

Thiago Chagas de Amorim

Modelo de disfunção tátil em ratos wistar: lesão dos núcleos talâmicos VPM/POM e seus efeitos comportamentais

Macaíba

2018

Thiago Chagas de Amorim

**Modelo de disfunção tátil em ratos wistar: lesão dos
núcleos talâmicos VPM/POM e seus efeitos
comportamentais**

Documento para defesa do projeto de pesquisa
apresentado ao Programa de Pós-Graduação
em Neuroengenharia do Instituto Internacio-
nal de Neurociências - Edmond e Lily Safra
como parte dos requisitos exigidos para a ob-
tenção do título de Mestre em Neuroengenha-
ria.

Orientador: Prof. Dra. Ana Carolina Bione Kunicki

Co-orientador Prof. Dr. Miguel Santos Pais-Vieira

Macaíba

2018

Thiago Chagas de Amorim

Modelo de disfunção tátil em ratos wistar: lesão dos núcleos talâmicos VPM/POM e seus efeitos comportamentais/ Thiago Chagas de Amorim. – Macaíba, 2018-

53 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Ana Carolina Bione Kunicki

Projeto de Mestrado – INSTITUTO INTERNACIONAL DE NEUROCIÊNCIAS
EDMOND E LILY SAFRA

Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia, 2018.

1. Sistema Trigeminal. 2. Tálamo. 3. Comportamento. I. Orientador. II. Universidade xxx. III. Faculdade de xxx. IV. Título

CDU 02:141:005.7

Thiago Chagas de Amorim

Modelo de disfunção tátil em ratos wistar: lesão dos núcleos talâmicos VPM/POM e seus efeitos comportamentais

Documento para defesa do projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia do Instituto Internacional de Neurociências - Edmond e Lily Safra como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Neuroengenharia.

Defesa aprovada em Macaíba, **26 de fevereiro de 2018:**

**Prof. Dra. Ana Carolina Bione
Kunicki**
Orientadora

Prof. Dr. Edgard Morya
Convidado 1

Prof. Maxwell Barbosa de Santana
Convidado 2

Macaíba
2018

Resumo

Os núcleos talâmicos ventro-pósterio-medial (VPM) e a região medial do grupo posterior (POM) são importantes estações de integração e redistribuição da informação tátil em roedores. VPM veicula informações a partir da via lemniscal e POM transmite informações pela via paralemniscal. Essas vias têm sido utilizadas como modelo de estudo para a percepção tátil, a propriocepção, bem como para o desenvolvimento de interfaces cérebro-cérebro (ICC). Embora as ICC tenham sido desenvolvidas para transferir informação entre dois cérebros diferentes, o mesmo princípio de obtenção de informações a partir de uma região e entrega a uma região distinta, pode ser usado dentro do mesmo cérebro. Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo de disfunção tátil no sistema trigeminal de ratos wistar, a partir da lesão de VPM e POM. Uma corrente catódica aplicada por 30 segundos foi suficiente para causar uma lesão esférica (500 μm de raio), homogênea e restrita a área de interesse. Contudo, a análise da tarefa comportamental revelou que os animais não apresentaram lateralidade da exploração tátil.

Palavras-chaves: Sistema Trigeminal; VPM; POM; Modelo Animal; Lesão Eletrolítica.

Abstract

The ventro-postero-medial (VPM) thalamic nuclei and the posterior medial region (POM) are important stations for integration and redistribution of tactile information in rodents. VPM conveys information from the lemniscal route and POM conveys information by the paralemniscal route. These pathways have been used as a model for the study of tactile perception, proprioception, as well as for the development of brain-to-brain interfaces (BBI). Although BBIs have been developed to transfer information between two different brains, the same principle of obtaining information from one region and delivery to another region can be used within the same brain. Therefore, the project's objective is to develop a model of tactile dysfunction in wistar's trigeminal system from the lesion of VPM and POM. A cathodic current applied for 30 seconds was sufficient to cause a spherical lesion (500 μm radius), homogeneous and restricted to the area of interest. However, the behavioral task analysis revealed that the animals had no laterality performing tactile scanning.

Keywords: Trigeminal System; VPM; POM; Animal Model; Electrolytic Lesion.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	O sistema trigeminal dos roedores	1
1.1.1	Vibrissas e folículo piloso	2
1.1.2	Nervo trigeminal	4
1.1.3	Núcleos trigeminais	6
1.1.4	Vias lemniscais	6
1.1.5	Tálamo	8
1.1.6	Córtex somatosensorial primário	10
2	Justificativa	13
3	Objetivos	15
3.1	Objetivo geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	Materiais e métodos	17
4.1	Desenho do Estudo	17
4.2	Sujeitos	17
4.3	Padronização da lesão de VPM e POM	18
4.3.1	Procedimentos para lesão química	18
4.3.2	Procedimentos para padronização da lesão eletrolítica	19
4.4	Procedimentos cirúrgicos	20
4.5	Análise dos dados	21
4.5.1	Descrição das variáveis	21
4.5.2	Estatística	21
5	Resultados	23
5.1	Desenvolvimento do protocolo para lesões talâmicas	23
5.1.1	Lesão química	23
5.1.2	Lesão eletrolítica	24
6	Discussão	27
6.1	Protocolo de lesão	27
6.1.1	Método químico	27
6.1.2	Método eletrolítico	27
6.2	Considerações Finais	29
	Referências	31

Anexos	37
A Artigo publicado	39

Lista de ilustrações

Figura 1.1 – O rato em seu habitat natural	1
Figura 1.2 – Esquema da via trigeminal.	2
Figura 1.3 – Esquema da organização matricial das vibrissas.	3
Figura 1.4 – Esquema da estrutura do folículo piloso e sua conexão com o nervo trigeminal	3
Figura 1.5 – Esquema de inervação das vibrissas pelo nervo trigeminal	4
Figura 1.6 – Os núcleos trigeminais e suas vias inibitórias	6
Figura 1.7 – Vias talâmicas ascendentes do sistema trigeminal	7
Figura 1.8 – Organização cortical	11
Figura 2.1 – Principais doenças neurológicas que se utilizam ratos como modelo de estudo	13
Figura 4.1 – Fluxograma	17
Figura 4.2 – Distribuição dos parafusos no crânio.	19
Figura 4.3 – Método para determinação do Bregma	20
Figura 5.1 – Análise histológica da lesão química	23
Figura 5.2 – Relação entre volume de solução de ácido quinolínico e diâmetro da área afetada.	24
Figura 5.3 – Análise histológica da lesão eletrolítica	25
Figura 5.4 – Alteração tecidual após aplicação da corrente catódica	25
Figura 5.5 – Comparação entre um tecido cerebral com lesão eletrolítica e outro sem lesão	26

1 Introdução

1.1 O sistema trigeminal dos roedores

O sistema trigeminal dos roedores e suas vibrissas são responsáveis pela captação das informações táteis do ambiente, transdução ao sistema nervoso e transmissão dessas informações para as estruturas corticais superiores. Este conjunto de ações possibilita a percepção da informação tátil, o reconhecimento de objetos e espaços. Estas habilidades sensoriais são relevantes para sobrevivência desses animais que dependem do tato para explorar o seu habitat escuro. (CARVELL; SIMONS, 1990; BRECHT *et al.*, 1997; DIAMOND *et al.*, 2008). A porção captadora do estímulo sensorial neste sistema são as vibrissas que podem ser observadas na Figura 1.1.

Figura 1.1 – O rato em seu habitat natural

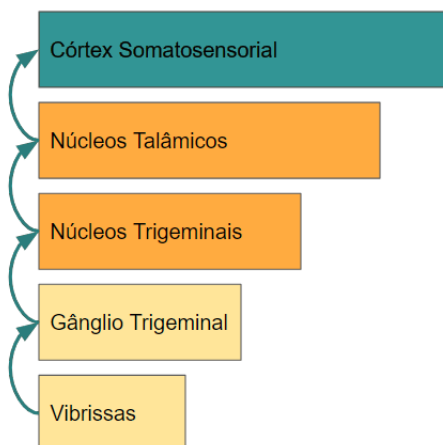


Seta vermelha indicando as vibrissas. Fonte: Adaptado de Fox e Woolsey (2008)

As vibrissas são pelos faciais que possuem em sua base, o folículo piloso com mecanorreceptores que transformam o estímulo mecânico em impulsos elétricos no nervo trigeminal em seu ramo infraorbital. Conforme esquematizado na Figura 1.2, este nervo transmite o estímulo tátil, por meio do gânglio trigeminal (GT), aos núcleos trigeminais (NT). Projeções dos NTs transferem as informações aos núcleos talâmicos. No tálamo, o núcleo ventro-posterior

medial (VPM) e a porção medial do núcleo posterior (POM) se destacam no processamento do estímulo tátil nesse sistema; que ascende principalmente para o córtex somatosensorial primário (S1). (DIAMOND *et al.*, 2008; ERZURUMLU *et al.*, 2010).

Figura 1.2 – Esquema da via trigeminal.

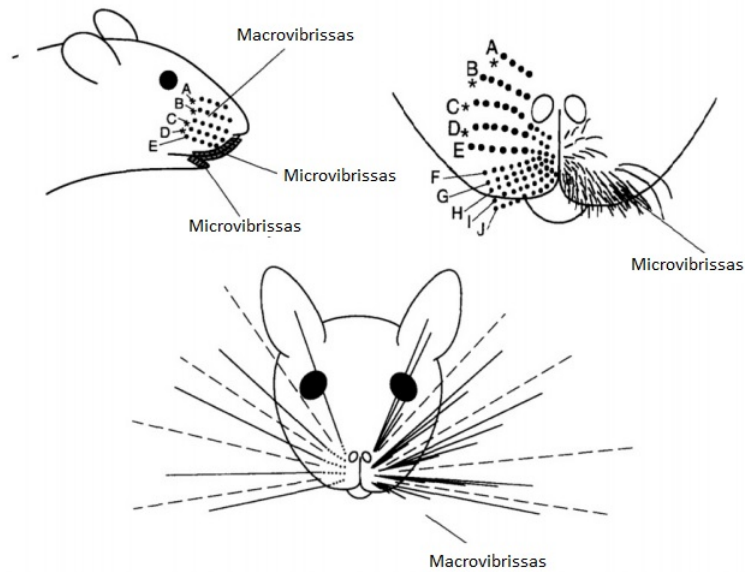


1.1.1 Vibrissas e folículo piloso

As vibrissas possuem uma organização matricial em linhas e colunas. Na Figura 1.3, os pontos das linhas A a E são a localização das macrovibrissas, enquanto que as das linhas F a J são as microvibrissas. Esta divisão de grupos é realizada observando a anatomia e suas capacidades funcionais distintas. A interação destes grupos maximizam a funcionalidade desta arquitetura de pelos para a exploração tátil, sendo comparada com a capacidade somatosensorial das palmas das mãos dos primatas (CARVELL; SIMONS, 1990; BRECHT *et al.*, 1997; FOX; WOOLSEY, 2008).

As microvibrissas estão localizadas no focinho, próximo aos lábios, e estão em maior número. Cerca de 50 fibras nervosas são responsáveis pela transmissão das informações destes pelos menores. As macrovibrissas são mais longas, possui orientação lateralizada e são inervadas por aproximadamente 200 corpos celulares trigeminais. Elas possuem uma musculatura que circunda a base da vibrissa possibilitando o movimento de retração (*whisking*) (BRECHT *et al.*, 1997). Esta movimentação aumenta a sua capacidade de captar distâncias, pressão, velocidade, direção de estímulo tátil, discriminar texturas e reconhecer objetos, mesmo não sendo condição obrigatória para nenhuma dessas habilidades (ZUCKER; WELKER, 1969; BRECHT *et al.*, 1997; KRUPA *et al.*, 2001; HIPPEL *et al.*, 2006; SZWED *et al.*, 2003; NARUMI

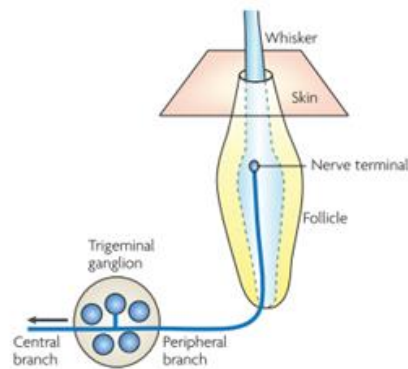
Figura 1.3 – Esquema da organização matricial das vibrissas.



Fonte: Adaptado de Brecht *et al.* (1997)

et al., 2007; NAKAMURA *et al.*, 2009).

Figura 1.4 – Esquema da estrutura do folículo piloso e sua conexão com o nervo trigeminal



Fonte: Diamond *et al.* (2008).

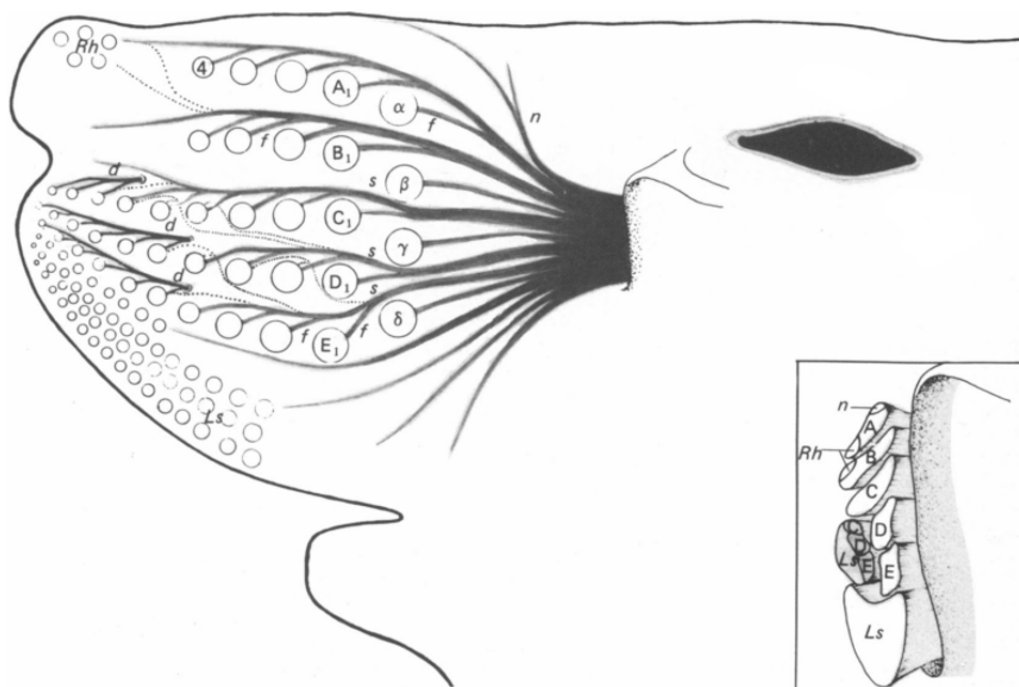
A Figura 1.4 esquematiza a base das vibrissas, apresentando o folículo piloso que é formado por um conjunto de membranas aderidas ao pelo. Com um papel de interface entre o folículo piloso e o nervo trigeminal temos os mecanorreceptores. Eles são capazes de

transduzir o estímulo tátil ou proprioceptivo em elétrico; sinal o qual é utilizado pelo sistema nervoso (DORFL, 1985; DÖRFL, 1982).

1.1.2 Nervo trigeminal

A primeira estrutura a receber as deflexões das vibrissas é o nervo trigeminal. O nervo trigeminal é parte do sistema nervoso periférico e inicia-se no tronco encefálico. A porção que inerva as vibrissas é o feixe infra-orbital (Figura 1.5), ele emerge pelo sulco infra-orbital rotaciona como uma elipse, de modo que sua porção dorsal inerva a porção mais medial do focinho, enquanto que a porção ventral do nervo trigeminal alcança a região lateral do focinho (DORFL, 1985). Especificamente no gânglio trigeminal, são encontrados os corpos celulares do nervo trigeminal. Pesquisadores que estudaram as respostas eletrofisiológicas destas células sugerem que elas são capazes de codificar informações somatosensoriais como: o contato do objeto com as vibrissas; localização espacial, frequência de movimento das vibrissas (ZUCKER; WELKER, 1969; NICOLELIS *et al.*, 1995; GHAZANFAR; NICOLELIS, 1997; LEISER; MOXON, 2007).

Figura 1.5 – Esquema de inervação das vibrissas pelo nervo trigeminal



No canto inferior direito, uma secção transversa do nervo trigeminal. Os feixes do nervo identificado por letras irão inervar as vibrissas que tem sua localização esquematizadas no canto superior esquerdo em conformidade as letras descritas. Fonte: Adaptado de Dorfl (1985)

Dentre estes estudos, Zucker e Welker (1969) dissecaram o nervo trigeminal e inseriu eletrodos para captar a atividade elétrica do GT, e então aplicou diferentes estímulos à vibrissa. A partir da análise eletrofisiológica, eles concluíram que o GT participa dos processamentos táteis de localização espacial, direção de estímulo tátil, início e término de um estímulo tátil, amplitude da deflexão das vibrissas e velocidade.

Buscando uma abordagem que interferisse menos no sistema observado, Szwed *et al.* (2003) com base na atividade elétrica do GT em roedores anestesiados, sugeriram que suas células possuíam atividade elétrica diferente para estímulos sensoriais específicos. Enquanto algumas células estariam responsáveis pela codificação do toque das vibrissas, outras pela movimentação delas, e um terceiro grupo desempenharia ambos os papéis.

Porém, Leiser e Moxon (2007) não observou o mesmo achado ao registrar as células do GT em ratos sem sedação, que exploravam uma caixa livremente. Estes pesquisadores puderam observar os disparos dos mesmos neurônios durante três diferentes condições. A primeira durante as deflexões no sentido anteroposterior devido ao contato da parede com as vibrissas; a segunda durante o movimento de tração das vibrissas sem contato com a parede; e a terceira durante o contato com a parede da caixa comportamental sem movimento ativo das vibrissas. As taxas de disparos apresentaram grande variabilidade de frequência entre as células sendo possível identificar que: todas as células responderam a primeira e a segunda condição analisadas; que a taxa de disparo pelo movimento ativo das vibrissas foram menor quando comparada ao toque do objeto; e que apresentou ausência de atividade elétrica na terceira condição, sugerindo que os GT não possuem potenciais de ações basais.

Estes achados eletrofisiológicos não elucidam o papel das células ganglionares no processamento somatossensorial. Alguns estudos indicam que há células que possuem taxa de disparo diretamente proporcional a velocidade do estímulo tátil e outras relacionadas com amplitude de movimento, velocidade de deflexão das vibrissas e direção das vibrissas (STÜTTGEN *et al.*, 2008; RITT *et al.*, 2008; KHATRI *et al.*, 2009). Estes pesquisadores contribuíram para corroborar com os achados anatômicos que apontavam para relevância desse sistema tátil para os roedores, e ampliou o entendimento do ponto de vista eletrofisiológico sobre o funcionamento do sistema nervoso.

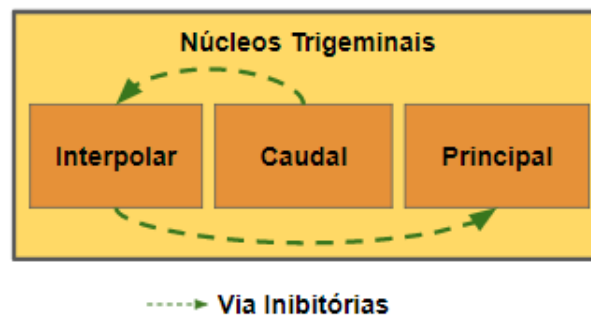
O confronto entre os desfechos encontrados nas pesquisas citadas torna possível estabelecer que a atividade elétrica entre animais sedados e animais sem o rebaixamento da consciências são diferentes, como também que os parâmetros da eletrofisiologia parecem codificar diferentes informações táteis. Somente então estas informações irão, por meio de suas aferências, alcançar os núcleos trigeminais (DIAMOND *et al.*, 2008).

1.1.3 Núcleos trigeminais

Os núcleos trigeminais são compostos de quatro conjuntos de corpos celulares de neurônios de segunda ordem. Esses conjuntos são: O núcleo espinal caudado (SpVc) localizado na região do tronco encefálico; o núcleo espinal interpolar (SpVi) e o núcleo espinal oralis (SpVo) ambos localizados na porção do bulbo do tronco encefálico; e o núcleo principal (PrV) na porção da Ponte. Parte de suas células respondem a uma única vibrissa; as regiões dos barreletes. há também regiões que respondem ao estímulo de diferentes vibrissas, tendo assim um papel de integração da informação tátil.

A função de processamento revela-se também ao observar as interações entre os NTs. Eles são capazes de modular uns aos outros por meio de suas interconexões anatômicas. o núcleo caudal é capaz de inibir a atividade do núcleo interpolar, que por sua vez, pode inibir a atividade elétrica do núcleo principal. Caso isso ocorra, a informação tátil que chega ao núcleo principal não será inibida, devido a ausência da inibição que o interpolar realiza no núcleo principal. Nessa situação, ocorre uma facilitação para que a informação somatosensorial que alcançou o núcleo principal chegue ao tálamo (FELDMAYER *et al.*, 2013).

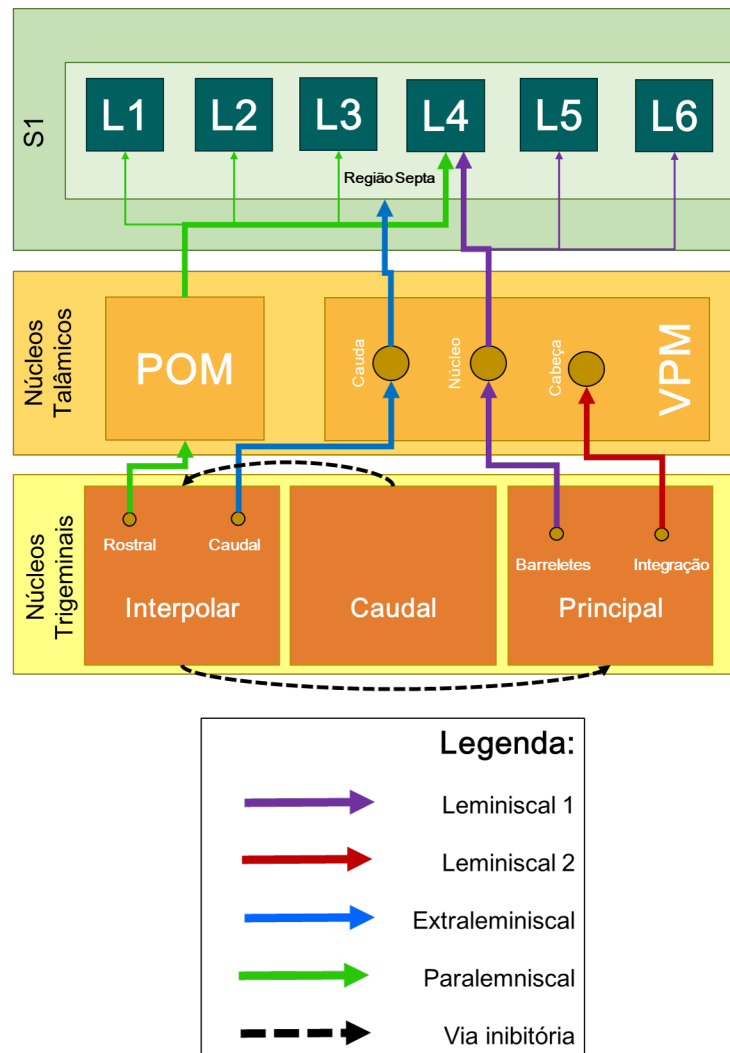
Figura 1.6 – Os núcleos trigeminais e suas vias inibitórias



1.1.4 Vias lemniscais

Para melhor compreender como a informação navega dos NTs para o córtex, é importante destacar os trajetos anatômicos e funcionais das principais vias que comunicam os NTs, o tálamo e o córtex somatossensorial primário. Estas vias são as lemniscais 1 e 2; a via paralemniscal e a via extralemniscal (FURUTA *et al.*, 2010; FELDMAYER *et al.*, 2013). As conexões dos Núcleos Trigeminais com o Tálamo e o córtex somatosensorial ocorrem pelas vias lemniscais esquematizadas na Figura 1.7.

Figura 1.7 – Vias talâmicas ascendentes do sistema trigeminal



Cerca de 90% das células do PrV se projetam para VPM formando as duas principais vias: lemniscais 1 e 2. É no início da via lemniscal 1 que se encontra os barreletes, local onde ocorre a primeira organização somatotópica deste sistema. Este envia projeções para a região dos barrilóides em VPM, que é a segunda região somatotópica do sistema. Os barrilóides são divididos em cauda, núcleo e cabeça (VEINANTE; DESCHÊNES, 1999; PIERRET *et al.*, 2000). A região dos núcleos é onde as fibras nervosas da via lemniscal 1 se insere e seguem para as camadas corticais de S1, mais especificamente na camada IV na região dos núcleos dos barris, e com poucas projeções para as camadas III, V e VI. A via lemniscal 2 se inicia nos grupos celulares de PrV que respondem ao estímulo de mais de uma vibrisa, alcança VPM na porção da cabeça dos barrilóides. Em seguida a via parte para a região das colunas septa de

S1; para as camadas I, II e III; e para o córtex somatosensorial secundário. (FELDMEYER *et al.*, 2013). A via extralemniscal inicia na região rostral de SpVi e envia aferências para a porção caudal dos barrelóides de VPM, para posteriormente alcançar a região septa de S1 e S2 (FELDMEYER *et al.*, 2013). A partir da região caudal de SpVi, emerge a via paralemniscal em direção a POM, chegando posteriormente com maior concentração na camada I4 e nas camadas I3, I2 e I1 de S1 (CHMIELOWSKA *et al.*, 1989; CHIAIA *et al.*, 1991; VEINANTE; DESCHÊNES, 1999).

1.1.5 Tálamo

O tálamo é uma estrutura presente nas vias lemniscais. Ele se encontra no diencéfalo juntamente com o epitálamo, cápsula interna e hipotálamo. O tálamo é dividido anatomicamente em três grandes grupos: o grupo anterior, o ventral e o posterior. Por sua vez elas se subdividem em cerca de 50 núcleos, o que reflete uma região com predominância de corpos celulares.

Quanto a função, sabe-se que o tálamo tem um papel na distribuição sensorial, que é possibilitado devido as projeções para diferentes regiões do encéfalo como o neocórtex e o cerebelo. Há também diversas eferências para a medula espinal, o que indica a sua ligação e mediação com as ações do sistema nervoso periférico. Dessa forma, pode-se concluir que o tálamo é uma estrutura do diencéfalo também responsável pela integração sensorial e motora do corpo (FOX; WOOLSEY, 2008; JONES, 2012).

Como descrito na Tabela 1.1, cada núcleo possui predominância de uma informação sensorial, e com base na função pode se afirmar que o tálamo somatosensorial é composto principalmente por VPM e VPL. Enquanto que no primeiro as informações táteis e proprioceptivas vem da face, VPL traz o mesmo tipo de informações do corpo. Portanto, as vias sensoriais das vibrissas não perpassam por VPL (FOX; WOOLSEY, 2008).

A sensação tátil advinda das vibrissas são processadas e transmitidas para o córtex por meio das estruturas talâmicas VPM e POM. Os núcleos trigeminais enviam sensações táteis advinda das vibrissas principalmente para VPM. Neste núcleo há células que estão organizadas em grupos denominados de barrilóides (WOOLSEY; Van der Loos, 1970). Apesar dos barrilóides apresentarem relação topográfica com as regiões do corpo, estas não se caracterizam como dermatômos. Isso justifica-se pela integração sensitiva dos sinais que ocorrem nos núcleos trigeminais e no próprio tálamo. (JONES, 2012).

Tabela 1.1 – Conexões anatômicas e funções dos núcleos talâmicos

Grupo	Núcleos Talâmicos	Aferência/Input	Eferência/Output	Função
Anterior	Anterior Lateral	Corpos Mamilares	Giro Cingulado	Processamento da função visual
	Anterior Medial	Corpos Mamilares	Giro Cingulado	Processamento da função auditiva
	Dorso Medial	Córtex Pre-frontal Lobo Temporal Amígdalas	Córtex Pre-frontal Giro Cingulado	Processamento da função tátil, aprendizado e memória
Ventral	Ventral Anterior	Globo Pálido Substância Negra Cerebelo	Córtex Premotor Córtex Motor Primário	Processamento de Função Motora
	Ventral Lateral	Globo Pálido Núcleo Denteado Cerebelo	Córtex Motor Primário	Processamento de função motora
	Ventro Postero Lateral (VPL)	Leminisco Medial – Trato Cortico espinhal Trato Gracil e cuneiforme	Córtex Somatosensorial Primário	Processamento de Informação Tátil e proprioceptiva de tronco e membros
	Ventro Postero Medial (VPM)	Trato trigêmio-talâmico (Nervo tageminal)	Córtex Parietal Córtex Somatossensorial	Processamento de Informação Tátil e proprioceptiva de face
Posterior	Núcleo Geniculado Medial	Colículo Inferior (Audição)	Córtex Auditório	Processamento de informação auditiva.

Por sua vez, POM é parte do núcleo talâmico posterior. Em roedores, este núcleo é o mais desenvolvido anatomicamente do grupo posterior. As células de POM são mais sensíveis ao movimento das vibrissas, ainda que não ocorra o contato das vibrissas com algum objeto (SOSNIK *et al.*, 2001).

Com o objetivo de entender os diferentes papéis de VPM e POM na discriminação tátil, Yu *et al.* (2006), registraram a atividade elétrica de ambos os núcleos. Com base na taxa de disparo, os pesquisadores concluíram que o papel de VPM é diferente entre as vias lemniscais e as vias extralemniscas. As vias lemniscais I e II processam tanto a informação de toque quanto da movimento das vibrissas. Já a via extralemniscal, que também perpassa por VPM, participa do processamento proprioceptivo das vibrissas. Porém esta somatosensação não se restringe a VPM, pois as taxas de disparos de POM também apontam para um processamento dos movimentos das vibrissas na via paralemniscal.

Buscando ampliar os conhecimentos sobre os papéis de VPM e POM nas vias lemniscais, Narumi *et al.* (2007) demonstraram a função de VPM em processar tanto as informações de toque a um objeto, quanto as informações de movimento das vibrissas. Os resultados indicam que uma lesão de VPM ou do núcleo trigeminal principal, estruturas que compõem as vias lemniscais de roedores, reduziu a taxa de acerto em uma tarefa de discriminação de direção de um estímulo tátil. Nesta mesma tarefa, uma lesão em POM e no núcleo trigeminal interpolar, que são as vias extralemniscais e paralemniscais, não ocasionou diferença comportamental significativa no animal. Em um outro estudo realizado pelo mesmo grupo (NAKAMURA *et al.*, 2009), mostrou que quando comparado as vias lemniscais e a extralemniscal, a lesão das vias lemniscais 1 e lemniscal 2 geraram uma acentuada queda de desempenho na discriminação do sentido de um estímulo tátil do que a via extralemniscal.

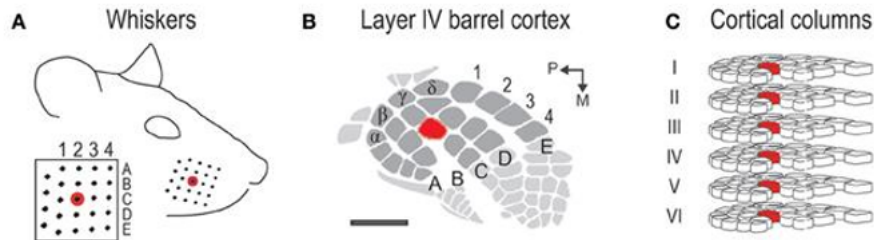
Esses achados sugerem que VPM possui um papel importante na discriminação da direção de um estímulo, e que uma lesão de VPM ou POM poderá gerar uma disfunção tátil em ratos, à medida que POM tem importância para o processamento de "onde" os estímulos estão, enquanto que VPM participa na identificação do "o quê" está sendo tocado, devido a interrupção da informação tátil e proprioceptiva para o córtex somatosensorial.

1.1.6 Córtex somatosensorial primário

Desde os trabalhos de Hall e Lindholm (1974), o córtex somatosensorial tem seu papel bem estabelecido acerca da sua capacidade de processar os estímulos sensoriais. Ademais, cerca de 70% de suas conexões intracorticais reforçam tal papel. Esta região está subdividida em duas regiões: primária (S1) e secundária (S2). Está também organizado em camadas e colunas (CHEN-BEE *et al.*, 2012). Na porção de S1 referente as vibrissas, cada coluna cortical

(Figura 1.8), é responsável pelo processamento de uma delas, enquanto que as camadas processam diferentes aspectos da sensação tátil.

Figura 1.8 – Organização cortical



Fonte: Chen-Bee *et al.* (2012).

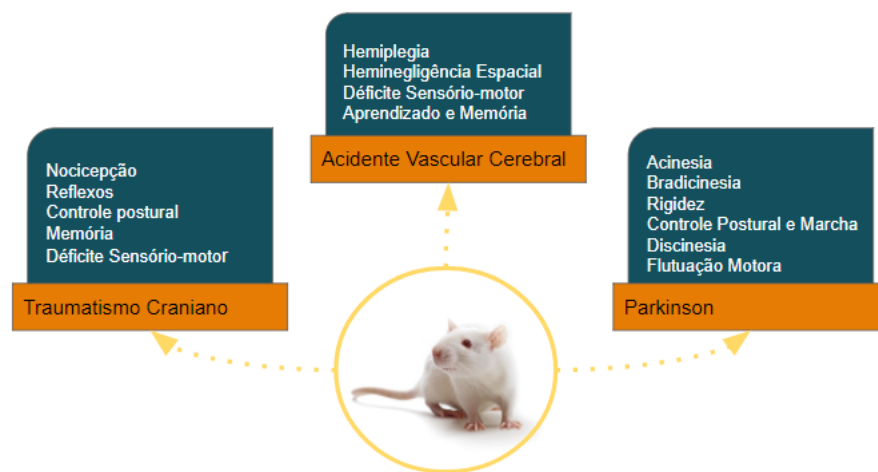
Uma coluna cortical está subdividida em seis camadas que vão de L1 à L6. Em roedores, a camada L1 é caracterizada pela ausência de neurônios excitatórios e projeções neuronais para L2, o que caracteriza uma ação inibitória em L2. As camadas L2 e L3, por possuírem limites pouco claro em roedores, é comumente referida como camada L2/L3. Estas possuem conexões locais e enviam aferências para L1 e L5. Há também um grande número de projeções para colunas vizinhas de S1 promovendo a integração sensorial entre vibrissas. L2/L3 também se comunicam com outros córtices possibilitando funções mais complexas como a percepção tátil. A camada L4 é exclusivamente receptiva dos tratos talâmicos, portanto é a região de S1 com maior aferência de VPM e POM (WOOLSEY; Van der Loos, 1970). Devido aos aglomerados de células que configuram a somatotopia referente as vibrissas, L4 é conhecida como o córtex em barris ou camada granular. (WOOLSEY; Van der Loos, 1970; FOX; WOOLSEY, 2008; SHEPHERD, 2010; CHEN-BEE *et al.*, 2012). A estrutura de um barril é devido a neurônios que se organizam em conglomerados como anéis que circundam e dão forma aos barris (WELKER, 1976; SHEPHERD, 2010). Os barris estão organizados em duas partes: o núcleo e a cauda. A primeira região recebe aferências do núcleo trigeminal principal e a segunda do núcleo trigeminal interpolar (VEINANTE; DESCHÊNES, 1999). Apesar da maior parte dos circuitos serem locais, parte das fibras nervosas alcança as camadas supragranulares, L1 à L3, advinda principalmente dos barris, e 3/5 de suas projeções são emitidas para as camadas infragranulares, L5 à L6. Há também conexões da camada L4 para outras colunas de S1, porém por ser mais escassa, contrasta com as conexões entre colunas das outras camadas. A camada L5 é subdividida em L5a e L5b possui um circuito local denso que recebe informações da camada L4, mas também envia muitas projeções para L2/L3, L6 e para as outras colunas de S1. 3/5 das projeções de L4 alcança L6, que pode ser dividida em outras duas VIa e VIB. A camada L6a retroalimenta VPM enquanto que as aferências de L6b

são projetadas para outros córtices como o parietal. Todas estas evidencias anatômicas das interconexões entre camadas e colunas apontam para uma forte atividade integrativa, e as projeção para outras estruturas corticais direcionam o processamento da informação somato-sensorial para uma função mais elevada como a percepção tátil e proprioceptiva (PIERRET *et al.*, 2000; FOX; WOOLSEY, 2008; FELDMEYER *et al.*, 1999; HOEFLINGER *et al.*, 1995).

2 Justificativa

Os ratos e camundogos são os animais mais utilizados para o desenvolvimento do conhecimento científico, sendo estes os mais presentes nos estudos do sistema sensório-motor (ELLENBROEK; YOUN, 2016; CENCI *et al.*, 2002). Por meio desses animais, pesquisadores buscam esclarecer o funcionamento neurológico hígido, bem como a fisiopatologia de doenças e síndromes. Por exemplo, estes modelos podem ser utilizados para o desenvolvimento de terapêuticas para condições como o parkinson, o acidente vascular cerebral e o traumatismo craniano; Figura 2.1 (CENCI *et al.*, 2002).

Figura 2.1 – Principais doenças neurológicas que se utilizam ratos como modelo de estudo



Neste sentido, pesquisadores dividem opiniões na escolha de qual animal representaria melhor o objeto de estudo da pesquisa. Os roedores seriam adequados apenas para esclarecer os mecanismos patofisiológicos de doenças, enquanto que os primatas deveriam estar mais presentes nos estudos comportamentais. Esses argumentos se sustentam na contraposição entre observações análogas e homólogas. A estrutura muscular, articular e esquelética de animais vertebrados são homólogas, porém o seu comportamento é análogo, ou seja, enquanto que um grupo de animais utiliza o membro superior para nadar e voar, outro grupo utiliza para agarrar alimentos (*grasping*). Dessa forma, os estudos poderiam utilizar os modelos para o estudo da anatomia mas não da função. Portanto, afirmações homólogas possuem maior valor científico por possuírem maiores chances de condizer com a realidade (CENCI *et al.*, 2002). Neste sentido, no campo da neurociências, evidências têm apontado para uma convergência

do funcionamento neurológico em diferentes espécies. Ou seja, apesar da grande divergência comportamental entre espécies, o sistema neurológico parece manter uma homologia quanto a sua origem e inserção de fibras nervosas em diferentes espécies; e que os parâmetros eletrofisiológicos como: *spikes*, correlação de fases das ondas e frequências codificam fenômenos comportamentais o que justifica o uso dos roedores como um bom modelo animal para o estudo da função neurológica.

Os roedores possui outras vantagens para figurarem nas áreas relacionadas a neurociências, pois possuem mais ferramentas disponíveis para melhor explorar o animal em busca de respostas com evidências confiáveis. Este avanço tecnológico teve seu marco no primeiro camundongo transgênico (THOMAS; CAPECCHI, 1987) e após a descrição do genoma dos ratos (GIBBS *et al.*, 2004). Isto propiciou o desenvolvimento de novas ferramentas utilizando técnicas genéticas e a criação de diversos modelos em roedores. Não por acaso, esses avanços aumentaram as chances dos roedores serem escolhidos como melhor modelo, na medida que novas tecnologias permitiram uma melhor abordagem para elucidar as hipóteses científicas, e desde então, muitos resultados foram analisados.(ELLENBROEK; YOUN, 2016).

Motivados pelos achados neurocomportamentais e pela crescente inovação tecnológica para as pesquisas, o mundo científico tem desenvolvido trabalhos que buscam responder as perguntas de investigação que versam acerca da informação sensorial utilizando o sistema trigeminal de ratos. Este sistema tem sido a base para o entendimento da fisiologia do sistema somatossensorial, do comportamento desses roedores e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas.

Atualmente, pesquisadores tem usado o sistema trigeminal de roedores para estudar a sensação tátil, sobre o olhar do funcionamento normal ou em condições adversas. Além das motivações biológicas, este sistema também tem servido de base para o desenvolvimento tecnológico como as interfaces cérebro-máquina e mais recentemente as interfaces cérebro-cérebro. Neste sentido, para que esta tecnologia possa restaurar uma função tátil e proprioceptiva faz-se necessário um modelo que possa servir de base para que novas tecnologias sejam testadas e desenvolvidas. Embora muitos trabalhos investiguem o sistema trigeminal dos roedores, não há relatos na literatura de um modelo bem estabelecido de disfunção tátil em roedores. Desta forma, objetivando desenvolver novas interfaces cérebro-cérebro e cérebro-máquina para o restabelecimento da função tátil, o presente projeto visa desenvolver um modelo de disfunção tátil em roedores por meio da lesão dos núcleos talâmicos VPM e POM.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

1. Desenvolver um modelo de disfunção somatosensorial no sistema trigeminal de ratos wistar.

3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer um modelo de lesão dos núcleos talâmicos VPM e POM;
2. Comparar dois métodos de lesão química e eletrolítica do tálamo;
3. Analisar os achados histológicos da lesão dos núcleos talâmicos VPM e POM.

4 Materiais e métodos

4.1 Desenho do Estudo

Figura 4.1 – Fluxograma



O presente estudo é caracterizado como um estudo transversal, descritivo e analítico; aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Associação Alberto Santos Dumont (AASDAP) sob o protocolo de número: 03/2016, que teve como base o fluxograma descrito na Figura 4.1.

O estudo utilizou-se de dois métodos de lesão tecidual que foram aplicados nos núcleos talâmicos VPM e POM (n=6)a, com objetivo de identificar qual métodos lesivo é capaz de produzir danos teciduais restritos a VPM e POM.

4.2 Sujeitos

Os sujeitos da pesquisa foram ratos *Wistar*, fêmeas, pesando entre 300g a 400g. Seriam excluídos da pesquisa os animais que apresenta-se perda de peso abrupta mesmo após o período de recuperação cirúrgica, infecção urinária e sinais de dor. Os ratos foram mantidos em caixas individuais com ciclo claro e escuro de 12h/12h, condições de temperatura controlada (23 +/-2 °C) e ração e água *ad libitum*.

4.3 Padronização da lesão de VPM e POM

Para padronizar a lesão de VPM/POM, os animais (n=6) foram organizados em dois grupos (Tabela 4.1), onde o primeiro foi submetido a lesão química seguido do grupo da lesão eletrolítica. Todos os animais foram submetidos a análise histológica do tecido cerebral sete dias após a lesão para que se consolidasse a resposta histológica ao trauma.

Tabela 4.1 – Parâmetros utilizados para padronização da lesão de VPM e POM.

	Grupos	
	Lesão Química	Lesão Eletrolítica
n = 6	2	4
Agente Lesivo	Ácido Quinolínico	Corrente Catódica
Parâmetros	Concentração: 0,18M	Espessura do Eletrodo: 100 m
	Volume: 0,06 L; 0,08 μ l; 0,1 μ l; 0,12 μ l	DDP: 30V
Coordenadas Esteriotáticas	Anteroposterior: -3,6mm	Duração: 30", 35", 40", 45"
	Médiolateral: $\pm$ 2,5mm	Anteroposterior: -3,6mm
	Dorso-ventral: 5,4mm	Médiolateral: $\pm$ 2,5mm
		Dorsoventral: 6,8mm

4.3.1 Procedimentos para lesão química

A solução utilizada para causar lesão ao tecido cerebral foi de ácido quinolínico (2,3-piridinodicarboxílico) 0,18M diluído em tampão fosfato 0,1M e pH = 7,3. A escolha deste ácido ocorreu em função do seu potencial lesivo restrito ao local de aplicação (SCHWARCZ *et al.*, 1983). A solução foi produzida em ambiente estéril para evitar contaminação do animal durante o procedimento cirúrgico.

Foram utilizados dois ratos, sendo que em cada hemisfério do animal foi injetado um volume diferente da solução para cada hemisfério cerebral, assim um único animal serviu para o teste de dois parâmetros diferentes.

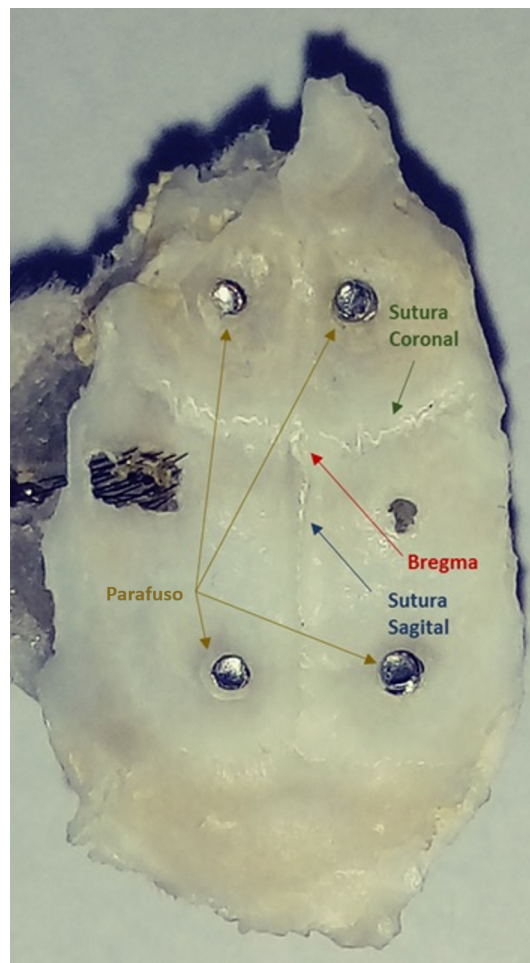
Seringas Hamilton® de 0,5 μ l foram utilizadas para administração da solução nas coordenadas descritas na Tabela 4.1, com auxílio do aparelho estereotático. A velocidade de injeção da solução foi de 0,1 μ l/min. O tempo de espera para a remoção da agulha foi de 5min/ μ l. A agulha foi removida a uma velocidade de 100 μ m/min até um deslocamento de 200 μ m. Em seguida, ela foi retirada 500 μ m por vez, até que a agulha fosse inteiramente removida do cérebro do animal.

4.3.2 Procedimentos para padronização da lesão eletrolítica

Foram utilizados quatro ratos wistar para testar a lesão eletrolítica e testados dois tipos de arranjos para os eletrodos: 1x1 e 2x1. Foram utilizados eletrodos de tungstênio, com 100 μm de espessura, revestido de material isolante (teflon). O espaçamento entre os fios foi de 500 μm (Tabela 4.1).

Os parâmetros elétricos para lesionar as estruturas alvos foram: 30mV de diferença de potencial durante 30, 35, 40 ou 45 segundos utilizando uma corrente catódica (GOLD, 1975). O fio terra do circuito foi fixado em quatro pontos no crânio: Nos ossos frontais em sua porção anterior e nos ossos parietais em sua porção posterior conforme Figura 4.2. Uma semana após a lesão eletrolítica, os animais foram submetidos a análise histológica.

Figura 4.2 – Distribuição dos parafusos no crânio.



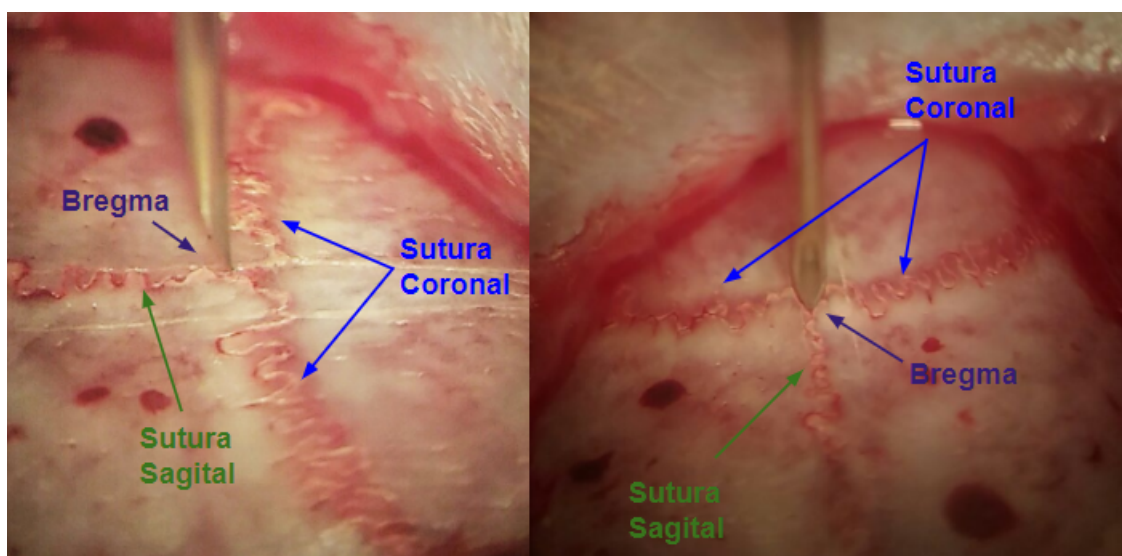
Legenda: Visão inferior da calota craniana. Pode-se observar os parafusos fixos aos ossos frontais e aos ossos parietais.

4.4 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram submetidos a um protocolo para início dos procedimentos cirúrgicos: Pré-anestésico - atropina administrada por via intramuscular na dose de 0.05mg/kg; Anestesia - xilazina administrada por via intramuscular na dose de 4mg/kg e Ketamina administrada por via intraperitoneal na dose de 50-70mg/Kg e manutenção com isoflurano de 1-2 %. O nível de sedação foi avaliado com base na frequência dos batimentos cardíacos e saturação de oxigênio. Ademais, a temperatura corporal foi tomada por via retal e mantida em 37° por meio de colchão térmico.

Em seguida o animal foi fixado ao estereotáxico utilizando as barras auriculares. Inicialmente foi feito a limpeza do tecido conjuntivo com Clorexidine® e posicionado o campo cirúrgico estéril. Utilizou-se de bisturi para a realização da incisão da pele na linha média do crânio. O tecido conjuntivo foi afastado com o auxílio de um destacador de periósteo expondo o crânio e as suturas cranianas. O bregma foi determinado pelo encontro das suturas sagital com a coronal(Figura 4.3), enquanto que o lambda foi determinado pelo ponto central da sutura lambdoidea com a sutura sagital. Estas referências anatômicas foram utilizadas para calibrar o estereotáxico em relação ao bregma e para o alinhamento do plano frontal da cabeça.

Figura 4.3 – Método para determinação do Bregma



Com estereotáxico calibrado, foram demarcadas no crânio as coordenadas das janelas utilizando o bregma como referência. Tendo em vista o posicionamento das janelas, foram

inserido quatro parafusos (Figura 4.2) utilizando broca dentária de alta rotação e chave de fenda para aterramento e fixação dos eletrodos. Em seguida, foi realizada a craniotomia nas regiões das janelas. Após o uso da broca, foi utilizado uma cureta para remoção do tecido ósseo em excesso em torno da janela. A dura-máter foi removida para possibilitar a inserção dos eletrodos. Ao término, foi construído o capacete de acrílico dentário para proteção e fixação dos eletrodos. Todo o procedimento cirúrgico foi estéril, para tanto, o instrumental foi autoclavado ou exposto a irradiação ultravioleta.

4.5 Análise dos dados

4.5.1 Descrição das variáveis

4.5.2 Estatística

Os resultados foram dispostos por meio de tabelas, gráficos e figuras. As variáveis foram contínuas e suas médias foram apresentadas acompanhada de sua mediana e seus valores máximos e mínimos. A distribuição dos dados foi analisada segundo a estatística descritiva (histograma, medidas de dispersão e teste de shapiro-wilk). As variáveis apresentaram comportamento não-paramétrico. O teste aplicado para volume de solução injetada e área lesionada; assumindo um nível de confiança de 95% foi o de Sperman.

5 Resultados

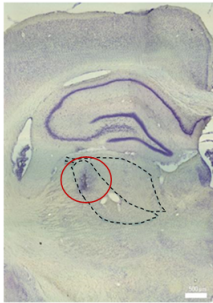
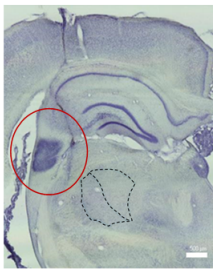
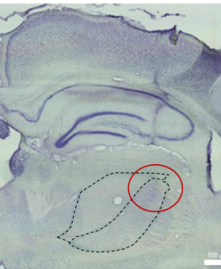
5.1 Desenvolvimento do protocolo para lesões talâmicas

O presente estudo coletou e analisou dados de duas abordagens para lesão dos núcleos talâmicos VPM e POM que encontram-se dispostos a seguir.

5.1.1 Lesão química

Os dados histológicos das lesões químicas realizada em dois ratos encontram-se na Figura 5.1.

Figura 5.1 – Análise histológica da lesão química

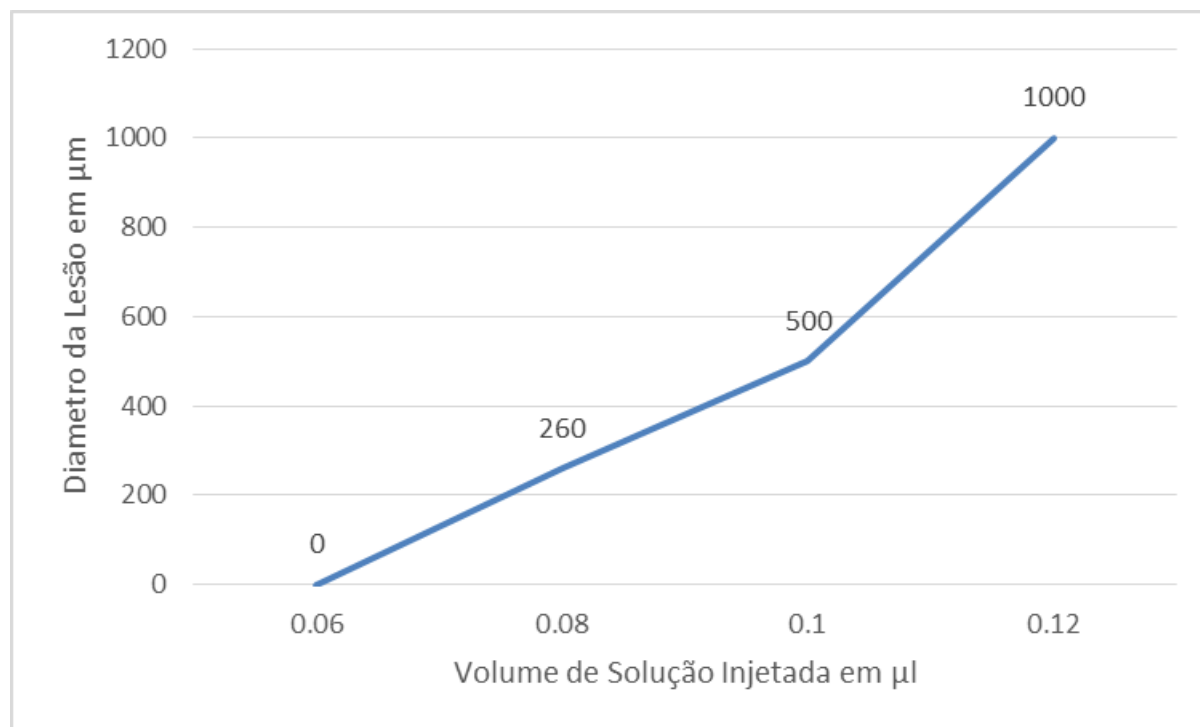
		Hemisfério	
		Direito	Esquerdo
Quantidade Injetada		0,1 μ l	0,08 μ l
Bregma		-3,48 μ m	-3,48 μ m
1 Tentativa			
Quantidade Injetada		0,12 μ l	0,06 μ l
Bregma		-3,96 μ m	-3,48 μ m
2 Tentativa			

Legenda. Pode-se observar a localização e a extensão das lesões químicas destacadas com um círculo vermelho.

Todas as lesões ocorreram na zona abaixo da saída da injeção da solução. Houve variação da coordenada médiolateral e anteroposterior de um animal para o outro. As lesões

alcançaram o máximo de 1 mm de "diâmetro" na injeção de 1,2 μ l. A forma da lesão variou de uma aplicação da solução para outra, e seu diâmetro máximo aumentou linearmente em relação ao volume injetado, Figura 5.2, revelando uma correlação linear pelo teste de Spearman ($r_s = 1.000$; $p < 0,001$).

Figura 5.2 – Relação entre volume de solução de ácido quinolínico e diâmetro da área afetada.

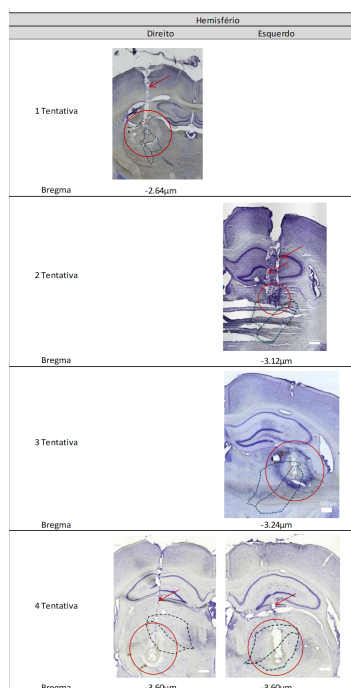


5.1.2 Lesão eletrolítica

Na lesão eletrolítica foi realizado apenas aplicações de corrente elétrica catódica pela duração de trinta segundos com um único eletrodo. Na Figura 5.3 pode-se observar as tentativas de padronização do protocolo para lesão eletrolítica. O diâmetro das lesões foi de 1mm e as coordenadas do centro da lesão obtiveram resultados com variações nos eixos anteroposterior, mediolateral e dorsoventral de um animal para o outro.

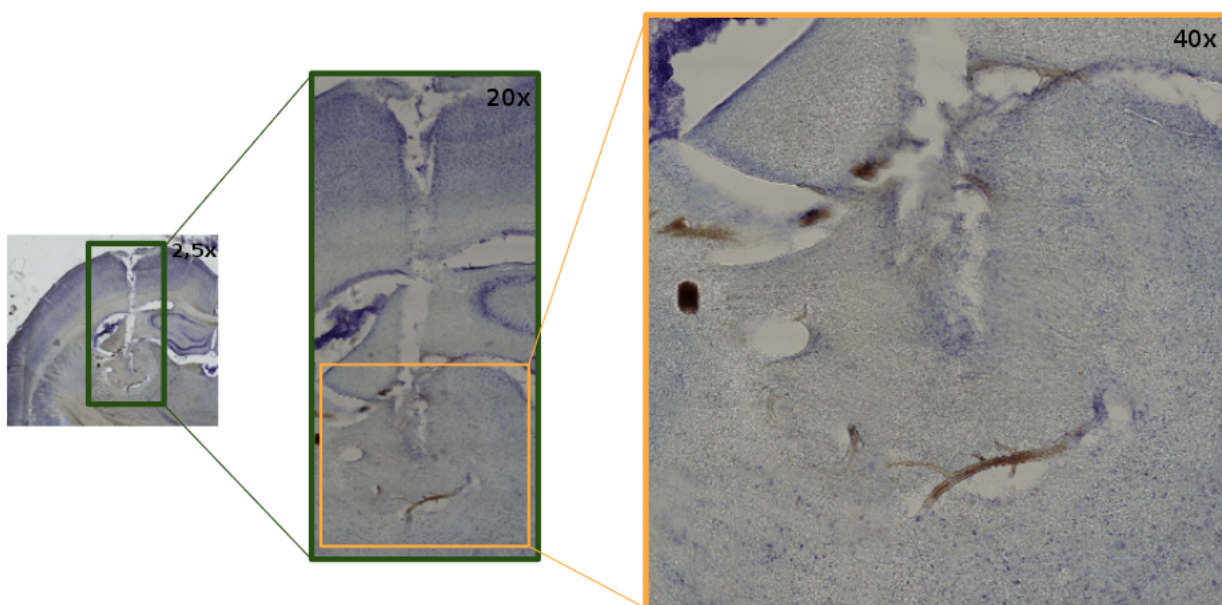
Quanto a alteração tecidual, podemos observar na Figura 5.4 uma linha formando o perímetro da lesão, onde no centro se encontra o fim do rastro do eletrodo. Dentro do círculo há uma região com uma menor concentração do marcador Nissl, e uma área mais central com perda tecidual, esses achados podem ser comparados com o tecido sem lesão exposto na Figura 5.5.

Figura 5.3 – Análise histológica da lesão eletrolítica



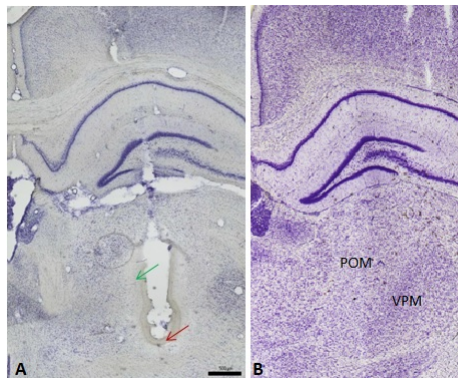
Legenda. Os locais da lesão encontram-se destacados com círculos vermelhos, enquanto que as setas vermelhas apontam para o rastro do eletrodo. A escala das imagens histológicas sobreposta ao atlas encontra-se em milímetros. Cada quadrante corresponde a 1 mm.

Figura 5.4 – Alteração tecidual após aplicação da corrente catódica



Legenda. Exemplo histológico de uma lesão eletrolítica utilizando microscopia óptica nos aumentos de 2,5x; 20x e 40x.

Figura 5.5 – Comparação entre um tecido cerebral com lesão eletrolítica e outro sem lesão



Legenda. A: Lesão eletrolítica no hemisfério direito. Pode-se observar a área da lesão restrita aos núcleos VPM e POM assim como o rastro do eletrodo. Foi destacado com uma seta vermelha o final da região com perda de tecido no eixo dorso-ventral e com a seta verde o término da região com perda neuronal no eixo medio-lateral. B: Imagem adaptada de Paxinos e Watson (2007) marcada com a coloração de Nissl onde se pode observar a área de interesse do estudo em um animal sem lesão eletrolítica.

6 Discussão

O foco principal do trabalho foi desenvolver um modelo de disfunção tátil em roedores. Para tanto, foram comparados métodos de lesão química e eletrolítica em VPM e POM. Dentre estas duas formas de lesão, a lesão eletrolítica foi a que apresentou área da lesão mais homogênea, circular e restrita aos núcleos talâmicos.

6.1 Protocolo de lesão

6.1.1 Método químico

Para os parâmetros químicos testados, apenas o volume de 0,12 μ l de ácido quinolínico foi capaz de produzir uma área de lesão de tamanho suficiente apenas para comprometer um dos núcleos talâmicos (VPM ou POM) de maneira satisfatória. O "diâmetro" máximo da lesão foi de 1mm no eixo dorso-ventral. Mediolateralmente, a área da lesão apresentou diâmetro de no máximo 0.5 mm. Além disso, as bordas da lesão não apresentaram perda tecidual.

Na região lesionada observou-se um aumento de células, possivelmente da glia, secundário a resposta inflamatória, inferido pelo aumento da marcação dos corpúsculos de nissl Figura 5.1 (LUGO-HUITRÓN *et al.*, 2013). O ácido quinolínico é utilizado para a criação do modelo da doença de Huntington por meio da lesão de estrutura subcortical (SCHWARCZ *et al.*, 1983; BEAL *et al.*, 1986). Estes estudos indicam que a aplicação do ácido quinolínico não é citotóxico para a glia, mas gera uma área com necrose tecidual e redução significativa no número de neurônios e complexos sinápticos destas estruturas (PERKINS; STONE, 1982; SCHWARCZ *et al.*, 1983). Estes estudos indicam que as áreas destacadas Figura 5.1 foram lesionadas quimicamente. Contudo, para confirmar os dados dos achados histológicos das lesões é necessário a utilização de marcadores de células neuronais.

Outra observação do método é a correlação direta (Spearman; $r_s = 1.000$; $p < 0,001$) entre o volume do ácido injetado e a área de lesão, Figura 5.2. Esse achado sugere que o protocolo pode ser adaptado para outras abordagens que necessitem de lesão cerebral.

6.1.2 Método eletrolítico

O tempo de trinta segundos de exposição à corrente elétrica foi apropriado desde a primeira tentativa sendo capaz de produzir uma lesão esférica com 1mm de diâmetro. Sabendo-se que o tamanho de VPM e POM é cerca de 1,7mm no eixo anteroposterior e 1mm

no eixo mediolateral (PAXINOS; WATSON, 2007), a lesão representa 58% da extensão anteroposterior e quase a totalidade da extensão mediolateral dos núcleos talâmicos. Contudo, Figura 5.3, apesar da assertividade no tamanho da lesão, ela foi gerada 0,96mm (bregma = -2,64mm/-3.66mm) anterior a área de interesse. Dessa forma, sabendo que as estruturas talâmicas iniciam-se em -2,76mm e terminam em - 4,44mm (PAXINOS; WATSON, 2007), o diâmetro da lesão não seria suficiente para alcançar toda a extensão no sentido anteroposterior, além de ter gerado lesões em estruturas que não foram o objetivo do trabalho. Não obstante, o eletrodo não acertou as coordenadas mediolaterais 3,0mm/2,5mm e no dorsoventral 5mm/5,4mm.

Os resultados da segunda tentativa com a aplicação de dois eletrodos, revela um persistente erro no sentido anteroposterior localizando o eletrodo em 0.48mm mais anterior ao alvo (bregma = -3,12mm/-3.6mm). No sentido mediolateral, o eletrodo mais medial localiza-se em 2,4mm e o outro em 2,8mm da linha média. Ambos mantiveram a coordenada dorsoventral de 5,5mm.

A terceira tentativa corresponde a aplicação de um único eletrodo, sem nenhuma alteração nas coordenadas estabelecidas. O eletrodo se aproximou da zona alvo estando a 0,36mm(bregma = -3,24mm/-3.60mm) mais anterior a coordenada. A localização no sentido mediolateral apresentou desvio lateral de 0.9mm. Blasiak *et al.* (2010) relatou que estes desvios médiolaterais são inerentes à técnica de determinação do bregma durante o processo cirúrgico, e em seu trabalho sugeriu um novo método para uma redução significativa desse desvio que consiste na análise da imagem da superfície do crânio do animal submetido à cirurgia. Neste método os autores substituem a referência da sutura sagital, pelo ponto médio entre as cristas temporais. Além do problema de determinação da coordenada, também é possível observar na mesma lâmina, que o centro da lesão está deslocada na direção dorsal.

Para a quarta tentativa, foi realizada uma alteração da coordenada de 5,4 μ m para 6,8 μ m no eixo dorsoventral com base nas histologias anteriores. Essa mudança resultou no acerto da estrutura neste sentido bem como no sentido anteroposterior (bregma = -3,60mm). Os desvios no sentido mediolateral persistem acarretando em duas coordenadas diferentes para cada hemisfério deste animal. Houve o acerto no hemisfério esquerdo, enquanto que no hemisfério direito há uma falha tanto no mediolateral quanto no dorsoventral , o que pode ser constatado pelo rastro do fio no hemisfério direito.

Quanto aos achados em comum nos tecidos nervosos estudados, foi observado uma região menor com perda tecidual e outra região com alteração tecidual que pode ser observada pela diferença de densidade na marcação de nissl na Figura 5.4. Este mesmo achado foi encontrado em outros estudos que realizaram a lesão eletrolítica em diferentes áreas cerebrais

(MCCUE *et al.*, 2014; KOO *et al.*, 2004; MCKEE *et al.*, 2010), sendo que a área central foi gerada devido a perda do tecido e liberação de gás pela corrente catódica, enquanto que a área mais periférica é uma região provavelmente com tecido cicatricial chamado gliose (GOLD, 1975; PEKNY; NILSSON, 2005; MCKEE *et al.*, 2010). Caracterizando assim, a lesão e perda da função das estruturas alvo, bem como a manutenção da forma e extensão da lesão nas diversas aplicações da corrente elétrica.

O formato e extensão da lesão do presente estudo apresentou-se regular durante as aplicações. Estes achados não foram encontrados em outros estudos como o de Narumi *et al.* (2007). Esse grupo também realizou lesões eletrolíticas em VPM e POM, porém sua abordagem foi um trem de corrente catódica, com 12 pulsos a 0.1Hz, com corrente variando de 20-40mA, aplicado por um eletrodo de tungstenio, em uma duração de cinco segundos. Os resultados das lesões possuíam diferentes formas, além de variar na extensão de suas extremidade, 500 μm à 1000 μm . Em outro estudo que lesionou o núcleo talâmico ventromedial (MCKEE *et al.*, 2010), o complexo talâmico ventromedial e ventrolateral (JELJELI *et al.*, 2003) utilizando abordagens diferentes, também apresentaram variação da forma e da extensão de suas extremidades

6.2 Considerações Finais

Dois métodos testados para lesão dos núcleo VPM e POM se mostraram eficazes: lesão química com a injeção de 0, 12 μl de ácido quinolínico; e a aplicação de uma corrente elétrica por 30 segundos. O método eletrolítico se mostrou mais uniforme quanto a área da lesão e pela perda tecidual e gliose na região afetada. Não foi possível observar alteração comportamental na análise estatística dos animais lesionados na tarefa de exploração de objetos durante o período analisado, mas é possível afirmar que o protocolo eletrolítico não gerou dor.

Com o intuito de aumentar o rigor científico sobre os dados adquiridos é necessário realizar a contagem de células nas áreas lesionadas pela lesão eletrolítica, e aumentar o número amostral para consolidar os dados a respeito da extensão e localização da lesão.

Para esclarecer alguns achados, é necessário que estudos futuros abordem as lesões químicas a partir de marcadores neuronais; e que a lateralidade dos animais seja identificada antes da intervenção lesiva.

Referências

BEAL, M. F.; KOWALL, N. W.; ELLISON, D. W.; MAZUREK, M. F.; SWARTZ, K. J.; MARTIN, J. B. Replication of the neurochemical characteristics of huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 321, n. 6066, p. 168, 1986. Citado na página 27.

BLASIAK, T.; CZUBAK, W.; IGNACIAK, A.; LEWANDOWSKI, M. H. A new approach to detection of the bregma point on the rat skull. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 185, n. 2, p. 199–203, 2010. Citado na página 28.

BRECHT, M.; PREILOWSKI, B.; MERZENICH, M. M. Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behavioural Brain Research*, v. 84, n. 1-2, p. 81–97, 1997. ISSN 01664328. Citado 3 vezes nas páginas 1, 2 e 3.

CARVELL, G. E.; SIMONS, D. J. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 10, n. 8, p. 2638–2648, 1990. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/10/8/2638>>. Citado 2 vezes nas páginas 1 e 2.

CENCI, M. A.; WHISHAW, I. Q.; SCHALLERT, T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nature Reviews Neuroscience*, Nature Publishing Group, v. 3, n. 7, p. 574–579, 2002. Citado na página 13.

CHEN-BEE, C. H.; ZHOU, Y.; JACOBS, N. S.; LIM, B.; FROSTIG, R. D. Whisker array functional representation in rat barrel cortex: transcendence of one-to-one topography and its underlying mechanism. *Frontiers in neural circuits*, v. 6, n. November, p. 93, 2012. ISSN 1662-5110. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3506988&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 11.

CHIAIA, N. L.; RHOADES, R. W.; FISH, S. E.; KILLACKEY, H. P. Thalamic processing of vibrissal information in the rat: II. morphological and functional properties of medial ventral posterior nucleus and posterior nucleus neurons. *J. Comp. Neurol.*, v. 314, n. 2, p. 217–236, 1991. ISSN 0021-9967. Citado na página 8.

CHMIELOWSKA, J.; CARVELL, G. E.; SIMONS, D. J. Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat SmI barrel cortex. *J. Comp. Neurol.*, v. 285, n. 3, p. 325–338, 1989. ISSN 0021-9967. Citado na página 8.

DIAMOND, M. E.; HEIMENDAHL, M. von; KNUTSEN, P. M.; KLEINFELD, D.; AHISSAR, E. 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci*, v. 9, n. 8, p. 601–612, 2008. ISSN 1471-003X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn2411>>. Citado 4 vezes nas páginas 1, 2, 3 e 5.

DÖRFL, J. The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *Journal of Anatomy*, Wiley-Blackwell, v. 135, n. Pt 1, p. 147, 1982. Citado na página 4.

- DORFL, J. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat*, v. 142, p. 173–184, 1985. ISSN 0021-8782. Citado na página 4.
- ELLENBROEK, B.; YOUN, J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease models & mechanisms*, The Company of Biologists Ltd, v. 9, n. 10, p. 1079–1087, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 14.
- ERZURUMLU, R. S.; MURAKAMI, Y.; RIJLI, F. M. Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nature Reviews Neuroscience*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2010. ISSN 1471-003X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn2804>>. Citado na página 2.
- FELDMEYER, D.; BRECHT, M.; HELMCHEN, F.; PETERSEN, C. C. H.; POULET, J. F. A.; STAIGER, J. F.; LUHMANN, H. J.; SCHWARZ, C. Barrel cortex function. *Prog. Neurobiol.*, Elsevier Ltd, v. 103, p. 3–27, 2013. ISSN 03010082. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.11.002>>. Citado 2 vezes nas páginas 6 e 8.
- FELDMEYER, D.; EGGER, V.; LÜBKE, J.; SAKMANN, B. Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single ‘barrel’ of developing rat somatosensory cortex. *The Journal of Physiology*, Wiley Online Library, v. 521, n. 1, p. 169–190, 1999. Citado na página 12.
- FOX, K.; WOOLSEY, T. *Barrel Cortex*. Cambridge University Press, 2008. ISBN 9780521852173. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=ppEkngEACAAJ>>. Citado 5 vezes nas páginas 1, 2, 8, 11 e 12.
- FURUTA, T.; URBAIN, N.; KANEKO, T.; DESCHENES, M. Corticofugal Control of Vibrissa-Sensitive Neurons in the Interpolaris Nucleus of the Trigeminal Complex. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 5, p. 1832–1838, 2010. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4274-09.2010>>. Citado na página 6.
- GHAZANFAR, A. A.; NICOLELIS, M. A. Nonlinear processing of tactile information in the thalamocortical loop. *Journal of neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 78, n. 1, p. 506–510, 1997. Citado na página 4.
- GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; METZKER, M. L.; MUZNY, D. M.; SODERGREN, E. J.; SCHERER, S.; SCOTT, G.; STEFFEN, D.; WORLEY, K. C.; BURCH, P. E. *et al.* Genome sequence of the brown norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 428, n. 6982, p. 493–521, 2004. Citado na página 14.
- GOLD, R. M. Anodal electrolytic brain lesions: How current and electrode metal influence lesion size and hyperphagiosity. *Physiology and Behavior*, v. 14, n. 5, p. 625 – 632, 1975. ISSN 0031-9384. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031938475901912>>. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 29.
- HALL, R. D.; LINDHOLM, E. P. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Research*, v. 66, n. 1, p. 23–38, 1974. ISSN 00068993. Citado na página 10.

- HIPP, J.; ARABZADEH, E.; ZORZIN, E.; CONRADT, J.; KAYSER, C.; DIAMOND, M. E.; KÖNIG, P. Texture signals in whisker vibrations. *Journal of neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 95, n. 3, p. 1792–1799, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 3.
- HOEFLINGER, B. F.; BENNETT-CLARKE, C. A.; CHIAIA, N. L.; KILLACKEY, H. P.; RHOADES, R. W. Patterning of local intracortical projections within the vibrissae representation of rat primary somatosensory cortex. *Journal of Comparative Neurology*, Wiley Online Library, v. 354, n. 4, p. 551–563, 1995. Citado na página 12.
- JELJELI, M.; STRAZIELLE, C.; CASTON, J.; LALONDE, R. Effects of ventrolateral-ventromedial thalamic lesions on motor coordination and spatial orientation in rats. *Neuroscience research*, Elsevier, v. 47, n. 3, p. 309–316, 2003. Citado na página 29.
- JONES, E. G. *The Thalamus*. Springer US, 2012. ISBN 9781461357049. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=WgMdngEACAAJ>>. Citado na página 8.
- KHATRI, V.; BERMEJO, R.; BRUMBERG, J. C.; KELLER, A.; ZEIGLER, H. P. Whisking in air: encoding of kinematics by trigeminal ganglion neurons in awake rats. *Journal of neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 101, n. 4, p. 1836–1846, 2009. Citado na página 5.
- KOO, J. W.; HAN, J.-S.; KIM, J. J. Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, Society for Neuroscience, v. 24, n. 35, p. 7654–7662, 2004. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/24/35/7654>>. Citado na página 29.
- KRUPA, D. J.; MATELL, M. S.; BRISBEN, a. J.; OLIVEIRA, L. M.; NICOLELIS, M. a. Behavioral properties of the trigeminal somatosensory system in rats performing whisker-dependent tactile discriminations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 21, n. 15, p. 5752–5763, 2001. ISSN 1529-2401. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 3.
- LEISER, S. C.; MOXON, K. A. Responses of trigeminal ganglion neurons during natural whisking behaviors in the awake rat. *Neuron*, Elsevier, v. 53, n. 1, p. 117–133, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 4 e 5.
- LUGO-HUITRÓN, R.; MUÑIZ, P. U.; PINEDA, B.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; RÍOS, C.; CRUZ, V. Pérez-de la. Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxidative medicine and cellular longevity*, Hindawi Publishing Corporation, v. 2013, 2013. Citado na página 27.
- MCCUE, M. G.; LEDOUX, J. E.; CAIN, C. K. Medial amygdala lesions selectively block aversive pavlovian-instrumental transfer in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 8, p. 329, 2014. ISSN 1662-5153. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00329>>. Citado na página 29.
- MCKEE, B. L.; KEYGHOBADI, M.; POTERIE, A. P. T. D. L.; MESHUL, C. K. Lesion of the ventromedial nucleus of the thalamus blocks acute cocaine-induced changes in striatal glutamate. *synapse*, Wiley Online Library, v. 64, n. 6, p. 445–448, 2010. Citado na página 29.

NAKAMURA, S.; NARUMI, T.; TSUTSUI, K.-I.; IJIMA, T. Difference in the functional significance between the lemniscal and paralemniscal pathways in the perception of direction of single-whisker stimulation examined by muscimol microinjection. *Neuroscience Research*, v. 64, n. 3, p. 323–329, 2009. ISSN 01680102. Citado 3 vezes nas páginas 2, 3 e 10.

NARUMI, T.; NAKAMURA, S.; TAKASHIMA, I.; KAKEI, S.; TSUTSUI, K.-I.; IJIMA, T. Impairment of the discrimination of the direction of single-whisker stimulation induced by the lemniscal pathway lesion. *Neuroscience Research*, v. 57, n. 4, p. 579–586, 2007. ISSN 01680102. Citado 4 vezes nas páginas 2, 3, 10 e 29.

NICOLELIS, M. A.; BACCALA, L. A.; LIN, R. C.; CHAPIN, J. K. Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system. *Science*, The American Association for the Advancement of Science, v. 268, n. 5215, p. 1353, 1995. Citado na página 4.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Elsevier Science, 2007. ISBN 9780080475134. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=4OBQ8wpK0usC>>. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 28.

PEKONY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, Wiley Online Library, v. 50, n. 4, p. 427–434, 2005. Citado na página 29.

PERKINS, M.; STONE, T. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain research*, Elsevier, v. 247, n. 1, p. 184–187, 1982. Citado na página 27.

PIERRET, T.; LAVALLÉE, P.; DESCHÊNES, M. Parallel streams for the relay of vibrissa information through thalamic barreloids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 20, n. 19, p. 7455–7462, 2000. ISSN 1529-2401. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 12.

RITT, J. T.; ANDERMANN, M. L.; MOORE, C. I. Embodied information processing: vibrissa mechanics and texture features shape micromotions in actively sensing rats. *Neuron*, Elsevier, v. 57, n. 4, p. 599–613, 2008. Citado na página 5.

SCHWARCZ, R.; WHETSELL, W. O.; MANGANO, R. M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 219, n. 4582, p. 316–318, 1983. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 27.

SHEPHERD, S. G. *Handbook of Brain Microcircuits*. Oxford University Press, 2010. ISBN 9780199780334. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=61lcGm7uhLgC>>. Citado na página 11.

SOSNIK, R.; HAIDARLIU, S.; AHISSAR, E. Temporal frequency of whisker movement. I. Representations in brain stem and thalamus. *Journal of neurophysiology*, v. 86, n. February, p. 339–353, 2001. ISSN 0022-3077. Citado na página 10.

STÜTTGEN, M. C.; KULLMANN, S.; SCHWARZ, C. Responses of rat trigeminal ganglion neurons to longitudinal whisker stimulation. *Journal of neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 100, n. 4, p. 1879–1884, 2008. Citado na página 5.

SZWED, M.; BAGDASARIAN, K.; AHISSAR, E. Encoding of vibrissal active touch. *Neuron*, Elsevier, v. 40, n. 3, p. 621–630, 2003. Citado 3 vezes nas páginas 2, 3 e 5.

THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, Elsevier, v. 51, n. 3, p. 503–512, 1987. Citado na página 14.

VEINANTE, P.; DESCHÊNES, M. Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. *J. Neurosci.*, v. 19, n. 12, p. 5085–5095, 1999. ISSN 1529-2401. Citado 3 vezes nas páginas 7, 8 e 11.

WELKER, C. Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 166, n. 2, p. 173–89, 1976. ISSN 0021-9967. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/770516>>. Citado na página 11.

WOOLSEY, T. A.; Van der Loos, H. The structural organization of layer iv in the somatosensory region (s i) of mouse cerebral cortex. *Brain Research*, v. 17, n. 2, p. 205–242, jan 1970. ISSN 00068993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689937090079X>>. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 11.

YU, C.; DERDIKMAN, D.; HAIDARLIU, S.; AHISSAR, E. Parallel thalamic pathways for whisking and touch signals in the rat. *PLoS biology*, v. 4, n. 5, p. e124, may 2006. ISSN 1545-7885. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16605304><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1436027>>. Citado na página 10.

ZUCKER, E.; WELKER, W. Coding of somatic sensory input by vibrissae neurons in the rat's trigeminal ganglion. *Brain research*, Elsevier, v. 12, n. 1, p. 138–156, 1969. Citado 4 vezes nas páginas 2, 3, 4 e 5.

Anexos

A Artigo publicado

REVIEW

Robotic assisted gait as a tool for rehabilitation of individuals with spinal cord injury: a systematic review.

Ledycnarf J Holanda^{1*}, Patrícia MM Silva¹, Thiago C Amorim¹, Matheus O Lacerda^{1,2}, Camila R Simão^{1,2} and Edgard Morya¹

*Correspondence:

fisioledyholanda@gmail.com

¹Neuroengineering Program.

Edmond and Lily Safrá

International Neuroscience

Institute, Santos Dumont

Institute, Rodovia RN 160, 3001

– Distrito Jundiá, 59280-000

Macaíba, BRA

²Federal University of Rio

Grande do Norte, Av. Sen.

Salgado Filho – Lagoa Nova,

59078-970 Natal, BRA

Full list of author information is
available at the end of the article

Abstract

Background: Spinal cord injury (SCI) is characterized by total or partial deficit of sensory and motor pathways. Impairments of this injury compromise muscle recruitment and motor planning, thus reducing functional capacity. SCI patients commonly present psychological, intestinal, urinary, osteomioarticular, tegumentary, cardiorespiratory and nervous alterations that aggravate in chronic phase. One of the neurorehabilitation goals is the restoration of these abilities by favoring improvement in quality of life and functional independence. Current literature highlights several benefits of robotic gait therapies in SCI individuals.

Objectives: The purpose of this study was to feature the robotic devices used, systematize the knowledge about scientific evidences that used these devices as a tool for rehabilitation of SCI individuals.

Methods: A systematic review was carried out in which relevant articles were identified by searching the following databases: Cochrane Library, PubMed, PEDro and Capes Periodic. Two authors selected the articles, which used robotic device for rehabilitation of spinal cord injury independent of the publication year.

Results: The robotic devices used in the research presented distinct features, with increasing application in the last years. Databases search found 2,941 articles, 39 articles were included due to met the inclusion criteria. Studies have shown promising results regarding the reduction of pain perception and spasticity level; alteration of the proprioceptive capacity, sensitivity to temperature, vibration, pressure, reflex behavior, electrical activity at muscular and cortical level, classification of the injury level; increase in walking speed, step length and distance traveled; improvements in sitting posture, intestinal, cardiorespiratory, metabolic, tegmental and psychological functions.

Conclusions: This systematic review shows significant progress encompassing robotic devices as an innovative and effective alternative therapy for the rehabilitation of individuals with SCI.

Keywords: robotic assisted gait; spinal cord injury; rehabilitation

Background

In the world, around 250 to 500 thousands people suffer spinal cord injury (SCI) every year. SCI is caused by a damage in neural structures of the spinal cord, such as medulla, medullary cone and/or cauda equina. Tissue lesions are mostly due to mechanical impact, laceration, compression, transection, infection or spinal cord degeneration. SCI is classified in two categories: incomplete or complete. The first

is determined by motor and sensory partial preservation and reduced electromyographic (EMG) signal below the injured level, whereas the second is determined by a complete loss of sensorimotor activity and EMG signal below the level of lesion [1, 2]. The sensorial input and motor output are reduced or absent in SCI patients. Thus, muscular recruitment and motor planning become compromised, which leads to a reduced functionality [3, 4]. Chronic SCI patients are predisposed to secondary complications such as psychological, bowel, urinary, musculoskeletal, neuronal, cutaneous and cardiorespiratory [1, 4, 5]. Therefore, one of the challenges in neurorehabilitation to restore functional independence and quality of life is the recovery of planning and executing the movement again [2, 6]. Restoration of locomotor function is one of the rehabilitation aims in SCI patients. Body weight support (BWS) over a treadmill associated with manual assistance leads to therapist physical exhaustion. According to the idea of improving rehabilitation, orthotic devices aligned to anatomic axes of lower limb have been developed. This may reduce professional physical exhaustion and bring new outcomes to rehabilitation [6, 7]. As a result, many studies that investigate the therapeutic effects of these orthotics devices have been published. Several researchers identified that robotic assisted gait training (RAGT) in SCI patients improved cardiorespiratory, urinary, musculoskeletal, neuronal and somatosensory system, due to body compensation and neural plasticity [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Therefore, this review aims to compare advantages, disadvantages, and requirements for use of robotic devices, systematize the knowledge about scientific evidences, which used these devices as a tool for rehabilitation of SCI individuals. It is expected that this knowledge compilation may support more therapies as well as further researches aiming to improve organic function and quality of life of SCI patients.

Methods

Literature search

The following databases were searched between February 15th and July 21st, 2016: Cochrane Library, PubMed, PEDro and Periódico Capes and the manuscript was drafted from July 25th to December 23th, 2016. To guarantee the most accurate keywords, it was conducted a search in Medical Subject Headings (MeSH) with spinal cord injury, tetraplegic, paraplegic, lower limbs paralysis and lower extremity paralysis associated with "body weight support", "assisted gait", "driven gait orthosis", "orthotic gait training", "gait training", "robotic gait", "exoskeleton", "treadmill rehabilitation", "walking", "gait", "locomotion", "overground walking", "robotic assisted gait", "robotic assisted gait training", "treadmills", "physiotherapy", "physical therapy", "locomotion therapy", "robotic assisted gait therapy", "locomotor treatment".

Selection of trials

The two authors/ physical therapists selected the relevant articles, according to the following pre-established criteria. Relevant researches were identified, and included only publication in English, Portuguese and Spanish. Exclusion criteria: reviews, duplicates and not full article. All papers which used a robotic device for spinal cord injury rehabilitation were included independent of the publication year.

Data synthesis and results

The literature search undertaken yielded 2,941 records, of which initially, the titles and abstracts were read and excluded the duplicate articles. In addition, articles were excluded since they were not available and review articles, resulting in 240 full articles to read. The articles that did not use robotic device were excluded. Thus, after careful analysis, 39 articles were included in full-text format. Figure 1 (see Figures: Figure 1) illustrates the PRISMA flowchart of the results from the literature search performed by three authors/ physical therapists followed guidelines for scale's application as shown.

Table 1 shows robotic devices features used in the research (see Figures: Figure 2) presented distinct features and increase application in individuals rehabilitation with spinal cord injury in the last years (see Figures: Figure 3).

Further, are shown tables with the corresponding items to the study design, patients' demography, outcome measures, rehabilitation and results of each article inserted in this review. Moreover, the articles were split into Table groups according to main outcome measured: (2) cardiorespiratory and metabolic parameters, (3) parameters of reflex behavior, (4) kinetic and kinematic parameters in gait evaluation, and (5) evaluation parameters of neurological function recovery, and listed according to the publication year in ascending order (see Additional file 1: Table 2, Additional file 2: Table 3, Additional file 3: Table 4, Additional file 4: Table 5).

Table 1 Robotic device(s) feature(s)

Robotic device(s)	Advantage(s)	Disadvantage(s)	Requirements
Welwalk WW-1000 [14]	• Treadmill system with BWS. • Video monitor up front. • Possibility to deliver different LOA, depending on the rehab needs of each patients.	• Not portable. • Designed for use with trained professional supervision.	• Patients with lower limb paralysis. • Device's sensors would be able to adjust to the user by monitoring their walking pattern.
ARGO [9, 15]	• Allows hip flexion of a lower limb to the lower contralateral member through a reciprocal bond. • Propulsive forces are provided by the trunk and upper limb muscles. • Possibility to add a BWS to encourage correct stride practice.	• Gait pattern is not physiologic.	• Requires high load on the upper limb joints. • Excessive energy expenditure due to the use of devices to assist gait such as crutches to help walk.
LokomatPRO (without FreeD module) [16, 17, 18]	• Can be configured to ensure safe treadmill training. • Present assistance to practice a physiological gait pattern at all phases. • BWS, exoskeleton aligned to the hip joints and lifters keep the ankle in neutral position. • Regulate the assistance according to the individual's physiological responses to the therapy. • Used to measure isometric force (torque), stiffness of the patient's joints while the legs are passively moved at 30, 60 and 90°/s, and PROM. • Reduction of the physical load on the therapist/patient. • More efficient for gait training.	• Heavy. • Not portable. • Designed to use with trained professional supervision. • Lokomat offers only four degrees of freedom (DOFs), hip and knee flexion-extension. • Not compatible with Pediatric Orthoses.	• Orthosis not adapted for the lower limbs. • Body weight up to 135 kg. • Severe contractures. • Bone instability. • Open skin lesions in the area of the lower limbs and torso. • Circulatory and cardiac problems. • Uncooperative or (self-)aggressive behavior, such as transitory syndrome. • Severe cognitive deficits. • Patients (with long-term) infusions. • Mechanical ventilation. • Patients with extremely disproportionate growth of the legs and/or spinal column (e.g. bone or cartilage dysplasia). • Severe vascular disorders of the lower limbs. • In general, patients who have been ordered to remain in bed or immobile due to, for instance, osteomyelitis or other inflammatory/infectious disorders. • Hip, knee, ankle arthrodesis.

Lokomat FreeD Module [19, 20]	• Allows lateral translation and transverse rotation of the pelvis and hip and knee flexion-extension. • Patients can activate their core muscles and experience balance aspects. • More efficient for gait training. • Reduction of the physical load on the therapist/patient.	• Heavy and not portable. • Designed to use with trained professional supervision. • More expensive than LokomatPRO. • Not compatible with Pediatric Orthoses.	• Body weight up to 135 kg. • Severe contractures. • Bone instability. • Open skin lesions in the area of the lower limbs and torso. • Circulatory and cardiac problems. • Uncooperative or (self-)aggressive behavior, such as transitory syndrome. • Severe cognitive deficits. • Patients (with long-term) infusions. • Mechanical ventilation. • Patients with extremely disproportionate growth of the legs and/or spinal column (e.g. bone or cartilage dysplasia). • Severe vascular disorders of the lower limbs. • In general, patients who have been ordered to remain in bed or immobile due to, for instance, osteomyelitis or other inflammatory/infectious disorders. • Hip, knee, ankle arthrodesis.
LOPES [21, 22]	• Offers DOF with two actuated rotation axes in the hip and knee joints (hip abduction/adduction, hip and knee flexion/extension). • Passive foot lifters can be added to keep dorsi-flexion ankle. • Reduction of the physical load on the therapist/patient. • More efficient for gait training.	• Heavy and not portable. • Designed to use with trained professional supervision.	• Severe contractures. • Bone instability. • Open skin lesions in the area of the lower limbs and torso. • Cardiac and circulatory contraindications • Severe cognitive deficits. • Hip, knee, ankle arthrodesis.
EKSO [23, 24, 25, 26, 27]	• Exoskeleton framework for the lower limbs with electric motors to power movement for the hip and knee joints. • Passive spring-loaded ankle joints. • Foot plates to user stand. • Backpack that houses a computer. • Battery supply. • Wired controller. • Portable. • Provides support from the posterior pelvis to the upper back.	• Subjects can walk at their own natural pace. • Requires gait assistance devices such as crutches resulting in high load on the upper limb joints and excessive energy expenditure. • A step will not be triggered unless both crutches are firmly on the ground.	• Not present severe orthostatic hypotension, significant cardiac or vascular disease and integumentary issues such as open wounds. • No pregnancy. • Not present significantly declined bone density as indicated by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) or a history of pathological fractures. • The Ekso rests in during setup for patients which can not be able to be transferred without a harness or lift to the chair. • Patients which do not present either bilateral upper-extremity strength or one functional upper extremity and one functional lower extremity. • Patients with contractures greater than 10 in the hip or knee joint, leg length differences more than 2 cm, or total hip replacements.

Brain-controlled robotic exoskeleton (EXO) [11]	• Attach to the user's body with straps over the dorsum of the foot, anterior shin and thigh, abdomen, and anterior shoulders. Adjustable to the user's leg and thigh length. The segment across the pelvis is adjustable for hip width and hip abduction angle. • Can be used for assistance and rehabilitation of patients with various levels of lower extremity weakness.		
	• 12 DOFs. • Can be associated with BWS, sensory feedback and pressure sensors, wire sensors, gyroscopes and EEG. • Designed to be anatomically coherent with the body of individual, because hip-to-knee segments of the legs could be adjusted to accommodate a variety of different leg lengths.	• Heavy.	• Not requires muscles strength of upper limbs and trunk, and postural control to execute gait, because stabilization is done automatically by EXO.
WPAL [28]	• Motors located at both hip, knee and ankle joints. • Exoskeleton and walker are placed at a convenient location suitable for walking (e.g. bedroom). • Other robotic parts can be added by the user in the wheelchair. • Robot can be folded into a roller bag and transported to anywhere. • Six DOFs (flexion-extension of bilateral hip, knee and ankle joints). • It can be used in uneven surfaces.	• Requires a moderate energy expenditure due total weight of the robotic orthosis (around 13 kg).	• The user will partially depend on crutches, or a walker to support their weight and maintain balance, joint angles and foot contact forces, which are often recorded to monitor basic gait performance. • Requires high load on the upper limb joints and excessive energy expenditure due to a need for gait assistance devices such as crutches to help walk. • Height patient between 145 – 191 cm and a body weight up to 136 kg. • Requires torso muscle strength.

HAL [29, 26]	• Present a frame and robotic actuators that attach to the patient's legs. • Joint movement is supported by electric motors. • Initiate by minimal bioelectrical signals detected via surface EMG electrodes measured in the hip and knee extensor and flexor muscles. • Allows voluntary robotic support movements, treadmill system and BWS.	• Expensive.	• The trunk is not secure in the orthosis and require trunk muscle strength. • Requires a high load on the upper limb joints and excessive energy expenditure due to a need for gait assistance devices such as crutches to help walk.
ReWalk [30, 26, 27]	• Powered exoskeleton that bilaterally controls the movements at the hip and knee joints (ankles are articulated with spring-assisted dorsiflexion), battery unit, computer-based controller contained in a backpack, wireless mode selector, sensors that measure upper-body tilt angle, joint angles, and ground contact. • The exoskeleton is articulated to footplates distally and to a sacral band proximally. • Additional modes include sit-to-stand, stand-to-sit, up and down stairs.	• Expensive. • Gait pattern is not physiological. • Due to standing up/sitting down with the crutches, the device exerts pressure at the bend of the elbow and present risk of bruises. • Requires walking aids (crutches or a walker) to ensure stability and safety of the user. • The gait is a three-point pattern.	• Requires high load on the upper limb joints. • Requires torso stability. • Excessive energy expenditure due to a need for gait assistance devices during walk. • Body weight up to 100 Kg, and height between 160 - 190 cm.
Indego [31, 32]	• Enables to help sitting, walking, and standing as well as sit-to-stand, stand-to-walk, walk-to-stand, and stand-to-sit transitions or sit with 100% powered robotic assistance. • Developed based on the user's ability to affect its center of pressure via the use of the upper body in combination with a stability aid.	• Expensive.	• Excessive energy expenditure due to a need for gait assistance devices such as crutches to help walk. • Height range 155 – 191 cm. • Body weight up to 113 kg. • Maximum hip width 42.2 cm. • Femur length range 35 – 47 cm. • Spasticity score: Modified Ashworth score 3 or lower. • It is necessary sufficient upper body strength to balance and support the forearms crutches, front-wheeled walker or platform walker. • For complete and incomplete spinal cord injured individuals T4 or below.

- Enables users and clinicians adjust the device settings and to view session progress.
- A Bluetooth LE radio allows communication between the Indego and iPhone or iPod touch through the custom Indego iOS application.

Mindwalker [33, 34, 35]

- Walk on the treadmill associated to BWS.
- Based on human anatomy and joint ROM, the desired DOF (five at each leg) and joint ROM for the exoskeleton are specified to allow sitting, standing, and walking.
- Three DOFs (hip ab/adduction, hip flex/extension and knee flex/extension) in each leg.
- Powered by series elastic actuators and two DOFs (hip endo/exorotation and ankle dorsi/plantarflexion);
- Passively sprung with certain stiffness (800 and 180 Nm/rad, respectively).
- The target maximal walking speed is 0.8 m/s.
- Controlled by excitation signals from the brain, which provide kinematics for controlling the exoskeleton. In this exoskeleton, steady-state visually evoked potential modality of control is based on visual stimulation. This is an intention-based control exoskeleton: light-emitting diodes blinking at four different frequencies are used to indicate the intention of the patient to initiate, terminate, halt, or walk at a faster or slower pace.
- Expensive.
- Heavy, weighing approximately 28kg.
- Excessive energy expenditure due to a need for gait assistance devices such as crutches.
- Patient height between 1.53 - 1.88 m.
- Hip width up to 0.44 m.
- Patient weight up to 100 kg.
- Requires high load on the upper limb joints.
- Excessive energy expenditure due to a need for gait assistance devices.

Discussion and conclusions

The primary goal of this study was to conduct a systematic review of scientific evidence related to the use and features of robotic devices in rehabilitation of patients with SCI. From this study, it is possible to base and guide news prospects for rehabilitation and research, in view of the numerous benefits that this type of therapy is able to provide.

Robotic devices are technologies in constant evolution that may offer a paradigm change in the treatment of individuals with motor impairments [35]. The studies included in these review cited advantages and disadvantages in relation to the use these devices, which should be considered to select the appropriate tool for each individual due to the peculiarity of the requirements for its use.

The devices cited in this review may be applied in indoor or outdoor environments, considering different DOFs, levels of GF, physical efforts demand and higher energy expenditure. The Welwalk WW-1000, LokomatPRO (without FreeD module), LokomatPRO FreeD module and LOPES present as main characteristics equipment the high weight, use in indoor environments, possibility to add BWS and treadmill training. Additionally, possibility of use only with trained professional and user with body weight up to 135 kg and DOFs of LOE [14, 18, 19, 21, 22, 33]. Although the ARGO, EKSO, WPAL, HAL, Indego and ReWalk can be used either in outdoor and indoor environments, the gait training do not reproduce the physiological gait pattern. These equipments require high load on the upper limb joints, trunk muscles strength and excessive energy expenditure due to need for gait assistance devices such as crutches or a walker to ensure stability and safety of the user [9, 15, 30, 23, 27, 28, 29, 26]. The EXO does not require muscles strength of upper limbs and trunk, and postural control to execute gait and it is flexible to adjust in a variety of different leg lengths [11].

Moreover, these studies demonstrated that this type of intervention is able to provide benefits that exceed improvement of sensorimotor functions of this population. Among these changes are included, improvements in activity performance, postural control, cardiorespiratory, metabolic functions and urinary and bowel functions. Emphasizing promising results related to changes positively impact functional independence resulting in high quality of life. In addition, the changes found in urinary and bowel functions are directly related to the improvements of psychological characteristics of the population.

The rehabilitation protocol based on specific task enhances neuroplasticity in individuals with clinical diagnosis of SCI. In this case, it is important to consider the rehabilitation parameters used, which should be related to the injury level, classification, and the secondary changes. During any training session, the BWS level was selected as the minimum amount of assistance that would not create excessive knee flexion during posture or drag during the swing that was diminished by 5% of BWS. In the inserted studies, BWS initial was averaged 60% and lasted 45-50%. The weekly frequency predominance was 2-3 times per week with low to moderate intensity. The initial treadmill varied between 0.22 and 0.56 m/s and, increased by 0.02 m/s. Some studies have graded treadmill speed, GF and BWS according to HR, VO_2 and MET of each individual.

Numerous studies revealed changes below the level of injury with multiple variables observed in the course of its protocol corroborating with results that indicate reduced the perception of pain and spasticity level [36, 37]. Likewise, it was observed changes in the proprioceptive ability, sensitivity to temperature, vibration, pressure, behavior reflex, electrical activity of muscle and cortical level [32, 38, 39, 10, 40, 41, 42, 43, 11, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50] and changes in the level of injury classification. Further, recovery of motor function; increased stability and strength of thoracic muscles and lumbar region [15]; functional improvements in skills in sitting posture and gait, in the bowel and urinary function, cutaneous and psychological. Therefore, positively impacting the performance of their routine activities, making these individuals with higher level of functional independence [11].

One study [17] suggests that the RAGT associated with anabolic medicine do not promote alterations in bone mineral density (BMD) index, although another study [11] found divergent results revealing that half of participants showed no change while the other half obtained a small evolution without relation to the improvement of neurological aspect.

Rehabilitation improvements of an individual with SCI, involves cardiorespiratory fitness, which is important in improving the quality of life as well as contributing to a better performance in routine activities. It was observed that improvements in this aspect provides a better performance of gait related to increase walking speed, stride length, distance walked [51, 9, 28, 52, 53, 54], related to reduction of HR, BF, MET and VO_2 . Studies [30, 32, 16, 55] found a VO_2 and HR variation when compared these parameters in sitting and orthostatic positions. Further, it was observed that the higher GF applied to assist walking, the lower HR and MET, suggesting that the RAGT interferes in the increase of energy expenditure, this is capable to provide metabolic and cardiorespiratory benefits for this population.

In conclusion, studies shows significant progress in development of robotic devices to be available for indoor and outdoor environments. It is hoped that in future is devices to be used that during therapy and routine. Scientific evidences show significant progress encompassing RAGT as an innovative and effective alternative therapy for the rehabilitation of individuals with SCI, achieving promising results from improvements in cardiorespiratory, musculoskeletal, intestinal, urinary, neural, somatosensory and psychological functions. One of the important features of this type of treatment is to be a specific task-based therapy with motor learning improvements and neuroplasticity, and reducing complications secondary injury.

Abbreviations

ABC: Activities-Specific Balance Confidence; AH: abductor hallucis; AIS: American Spinal Injury Association impairment scale; ARGO: advanced reciprocating gait orthosis; AROM: active range of motion; BDI: Beck Depression Inventory; BF: breathing frequency; BFM: biceps femoris; BMD: bone mineral density; BWS: body weight support; CF: crutch force; CG: control group; COPM: Canadian Occupational Performance Measure; DF: dorsi-flexors; DELTa: anterior deltoid; DELTp: posterior deltoid; DGO: driven gait orthosis; DFO: degrees of freedom; DXA: Dual-energy x-ray absorptiometry; EAW: exoskeletal - assisted walking; ECU: extensor carpi ulnaris; EEG: electroencephalogram; EMG: electromyographic; EXO: FAC: functional ambulation category; FES-1: falls efficacy scale; FET: figure eight scale; FCU: flexor carpi ulnaris; FIM: functional independence measure; FSR: Force-sensitive resistors; GMM: Growth Mixture Modeling; GRC: gracilis; GTX: graded exercise test; GF: guidance force; HAL: hybrid assistive limb; HR: heart rate; HS: healthy subject; IPAQ: Impact on Participation and Autonomy Questionnaire; LEMS: Lower Extremity Motor Score; LH: lateral hamstrings; LOA: level of assistance; LSQ: Life Satisfaction Questionnaire; LTSO: thoracolumbosacral orthosis; MCF: mean crutch force; MeSH: Medical Subject Headings; MET: metabolic equivalents; MG: medial gastrocnemius; MH:

medial hamstrings; MVC: maximal voluntary contraction; PCF: peak crutch force; PCI: physiological cost index; PF: plantar-flexion; PL: peroneus longus; P1NP: intact aminoterminal propeptide of type I procollagen; ppSEP: paired pulse somatosensory evoked potentials; PROM: passive range of motion; PTH: Parathyroid hormone; RAGT: Robotic assisted gait training; RF: rectus femoris; ROM: range of motion; RPE: rate of perceived exertion; SCI: spinal cord injury; SCI-FAP: Spinal Cord Injury-Functional Ambulation Profile; SCIM: Spinal Cord Independence Measure; SHO: sides of the acromium; SOL: soleus; SpO₂: Saturation of Peripheral Oxygen; SR: spinal reflex; ST: semitendinosus; TA: tibialis anterior; TLSO: thoracolumbosacral orthosis; TUGT: Timed up and go test; UEMS: upper extremity motor score; VAS: visual analog scale; VE: pulmonary ventilation; VEL: hip angular velocity; VL: vastus lateralis; VM: vastus medialis; VO₂: oxygen uptake; VO₂peak: peak cardiorespiratory capacity; VP: velocity peak; WISCI II: Walking index for spinal cord injury II; WPAL: Wearable Power-Assist Locomotor; 2MWT: 2-minute walk test; 10 MWT: 10-meter walk test; 6MWT: 6 min walk test.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

LJH reviewed the technical and clinical literature, and drafted the manuscript. MOL reviewed the technical and clinical literature and drafted the manuscript. TCO, PMMS, CRS and EM drafted the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Santos Dumont Institute (ISD), the Brazilian Ministry of Education (MEC) for their assistance during the research.

Author details

¹Neuroengineering Program. Edmond and Lily Safra International Neuroscience Institute, Santos Dumont Institute, Rodovia RN 160, 3001 – Distrito Jundiaí, 59280-000 Macaíba, BRA. ²Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Sen. Salgado Filho – Lagoa Nova, 59078-970 Natal, BRA.

References

1. WHO: WHO | Spinal cord injury (2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/en/> Accessed 2016-09-12
2. Nas, K., Yazmalar, L., Şah, V., Aydın, A., Öneş, K.: Rehabilitation of spinal cord injuries. *World journal of orthopedics* **6**(1), 8–16 (2015). doi:10.5312/wjo.v6.i1.8
3. Frood, R.T.: The use of treadmill training to recover locomotor ability in patients with spinal cord injury. *Bioscience Horizons* **4**(1), 108–117 (2011). doi:10.1093/biohorizons/hzr003
4. Van Hedel, H.J.A., Dietz, V.: Rehabilitation of locomotion after spinal cord injury. *Restorative Neurology and Neuroscience* **28**(1), 123–134 (2010). doi:10.3233/RNN-2010-0508
5. Louie, D.R., Eng, J.J., Lam, T.: Gait speed using powered robotic exoskeletons after spinal cord injury: a systematic review and correlational study. *Journal of neuroengineering and rehabilitation* **12**(1), 82 (2015). doi:10.1186/s12984-015-0074-9
6. Mirbagheri, M.M., Patel, C., Quiney, K.: Robotic-assisted locomotor training impact on neuromuscular properties and muscle strength in Spinal Cord Injury. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, 4132–4135 (2011). doi:10.1109/IEMBS.2011.6091026
7. Schwartz, I., Sajina, a., Neeb, M., Fisher, I., Katz-Luerer, M., Meiner, Z.: Locomotor training using a robotic device in patients with subacute spinal cord injury. *Spinal Cord* **49**(10), 1062–1067 (2011). doi:10.1038/sc.2011.59
8. Schwartz, I., Meiner, Z.: Robotic-Assisted Gait Training in Neurological Patients: Who May Benefit? *Annals of Biomedical Engineering* **43**(5), 1260–1269 (2015). doi:10.1007/s10439-015-1283-x
9. Kawashima, N., Taguchi, D., Nakazawa, K., Akai, M.: Effect of lesion level on the orthotic gait performance in individuals with complete paraplegia. *Spinal cord : the official journal of the International Medical Society of Paraplegia* **44**(8), 487–494 (2006). doi:10.1038/sj.sc.3101941
10. Bolliger, M., Trepp, A., Zörner, B., Dietz, V.: Modulation of spinal reflex by assisted locomotion in humans with chronic complete spinal cord injury. *Clinical Neurophysiology* **121**(12), 2152–2158 (2010). doi:10.1016/j.clinph.2010.05.018
11. Donati, A.R.C., Shokur, S., Morya, E., Campos, D.S.F., Moiola, R.C., Gitti, C.M., Augusto, P.B., Tripodi, S., Pires, C.G., Pereira, G.A., Brasil, F.L., Gallo, S., Lin, A.A., Takigami, A.K., Aratana, M.A., Joshi, S., Bleuler, H., Cheng, G., Rudolph, A., Nicoletis, M.A.L.: Long-Term Training with a Brain-Machine Interface-Based Gait Protocol Induces Partial Neurological Recovery in Paraplegic Patients. *Scientific Reports* **6**(April), 30383 (2016). doi:10.1038/srep30383
12. Aach, M., Cruciger, O., Sczesny-Kaiser, M., Höffken, O., Meindl, R.C., Tegenthoff, M., Schwenkreis, P., Sankai, Y., Schildhauer, T.A.: Voluntary driven exoskeleton as a new tool for rehabilitation in chronic spinal cord injury: a pilot study. *The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society* **14**(12), 2847–2853 (2014). doi:10.1016/j.spinee.2014.03.042
13. Chisholm, A.E., Malik, R.N., Blouin, J.-S., Borisoff, J., Forwell, S., Lam, T.: Feasibility of sensory tongue stimulation combined with task-specific therapy in people with spinal cord injury: a case study. *Journal of neuroengineering and rehabilitation* **11**(1), 96 (2014). doi:10.1186/1743-0003-11-96
14. Toyota Releases New Robotic Rehab System for Lower Limb Paralysis. http://www.medgadget.com/2017/04/toyota-releases-new-robotic-rehab-system-lower-limb-paralysis.html_links.html Accessed 2017-05-20
15. Arazpour, M., Gharib, M., Hutchins, S.W., Bani, M.A., Curran, S., Mousavi, M.E., Saberi, H.: The influence of trunk extension in using advanced reciprocating gait orthosis on walking in spinal cord injury

- patients: A pilot study. *Prosthetics and orthotics international* **39**(4), 286–292 (2015). doi:10.1177/0309364614531010
16. Fenuta, A.M., Hicks, A.L.: Metabolic demand and muscle activation during different forms of bodyweight supported locomotion in men with incomplete SCI. *BioMed Research International* **2014** (2014). doi:10.1155/2014/632765
 17. Gordon, K.E., Wald, M.J., Schnitzer, T.J.: Effect of parathyroid hormone combined with gait training on bone density and bone architecture in people with chronic spinal cord injury. *Pm R* **5**(8), 663–671 (2013). doi:10.1016/j.pmrj.2013.03.032
 18. AG, H.: Lokomat System. (2009)
 19. Lokomat FreeD Module. http://knowledge.hocoma.com/fileadmin/user_upload/clinical_practice/lokomatL_QA_37_FreeD_vs_noFreeD_diff_27022015.pdf_links.html Accessed 2017-05-20
 20. Aurich-Schuler, T., Grob, F., van Hedel, H.J., Labruyère, R.: Can lokomat therapy with children and adolescents be improved? an adaptive clinical pilot trial comparing guidance force, path control, and freed. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* **14**(1), 76 (2017)
 21. Fleerkotte, B.M., Koopman, B., Buurke, J.H., Asseldonk, E.H.F.V., Kooij, H.V.D., Rietman, J.S.: <the Effect of Impedance Controlled Robotic Gait Training.Pdf>, 1–15 (2014). doi:10.1186/1743-0003-11-26
 22. Ekkelenkamp, R., Veneman, J., van der Kooij, H.: Lopes: Selective control of gait functions during the gait rehabilitation of cva patients. In: *Rehabilitation Robotics, 2005. ICORR 2005. 9th International Conference On*, pp. 361–364 (2005). IEEE
 23. Kozłowski, A.J., Bryce, T.N., Dijkers, M.P.: Time and Effort Required by Persons with Spinal Cord Injury to Learn to Use a Powered Exoskeleton for Assisted Walking. *Topics in spinal cord injury rehabilitation* **21**(2), 110–121 (2015). doi:10.1310/sci2102-110
 24. Sale, P., Russo, E.F., Russo, M., Masiero, S., Piccione, F., Calabrò, R.S., Filoni, S.: Effects on mobility training and de-adaptations in subjects with Spinal Cord Injury due to a Wearable Robot : a preliminary report. *BMC Neurology*, 2–9 (2016). doi:10.1186/s12883-016-0536-0
 25. Tom-Wigfield, D., Martin, R.: Activity-Based Restorative Therapy Steps into Robotic Gait Training for Innovative Approaches for Patients with Chronic Spinal Cord Injuries. rehabpub.com/2016/06/activity-based-restorative-therapy-steps-robotic-gait-training-innovative-approaches-patients-chronic-spinal-cord-injuries/ Accessed 2017-08-21
 26. Wall, A., Borg, J., Palmcrantz, S.: Clinical application of the hybrid assistive limb (hal) for gait training—a systematic review. *Frontiers in systems neuroscience* **9** (2015)
 27. Contreras-Vidal, J.L., Bhagat, N.A., Brantley, J., Cruz-Garza, J.G., He, Y., Manley, Q., Nakagome, S., Nathan, K., Tan, S.H., Zhu, F., et al.: Powered exoskeletons for bipedal locomotion after spinal cord injury. *Journal of neural engineering* **13**(3), 031001 (2016)
 28. Tanabe, S., Hirano, S., Saitoh, E.: Wearable Power-Assist Locomotor (WPAL) for supporting upright walking in persons with paraplegia. *NeuroRehabilitation* **33**(1), 99–106 (2013). doi:10.3233/NRE-130932
 29. Sczesny-Kaiser, M., Höffken, O., Aach, M., Cruciger, O., Grasmücke, D., Meindl, R., Schildhauer, T.a., Schwenkreis, P., Tegenthoff, M.: HAL® exoskeleton training improves walking parameters and normalizes cortical excitability in primary somatosensory cortex in spinal cord injury patients. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* **12**(1), 68 (2015). doi:10.1186/s12984-015-0058-9
 30. Asselin, P., Knezevic, S., Kornfeld, S., Ciriogliaro, C., Agranova-Breyter, I., Bauman, W.A., Spungen, A.M.: Heart rate and oxygen demand of powered exoskeleton-assisted walking in persons with paraplegia. *Journal of Rehabilitation Research and Development* **52**(2), 147–158 (2015). doi:10.1682/JRRD.2014.02.0060
 31. Hartigan, C., Kandilakis, C., Dalley, S., Clausen, M., Wilson, E., Morrison, S., Etheridge, S., Farris, R.: Mobility Outcomes Following Five Training Sessions with a Powered Exoskeleton. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation* **21**(2), 93–99 (2015). doi:10.1310/sci2102-93
 32. Evans, N., Hartigan, C., Kandilakis, C., Pharo, E., Clessen, I.: Acute Cardiorespiratory and Metabolic Responses During Exoskeleton-Assisted Walking Overground Among Persons with Chronic Spinal Cord Injury. *Topics in spinal cord injury rehabilitation* **21**(2), 122–132 (2015). doi:10.1310/sci2102-122
 33. Sylos-Labini, F., La Scaleia, V., D'Avella, A., Pisotta, I., Tamburella, F., Scivoletto, G., Molinari, M., Wang, S., Wang, L., van Asseldonk, E., van der Kooij, H., Hoellinger, T., Cheron, G., Thorsteinsson, F., Ilzkovitz, M., Gancet, J., Hauffe, R., Zanov, F., Lacquaniti, F., Ivanenko, Y.P.: EMG patterns during assisted walking in the exoskeleton. *Frontiers in Human Neuroscience* **8**(June), 423 (2014). doi:10.3389/fnhum.2014.00423
 34. Chen, G., Chan, C.K., Guo, Z., Yu, H.: A review of lower extremity assistive robotic exoskeletons in rehabilitation therapy. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering* **41**(4-5) (2013)
 35. Esquenazi, A., Talaty, M., Jayaraman, A.: Powered exoskeletons for walking assistance in persons with central nervous system injuries: a narrative review. *PM&R* **9**(1), 46–62 (2017)
 36. Houldin, A., Luttin, K., Lam, T.: Locomotor adaptations and aftereffects to resistance during walking in individuals with spinal cord injury. *J. Neurophysiol.* **106**(1), 247–258 (2011). doi:10.1152/jn.00753.2010
 37. Lam, T., Paulhl, K., Ferguson, A., Malik, R.N., Krassioukov, A., Eng, J.J.: Training with robot-applied resistance in people with motor-incomplete spinal cord injury: Pilot study **52**(1), 113–130 (2015)
 38. Dietz, V., Grillner, S., Trepp, A., Hubli, M., Bolliger, M.: Changes in spinal reflex and locomotor activity after a complete spinal cord injury: A common mechanism. *Brain* **132**(8), 2196–2205 (2009). doi:10.1093/brain/awp124
 39. Gordon, K.E., Wu, M., Kahn, J.H., Schmit, B.D.: Feedback and feedforward locomotor adaptations to ankle-foot load in people with incomplete spinal cord injury. *Journal of neurophysiology* **104**(3), 1325–1338 (2010). doi:10.1152/jn.00604.2009
 40. Hubli, M., Dietz, V., Bolliger, M.: Influence of spinal reflexes on the locomotor pattern after spinal cord injury. *Gait and Posture* **34**(3), 409–414 (2011). doi:10.1016/j.gaitpost.2011.06.012
 41. Mirbagheri, M.M., Niu, X., Kindig, M., Varoqui, D.: The effects of locomotor training with a robotic-gait orthosis (Lokomat) on neuromuscular properties in persons with chronic SCI. *Proceedings of the Annual*

- International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS, 3854–3857 (2012). doi:10.1109/EMBC.2012.6346808
42. Knikou, M.: Functional reorganization of soleus H-reflex modulation during stepping after robotic-assisted step training in people with complete and incomplete spinal cord injury. *Experimental Brain Research* **228**(3), 279–296 (2013). doi:10.1007/s00221-013-3560-y
 43. Smith, A.C., Mummidisetty, C.K., Rymer, W.Z., Knikou, M.: Locomotor training alters the behavior of flexor reflexes during walking in human spinal cord injury. *Journal of neurophysiology* **112**(9), 2164–75 (2014). doi:10.1152/jn.00308.2014
 44. Mirbagheri, M.M., Kindig, M.W., Niu, X.: Effects of robotic-locomotor training on stretch reflex function and muscular properties in individuals with spinal cord injury. *Clinical Neurophysiology* **126**(5), 997–1006 (2015). doi:10.1016/j.clinph.2014.09.010. 15334406
 45. Lünenburger, L., Bolliger, M., Czell, D., Müller, R., Dietz, V.: Modulation of locomotor activity in complete spinal cord injury. *Experimental Brain Research* **174**(4), 638–646 (2006). doi:10.1007/s00221-006-0509-4
 46. Banz, R., Bolliger, M., Colombo, G., Dietz, V., Lünenburger, L.: Computerized visual feedback: an adjunct to robotic-assisted gait training. *Physical therapy* **88**(10), 1135–45 (2008). doi:10.2522/ptj.20070203
 47. Moreh, E., Meiner, Z., Neeb, M., Hiller, N., Schwartz, I.: Spinal decompression sickness presenting as partial brown-segurd syndrome and treated with robotic-assisted body-weight support treadmill training. *Journal of Rehabilitation Medicine* **41**(1), 88–89 (2009). doi:10.2340/16501977-0279
 48. Manella, K.J., Torres, J., Field-Fote, E.C.: Restoration of walking function in an individual with chronic complete (AIS A) spinal cord injury. *Journal of Rehabilitation Medicine* **42**(8), 795–798 (2010). doi:10.2340/16501977-0593
 49. Labruyère, R., Hedel, H.J.A.V.: <Strength Training Vs Robot Assisted Gait Training After Incomplete.Pdf>, 1–12 (2014)
 50. Niu, X., Varoqui, D., Kindig, M., Mirbagheri, M.M.: Prediction of gait recovery in spinal cord injured individuals trained with robotic gait orthosis. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* **11**(1), 42 (2014). doi:10.1186/1743-0003-11-42
 51. Varoqui, D., Niu, X., Mirbagheri, M.M.: Ankle voluntary movement enhancement following robotic-assisted locomotor training in spinal cord injury. *Journal of neuroengineering and rehabilitation* **11**(1), 46 (2014). doi:10.1186/1743-0003-11-46
 52. Hoekstra, F., van Nunen, M.P.M., Gerrits, K.H.L., Stolwijk-Swüste, J.M., Crins, M.H.P., Janssen, T.W.J.: Effect of robotic gait training on cardiorespiratory system in incomplete spinal cord injury. *Journal of rehabilitation research and development* **50**(10), 1411–22 (2014). doi:10.1682/JRRD.2012.10.0186
 53. Galen, S.S., Clarke, C.J., Allan, D.B., Conway, B.A.: A portable gait assessment tool to record temporal gait parameters in SCI. *Medical Engineering and Physics* **33**(5), 626–632 (2011). doi:10.1016/j.medengphy.2011.01.003
 54. Lam, T., Pauhl, K., Krassioukov, A., Eng, J.J.: Using robot-applied resistance to augment body-weight-supported treadmill training in an individual with incomplete spinal cord injury. *Physical therapy* **91**(1), 143–151 (2011). doi:10.2522/ptj.20100026
 55. Yang, A., Asselin, P., Knezevic, S., Kornfeld, S., Spungen, A.: Assessment of In-Hospital Walking Velocity and Level of Assistance in a Powered Exoskeleton in Persons with Spinal Cord Injury. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation* **21**(2), 100–109 (2015). doi:10.1310/sci2102-100

Figures

Figure 1 Prisma flowchart of the results from the literature search.

Figure 2 All robotic devices presented in this review.

Figure 3 Different robotic devices used over the number of studies in the last years.

Additional Files

Additional file 1 — Table 2

Studies that presented metabolic and cardiorespiratory parameters as primary outcome measures in individuals with SCI. (PDF 152kb).

Additional file 2 — Table 3

Studies that presented the parameters of altered reflex behavior as the main measures of outcome in individuals with SCI. (PDF 159 kb).

Additional file 3 — Table 4

Studies that evaluated kinetic and kinematics parameters of gait as the principal measures of outcome in individuals with SCI. (PDF 150kb).

Additional file 4 — Table 5

Studies that presented parameters related to the evaluation of motor function recovery as the primary outcome in SCI individuals. (PDF 167 kb).