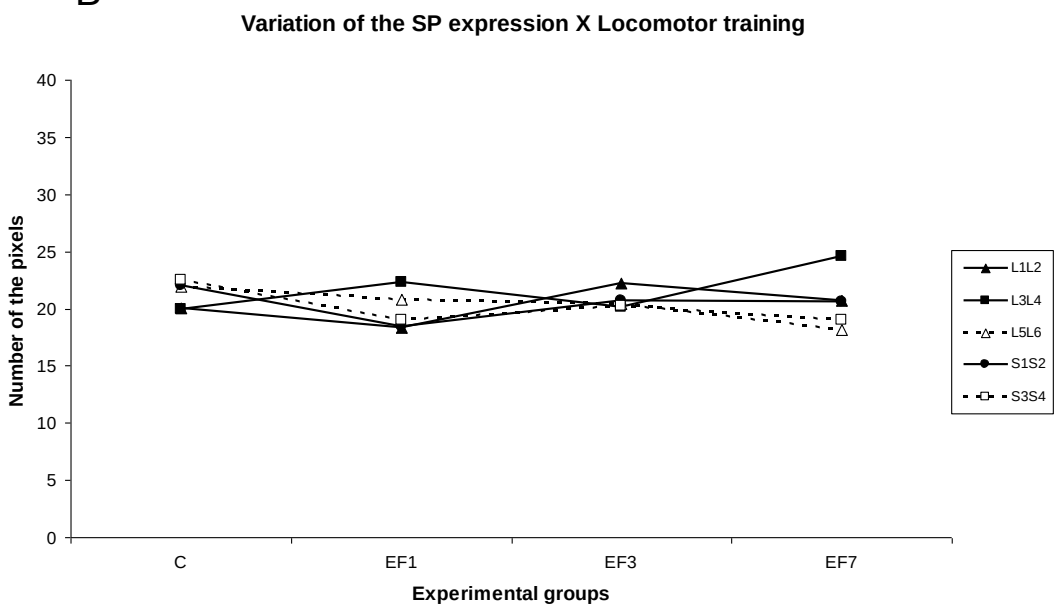

Variation of the SP expression X Locomotor training
Number of the pixels
40
35
30
25
20
15
10
5
0
C
EF1
EF3
EF7
Experimental groups
L1L2
L3L4
L5L6
S1S2
S3S4

Tabela 1

GROUP	N	MM (g)	VM (m/min)
C	5*	84,69	0
EF1	5*	90,55	9,27
EF3	7	96,27	12,83
EF7	6	107,03	15,52
TOTAL	23	289,10	37,62

6 CONCLUSÃO

Neste estudo observamos que o treinamento locomotor gera uma série de alterações nos mecanismos intra e inter-celulares na medula espinal que compõem a plasticidade na região.

Analisando a expressão do gene imediato Egr1 após 1, 3 e 7 dias de treinamento locomotor, podemos observar que este tipo de estímulo desencadeia plasticidade sináptica semelhante ao processo que ocorre em regiões cerebrais ao receberem estímulo elétrico ou aversivo, demonstrando até mesmo as etapas em que pode ser dividida a LTP.

No corno dorsal, o aumento da expressão de Egr1 e a possível presença de LTP parecem não estar associadas a um aumento na liberação de SP, indicando que a LTP desencadeada pela locomoção ocorre por mecanismos diferentes que o mesmo processo após estímulo das vias nociceptivas.

A presença maciça de receptores NMDA nas seções espinais lombossacrais é um dado importante para considerarmos a presença de LTP. No entanto, a caracterização desses mecanismos na medula espinal ainda não está clara. Torna-se necessária a investigação dos receptores e moduladores envolvidos neste processo, de acordo com a habilidade que está sendo estimulada, para assim promover o melhor entendimento fisiológico e comportamental do individuo.

ANEXOS

ANEXO 1

BRAIN RESEARCH

Link:
http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622287/authorinstructions

ORGANIZATION OF THE ARTICLE

Title page. The title page should contain the following items: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the name and complete address of the corresponding Author (as well as telephone number, facsimile number and E-mail address, and if available URL address) to whom correspondence and proofs should be sent.
Abstract. This should provide a concise description of the purpose of the report or summary of the review and should not exceed 250 words. References should therefore be avioded, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list.
Classification terms (to be placed under the Abstract):
Section. One term should be selected from the 9 (sub)Section headings listed above under "Scope".
Keywords. Provide a maximum of six keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.
Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be difined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistancy of abbreviations throughout the article.
Acknowledgements. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.
DNA sequences and GenBank Accession numbers. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via

links to these sources, should type this information in the following manner: *For each and every* accession number cited in an article, Authors should type the accession number in **bold, underlined text.** Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below.) This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences. **Example:** "GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)". Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the ***printed* article**, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the ***electronic* copy,** the accession number will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to the source from the article.

Research Reports and *Reviews* should be divided into **numbered sections** headed by a caption (e.g. Abstract, 1. Introduction, 2. Results, 3. Discussion, 4. Experimental Procedure, Acknowledgements, References).

Introduction. In this section, the objectives of the research should be clearly stated. Relevant background information and published studies should be described concisely, and be cited appropriately.

Results. The results should be described clearly and concisely, and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

Discussion. The results of the research should be discussed in the context of other relevant published work, and as concisely as possible. Extensive citations and discussion of published literature should be avoided.

Experimental Procedure. This section should contain all the details necessary to reproduce the experiments. Avoid re-describing methods already published; only relevant modifications should be included in the text.

Literature references. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript on a separate page, arranged in alphabetical order of first author then year of publication. The references should include only articles that are published or in press. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal

communications should be cited within the text only. Personal communications should be documented by a letter of permission. Abstracts of work presented at meetings may not be cited. All items in the list of references should be cited in the text and, conversly, all references cited in the text must be presented in the list. The abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the *List of Serial Title Word Abbreviations*, CIEPS/ISDS, Paris, 1985 (ISBN 2-904938-02-8).

Please use the following style for references:

Article in a periodical:

Allan, K., Doyle, M.C., Rugg, M.D., 1996. An event related potential study of word-stem cued recall. Cognitive Brain Res. 4, 251-262.

Chapter in a book (within a series):

Mize, R.R., 1994. Conservation of basic synaptic circuits that mediate GABA inhibition in the subcortical visual system. In Neuroscience: From the Molecular to the Cognitive. Progress in Brain Research, Vol. 100, F.E. Bloom, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 123-132.

An entire book:

Swanson, L.W., Bjorklund, A., Hokfelt, T., 1966, Integrated Systems of the CNS, Part III: Cerebellum, Basal Ganglia, Olfactory System. Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 12, Elsevier, Amsterdam.

URLs should be included for websites that are relevant to the article.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

Illustrations. Authors should consult the Elsevier website for guidelines for preparing (electronic) artwork: http://authors.elsevier.com/artwork. *N.B. With Web submission, only the following formats are acceptable: TIFF, PDF and EPS.*

It should be borne in mind that in the journal illustrations will appear either across a single column (=8.3 cm) or a whole page (=17.6 cm). The illustrations should be numbered in Arabic numerals according to the sequence of appearance in the text, where they are referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc. *Accepted manuscripts submitted on diskette, ZIP-disk or CD-ROM* that include electronic files of the illustrations must be accompanied by a hardcopy set of the final illustrations.

All hardcopy illustrations should bear the author's name, the orientation (top, bottom, etc.) and be numbered. Hardcopy colour figures should be submitted as separate prints and not be mounted on cardboard.
If illustrations (or other small parts) of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to *Brain Research*, the written permission of the authors and publisher concerned must be included with the manuscript. The original source must be indicated in the legend of the illustration in these cases.

Colour reproduction.

On the Web: If you submit usable colour figures with your accepted article, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether they are reproduced in colour or black-and-white in the printed version of the article.

In the print journal: Authors will be required to pay a fee towards the extra costs incurred in colour reproduction in print. The charges are EURO 200.00 (approx. US$200) per figure reproduced in colour.
Important: Should you not opt for colour in print, please submit in addition usable black-and-white prints corresponding to all the colour illustrations; this is necessary because of technical complications that can arise when converting colour figures to 'grey scale'.

Figure legends should be concise and clear and should not duplicate the body of the text. Each illustration must have a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. The legends should be placed on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration they refer to. All symbols and abbreviations used in the figure must be explained.

Cover illustration. The selection of illustrations for the cover is at the discretion of the Editors; only those related to articles accepted for publication will be considered. At the end of each year, all published covers will automatically qualify to take part in a competition for the year's best cover illustration, and will be judged on their aesthetic value and scientific interest. The winner will receive a prize of **US$ 1000** from Elsevier. Authors are encouraged to submit aesthetically interesting figures for possible publication on the front cover of an

issue of the journal. The photograph should at least be related to the author's accepted article, but need not be one of the figures appearing in that article. The ideal format of a cover figure should be 25.4 x 21.4 cm for 1:1 reproduction (or any multiples of the above).

Tables. Tables should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text. Tables of numerical data should each be typed (with double-spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.) and referred to in the text as Table 1, Table 2, etc. The title of the table should appear above it. A detailed description of its contents and footnotes should be given below the body of the table.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo