



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

KETLIN JAQUELLINE SANTANA DE CASTRO

**EFEITO COMBINADO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA DEGRADAÇÃO
DA MATRIZ EXTRACELULAR NA PLASTICIDADE DO CÓRTEX
CEREBRAL APÓS ISQUEMIA**

**Belém
2014**

KETLIN JAQUELLINE SANTANA DE CASTRO

**EFEITO COMBINADO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA DEGRADAÇÃO
DA MATRIZ EXTRACELULAR NA PLASTICIDADE DO CÓRTEX
CEREBRAL APÓS ISQUEMIA**

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

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade

Orientador: Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Carlomagno Pacheco Bahia

**Belém
2014**

KETLIN JAQUELLINE SANTANA DE CASTRO

**EFEITO COMBINADO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA DEGRADAÇÃO
DA MATRIZ EXTRACELULAR NA PLASTICIDADE DO CÓRTEX
CEREBRAL APÓS ISQUEMIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientador: Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Carlomagno Pacheco Bahia

BANCA EXAMINADORA:

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

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

_____ - Membro Titular
Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena – 1º Avaliador
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Pará

_____ – Membro Titular
Prof. Dr. Ghislain Jean André Saunier – 2º Avaliador
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Pará

FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Universidade Federal do Pará – UFPA

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

À Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior, pela oportunidade e confiança. Por compreender minhas dificuldades e mesmo assim me ajudar a fazer ciência;

Ao co-orientador Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, por estar próximo, pela credibilidade e incentivo em alcançar os melhores resultados;

Ao Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE) na UFPA, coordenado pelo Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, pela colaboração material com este projeto;

Ao Instituto do Cérebro da UFRN por viabilizar a ChABC utilizada neste estudo.

A todos os membros do Laboratório de Neuroplasticidade (LNP). Aos professores, alunos de doutorado e mestrado, além dos alunos de Iniciação Científica, que por vezes suavizaram os momentos difíceis. Em especial, aos amigos imprescindíveis Gisele Aguiar e Mário Santos (por toda a amizade e orientação prática durante a finalização do mestrado); aos meus parceiros de bancada Márcio Sfair e Rafael Cei (que sempre mantiveram o pensamento positivo); e aos queridíssimos Marcelo Cardoso, Soanne Soares, Rosana Lopes e Celice Cordeiro, amigos que sempre tiveram as palavras certas para as minhas aflições.

Ao apoio financeiro da CAPES por incentivar a formação na pós-graduação.

À minha mãe Vera, por todo o apoio, dedicação e carinho, ao longo de toda a minha jornada.

Ao meu companheiro Yuri, por caminhar ao meu lado e sempre acreditar no meu melhor.

Ao meu pequeno Ygor, que transformou minha vida e me mostrou que sou muito mais capaz do que imaginava ser.

À Deus e à Nossa Senhora de Nazaré, por todo amor, motivação e força.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a maior causa de mortes e incapacidades neurológicas no Brasil, e mais de 80% deles são decorrentes de evento isquêmico. Os sobreviventes de AVC apresentam uma variedade de déficits motores, cognitivos e sensoriais, que prejudicam suas atividades de vida diária, limitando assim sua independência. Portanto, torna-se cada vez mais necessário elaborar estratégias terapêuticas que promovam a recuperação funcional de pacientes acometidos por AVC. Após isquemia do tecido nervoso, ocorre no meio extracelular a super expressão de moléculas inibitórias a regeneração neuronal e à plasticidade sináptica, como os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSCs), o principal componente das redes perineuronais (RPNs). A remoção destas moléculas com a ação da enzima condroitinase ABC (ChABC) tem sido usada como estratégia para induzir a plasticidade neuronal. Outro fator que tem sido utilizado para estimular a neuroplasticidade é o exercício físico específico para o membro afetado após AVC. O exercício físico está relacionado à liberação de neurotrofinas, importantes para a regeneração do sistema nervoso. Portanto, a remoção dos PGSCs junto com o exercício físico pode potencializar a indução da plasticidade cerebral e recuperação funcional após lesão isquêmica experimental na área sensório-motora de ratos. Para testar nossa hipótese, utilizamos n=16 ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, divididos nos seguintes grupos experimentais (todos com sobrevida de 21 dias após AVC isquêmico): Grupo Controle ou BSA (Isquemia experimental, implante de Elvax saturado com BSA); Grupo Exercício (Isquemia experimental, implante de Elvax saturado com BSA + exercício físico específico); Grupo ChABC (Isquemia experimental, implante de Elvax saturado com ChABC); e Grupo ChABC + Exercício (Isquemia experimental, implante de Elvax saturado com ChABC + exercício físico específico). A lesão isquêmica foi induzida através de microinjeções do vasoconstritor Endotelina-1 (ET-1) no córtex sensório-motor, na representação da pata anterior. Logo em seguida foi implantado uma microfatia de polímero de Etileno vinil acetato saturado com ChABC (grupos ChABC e ChABC + Exercício) ou BSA (grupos Controle e Exercício). Foram avaliadas a área de lesão e a degradação dos PGSCs, além da recuperação funcional da pata afetada através do teste da exploração vertical e do teste da escada horizontal. Avaliamos a área de lesão (mm²) com auxílio do programa ImageJ (NIH, USA), delimitando a área com palor celular e também marcada com azul de colanil que estava presente na solução de injeção do peptídeo vasoconstritor ET-1 e verificamos que não houve diferença significativa no tamanho da área de lesão entre os grupos Controle (0,48±0,12), Exercício (0,46±0,05), ChABC (0,50±0,18) e ChABC + Exercício (0,55±0,05) (ANOVA, pós-teste de Tukey, ***p<0,001; **<0,01; *p<0,5). Animais que foram submetidos à remoção enzimática dos PGSCs apresentaram imunomarcagem para o anticorpo anti-condroitin-4-sulfato (C4S) na área de lesão ao final da sobrevida, não havendo

evidências de degradação de PGSCs nos grupos Controle e Exercício. Verificamos ainda no teste do cilindro que a indução da lesão isquêmica não provocou perda funcional ampla, não alterando o comportamento exploratório, nem a frequência de uso da pata anterior afetada dos animais após a lesão (grupo Controle: pré-lesão ou baseline (0,33±0,10), 3 (0,29±0,17), 7 (0,30±0,10), 14 (0,29±0,16) e 21 (0,27±0,13) dias após a lesão; grupo Exercício: pré-lesão ou baseline (0,30±0,12), 3 (0,32±0,24), 7 (0,19±0,37), 14 (0,31±0,10) e 21 (0,32±0,09) dias após a lesão; grupo ChABC: pré-lesão ou baseline (0,34±0,07), 3 (0,20±0,11), 7 (0,23±0,07), 14 (0,33±0,14) e 21 (0,39±0,16) dias após a lesão; grupo ChABC + Exercício: pré-lesão ou baseline (0,34±0,04), 3 (0,20±0,09), 7 (0,26±0,04), 14 (0,18±0,08) e 21 (0,27±0,04) dias após a lesão) (ANOVA, pós-teste de Tukey, *** $p < 0,001$; ** $< 0,01$; * $p < 0,5$). O grupo que teve apenas a remoção dos PGSCs apresentou um melhor desempenho motor no teste da escada horizontal, mantendo sua frequência de acertos quando comparado aos demais grupos, sendo que ao final da sobrevivência de 21 dias, os grupos Controle e ChABC + Exercício alcançaram uma recuperação espontânea (equivalente ao teste pré-lesão), se aproximando do grupo ChABC. Apenas o grupo tratado somente com Exercício não alcançou a recuperação espontânea, apresentando um desempenho motor significativamente inferior aos demais grupos em todos os momentos de reavaliação (grupo Controle: pré-lesão ou baseline (7,70±0,54), 3 (5,30±0,71), 7 (5,4±1,14), 14 (5,20±0,37) e 21 (6,70±0,48) dias após a lesão; grupo Exercício: pré-lesão ou baseline (8,40±0,28), 3 (4,30±0,48), 7 (4,75±0,50), 14 (5,35±0,41) e 21 (5,05±0,67) dias após a lesão; grupo ChABC: pré-lesão ou baseline (7,65±0,97), 3 (6,90±0,65), 7 (7,80±0,37), 14 (7,15±0,87) e 21 (7,45±0,32) dias após a lesão; e grupo ChABC + Exercício: pré-lesão ou baseline (8,10±0,22), 3 (3,65±1,48), 7 (4,95±1,06), 14 (7,35±0,37) e 21 (6,70±0,48) dias após a lesão) (ANOVA, pós-teste de Tukey, *** $p < 0,001$; ** $< 0,01$; * $p < 0,5$). Portanto, a remoção dos PGSCs, o exercício físico forçado precoce e sua associação não influenciaram no tamanho da área de lesão após isquemia focal no córtex sensorio-motor. Porém, apenas a remoção dos PGSCs das redes perineuronais melhorou precocemente o desempenho motor do membro afetado após isquemia focal no córtex sensorio-motor. Enquanto que a remoção dos PGSCs associada ao exercício físico melhorou o desempenho motor do membro afetado após a lesão, porém essa melhora foi tardia. E o exercício físico aplicado precocemente após isquemia focal no córtex sensorio-motor prejudicou o desempenho motor do membro afetado.

Palavras-chave: Acidente Vascular Cerebral. Neuroplasticidade. Matriz Extracelular. Exercício.

Apoio Financeiro: CAPES.

ABSTRACT

Cerebrovascular diseases are major cause of neurological disability and death in Brazil, and more than 80% of them are caused by ischemic stroke. The survivors subsist with a variety of sensory, cognitive and motor deficits. Therefore, it becomes necessary to develop therapeutic strategies to promote functional recovery in this patients. After ischemia, there is an increase in the inhibitory molecules expression as proteoglycans of chondroitin sulfate (CSPGs) presents in the extracellular matrix of the nervous tissue. The removal of these molecules, as well as physical exercise, have been used as strategy to induce another window of brain plasticity and improve functional recovery. In this work, we running experimental ischemic injury on sensorimotor areas forepaw representation (S1/M1) and tested associations between removal of CSPGs and physical exercise in n=16 Wistar rats (*Rattus norvegicus*). To delivery drugs to the forepaw representation in the cerebral cortex, we used a biomembrane previously ChABC-saturated or BSA-saturated and all animals had 21 days of survival divided in : Control group or BSA; Exercise group; ChABC group; and ChABC + Exercise group. The lesion area was no different across groups (control: $0,48\pm0,12$; exercise: $0,46\pm0,05$; ChABC: $0,50\pm0,18$; ChABC+exercise: $0,50\pm0,18$; ANOVA and Tukey post-test). Animals that were subjected to CSPGs enzymatic removal showed immunostaining for anti-chondroitin-4-sulphate (C4S) antibody in lesion area at the end of survival, with no evidence of CSPGs degradation in Control and Exercise groups. We evaluated the functional recovery of affected paw running vertical exploration test and ladder rung walking test. The vertical exploration test showed ischemic injury did not cause extensive functional loss, not changing exploratory behavior, or the use frequency of the affected forepaw after injury (Control group: baseline ($0,03\pm0,10$), 3d ($0,29\pm0,17$), 7d ($0,30\pm0,10$), 14d ($0,29\pm0,16$) e 21d ($0,27\pm0,13$) days after injury; Exercise group: baseline ($0,30\pm0,12$), 3d ($0,32\pm0,24$), 7d ($0,19\pm0,37$), 14d ($0,31\pm0,10$) e 21d ($0,32\pm0,09$) days after injury; ChABC group: baseline ($0,34\pm0,07$), 3d ($0,20\pm0,11$), 7d ($0,23\pm0,07$), 14d ($0,33\pm0,14$) e 21d ($0,39\pm0,16$) after injury; ChABC + Exercício group: baseline ($0,34\pm0,04$), 3d ($0,20\pm0,09$), 7d ($0,26\pm0,04$), 14d ($0,18\pm0,08$) e 21d ($0,27\pm0,04$) after injury (ANOVA and Tukey post-test). The group that only had removing CSPGs presented a better performance on Ladder rung walking test but at the end of the 21-day survival, the control groups and ChABC + Exercise reached a spontaneous recovery (equivalent to pre-injury test) reaching the ChABC group. The group treated with Exercise did not achieve the spontaneous recovery showing a motor performance significantly lower than other groups at all times of reevaluation (baseline: $8,40\pm0,28$; 3d: $4,30\pm0,48$; 7d: $4,75\pm0,50$; 14d $5,35\pm0,41$; 21d: $5,05\pm0,67$; ANOVA and Tukey post-test). We conclude that the removal of CSPGs early improves motor performance in the affected forepaw after stroke on sensoriomotor cortex but associate with specific physical exercise doesn't improve functional recovery.

Keywords: Stroke. Neuroplasticity. Extracellular Matrix. Exercise.

Financial support: CAPES.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	EVOLUÇÃO DOS EVENTOS FISIOPATOLÓGICOS AO LONGO DO TEMPO APÓS ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL	19
FIGURA 2	CENTRO ISQUÊMICO E PENUMBRA ISQUÊMICA	19
FIGURA 3	PROTEOGLICANOS SULFATO DE CONDROTINA	23
FIGURA 4	A ESTRUTURA DAS RPNS	24
FIGURA 5	RESTRICÇÃO DA PLASTICIDADE NO TECIDO NERVOSO PELAS CADEIAS DE PGSC QUE FORMAM AS RPN	25
FIGURA 6	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A ESTRUTURA DAS LECTINAS E DEGRADAÇÃO DAS CADEIAS DE SULFATO DE CONDRITINA PELA ENZIMA CHABC	26
FIGURA 7	LTP PÓS-ISQUÊMICO (I-LTP) INDUZIDO EM NEURÔNIOS SUBCORTICAIS	28
FIGURA 8	CAVIDADE DE UMA LESÃO DO SNC	30
FIGURA 9	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS MODIFICAÇÕES EM CIRCUITOS NEURAIS APÓS LESÃO NO SNC	31
FIGURA 10	DESENHO EXPERIMENTAL	36
FIGURA 11	O TESTE DA EXPLORAÇÃO VERTICAL	37
FIGURA 12	ESQUEMA ILUSTRATIVO DO APARATO DO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	38
FIGURA 13	ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PADRÃO REGULAR UTILIZADO PARA PRÉ-TREINO NO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	38
FIGURA 14	ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS 5 PADRÕES IRREGULARES UTILIZADOS NO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	38
FIGURA 15	VARIAÇÃO DO POSICIONAMENTO DA PATA ANTERIOR NAS HASTES DE METAL DA ESCADA HORIZONTAL	40
FIGURA 16	APARATO DO TESTE DO STAIRCASE	42
FIGURA 17	ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LESÃO UNILATERAL E COMPROMETIMENTO DO MEMBRO CONTRALATERAL À LESÃO	43
FIGURA 18	ÁREA DE LESÃO	46

FIGURA 19	ANÁLISE QUANTITATIVA DA ÁREA DE LESÃO	47
FIGURA 20	IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL REPRESENTATIVAS DA MARCAÇÃO DE PGSCS DEGRADADOS NA BORDA DA ÁREA DE LESÃO	48
FIGURA 21	COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	49
FIGURA 22	TESTE DO CILINDRO	50
FIGURA 23	FREQUÊNCIA DE ACERTOS NO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	51
FIGURA 24	ANÁLISE INTERGRUPO DA FREQUÊNCIA DE ACERTOS	52
FIGURA 25	FREQUÊNCIA DE AJUSTES NO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	53
FIGURA 26	ANÁLISE INTERGRUPO DA FREQUÊNCIA DE AJUSTES	54
FIGURA 27	FREQUÊNCIA DE ERROS NO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	55
FIGURA 28	ANÁLISE INTERGRUPO DA FREQUÊNCIA DE ERROS	56
TABELA 1	GRUPOS EXPERIMENTAIS, DESCRIÇÃO E QUANTIDADE DE ANIMAIS POR GRUPO	35
TABELA 2	DESCRIÇÃO DA ANÁLISE COMPORTAMENTAL DO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BSA	Albumina de soro bovino
C-4-S	Sulfato 4 de condroitina
ChABC	Condroitinase ABC
EPCs	Células progenitoras endoteliais
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
GAG	Glicosaminoglicanas
GAG-SC	Glicosaminoglicanas Sulfato de condroitina
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
M1	Córtex motor primário
MCP1	Proteína 1 quimioatraente de monócitos
MEC	Matriz extracelular
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PGSC	Proteoglicanos de sulfato de condroitina
RPN	Redes perineuronais
S1	Córtex somatosensorial primário
SC	Sulfato de condroitina
SNC	Sistema nervoso central

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL (AVC)	18
1.1 EPIDEMIOLOGIA E CONCEITO	18
1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVC	18
2 MATRIZ EXTRACELULAR E REDES PERINEURONAIS	22
3 REDES PERINEURONAIS NA LESÃO DO SNC	25
4 NEUROPLASTICIDADE	27
4.1 ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NA NEUROPLASTICIDADE	27
4.2 ALTERAÇÕES ANATÔMICAS NA NEUROPLASTICIDADE	29
4.3 EXECÍCIO FÍSICO E NEUROPLASTICIDADE	32
5 OBJETIVOS	34
5.1 OBJETIVO GERAL	34
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
6 MÉTODO	35
6.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
6.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	36
6.2.1 Teste da Exploração Vertical	36
6.2.2 Teste da Escada Horizontal	37
6.3 EXERCÍCIO FÍSICO: Teste do <i>staircase</i>	41
6.4 CIRURGIA PARA INDUÇÃO DE ISQUEMIA	42
6.5 IMPLANTE DE ELVAX SATURADO COM CHABC OU BSA	43
6.6 PERFUSÃO E ARMAZENAMENTO DOS CORTES	43
6.7 HISTOLOGIA	43

6.7.1 Área de Lesão	44
6.8 IMUNOMARCAÇÃO	44
6.8.1 Degradação dos PGSCs da rede perineuronal	44
6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
7 RESULTADOS	46
7.1 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL INDUZIU MORTE DO TECIDO NERVOZO	46
7.2 REMOÇÃO DOS PGSCs NA BORDA DA LESÃO	47
7.3 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL NÃO ALTEROU O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO	49
7.4 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL PROVOCOU DÉFICIT MOTOR NA PATA ANTERIOR	50
8 DISCUSSÃO	57
8.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	57
8.2 A DEGRADAÇÃO DOS PGSCs E O EXERCÍCIO FÍSICO NÃO INFLUENCIARAM NO TAMANHO DA ÁREA DE LESÃO	57
8.3 A DEGRADAÇÃO DE PGSCs FOI OBSERVADA AO FINAL DA SOBREVIDA	58
8.4 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL NÃO ALTEROU O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO	58
8.5 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL PROVOCOU DÉFICIT MOTOR NA PATA ANTERIOR	59
REFERÊNCIAS	64

INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é considerado, atualmente, a principal causa de mortes no Brasil, sendo que mais de 80% é provocado por evento isquêmico (BRASIL, 2011). Além disso, é a maior causa de incapacidade física na faixa etária superior a 50 anos, sendo responsável por 40% das aposentadorias precoces no país (BRASIL, 2011). O tratamento das sequelas do AVC incorre em gastos elevados, tanto para a família quanto para a Previdência Social (GAGLIARDI, 2009).

O grande desafio é desenvolver terapias de reabilitação que melhorem a qualidade de vida dos pacientes, manipulando a plasticidade espontânea dos circuitos neurais que ocorre logo após o AVC. Porém, este processo é limitado pela presença, no meio extracelular, de moléculas inibitórias à reorganização plástica do tecido nervoso, como os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSCs), presentes nas redes perineuronais (RPNS) e também liberados por astrócitos reativos no local da lesão (FAWCETT; WANG, 2012).

A nossa hipótese experimental é que a remoção dos PGSCs associada ao exercício físico específico para a pata afetada favoreçam a plasticidade neuronal e a recuperação funcional após lesão isquêmica focal unilateral do córtex sensoriomotor. Neste projeto, utilizamos a enzima bacteriana Condroitinase ABC (ChABC – Sigma-Aldroch) para degradar os PGSCs imediatamente após a lesão isquêmica. Em seguida, os animais foram submetidos a sessões diárias de exercício físico específico para a pata afetada pela lesão.

1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL (AVC)

1.1 EPIDEMIOLOGIA E CONCEITO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a terceira principal causa de morte no mundo (5,5 milhões de pessoas), ficando atrás apenas das doenças coronarianas (7,2 milhões de pessoas) e câncer (7,1 milhões de pessoas) (WHO, 2004). No Brasil, o AVC foi responsável por 52,3 óbitos para cada 100.000 habitantes, em 2010. E no Pará essa taxa permanece elevada, com o AVC responsável por 49,2 mortes para cada 100.000 habitantes no ano de 2010 (BRASIL, 2009).

O acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico resulta de uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo em uma região cerebral. A redução do fluxo é, na maioria dos casos, provocada pela oclusão da artéria cerebral por um êmbolo ou trombo (Dirnagl; Iadecola; Moskowitz, 1999). O prejuízo no fornecimento de energia leva a uma disfunção dos canais iônicos, perda de potencial de membrana e liberação descontrolada de neurotransmissores, ocasionando uma complexa sequência de eventos fisiopatológicos, que incluem excitotoxicidade, despolarizações peri-infarto, inflamação e morte celular programada (Dirnagl; Iadecola; Moskowitz, 1999; Liguz-Leczmar; Kossut, 2013).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVC

O AVC é caracterizado por complexos eventos temporais e espaciais, evoluindo ao longo de horas ou até mesmo dias (FIGURA 1). No local da lesão, também denominado de centro isquêmico, o déficit de fluxo sanguíneo diminui o nível de ATP, ocorre grave perturbação iônica e insuficiência metabólica e a morte celular progride em minutos. Enquanto que na região próxima, denominada de penumbra isquêmica, o prejuízo é menos severo devido à perfusão residual de vasos sanguíneos colaterais (Lo; Dalkara; Moskowitz, 2003).

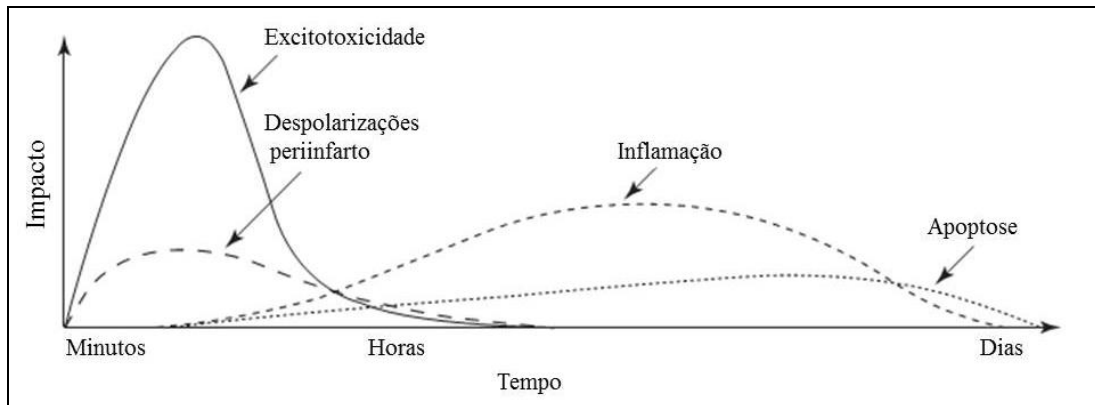


Figura 1 – Evolução dos eventos fisiopatológicos ao longo do tempo após isquemia cerebral focal. Logo após a isquemia, mecanismos excitotóxicos podem levar neurônios e glia à morte. Além disso, a excitotoxicidade desencadeia diversos eventos que posteriormente contribuem para a morte tecidual, tais como despolarizações peri-infarto, inflamação e morte celular programada.

Fonte: Adaptado de DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999.

Durante as fases iniciais da oclusão, a penumbra pode compreender um terço ou metade do volume da lesão. Nesta região o tecido encontra-se metaestável, com alterações metabólicas e iônicas, e as células morrem mais lentamente e a lesão se expande ao longo do tempo. Na penumbra, mecanismos ativos de morte celular são recrutados, e a orientação desses mecanismos pode funcionar como abordagens terapêuticas promissoras. No centro isquêmico, a recuperação de células cerebrais que morrem rapidamente pode não ser viável sem reperfusão precoce, pois uma vez que os tecidos sejam danificados para além de um ponto crítico, a morte celular é inevitável, apesar de restauração do fluxo sanguíneo e dos níveis de ATP (Lo; Dalkara; Moskowitz, 2003) (FIGURA 2).

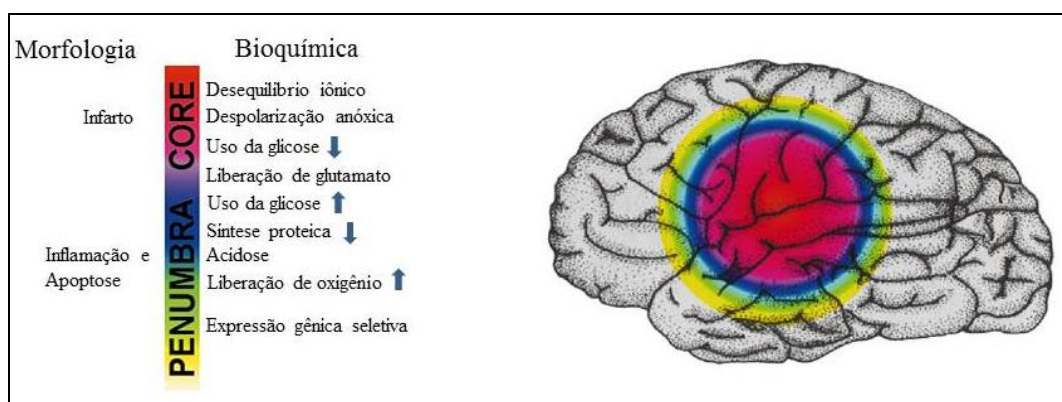


Figura 2 – Centro isquêmico e Penumbra isquêmica. A região cerebral com perda de perfusão, onde as células morrem rapidamente (*core* - vermelho) é rodeada por uma área na qual existe uma perfusão residual e as células têm maior potencial de recuperação (penumbra – amarelo).

Fonte: Adaptado de DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999.

1.2.1 Excitotoxicidade

O sistema nervoso central tem um consumo relativamente alto de oxigênio e glicose, e depende quase exclusivamente de fosforilação oxidativa para produção de energia. Um prejuízo focal do fluxo sanguíneo cerebral diminui a chegada de substratos, particularmente de oxigênio e glicose, prejudicando a energia necessária para manter gradientes iônicos. Com a alteração de gradientes iônicos, o potencial de membrana também é alterado e neurônios e glia despolarizam. Consequentemente ocorrem vários eventos intra e extracelulares que atuam na progressão do dano tecidual: aminoácidos excitatórios são liberados para o meio extracelular, acúmulo de glutamato no meio extracelular, aumenta a concentração de sódio e cloro nos neurônios, e consequentemente de água. Este edema subsequente pode afetar a perfusão de regiões vizinhas. Além destes, ocorrem também eventos citoplasmáticos e nucleares que estimulam profundamente o dano tecidual, tais como, ativação de enzimas proteolíticas, que degradam proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular, de enzimas que produzem espécies de radicais livres que sobrecarregam os mecanismos endógenos de eliminação, produzindo peroxidação lipídica e danos na membrana. Espécies de radicais livres de oxigênio também servem como importantes moléculas de sinalização que desencadeiam a inflamação e apoptose. Óxido Nítrico (NO) e óxido nítrico sintase (NOS) reagem com outras moléculas para formar espécies altamente reativas promotoras de dano tecidual, como o peroxinitrito (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

As alterações hemodinâmicas, metabólicas e iônicas não afetam o território isquêmico homogeneamente. No centro isquêmico, o fluxo sanguíneo é 20% abaixo do normal, e logo após a isquemia ocorre despolarização anóxica e permanente. Células morrem rapidamente por lipólise, proteólise e desagregação de microtúbulos. Já na área de penumbra isquêmica, o fluxo sanguíneo é restrito e o metabolismo energético parcialmente preservado. Com o passar do tempo e sem tratamento, a penumbra pode evoluir para infarto, devido à contínua excitotoxicidade ou fenômenos secundários (despolarização, inflamação e apoptose). Várias pesquisas têm sido feitas com o objetivo de preservar esta região, pois é uma região com grande potencial de recuperação e há ampla evidência de que ela existe em pacientes de AVC, com dinâmica temporal e de extensão menos definidas (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

1.2.2 Despolarizações Periinfarto

Despolarizações periinfarto são despolarizações repetitivas que ocorrem com neurônios e glia devido à falta de fornecimento de energia e liberação de glutamato e potássio. Em modelos animais de AVC, estas despolarizações ocorrem com uma frequência de vários eventos por hora. No centro isquêmico, as células podem sofrer uma despolarização anóxica e nunca repolarizar. Na região de penumbra as células podem repolarizar, mas o consumo de energia é maior. As mesmas células podem despolarizar novamente, em resposta à um aumento extracelular de glutamato e potássio. À medida que o número de despolarizações aumenta a área de dano tecidual também cresce. Terapias que bloqueiam estas despolarizações diminuem o tamanho da área de infarto (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

1.2.3 Inflamação

A inflamação pós-isquêmica pode contribuir para o dano tecidual através da ativação de diferentes mediadores moleculares: a infiltração de neutrófilos pode causar obstrução microvascular e aumentar o grau da isquemia; e células inflamatórias ativadas e neurônios lesionados produzem mediadores tóxicos (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

O déficit de energia leva ao acúmulo de glutamato no espaço extracelular e excitotoxicidade. Espécies reativas de oxigênio são produzidas no tecido isquêmico e a integridade da barreira hematoencefálica é prejudicada. Micróglia ativadas são as principais células que produzem citocinas e quimiocinas próinflamatórias. Essa liberação leva à ativação de micróglia residente, aumento de moléculas de adesão celular e mobilização de leucócitos. O aumento do estresse oxidativo e a ativação de citocinas contribuem para o agravamento do processo inflamatório, disfunção da barreira hematoencefálica e, finalmente, morte neuronal (CYBULSKA-KLOSOWICZ *et al*, 2011; LIEBIGT *et al*, 2012; LIGUZ-LECZNAR; KOSSUT, 2013).

1.2.4 Apoptose

As células que foram comprometidas pela ativação excessiva de receptores glutamatérgicos, sobrecarga de Ca^{+2} e radicais livres de oxigênio, ou pela danificação de DNA ou mitocôndria, podem morrer por necrose ou apoptose. A apoptose é também conhecida como tipo nuclear de morte celular, devido às alterações morfológicas no núcleo: compactação da cromatina e condensação nuclear. Essas modificações na morfologia do

núcleo são acompanhadas pela retração do citoplasma e uma distorção da membrana plasmática, formando dobras que se quebram e formam o corpo apoptótico. No cérebro isquêmico ocorre morte celular principalmente por padrões semelhantes a apoptose, pois a perda da integridade da membrana e das organelas são os principais mecanismos de morte celular na isquemia, principalmente na área da penumbra (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003; PUYAL; GINET; CLARKE, 2013).

2 MATRIZ EXTRACELULAR E REDES PERINEURONAIS

A matriz extracelular (MEC) é formada por várias proteínas e polissacarídeos sintetizados por neurônios, células da glia e outras células não neuronais (DITYATEV, 2010). Essas moléculas secretadas no espaço extracelular e posteriormente associadas com receptores na superfície das células são responsáveis pela regulação de diversas funções celulares, tais como proliferação, migração, diferenciação morfológica e bioquímica. No sistema nervoso especificamente, a MEC também está envolvida com sinaptogênese e função sináptica (DITYATEV, 2003; DITYATEV, 2010).

As principais moléculas que compõem a MEC são: as glicoaminoglicanas (GAGs), que são cadeias longas de dissacarídeos ligados covalentemente à proteínas (principalmente da família das lectinas) na forma de proteoglicanos (FIGURA 3) ou na forma livre como ácido hialurônico; proteínas fibrosas (colágeno e elastina); glicoproteínas adesivas (fibronectina, tenascina e laminina); fatores de crescimento e outras macromoléculas (GALTREY; FAWCETT, 2007; RHODES, 2004).

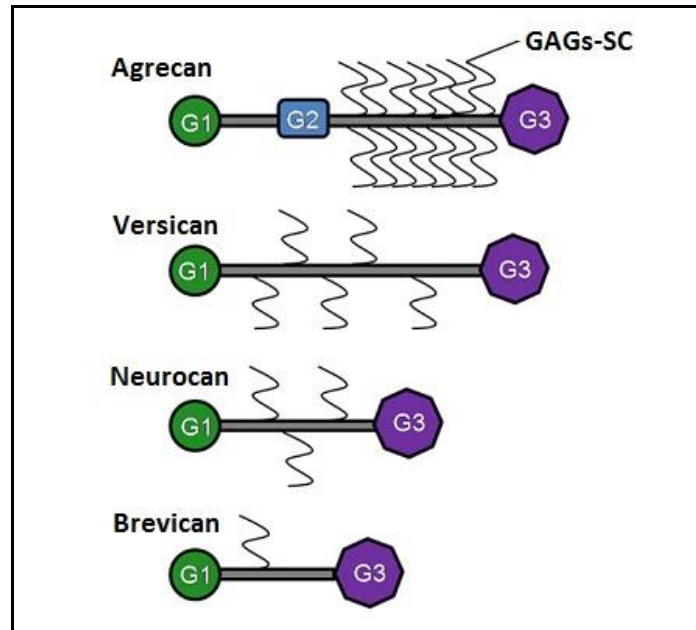


Figura 3 – Proteoglicanos Sulfato de Condrotina. Moléculas formadas principalmente por proteínas da família das lectinas: Agrecan, Versican, Neurocan e Brevican. São as principais proteínas que compõem a MEC. Todas as lectinas contêm um domínio G1 (N-terminal) que se liga a hialuronana (na célula) e um domínio G3 (C-terminal) que se liga a tenascina-R. Apenas a agrecan contem um domínio G2. A região central (núcleo proteico) contem sítios de ligação para cadeias de glicoesaminoglicanas sulfato de condroitina (GAG-SC).

Fonte: Adaptado de BARTUS *et al.*, 2012.

A quantidade destas moléculas na MEC varia de acordo com o tecido. No SNC, a MEC coalesce em volta dos neurônios em uma forma especializada composta de poucas proteínas fibrosas e grande quantidade de GAG, denominada rede perineuronal (RPN) (GALTREY; FAWCETT, 2007; YAMAGUCHI, 2000). As RPNs estão associadas com uma subpopulação neuronal específica do SNC, encobrindo o corpo celular e os dendritos proximais como uma malha reticulada. As RPNs desempenham um papel importante na neuroproteção, estabilização sináptica, tamponamento iônico, desenvolvimento neuronal e plasticidade (FAWCETT; WANG, 2012).

Outros componentes das RPNs são proteínas de ligação e proteínas adesivas, como a tenascina, que são importantes na estabilização destas redes. Esta organização complexa das RPNs é mostrada na figura 4, a seguir:

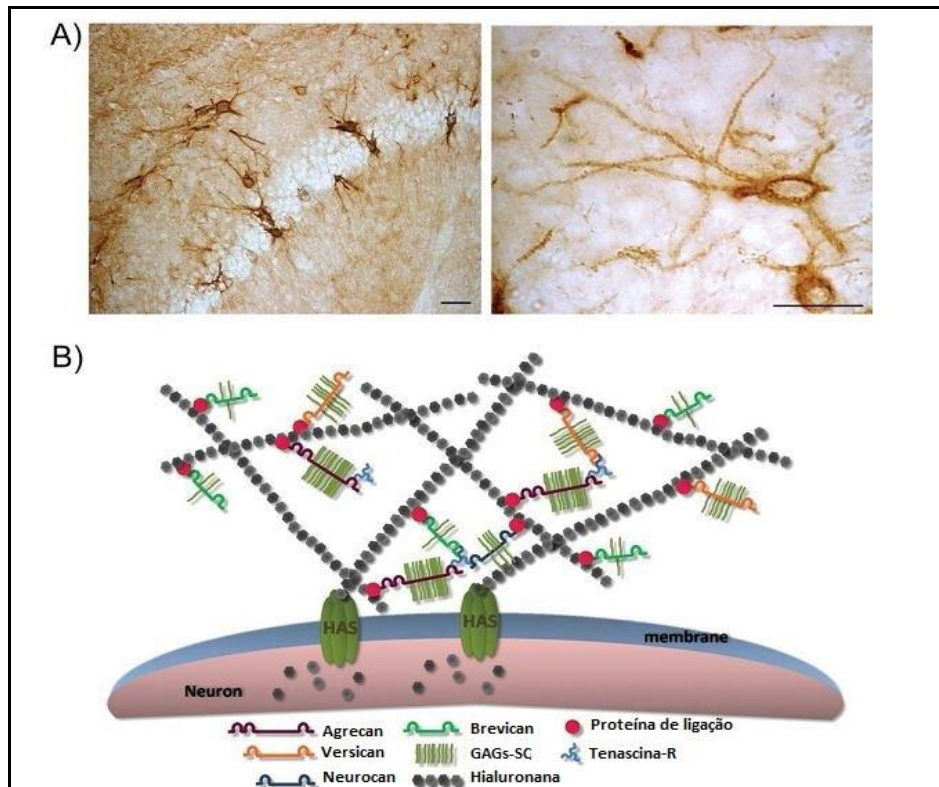


Figura 4 – A estrutura das RPNs. (A) RPN marcadas com *Wisteria floribunda* no encéfalo de rato. A marcação é principalmente observada na superfície do corpo e dendritos proximais nos neurônios. (B) A enzima hialuronana sintase (HAS) presente na superfície neuronal produz hialuronana (HA) e secreta para a área perineuronal. Integrantes da família das lectinas (agrecan, neurocan, brevican e versican) ligam-se à HA (através do N-terminal). Esta interação é consolidada pelas proteínas de ligação. As cadeias GAGs encontram-se no núcleo das lectinas, variando em quantidade de acordo com a molécula. O outro domínio de ligação das lectinas (C-terminal) se liga à tenascina-R, formando o estável complexo ternário.

Fonte: Adaptado de KWOK *et al.*, 2011.

As RPNs estabilizam as conexões neuronais e restringem as mudanças plásticas relacionadas com estimulação ambiental. Como efeito, o pico de expressão das RPNs coincide com o fechamento do período crítico de plasticidade em várias regiões corticais (YAMAGUCHI, 2000).

O período crítico de plasticidade é a fase do desenvolvimento do SNC que é caracterizada por um aumento na sensibilidade plástica dos circuitos corticais aos estímulos ambientais, ou seja, o SNC tem a capacidade de se reorganizar em resposta aos estímulos que recebe (DITYATEV, 2010; PIZZORUSSO, *et al.*, 2002). As bases neurais deste evento começaram a ser exploradas na década de 70, através da demonstração do período crítico de plasticidade na região binocular do córtex visual primário de gatos (HUBEL; WIESEL, 1970). Se o animal não recebe o estímulo apropriado durante este período crítico, os circuitos binoculares se tornam aberrantes e disfuncionais (DITYATEV, 2010; HUBEL; WIESEL,

1970). Cada parte do sistema nervoso possui um período crítico de plasticidade diferente, e no momento da maturação desse sistema ocorre o fechamento desse período crítico, diminuindo a capacidade plástica do SNC.

3 REDES PERINEURONAIS NA LESÃO DO SNC

Na ocorrência de uma lesão, a quantidade de proteoglicanos aumenta no epicentro da lesão, secretados principalmente por células da glia, que formam uma barreira de contenção no tecido lesionado, limitando o surgimento de cavitação e lesão secundária (GALTREY; FAWCETT, 2007; RHODES 2004). Entretanto, esses proteoglicanos também atuam impedindo a migração celular e o crescimento de neuritos, inibindo, portanto os processos regenerativos que podem ocorrer no SNC (GALTREY; FAWCETT, 2007; YAMAGUCHI, 2000). A principal ação inibitória dos proteoglicanos é devido à presença das cadeias de sulfato de condroitina que bloqueiam a formação de novos contatos sinápticos (FIGURA 5) (YAMAGUCHI, 2000).

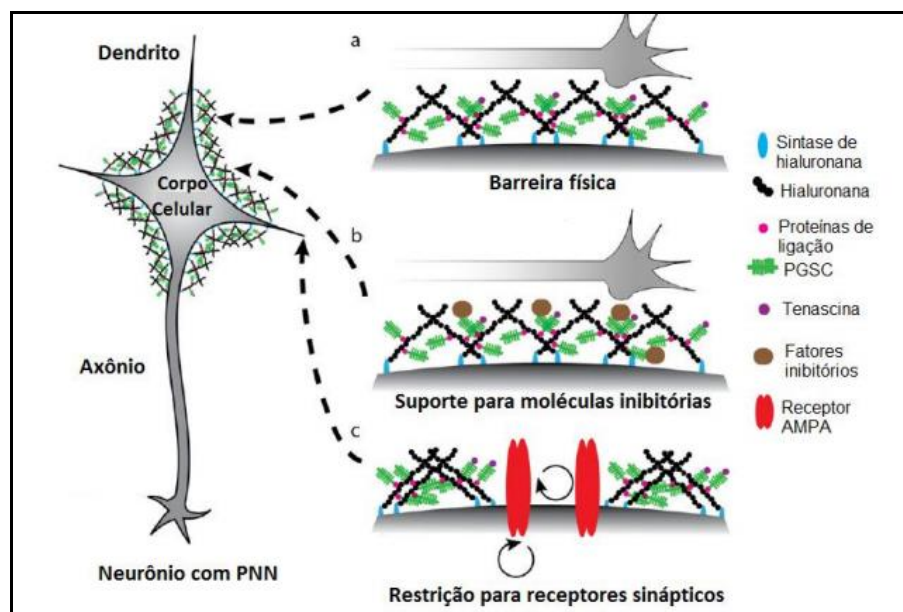


Figura 5 – Restrição da plasticidade no tecido nervoso pelas cadeias de PGSC que formam as RPNs. Em a) formação de uma barreira física contra a formação de novas conexões sinápticas; b) atuando como um suporte para a ligação de moléculas inibidoras da plasticidade; c) restrição da mobilidade dos receptores sinápticos.

Fonte: Adaptado de WANG; FAWCETT, 2012.

A remoção de PGSCs em regiões específicas do córtex induz a reabertura de um novo período crítico de plasticidade cerebral, facilitando dessa forma a regeneração neuronal e

recuperação funcional em situações de lesão (DITYATEV, 2010; PIZZORUSSO, *et al.*, 2002; PIZZORUSSO, *et al.*, 2006). As RPNs são estruturas dinâmicas que podem ser modificadas através do enriquecimento ambiental ou, de maneira mais invasiva, pela utilização de enzimas degradantes como a condroitinase ABC (ChABC), que remove principalmente a glicosilação (sulfato de condroitina) dos proteoglicanos (FIGURA 6) (FAWCETT; WANG, 2012). A degradação das RPNs pode estimular o crescimento axonal, reinervação e formação de novas sinapses (FAWCETT; WANG, 2012).

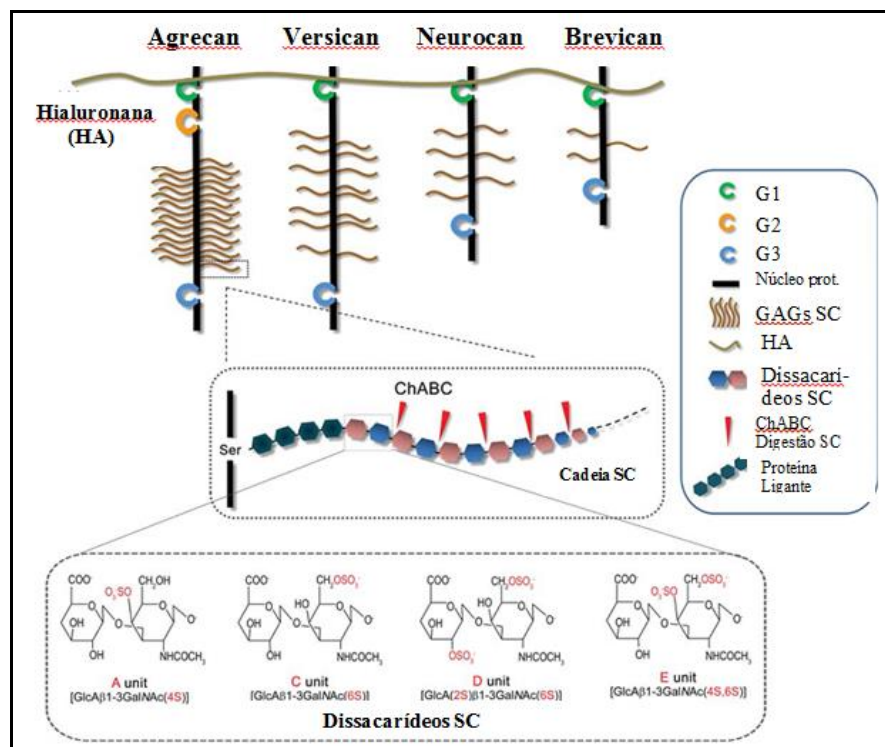


Figura 6 – Diagrama esquemático mostrando a estrutura das lectinas e degradação das cadeias de sulfato de condroitina pela enzima ChABC. A porção superior do diagrama esquemático mostra os membros da família das lectinas: agrecan, versican, neurocan e brevican. Todas as lectinas contêm um domínio N-terminal (G1), uma região medial, onde se ligam as cadeias GAG, e um domínio C-terminal (G3). Apenas o agrecan contém um domínio adicional (G2), cuja função não está esclarecida. G1 é um domínio importante para a ligação com hialuronana (HA), e G3 com a glicoproteína tenascina-R. O tamanho da cadeia GAG na região medial é altamente variável de acordo com a lectina, e determina o tamanho final do núcleo da proteína. A porção central da imagem mostra a cadeia GAG-SC ligada ao núcleo proteico. O SC é um polímero linear composto de subunidades de GlcA e GalNAc. A enzima ChABC degrada as cadeias de SC removendo a cadeia GAG do núcleo proteico. As subunidades de dissacarídeos de GlcA e GalNAc são modificadas por sulfatação, conferindo os dissacarídeos de SC, como demonstrado na porção inferior da imagem.

Fonte: Adaptado de KWOK *et al.*, 2011.

4 NEUROPLASTICIDADE

Existem várias evidências de que o encéfalo adulto mantém uma capacidade limitada de se modificar em resposta aos estímulos ambientais, incluindo lesões como o acidente vascular cerebral (AVC) (CARMICHAEL *et al.*, 2001; KOLB *et al.*, 2010). É comum após um AVC os pacientes apresentarem um grau limitado de recuperação funcional espontânea através da reorganização de circuitos nas áreas peri-infarto e nas áreas corticais conectadas com a área de lesão (CARMICHAEL *et al.*, 2001).

Logo após a lesão cortical, ocorre redução temporária de moléculas inibitórias do crescimento axonal, como a fosfacana e os PGSC, principalmente agrecan e versican, e aumento da expressão de proteínas relacionadas com o crescimento neuronal – GAP43, CAP23, MARCKS –, que favorecem a produção de neurotrofinas e proteínas associadas ao crescimento axonal nas áreas peri-infarto, sugerindo que existe uma janela temporária favorável à reorganização neural (CARMICHAEL, 2005; HARRIS *et al.*, 2009; HARRIS *et al.*, 2010).

Essa capacidade de reorganização é denominada plasticidade neuronal (DAYAN; COHEN, 2011; TAKEUCHI; IZUMI, 2012). A plasticidade neuronal espontânea que ocorre após a lesão possui características semelhantes à plasticidade observada na fase de neurodesenvolvimento, apresentando a capacidade de reorganização cortical em resposta a estímulos externos (CARMICHAEL, 2005).

No nível celular, os principais eventos regenerativos ocorrem na zona peri-infarto e são compostos de alterações funcionais e anatômicas. As alterações funcionais incluem modificações sinápticas – potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) –; As alterações anatômicas incluem: remodelamento dendrítico, aumento no número de espinhas dendríticas, crescimento de novas conexões axonais (estabelecendo novos padrões de projeção), formação de novas sinapses (sinaptogênese) e modulação da neurogênese (CARMICHAEL, 2001; CARMICHAEL, 2003; CARMICHAEL, 2005; CARMICHAEL, 2006; KATSMAN, *et al.*, 2003; HOSP; LUFT, 2011; STROEMER; KENT; HULSEBOSCH, 1995; STROEMER; KENT; HULSEBOSCH, 1998; TONI *et al.*, 1999; WARD; COHEN, 2004).

4.1 ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NA NEUROPLASTICIDADE

O córtex motor conecta-se com outras regiões corticais e subcorticais através de um padrão complexo de conexões (HESS; DONOGHUE, 1996a). Estas conexões possuem potencial para modificações da eficiência sináptica. As conexões corticais horizontais podem servir como substrato para induzir a reorganização do mapa motor e tanto LTP como LTD podem servir como mecanismos dependentes da atividade para alterações bidirecionais na eficácia sináptica (HESS; DONOGHUE, 1996b).

Alterações na eficiência sináptica podem resultar no fortalecimento ou enfraquecimento de sinapses existentes e podem ser induzidos no córtex motor de ratos nas camadas II/III, que são o alvo das conexões horizontais (HESS; DONOGHUE, 1996a; HESS; DONOGHUE, 1996b; HESS; AIZENMAN; DONOGHUE, 1996; JOHNSTON, 2009).

Alterações na excitabilidade da membrana neuronal é um dos fatores que contribuem para a reorganização cerebral após isquemia. Após o evento isquêmico ou hemorrágico causador do AVC ocorre uma alteração iônica reversível na área de penumbra que pode resultar no fortalecimento de conexões neurais pré-existentes, ou seja, sinapses antes silenciosas podem tornar-se ativas, com possibilidade de participação na recuperação da função pós-lesão (FIGURA 7) (DI FILIPPO *et al.*, 2008).

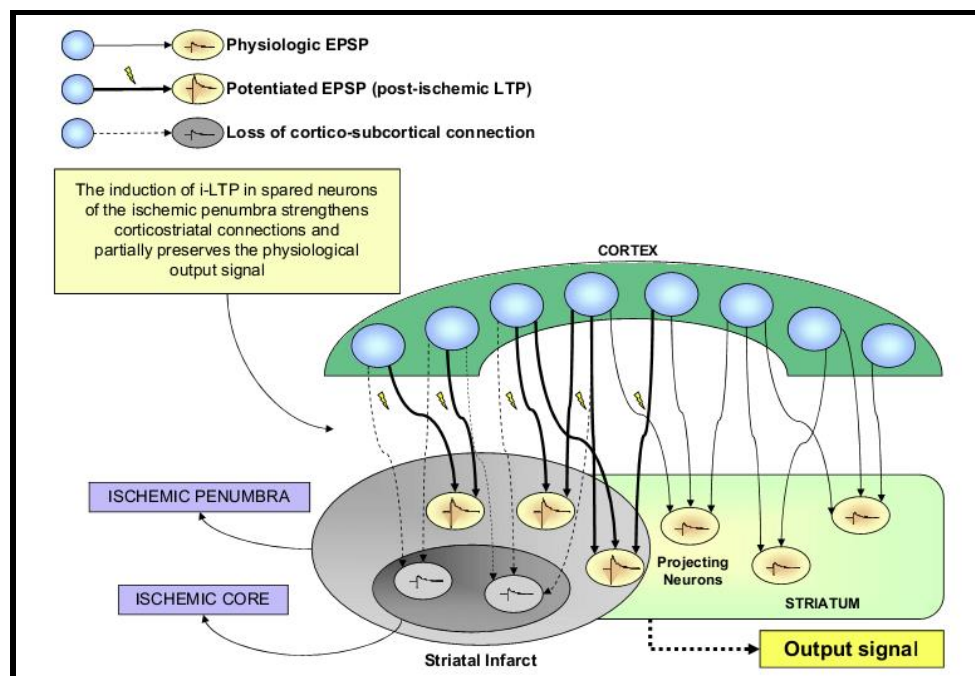


Figura 7 – LTP pós-isquêmico (i-LTP) induzido em neurônios subcorticais.

Fonte: Adaptado de DI FILIPPO *et al.*, 2008.

A depressão de longa duração (LTD) é outro mecanismo de plasticidade sináptica dependente de atividade, mas que resulta na diminuição da força sináptica. Do mesmo modo que a LTP, a indução de LTD também requer uma atividade aferente repetida, porém numa intensidade menor. Portanto, diferentes padrões de atividade engajam mecanismos de plasticidade diferentes (HESS; DONOGHUE, 1996a).

4.2 ALTERAÇÕES ANATÔMICAS NA NEUROPLASTICIDADE

Modificações estruturais como remodelamento dendrítico, formação de novas sinapses e crescimento axonal ocorrem nas primeiras semanas após a lesão. Na região próxima à lesão ocorre uma diminuição inicial da densidade de espinhas dendríticas, seguida de aumento no remodelamento dendrítico e renovação sináptica (HOSP; LUFT, 2011).

No cérebro adulto normal o crescimento axonal é inibido por três classes de proteínas inibitórias: proteínas das redes perineuronais (tenascina e proteoglicanos com sulfato de condroitina); proteínas associadas à mielina (Nogo-A e glicoproteína associada à mielina); e proteínas relacionadas com o desenvolvimento (moléculas da classe das efrinas e semaforinas). Após lesão, essas mesmas proteínas contribuem para impedir processos regenerativos que poderiam levar à recuperação funcional de pacientes com AVC (CARMICHAEL, 2005; CARMICHAEL, 2006; FIELDS; STEVENS-GRAHAM, 2002; KATSMAN, et. al., 2003; HOSP; LUFT, 2011).

A cicatriz glial é uma região com ocorrência elevada de morte celular e proteínas inibidoras do crescimento. Ao redor da cicatriz glial ocorre a degradação parcial das redes perineuronais e facilitação do crescimento axonal (CARMICHAEL, 2005). Este local é denominado zona permissiva de crescimento, onde moléculas inibidoras do crescimento permanecem com níveis reduzidos por até um mês após o infarto, enquanto neurônios ativam genes promotores de crescimento que expressam as proteínas GAP43 e CAP23, além do aumento da expressão de proteínas que regulam o processo de maturação (FIGURA 8) (CARMICHAEL, 2005).

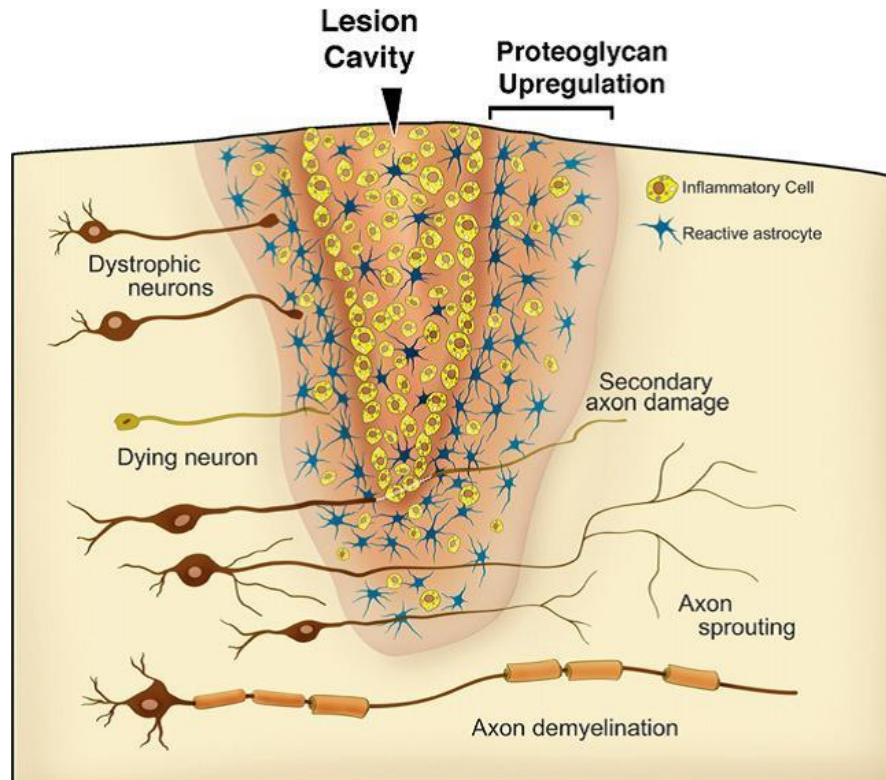


Figura 8 – Cavidade de uma lesão do SNC. Este centro de lesão contém células inflamatórias que interagem com astrócitos reativos (e outras células da glia reativas) ao redor da lesão. Esta região de formação de cicatriz glial está associada ao aumento da expressão de moléculas inibitórias da matriz extracelular, tais como proteoglicanos, que estão distribuídos em um gradiente de concentração crescente da área de penumbra ao epicentro da lesão. Esta resposta inflamatória intensa conduz à uma cascata de efeitos secundários para axônios inicialmente poupados do traumatismo direto, e desmielinização dos axônios adjacentes que não são facilmente remielinizados por oligodendrócitos e células precursoras adultas. O gradiente aumentado de moléculas inibitórias na área de intensa inflamação proporciona um ambiente não permissivo para a regeneração. Os neurônios distroficados desenvolvem uma deformidade classicamente descrita no bulbo dos terminais axonais, característicos de tentativas de regeneração fracassadas.

Fonte: Adaptado de FITCH; SILVER, 2008.

A expressão destas proteínas (GAP43 e CAP23) na zona permissiva após a lesão aumenta a probabilidade de formação de novas projeções axonais, estabelecendo novos padrões de conexões corticais nas regiões cerebrais parcialmente danificadas (CARMICHAEL, 2003; CARMICHAEL, 2006; HOSP; LUFT, 2011).

Portanto, o ambiente celular após AVC está longe de ser apenas um ambiente de morte e destruição, abrigando também processos de regeneração neuronal, que podem ser influenciados e otimizados por diversas terapias, contribuindo para uma melhor recuperação funcional (CARMICHAEL *et. al.*, 2001; HOSP; LUFT, 2011).

A recuperação funcional é acompanhada por modificações nos circuitos neurais subjacentes que podem ser agrupados da seguinte maneira: (1) reorganização ou redistribuição das interações funcionais em redes já existentes; (2) recrutamento de novas áreas dentro de uma rede, ou uso de uma rede alternativa, que não era utilizada anteriormente para execução da tarefa; (3) plasticidade em regiões do córtex próximo à área danificada (FIGURA 9) (MUNOZ-CESPEDES *et al.*, 2005).

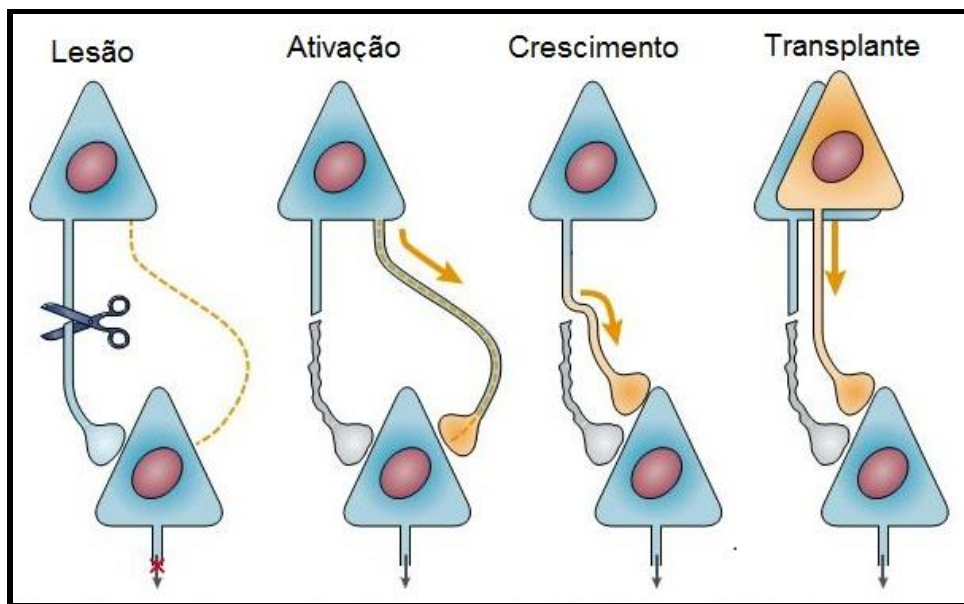


Figura 9 – Diagrama esquemático das modificações em circuitos neurais após lesão no SNC. A lesão pode resultar em dois tipos de dano: morte neuronal e deafferentação. O último processo provoca uma maior perda inicial de função que pode ser explicada pela perda de neurônios. Vários processos podem restabelecer o funcionamento da rede e levar à recuperação: conexões restantes dentro de conjuntos de células danificadas podem ser reforçadas, tratos silenciosos podem ser ativados, e axônios podem superar as interrupções resultantes dos danos. No futuro, também pode ser possível reduzir as consequências dos danos no SNC através de transplante.

Fonte: Adaptado de TAUB; USWATTE; ELBERT, 2002.

A forma e o grau de recuperação estão também relacionados com a extensão da área primária de lesão e da penumbra isquêmica (MUNOZ-CESPEDES *et al.*, 2005).

Uma abordagem experimental comum para promover a recuperação da área de lesão é inibir os fatores negativos (proteínas inibitórias) liberados no meio extracelular e promover os fatores que induzem o crescimento e sobrevivência celular, através de diversas terapias, farmacológicas (como anti-inflamatórias com a minociclina, uso do anticorpo anti-NOGO, ou remoção das RPNs com ChABC); celulares (usando-se células tronco); ou exercícios de reabilitação (ambiente enriquecido, terapia de movimento induzido por restrição e exercícios

específicos para os membros comprometidos) (BIERNASKIE; CORBETT, 2001; CARMICHAEL *et al.*, 2005; CARMICHAEL, 2008; CHEATWOOD *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2001; CRESPO *et al.*, 2007; DROMERICK, 2009; FOX *et al.*, 2005; GALTREY *et al.*, 2007; HIMANEN *et al.*, 2004; HYATT *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 1999; MOON *et al.*, 2001; MURPHY; CORBETT, 2009; NAKAGAWA *et al.*, 2013; PAPADOPOULOS *et al.*, 2006; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999).

4.3 EXERCÍCIO FÍSICO E NEUROPLASTICIDADE

Após o estabelecimento do quadro neurológico pós-AVC, segue um período de recuperação espontânea dos sintomas, refletindo a reorganização espontânea do sistema nervoso central. O exercício físico e a reabilitação específica podem interagir com estes fatores espontâneos, estimulando ainda mais a recuperação (CHEN *et al.*, 2010).

O treinamento de uma atividade motora específica também facilita a melhora do desempenho funcional em modelos experimentais de AVC (MURPHY; CORBETT, 2009). Protocolos de avaliação do desempenho funcional são comumente usados em humanos e em modelos animais, porém raramente determinam o quanto a melhora do desempenho reflete a verdadeira recuperação funcional, movimentos de compensação ou uma combinação de ambos, por isso muitos autores têm verificado a correlação entre diversos tipos de exercício e a recuperação da função motora, tentando excluir ao máximo os movimentos de compensação (MURPHY; CORBETT, 2009).

Vários estudos têm mostrado que, após uma lesão isquêmica, o exercício físico promove efeitos que melhoram a circulação e perfusão cerebral a curto e longo prazo e a recuperação funcional (DING *et al.*, 2004; 2005; ENDRES *et al.*, 2003; GERTZ *et al.*, 2006) através da arteriogênese, vasculogênese e angiogênese (SCHMIDT *et al.*, 2013).

A arteriogênese é estimulada pelo aumento da tensão nas paredes das artérias devido ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral, induzido pelo exercício. O aumento da tensão sanguínea no endotélio produz uma cascata molecular, incluindo a expressão da molécula de adesão intracelular (ICAM-1), aumento da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP1), que desencadeiam uma invasão de células mononucleares derivadas da medula óssea, levando à proliferação de células endoteliais e da musculatura lisa do endotélio, aumentando o diâmetro de artérias colaterais existentes (SCHMIDT *et al.*, 2013).

Com relação à vasculogênese e angiogênese, o exercício também atua aumentando a quantidade de células progenitoras endoteliais (EPCs), que são células-tronco derivadas da medula óssea, com potencial de diferenciação em células endoteliais. Estas células estão envolvidas no crescimento de capilares e na liberação de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), resultando no recrutamento de progenitores neuronais residentes e migração de neuroblastos, facilitando a neurogênese (SCHMIDT *et al.*, 2013; YUEWEN; QIANG; HE, 2013).

Esse aumento da vascularização tem sido encontrado em várias regiões do encéfalo, incluindo cerebelo, hipocampo, córtex frontal e córtex motor (ERICKSON; GILDENGERS; BUTTERS, 2013; NUDO, 2003).

O exercício também é capaz de influenciar o perfil de expressão temporal de várias moléculas, tais como o BDNF, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e sinapsina-1, relacionadas com processos plásticos fundamentais à recuperação (PLOUGHMAN *et al.*, 2007; YUEWEN; QIANG; HE, 2013).

As alterações neurais induzidas pelo exercício acontecem paralelamente àquelas observadas durante a recuperação espontânea, mas persistem por um período maior e dependem de experiência individual e adaptação e/ou reabilitação específica (CHEN *et al.*, 2010; LUFT *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2008).

De forma geral o aumento da plasticidade neuronal após lesão permite recuperação funcional, observada em níveis micro e macroscópicos, podendo ser espontâneo ou induzido pelo treinamento, embora ocorra apenas dentro de um período crítico após a lesão. Esse período crítico tem sido alvo de muitas investigações, com o intuito de descobrir o melhor momento para iniciar as diversas terapias. A intensidade do treino reabilitativo pode induzir efeitos permanentes nos fatores de crescimento e moléculas envolvidas na plasticidade sináptica, favorecendo o remodelamento cerebral (CHEN *et al.*, 2010; DI FILIPPO *et al.*, 2008).

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito combinado da remoção dos PGSCs com exercício físico para o membro afetado na recuperação motora após isquemia experimental do córtex sensório-motor.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito combinado da remoção dos PGSCs com exercício físico sobre o tamanho da área de lesão e no desempenho motor do membro afetado após isquemia experimental no córtex sensório-motor;
- b) Avaliar o efeito somente do exercício físico sobre o tamanho da área de lesão e no desempenho motor do membro afetado após isquemia experimental no córtex sensório-motor;
- c) Avaliar o efeito somente da remoção dos PGSCs sobre o tamanho da área de lesão e no desempenho motor do membro afetado após isquemia experimental no córtex sensório-motor.

6 MÉTODO

6.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 16 ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, todos machos com peso corporal entre 250 e 300g. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (ver TABELA 1) e receberam diferentes protocolos de treinamento comportamental (FIGURA 10). Todos os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA nº 156-13).

TABELA 1: Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.

Grupo	Tratamento	N
Controle 21 dias	Isquemia, implante de Elvax saturado com BSA, avaliação comportamental em -1, 3, 7, 14 e 21 dias pós-lesão e perfusão.	04
Exercício 21 dias	Isquemia, implante de Elvax saturado com BSA + exercício físico, avaliação comportamental em -1, 3, 7, 14 e 21 dias pós-lesão perfusão.	04
ChABC 21 dias	Isquemia, implante de Elvax saturado com ChABC, avaliação comportamental em -1, 3, 7, 14 e 21 dias pós-lesão e perfusão.	04
ChABC + Exercício 21 dias	Isquemia, implante de Elvax saturado com ChABC + exercício físico, avaliação comportamental em -1, 3, 7, 14 e 21 dias pós-lesão e perfusão.	04
Total		16

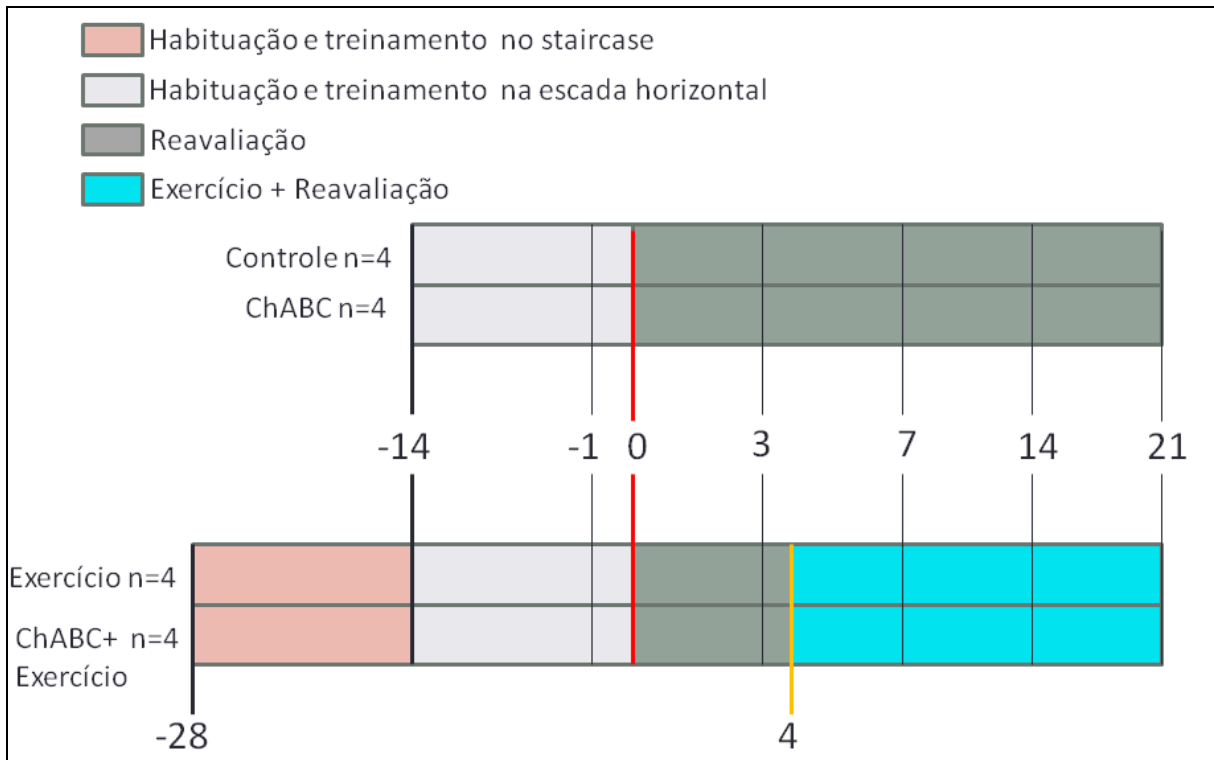


Figura 10 - Desenho experimental.

6.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Antes de qualquer manipulação os animais foram habituados ao toque humano pelo período de duas semanas. A análise comportamental foi realizada através dos testes de exploração vertical (SCHALLERT *et al.*, 2000) e da escada horizontal (METZ; WHISHAW, 2002) em -1 (um dia antes da indução da lesão isquêmica), 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão isquêmica, para observar o desempenho motor nas fases aguda (3 e 7 dias) e crônica (14 e 21 dias) após a lesão.

6.2.1 Teste da Exploração Vertical

Os animais foram colocados em um cilindro de vidro para avaliar a frequência de utilização das patas anteriores durante a exploração vertical espontânea. Este procedimento permite quantificar a preferência de uso das patas e o comportamento exploratório do animal (SCHALLERT *et al.*, 2000).

O cilindro de vidro mede 20 cm de diâmetro por 40 cm de altura e o registro do vídeo foi feito por 5 minutos, com dois espelhos com angulação de 90° entre si atrás do cilindro para permitir a visualização de mais de um ângulo de visão dos animais (FIGURA 11).



Figura 11 - O teste da exploração vertical.

A análise *offline* dos vídeos para determinar a frequência de uso das patas anteriores durante a exploração vertical foi realizada com o auxílio do programa VLC media player 2.0.1 (VideoLAN *Organization*). Quantificamos o primeiro contato na parede do cilindro no momento da içada do animal: primeiro contato com a pata esquerda, primeiro contato com a pata direita ou a realização do primeiro contato com ambas as patas anteriores. A frequência de uso das patas foi expressa em porcentagem do total de eventos. Permaneceram no estudo os animais que mantiveram o comportamento exploratório, indicando que a lesão isquêmica foi focal e não alterou este comportamento espontâneo.

6.2.2 Teste da Escada Horizontal

O aparato para o teste da escada horizontal consiste em duas placas de acrílico, paralelas entre si, de 100 cm de comprimento e 20 cm de altura, com hastes de metal inseridas na porção inferior do aparato à uma distância mínima de 1 cm entre elas. A distância entre as placas de acrílico deve ser cerca de 1 cm maior que o eixo látero-lateral do animal para dificultar que o mesmo se vire, estimulando que o animal tenha trajeto unidirecional de uma extremidade à outra do aparato. O aparato deverá ser colocado a 30 cm de altura de uma superfície plana (FIGURA 12) (METZ; WHISHAW, 2009).

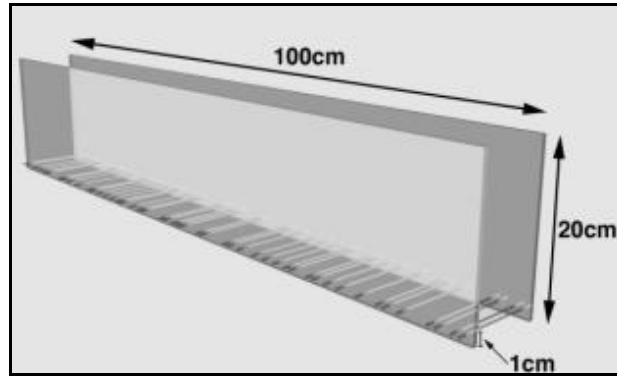


Figura 12 – Esquema ilustrativo do aparato do teste da escada horizontal.

Fonte: Adaptado de METZ; WHISHAW, 2002.

Para executar a tarefa, todos os animais foram treinados por duas semanas antes da indução isquêmica. O treinamento foi diário e consistiu em habituar os animais a atravessar o aparato em um padrão regular (FIGURA 13), por três vezes consecutivas.

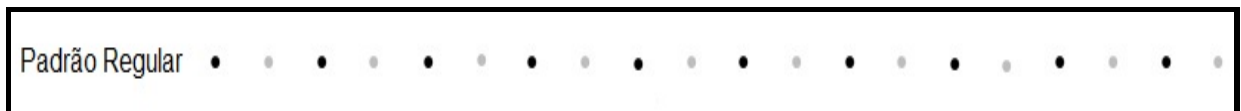


Figura 13 – Esquema ilustrativo do padrão regular utilizado para pré-treino no teste da escada horizontal.

Pontos pretos: presença das hastes de metal; pontos cinzas: ausência das hastes de metal.

A dificuldade da tarefa foi controlada modificando-se as posições das hastes de metal, a uma distância que variou de 1 a 5 cm. Todos os animais atravessaram o aparato em cinco padrões de distribuição das hastes de metal já utilizados no Laboratório de Neuroplasticidade (HUJBB/ICS/UFPA) para padronizar a dificuldade do teste e melhorar a interpretação dos resultados (FIGURA 14).

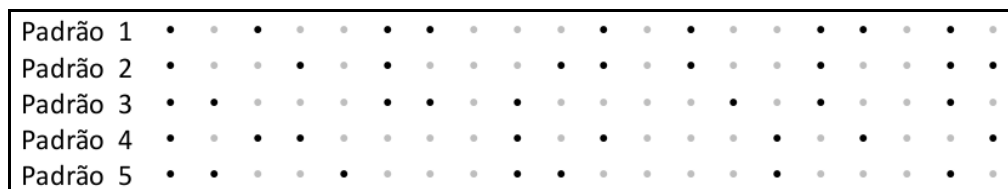


Figura 14 – Esquema ilustrativo dos 5 padrões irregulares utilizados no teste da escada horizontal.

Pontos pretos: presença das hastes de metal; pontos cinzas: ausência das hastes de metal.

A análise qualitativa do teste foi realizada de acordo com a TABELA 2 e a FIGURA 15 a seguir:

TABELA 2: Descrição da análise comportamental do teste da escada horizontal.

Índice	Colocação da pata	Descrição
(0)	<i>Total miss</i> (Erro total)	Queda profunda do membro entre as hastes, sem fazer nenhum contato, perturbando a postura e equilíbrio do animal.
(I)	<i>Deepslip</i> (Queda da pata)	Após fazer contato com a haste, o membro escorrega com a descarga de peso, e cai profundamente entre as hastes.
(II)	<i>Slightslip</i> (Deslizamento leve)	Após fazer contato com a haste, o membro escorrega com a descarga de peso, mas não há queda. O animal continua a marcha.
(III)	<i>Replacement</i> (Reposicionamento)	O membro é reposicionado de uma haste para outra antes de ocorrer a descarga de peso e a queda da pata.
(IV)	<i>Correction</i> (Correção)	A posição do membro na haste é corrigida.
(V)	<i>Partial placement</i> (Apoio parcial)	O membro faz contato com a haste usando os dedos ou o punho.
(VI)	<i>Correct placement</i> (Apoio correto - acerto)	A porção média da pata é colocada sobre a haste, não ocorre queda com a descarga de peso.

Fonte: Adaptado de METZ; WHISHAW, 2002.

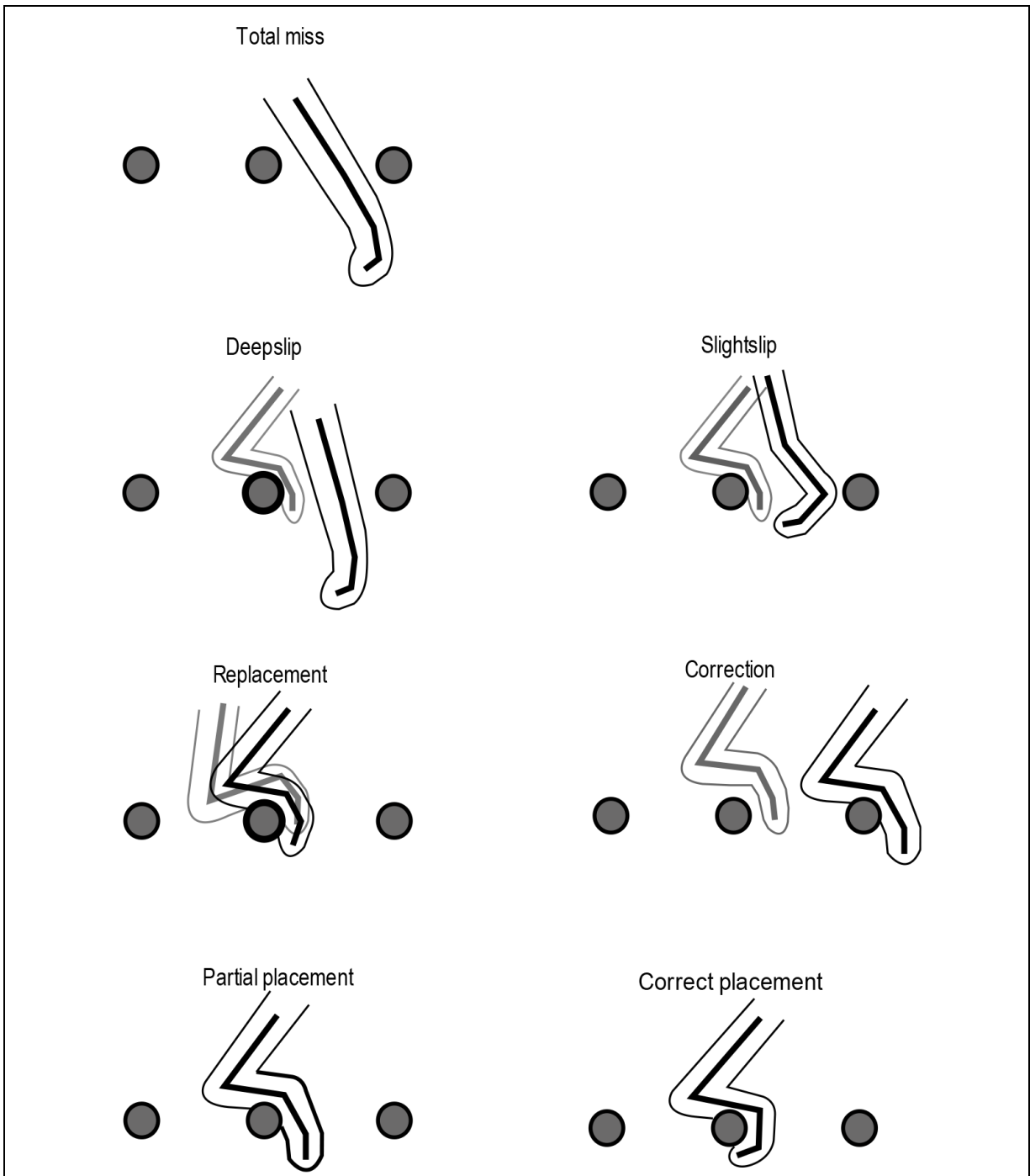


Figura 15 – Variação do posicionamento da pata anterior nas hastes de metal da escada horizontal. A análise qualitativa foi feita através da identificação dos erros (*Total miss*, *Deepslip*, *Slightslip*), compensações ou ajustes (*Replacement*, *Correction*, *Partial placement*) e acertos (*Correct placement*).

Fonte: Adaptado de BARBOSA *et al.*, 2014.

A análise quantitativa do teste foi feita a partir das frequências de erros agrupados (*Total miss*, *Deepslip*, *Slightslip*), compensações ou ajustes (*Replacement*, *Correction*, *Partial placement*) e acertos (*Correct placement*).

6.3 EXERCÍCIO FÍSICO: Teste do *Staircase*

O teste do *staircase* avalia o desempenho do animal na tarefa de alcance e preensão de um objeto com a pata anterior. Essa avaliação pode ser feita de maneira independente para as duas patas anteriores (MONTROYA *et al.*, 1991).

No presente estudo, o aparato do *staircase* foi utilizado para exercício físico específico para a pata afetada pela isquemia experimental do córtex sensório-motor. Este teste foi escolhido para a realização do exercício porque ele permite o treinamento independente das patas anteriores. O aparato consiste em uma caixa com uma plataforma central para o animal subir e 6 degraus localizados de cada lado da plataforma (FIGURA 16).

Os animais do grupo ChABC + Exercício e grupo Exercício foram habituados ao aparato por duas semanas, e depois treinados nesta tarefa diariamente, durante duas semanas anteriores à cirurgia, com duas sessões de 15 minutos por dia. Três bolas de açúcar foram colocadas em cada degrau, de cada lado, e ele fazia o alcance e a preensão das bolas de açúcar. Após este período foi possível identificar a pata preferencial do animal e iniciou-se o treino na escada horizontal.

No 4º dia após a lesão isquêmica (abrangendo o período de pico máximo de inflamação pós-lesão – 3 a 7 dias), iniciaram-se as sessões de exercício físico específico para a pata afetada. As sessões foram diárias, com duração de 20 minutos (média de 80 alcances), e as bolas de açúcar foram colocados apenas nos degraus do lado da pata afetada, induzindo o uso desta pata pelo animal. O exercício físico foi realizado cinco vezes por semana, por duas semanas consecutivas.

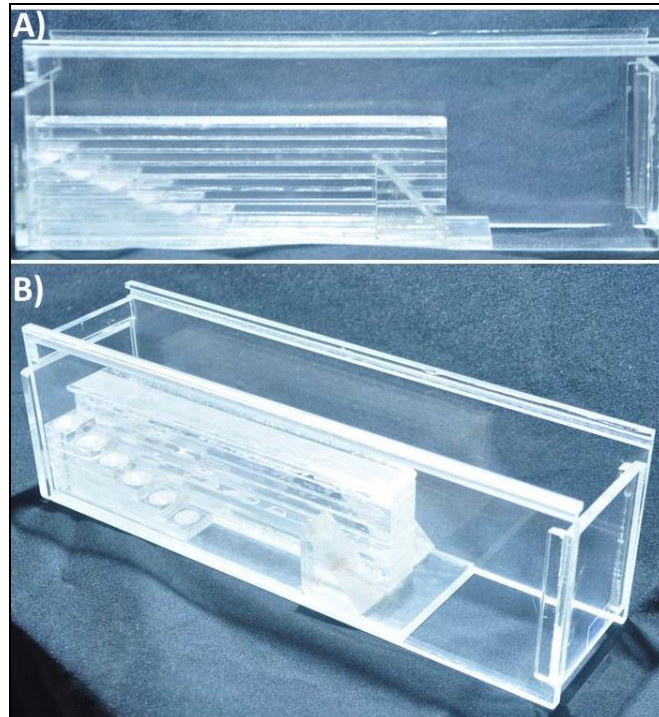


Figura 16 – Aparato do teste do staircase. A) Visão lateral do aparato. B) Visão superior do aparato.

6.4 CIRURGIA PARA INDUÇÃO DE ISQUEMIA

Após anestesia (com Cloridrato de Cetamina – Vetanarcol[®], König. 72mg/kg – e Cloridrato de Xilazina – Kensol[®], König. 9mg/kg) e observada a ausência dos reflexos dolorosos os animais foram ajustados a um aparelho estereotáxico (Insight[®], EFF-336) e submetidos a craniotomia para exposição do córtex sensório-motor (a área de representação motora da pata anterior encontra-se superposta com a região sensorial). A isquemia experimental foi induzida com 3 microinjeções de 0,5µl do vasoconstritor endotelina (ET-1 - Sigma-Aldroch) a uma concentração de 80pmol, diluída em azul de colanil para marcação das áreas de injeção no córtex cerebral, nas seguintes coordenadas estereotáxicas (todas relativas ao bregma): (-/+3,0mm ML, -0,5mm AP), (-/+3,0mm ML, +0,5mm AP), e (-/+3,0mm ML, +1,5mm AP) (área de representação sensório-motora da pata anterior contralateral) (FIGURA 17) (CASTRO-ALAMANCOS; BORREL, 1995).

Após as microinjeções de ET-1, uma fatia de ELVAX de 150µm de espessura saturado com Condroitinase ABC (grupos ChABC e ChABC + Exercício) ou com BSA (grupos Controle e Exercício), foi posicionada no espaço epidural, imediatamente em cima da lesão isquêmica do córtex sensório-motor.

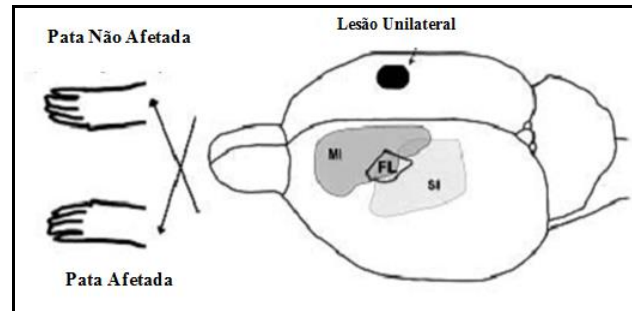


Figura 17 – Ilustração esquemática da lesão unilateral e comprometimento do membro contralateral à lesão. M1: Córtex motor primário; S1: Córtex somatosensorial primário; FL: pata anterior.

Fonte: Adaptado de JONES *et. al.*, 2003.

6.5 IMPLANTE DE ELVAX SATURADO COM CHABC OU BSA: PROTOCOLO DE SATURAÇÃO

Uma pequena quantidade de etileno-vinil-acetato (Elvax®-DUPONT) foi lavada previamente com álcool comercial (90-95%) sob agitação constante durante 24 horas. Em seguida, 200mg do polímero foram dissolvidos em 2 mL de diclorometano (Vetec). Alíquotas de 2 mL foram separadas em tubos de vidros de 70 x 9mm e adicionadas de 20µL de condroitinase ABC (50U/ml, Sigma Aldrich®) ou o mesmo volume de albumina soro bovino (BSA, para os animais dos grupos Controle e Exercício). O volume resultante foi homogeneizado durante 1 minuto e armazenado em ultrafreezer (-80°C). Em seguida, as alíquotas foram transferidas para um tubo de liofilização e colocadas sob vácuo durante 24 horas para a evaporação do diclorometano e foram então cortadas em fatias de 150 µm com o auxílio de um criostato. Os cortes foram mantidos a -20°C até o momento do implante. A concentração de ChABC é de 1,5 U/mL por fatia (SÁ, et al., 2010).

Após os implantes de Elvax saturado com Condroitinase ABC ou BSA, os animais foram submetidos ao exercício físico (4º dia pós-lesão) e perfundidos em 21 dias após lesão isquêmica.

6.6 PERFUSÃO E ARMAZENAMENTO DOS CORTES

Os animais foram perfundidos no tempo de sobrevida de 21 dias. Foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg). E depois de abolidos os reflexos corneanos e de retirada da pata,

os animais foram perfundidos pelo ventrículo esquerdo com 250-300 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparinizada (Cristália), seguido de 250-300 ml de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Após craniotomia, os encéfalos foram retirados, pós-fixados por 24h na mesma solução fixadora e em seguida crioprotégidos por imersão em solução com concentrações crescentes de sacarose diluída em glicerina (10%, 20% e 30%) com tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 – 7,4. Os encéfalos foram então emblocados por congelamento em Tissue-Tek® (Sakura) e seccionados no criostato (Micron, HM505E) em fatias com espessura de 50 µm. Para marcação de corpos celulares foram utilizadas lâminas histológicas previamente gelatinizadas, montadas com 3 secções cada, sendo 3 lâminas para cada animal. Os cortes restantes foram armazenados em solução tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4) em placas de 24 poços, com 2 secções em cada poço, e guardados na geladeira para posterior realização da imunofluorescência.

6.7 HISTOLOGIA

6.7.1 Área de Lesão

Para verificar a área de lesão, utilizamos a técnica de coloração pela violeta de cresila (coloração de Nissl), que permite a identificação de corpos celulares neuronais e de células da glia. Para isto utilizamos secções com espessura de 50µm. A área lesionada foi identificada pela presença do corante azul de colanil, utilizado na diluição da ET-1, ou simplesmente pela necrose tecidual. A análise quantitativa da área de lesão foi realizada com o auxílio do programa de computação ImageJ.

6.8 IMUNOMARCAÇÃO

6.8.1 Degradação dos PGSCs da Rede Perineuronal

Para investigar a degradação dos PGSCs das redes perineuronais da área de lesão na recuperação funcional do córtex sensorio-motor, realizamos imunomarcção para o anticorpo anti-chondroitin-4-sulfate (anti-C4S), que marca moléculas de PGSCs degradadas (KARIMI-ABDOLREZAEI *et al*, 2012). O processo de imunomarcção consistiu, primeiramente, de lavagem em solução PBS sob agitação constante por 10 minutos. Após isso, as secções foram imersas em soro de jumento a 10% e PBS triton a 0,25% em temperatura ambiente durante 1

hora. Esse procedimento foi realizado para bloquear as reações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo anti-chondroitin-4-sulfate (C4S, Milipore; 1:200 em PB 0,1M) durante a noite em temperatura ambiente. No segundo dia, as secções foram lavadas sob agitação constante e suave, 3 vezes, com duração de 10 minutos cada em PBS triton a 0,25%. Após isso, as secções foram incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário feito em cabra anti-camundongo fluorescente (goat anti-mouse, Sigma Aldrich®; 1:125 em PB 0,1M) em temperatura ambiente, no escuro. Depois, as secções foram novamente lavadas sob agitação constante e suave, 3 vezes, com duração de 10 minutos cada em PBS triton a 0,25%. Após isso, as secções foram colocadas nas lâminas previamente gelatinizadas, e colocadas para secar no escuro. Posteriormente, foram enxaguadas em água destilada por alguns segundos e colocadas para secar novamente. Depois foram montadas com a lamínula e glicerina.

A análise da imunomarcção para anticorpo anti-C4S foi realizada de maneira qualitativa, evidenciando ou não a marcação do PGSC degradado.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos testes comportamentais foi realizada através do teste de análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey (para as análises intragrupo) e pós-teste de Bonferroni (para as análises intergrupo), com nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$). Os gráficos e a análise estatística foram realizados no programa GraphPad (Prism 5.0).

7 RESULTADOS

No presente estudo, induzimos AVC isquêmico experimental no córtex sensório-motor, especificamente na representação motora da pata anterior de ratos adultos, utilizando-se microinjeções do peptídeo vasoconstritor ET-1 e, em seguida, implantamos Elvax® saturado com BSA (grupos controle/exercício) ou ChABC (grupos ChABC/ChABC e exercício) na superfície do córtex cerebral, na região correspondente ao córtex motor (M1) e somestésico (S1) aqui referida como córtex sensório-motor. Para avaliarmos se houve recuperação funcional da pata anterior afetada pelo AVC após remoção das RPNs associada ao exercício físico, realizamos o teste comportamental da escada horizontal, específico para atividade motora da pata anterior. Adicionalmente, foi realizada análise histológica (área de lesão) e imunofluorescência para marcação de proteoglicano de sulfato de condroitina degradado.

7.1 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL INDUZIU MORTE DO TECIDO NERVOSO

Avaliamos a área de lesão com auxílio do programa ImageJ (NIH, USA), delimitando a área com palor celular e também marcada com azul de colanil que estava presente na solução de injeção do peptídeo vasoconstritor ET-1 (FIGURA 18).

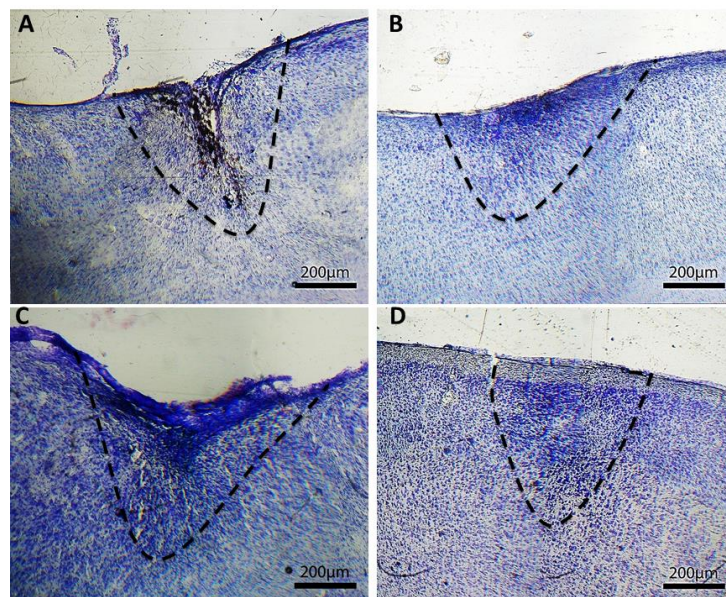


Figura 18 – Área de lesão. Coloração com violeta de cresila no córtex sensório-motor após AVC isquêmico experimental provocado por microinjeções de ET-1 nos grupos Controle (A), Exercício (B), ChABC (C) e ChABC + Exercício (D). Em pontilhado, a delimitação da área de lesão. Escala: 200µm.

Fonte: Pesquisa, 2014.

A remoção dos PGSCs, assim como a realização de exercício físico ou mesmo a associação de ambos não interferiram no tamanho da área de lesão, pois nossos resultados demonstram que não houve diferença significativa no tamanho da área de lesão entre os grupos experimentais do presente trabalho (FIGURA 19).

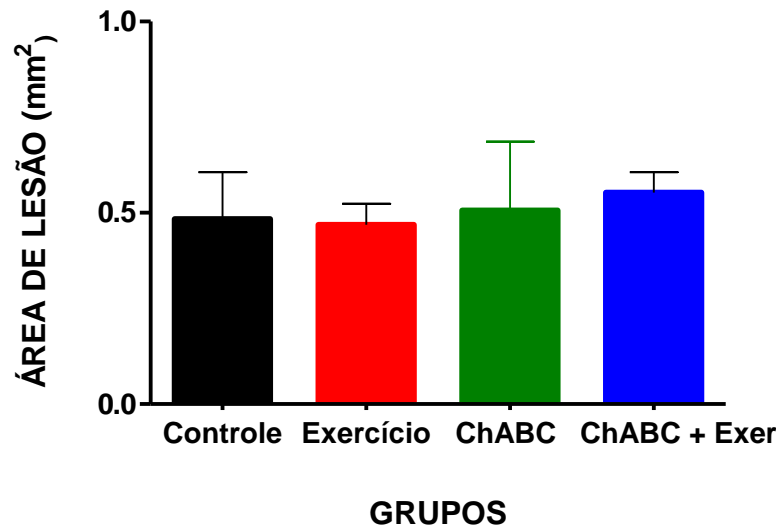


Figura 19 – Análise quantitativa da área de lesão. Gráfico representando a análise quantitativa da área (mm²) de lesão dos grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os grupos Controle (média=0,48 e DP=0,12), Exercício (média=0,46 e DP=0,05), ChABC (média=0,50 e DP=0,18) e ChABC + Exercício (média=0,55 e DP=0,05) (ANOVA, pós-teste de Tukey, ***p<0,001; **<0,01; *p<0,5).

Fonte: Pesquisa, 2014.

7.2 REMOÇÃO DOS PGSCs NA BORDA DA LESÃO

Animais que foram submetidos à remoção dos PGSCs das RPNs apresentaram neurônios com epítomos para o anticorpo anti-condroitin-4-sulfato (C4S) na borda da área de lesão ao final da sobrevida (FIGURA 20).

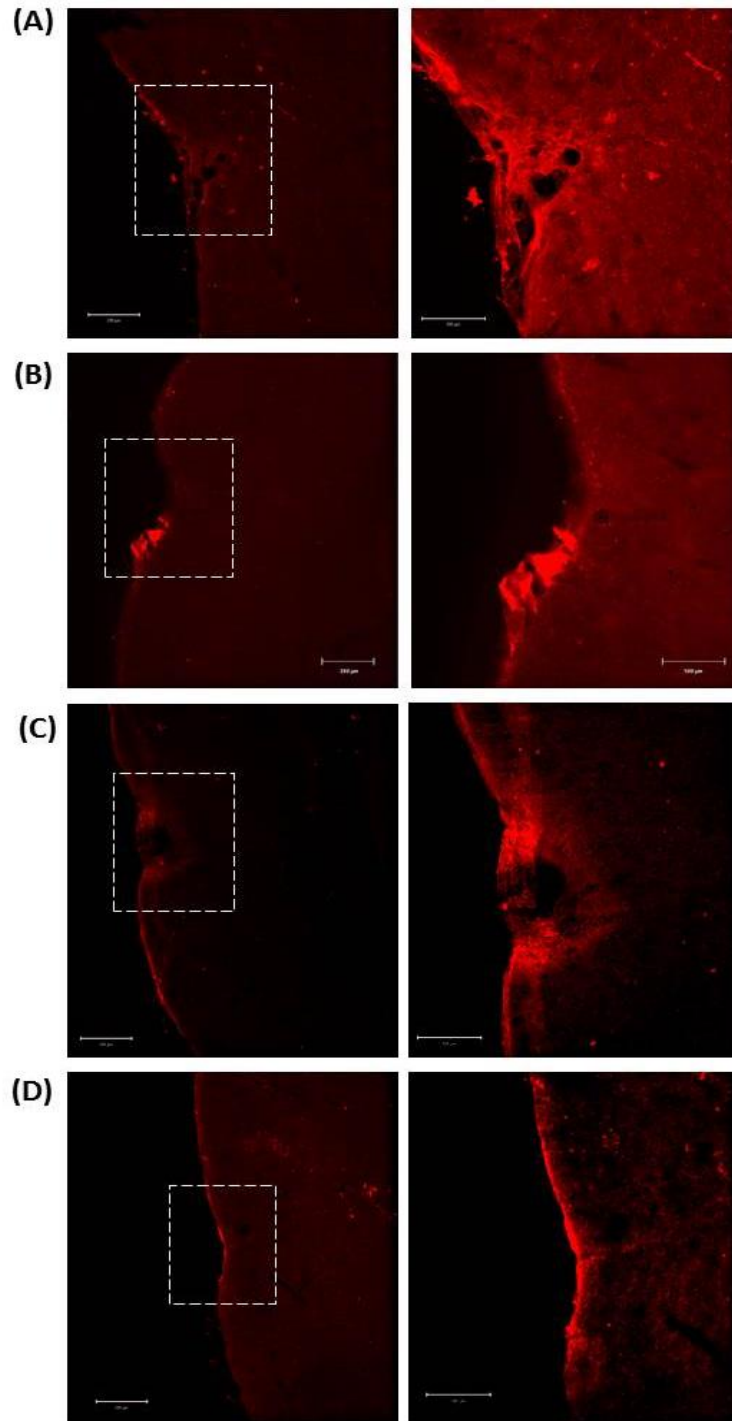


Figura 20 – Imagens de microscopia confocal representativas da marcação de PGSCs degradados na borda da área de lesão. Grupo Controle (A); Grupo Exercício (B); Grupo ChABC (C); Grupo ChABC + Exercício (D). (A), (B) Não há evidências de degradação de PGSCs nos grupos Controle e Exercício. (C), (D) A remoção das RPNs é confirmada nos animais dos grupos ChABC e ChABC + Exercício, pelo aparecimento de imunomarcação de condroitin-4-sulfato (C4S) ao redor da área lesionada (C) e na borda da lesão (D). Coluna da direita é a ampliação da imagem delimitada pelo boxe branco.

Fonte: Pesquisa, 2014.

7.3 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL NÃO ALTEROU O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO

Antes da realização do teste da escada horizontal, realizamos o teste do cilindro para avaliarmos a capacidade exploratória dos animais. Neste teste, quantificamos o uso da pata afetada ao explorar o cilindro e não houve variação significativa deste comportamento em todos os grupos experimentais avaliados após a lesão (FIGURA 21).

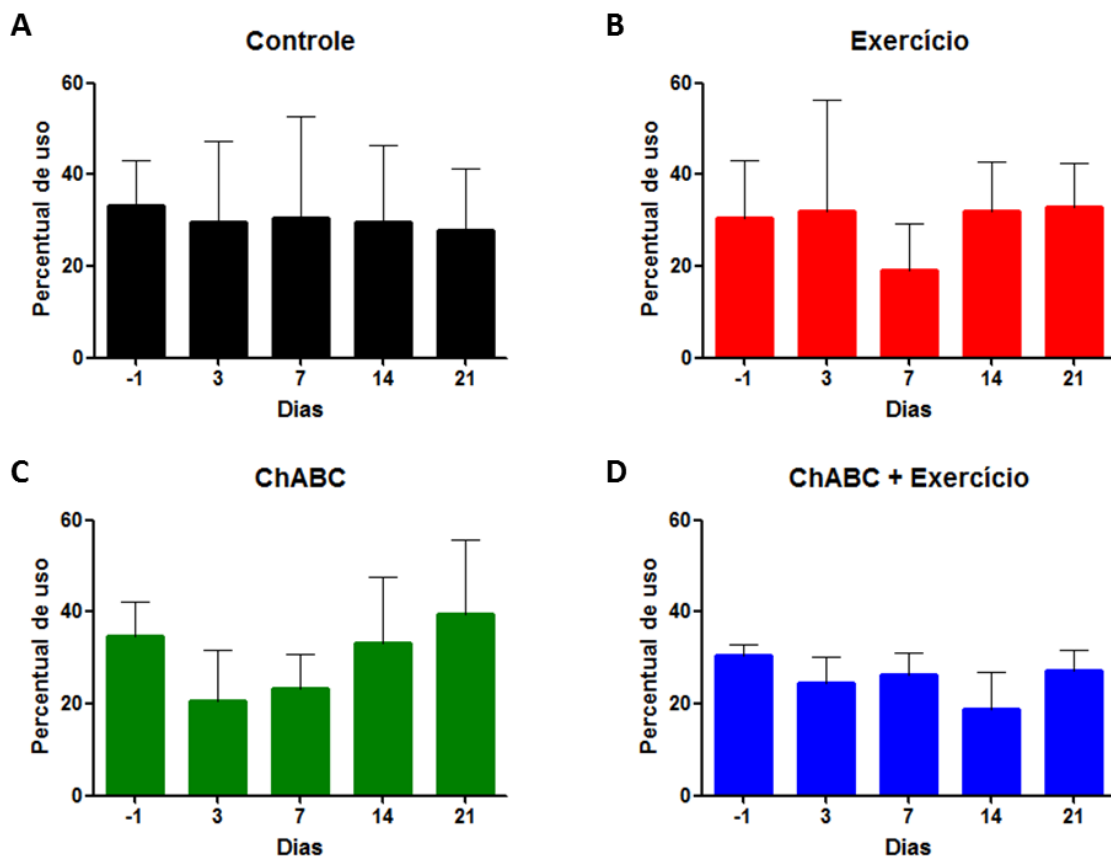


Figura 21 – Comportamento Exploratório dos grupos experimentais. Gráficos representando o percentual de uso da pata afetada ao explorar o cilindro antes da cirurgia ou baseline (dia -1) e após a cirurgia (dias 3, 7, 14 e 21) nos grupos Controle (A), Exercício (B), ChABC (C) e ChABC + Exercício (D). Não houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline e 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão em todos os grupos experimentais (ANOVA, pós-teste de Tukey, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

Da mesma forma, na avaliação intergrupo do teste do cilindro, não observamos diferença significativa entre os grupos experimentais, ou seja, a indução da lesão isquêmica não provocou uma perda funcional ampla, não alterando o comportamento exploratório e nem a frequência de uso da pata afetada dos animais após a lesão (FIGURA 22).

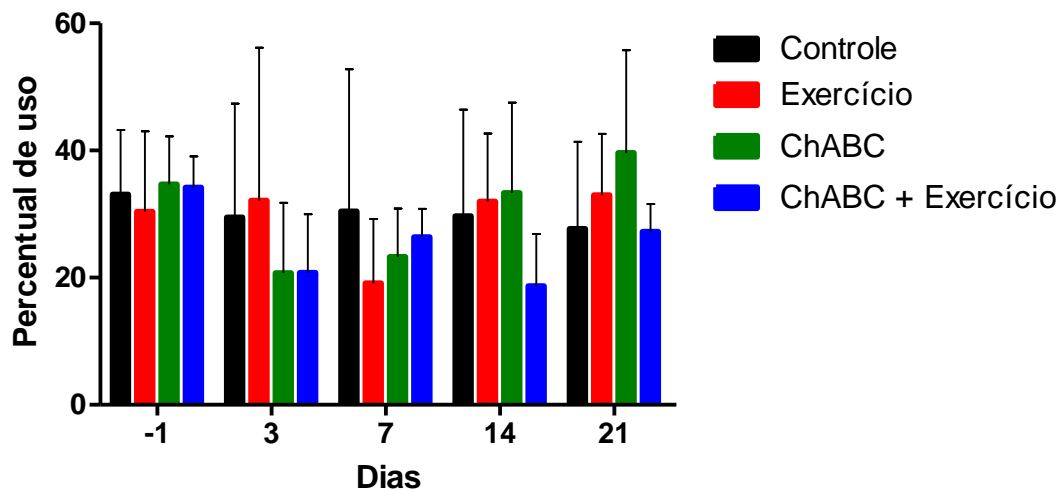


Figura 22 – Teste do Cilindro. Comparação da frequência de uso da pata afetada entre os grupos Controle, Exercício, ChABC e ChABC + Exercício, antes da cirurgia ou baseline (-1) e após a cirurgia (dias 3, 7, 14 e 21). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle (pré-lesão ou baseline média=0,33 e DP=0,10; dia 3 média=0,29 e DP=0,17; dia 7 média=0,30 e DP=0,10; dia 14 média=0,29 e DP=0,16; e dia 21 média=0,27 e DP=0,13); Exercício (pré-lesão ou baseline média=0,30 e DP=0,12; dia 3 média=0,32 e DP=0,24; dia 7 média=0,19 e DP=0,37; dia 14 média=0,31 e DP=0,10; e dia 21 média=0,32 e DP=0,09); ChABC (pré-lesão ou baseline média=0,34 e DP=0,07; dia 3 média=0,20 e DP=0,11; dia 7 média=0,23 e DP=0,07; dia 14 média=0,33 e DP=0,14; e dia 21 média=0,39 e DP=0,16); e ChABC+Exercício (pré-lesão ou baseline média=0,34 e DP=0,04; dia 3 média=0,20 e DP=0,09; dia 7 média=0,26 e DP=0,04; dia 14 média=0,18 e DP=0,08; e dia 21 média=0,27 e DP=0,04). (ANOVA, pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

7.4 AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL PROVOCOU DÉFICIT MOTOR NA PATA ANTERIOR

O teste da escada horizontal foi analisado em três parâmetros: Acertos; Ajustes; e Erros. E, após avaliação intragrupo deste teste, podemos afirmar que houve declínio da função motora após a lesão isquêmica experimental nas áreas M1/S1 para todos os grupos experimentais. Observando redução significativa na frequência de acertos, e aumento significativo na frequência de ajustes e erros ao realizar a tarefa de atravessar a escada horizontal nos dias avaliados.

Com relação à frequência de acertos verificamos que houve diferença significativa do desempenho motor entre os grupos nos dias de reavaliação (FIGURAS 23 e 24).

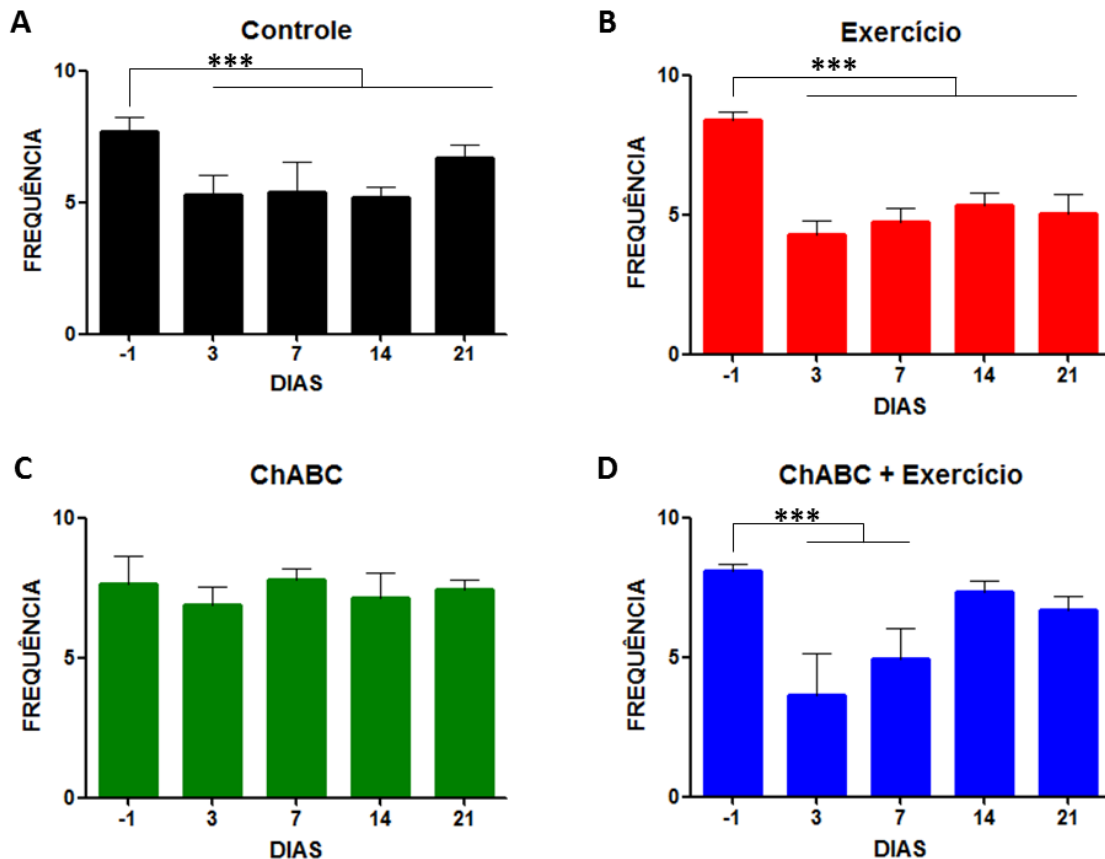


Figura 23 – Frequência de Acertos no Teste da Escada Horizontal. Gráficos representando a frequência de acertos antes da cirurgia ou baseline (dia -1) e após a cirurgia (dias 3, 7, 14 e 21) nos grupos Controle (A), Exercício (B), ChABC (C) e ChABC + Exercício (D). (A) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=7,70 e DP=0,54), e 3 (média=5,30 e DP=0,71), 7 (média=5,4 e DP=1,14), 14 (média=5,20 e DP=0,37) e 21 (média=6,70 e DP=0,48) dias após a lesão; (B) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=8,40 e DP=0,28), e 3 (média=4,30 e DP=0,48), 7 (média=4,75 e DP=0,50), 14 (média=5,35 e DP=0,41) e 21 (média=5,05 e DP=0,67) dias após a lesão; (C) Não houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline e 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão; (D) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=8,10 e DP=0,22), e 3 (média=3,65 e DP=1,48) e 7 (média=4,95 e DP=1,06) dias após a lesão (ANOVA, pós-teste de Tukey, *** $p < 0,001$; ** $< 0,01$; * $p < 0,5$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

A figura 23 mostra redução na frequência de acertos altamente significativa nos grupos Controle e Exercício ($p < 0,001$) durante toda a sobrevida, ou seja, os animais não recuperaram a frequência de acertos obtida antes da lesão. O grupo ChABC + Exercício também teve uma redução significativa nessa frequência em 3 e 7 dias ($p < 0,001$), porém essa redução não se manteve ao final da sobrevida, logo, estes animais recuperaram seu comportamento pré-lesão. Já o grupo que teve apenas a remoção dos PGSCs (ChABC) não apresentou redução significativa da frequência de acertos durante toda a sobrevida.

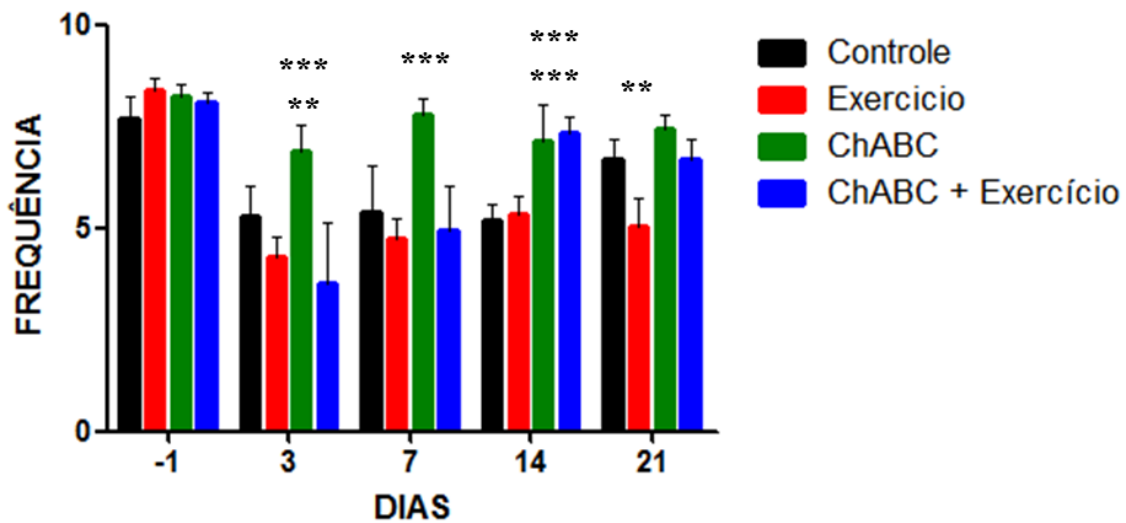


Figura 24 – Análise intergrupo da Frequência de Acertos. Gráfico representando a frequência de acertos dos grupos experimentais no teste da escada horizontal. Comparação entre os grupos Controle, Exercício, ChABC e ChABC + Exercício. Houve diferença significativa entre os grupos no dia 3 média=6,9 e (DP)=0,65; dia 7 média=7,8 e (DP)=0,37; dia 14 média=7,15 e (DP)=0,87; e dia 21 média=7,4 e (DP)=0,32 para o grupo ChABC; e no dia 3 média=3,65 e (DP)=1,48; e dia 14 média=7,35 e (DP)=0,37 para o grupo ChABC+Exercício; e no dia 21 média=5,05 e (DP)=0,67 para o grupo Exercício. (ANOVA, pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $< 0,01$; * $p < 0,5$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

Comparando o comportamento de todos os grupos na escada horizontal, como mostra a figura 24, o grupo ChABC manteve sua frequência de acertos, enquanto os demais grupos tiveram a frequência de acertos significativamente menor em 3 e 7 dias pós-lesão em relação aos seus baselines (grupo Controle: $p < 0,01$ em 3 dias e $p < 0,001$ em 7 dias; grupos Exercício e ChABC + Exercício: $p < 0,001$ em 3 e 7 dias). Em 14 dias pós-lesão, apenas os grupos Controle e Exercício apresentaram uma frequência de acertos significativamente menor do que o grupos ChABC ($p < 0,001$ para o grupo controle; $p < 0,01$ para o grupo exercício) e ChABC + Exercício ($p < 0,001$). Em 21 dias após a lesão apenas o grupo Exercício manteve a frequência de acertos significativamente reduzida em comparação aos grupos Controle ($p < 0,01$), ChABC ($p < 0,001$) e ChABC + Exercício ($p < 0,01$).

Portanto, a figura 24 mostra que houve melhora no desempenho sensório-motor da pata afetada pelo AVC isquêmico experimental precocemente (3 dias após lesão) no grupo em que foi realizada a remoção enzimática das RPNs, enquanto os demais grupos permaneceram com déficit sensório-motor acentuado em 3, 7 e 14 dias após lesão, sendo que ao final da sobrevivência de 21 dias os grupos Controle e ChABC + Exercício alcançaram a recuperação funcional equiparando-se ao grupo ChABC. A apenas o grupo Exercício não obteve recuperação sensório-motora semelhante aos demais grupos experimentais.

A frequência de Ajustes ou de compensações também apresentou diferença estatística significativa em todos os grupos experimentais ao longo dos tempos (FIGURAS 25 e 26). Como mostra a figura 25, todos os grupos apresentaram, em algum momento, um aumento significativo da frequência de ajustes. Os grupos Controle e Exercício apresentaram um aumento significativo de ajustes até o final da sobrevivência de 21 dias. Enquanto os grupos que tiveram remoção dos PGSCs apresentaram aumento significativo na frequência de ajustes em 14 ($p < 0,01$) e 21 ($p < 0,5$) dias (ChABC) e em 3 e 7 dias ($p < 0,001$) (ChABC + Exercício).

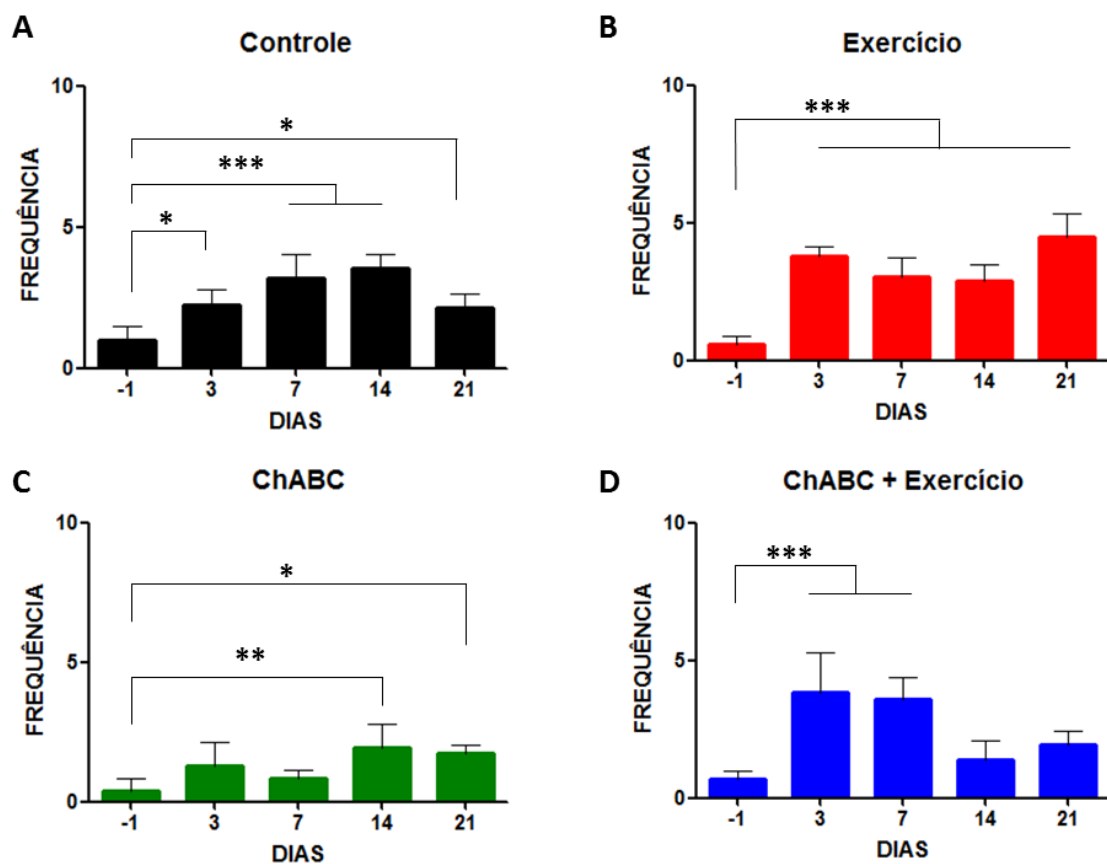


Figura 25 –Frequência de Ajustes no Teste da Escada Horizontal. Gráficos representando a frequência de ajustes antes da cirurgia ou baseline (dia -1) e após a cirurgia (dias 3, 7, 14 e 21) nos grupos Controle (A), Exercício (B), ChABC (C) e ChABC + Exercício (D). (A) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=1,00 e DP=0,46), e 3 (média=2,25 e DP=0,88), 7 (média=3,20 e DP=1,03), 14 (média=3,55 e DP=0,65) e 21 (média=2,15 e DP=0,73) dias após a lesão; (B) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=0,60 e DP=0,28), e 3 (média=3,80 e DP=0,70), 7 (média=3,05 e DP=1,33), 14 (média=2,90 e DP=0,86) e 21 (média=3,40 e DP=1,19) dias após a lesão; (C) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=0,40 e DP=0,46), e 14 (média=1,95 e DP=0,85) e 21 (média=1,75 e DP=0,94) dias após a lesão. (D) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=0,70 e DP=0,27), e 3 (média=3,85 e DP=1,88), e 7 (média=3,60 e DP=1,13) dias após a lesão (ANOVA, pós-teste de Tukey, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

Comparando os grupos, observamos na figura 26 que os grupos Exercício e ChABC + Exercício apresentaram maior frequência de ajustes em 3 ($p<0,01$) e 7 dias ($p<0,01$, para o grupo Exercício; e $p<0,001$ para o grupo ChABC + Exercício) pós-lesão em comparação com o grupo ChABC. O grupo Controle também apresentou maior frequência de ajustes quando comparado ao grupo ChABC em 7 dias pós-lesão ($p<0,01$). Em 14 dias após a lesão o grupo Controle apresentou maior frequência de ajustes quando comparado ao grupo ChABC + Exercício ($p<0,01$). Em 21 dias pós-lesão não houve diferença significativa na frequência de ajustes entre os grupos.

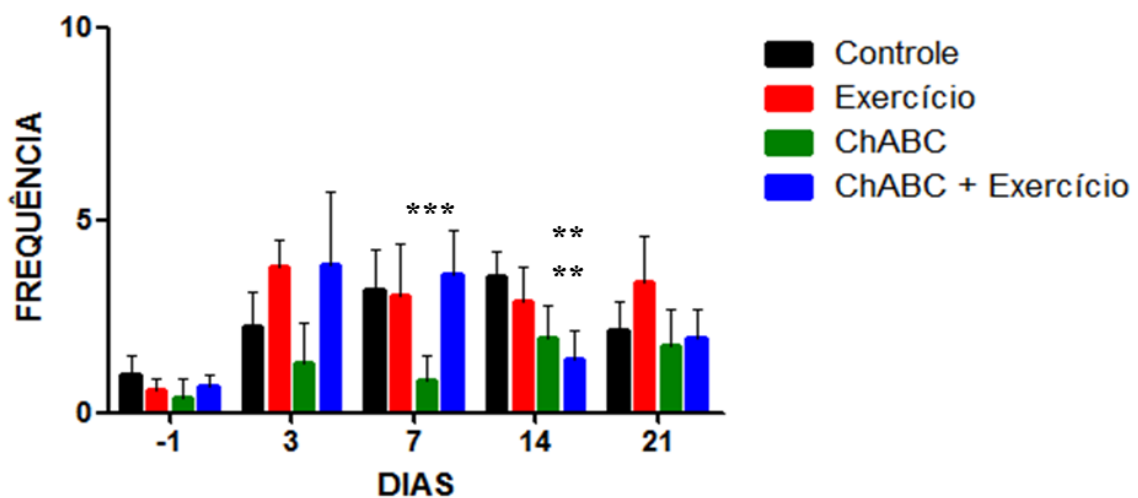


Figura 26 – Análise intergrupo da Frequência de Ajustes. Gráfico representando a frequência de ajustes dos grupos experimentais no teste da escada horizontal. Comparação entre os grupos Controle, Exercício, ChABC e ChABC + Exercício. Houve diferença significativa entre os grupos no dia 3 média=1,3 e Desvio padrão (DP)= 1,0; dia 7 média=0,85 e (DP)= 0,64; dia 14 média=1,95 e (DP)= 0,85 para o grupo ChABC e no dia 14 média=1,4 e (DP)=0,74 para o grupo ChABC+Exercício (ANOVA, pós-teste de Bonferroni, *** $p<0,001$; ** $<0,01$; * $p<0,05$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

Com relação à frequência de Erros, observamos na figura 27 que os grupos Controle, ChABC e ChABC + Exercício apresentaram diferença altamente significativa ($p<0,001$) comparando o desempenho motor pré-lesão (-1) e 3 dias pós-lesão. Houve também diferença significativa nos grupos Controle e ChABC + Exercício comparando-se o desempenho sensorio-motor 3 dias pós-lesão com 7, 14 e 21 dias pós-lesão ($p<0,05$). Para o grupo ChABC houve também diferença significativa comparando o desempenho motor 3 dias pós-lesão com 14 e 21 dias pós-lesão ($p<0,01$), e comparando 7 dias pós-lesão com 21 dias pós-lesão ($p<0,05$). Para o grupo tratado somente com exercício físico, essa diferença foi significativa comparando o desempenho motor pré-lesão e 3 ($p<0,05$) e 7 ($p<0,01$) dias pós-lesão, sendo

que a frequência máxima de erros ocorreu em 7 dias pós-lesão, onde houve diferença significativa quando comparado com 21 dias pós-lesão ($p < 0,05$).

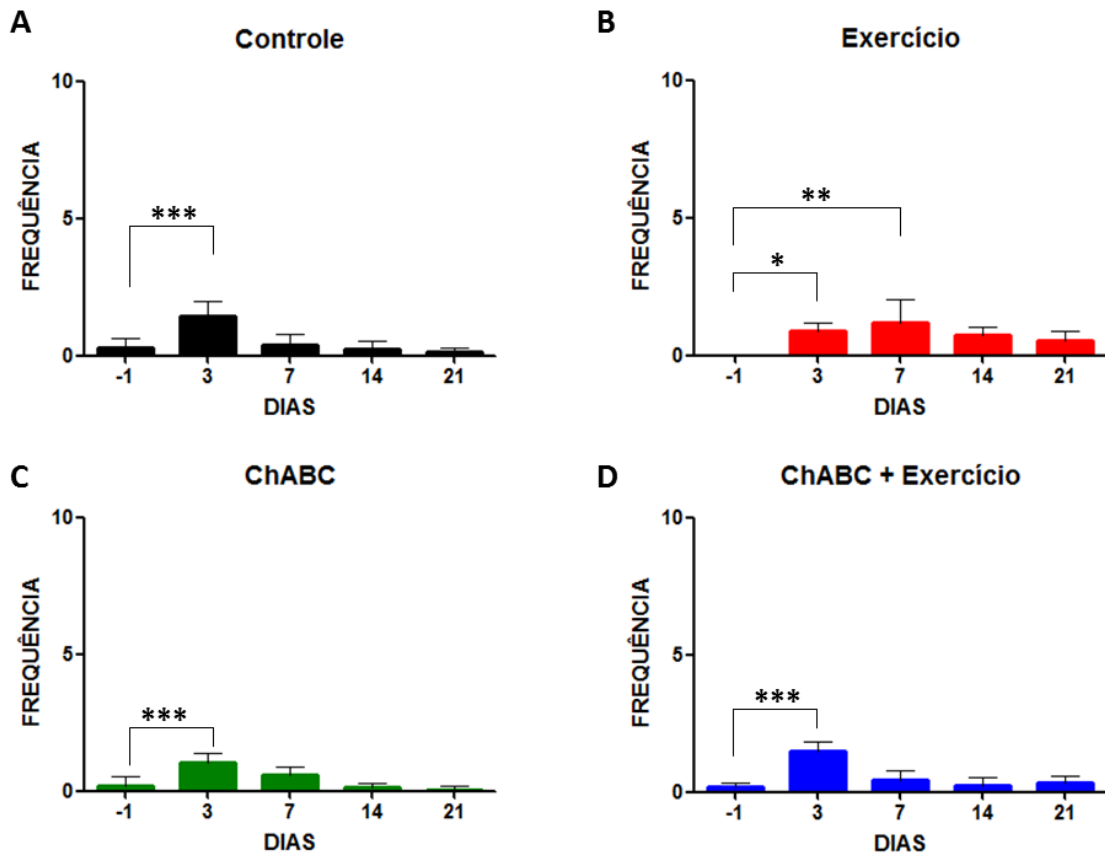


Figura 27 – Frequência de Erros no Teste da Escada Horizontal. Gráficos representando a frequência de erros antes da cirurgia ou baseline (dia -1) e após a cirurgia (dias 3, 7, 14 e 21) nos grupos Controle (A), Exercício (B), ChABC (C) e ChABC + Exercício (D). Houve aumento significativo da frequência de erros em todos os grupos. (A) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=0,30 e DP=0,44), e 3 (média=1,45 e DP=0,94) dias após a lesão; (B) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=0,00 e DP=0,00), e 3 (média=0,90 e DP=0,58) e 7 (média=1,20 e DP=0,98) dias após a lesão. (C) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=0,20 e DP=0,36), e 3 (média=1,05 e DP=0,83) dias pós-lesão. (D) Houve diferença significativa entre pré-lesão ou baseline (média=0,20 e DP=0,36) e 3 (média=1,50 e DP=0,77) dias pós-lesão (ANOVA, pós-teste de Tukey, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

Como todos os grupos apresentaram um aumento na frequência de erros, verificamos na figura 28 que não houve diferença significativa desta frequência entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados no presente trabalho.

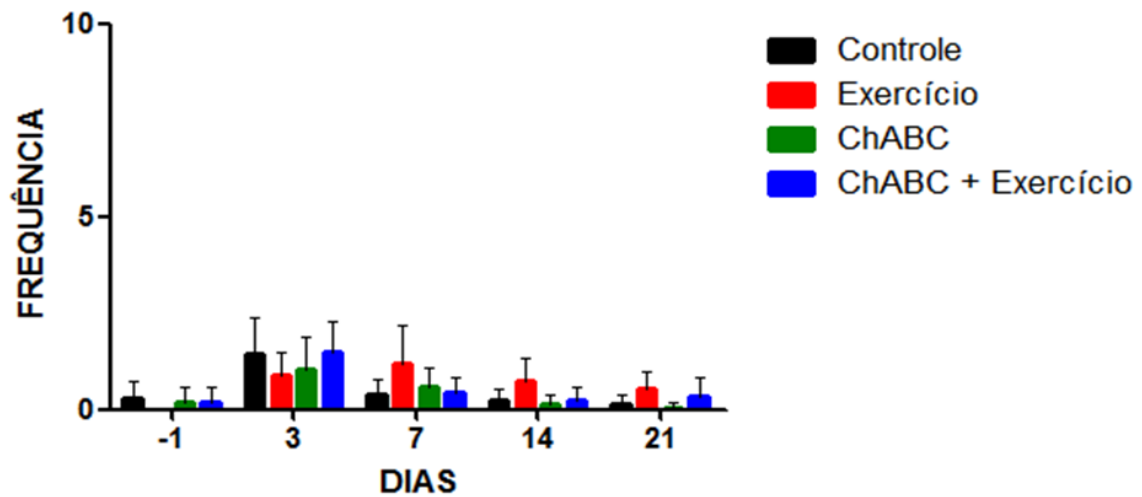


Figura 28 – Análise intergrupo da Frequência de Erros. Gráfico representando a frequência de erros dos grupos experimentais no teste da escada horizontal. Comparação entre os grupos Controle, Exercício, ChABC e ChABC + Exercício. Não houve diferença significativa entre os grupos Controle, Exercício, ChABC e ChABC + Exercício nos dias avaliados (ANOVA, pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $< 0,01$; * $p < 0,5$).

Fonte: Pesquisa, 2013.

8 DISCUSSÃO

8.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A indução de isquemia experimental utilizando microinjeções do peptídeo vasoconstritor ET-1 foi eficaz em provocar lesão do tecido nervoso no córtex cerebral, pois provocou déficits funcionais associados à área lesionada como demonstrado em outros estudos (ADKINS; VOORHIES; JONES, 2004; CARDOSO *et al.*, 2010; FUXE *et al.*, 1997; HUGHES *et al.*, 2003).

Neste trabalho as microinjeções de ET-1 foram focais e restritas ao córtex sensório-motor, na representação cortical da pata anterior, provocando déficits motores restritos à porção distal da pata anterior contralateral à lesão. Este modelo experimental de lesão no SNC já foi utilizado por Gilmour *et al.* (2004) para ratos da linhagem *Lister Hooded*. Para o presente trabalho, as coordenadas estereotáxicas para localização de M1/S1 foram adaptadas para ratos da linhagem *Wistar* (CASTRO-ALAMANCOS; BORREL, 1995). Após indução da lesão, uma fatia de 150 μm do polímero de Elvax® saturado com BSA (grupos Controle e Exercício) ou ChABC (grupos ChABC e ChABC+Exercício) foi implantada sobre a superfície do córtex cerebral lesionado. Nosso modelo experimental apresenta diversas vantagens na aplicação de drogas por matrizes de polímero: os polímeros são biologicamente inertes, não ativando resposta imunológica no SNC; são capazes de difundir lentamente a droga para o parênquima do tecido nervoso, resultando em maior regularidade na liberação e maior tempo de ação da enzima, diferente de técnicas que são limitadas à apenas uma única aplicação e evitam o desperdício da droga (RECINOS *et al.*, 2006; SÁ *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 1995).

No presente estudo, investigamos a influência da remoção dos PGSCs das RPNs e da terapia por exercício físico específico para a pata afetada, de maneira isolada e em associação, na recuperação funcional após a indução experimental de AVC no córtex sensório-motor de ratos.

8.2 A DEGRADAÇÃO DOS PGSCs DAS RPNs E O EXERCÍCIO FÍSICO NÃO INFLUENCIARAM NO TAMANHO DA ÁREA DE LESÃO

A degradação dos PGSCs não influenciou no tamanho da área isquêmica. Após lesão no córtex sensório-motor, os PGSCs são liberados em grande quantidade por astrócitos

reativos e passam a ser superexpressados, formando a cicatriz glial. Uma das funções da cicatriz glial é inibir a propagação da lesão (BARTUS *et al.*, 2012; CARMICHAEL *et al.*, 2005). Logo, a ausência da cicatriz, com a remoção dos PGSCs, poderia promover o alastramento da lesão. Porém, isto não foi verificado de forma significativa neste trabalho (FIGURA 17). Outros estudos envolvendo modelo de lesão traumática do encéfalo, oclusão da artéria cerebral média e contusão da medula espinhal também apresentaram resultados semelhantes (CAGGIANO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2014; HARRIS *et al.*, 2010). O grau de recuperação visto com o exercício físico forçado pode ser variável, pois não se tem muito conhecimento sobre o melhor momento para iniciar a reabilitação após a lesão ou a duração da sessão, o que pode ser prejudicial para a lesão inicial e a recuperação. Porém, neste estudo o exercício físico não influenciou no tamanho da área de lesão, semelhante ao encontrado em outros autores (LIVINGSTON-THOMAS *et al.*, 2013; SCHNEIDER *et al.*, 2014)

8.3 A DEGRADAÇÃO DE PGSCs FOI OBSERVADA AO FINAL DA SOBREVIVÊNCIA

A degradação de PGSCs foi avaliada através da imunomarcagem de proteoglicano de sulfato de condroitina degradado usando o anti-corpo anti-C4S (anticorpo anti-condroitin-4-sulfato; Milipore). Este anticorpo reconhece um epítipo que fica exposto após a degradação dos PGSCs (não reconhece o PGSC intacto) e estratégia semelhante já foi utilizada em outros trabalhos (COVERTI; ROSSI, 2005; MOON *et al.*, 2001). A referida marcação foi observada apenas nos animais que receberam implante de Elvax® previamente saturado com ChABC. Outros trabalhos também encontraram degradação de PGSCs após a utilização da enzima, mesmo utilizando diferentes formas de administração, como injeção intraparenquimatosa de ChABC no estado líquido ou infusão por cateter (COVERTI; ROSSI, 2005; CHEN *et al.*, 2014; CRESPO *et al.*, 2007; HARRIS *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2006). No estudo de Harris e colaboradores (2010), foi observada degradação de PGSCs até 7 dias após trauma encefálico, enquanto Huang e colaboradores (2006) encontraram marcação para condroitin-4-sulfato até 2 semanas após lesão da medula espinhal.

8.4 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL NÃO ALTEROU O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO

No teste do cilindro, os animais encontraram-se aptos para realizar içadas e pousos com ambas as patas, não alterando o seu comportamento exploratório. Isso se deve ao fato de

que a isquemia induzida experimentalmente foi focal e restrita à representação sensorial (S1) e motora (M1) da pata anterior contralateral, provocando déficits motores finos, como o movimento de preensão, da pata afetada. Estudos que mostraram alteração na frequência de uso das patas anteriores e no comportamento exploratório estão associados a uma lesão mais ampla do córtex sensório-motor, como no modelo de oclusão da artéria cerebral média (OACM), que causa déficits motores mais severos como hemiparesia contralateral à oclusão (BRENNEMAN *et al.*, 2010; SCHALLERT *et al.*, 2000). Nosso modelo experimental de lesão isquêmica focal da representação sensório-motora apresentou vantagens em relação a outros métodos, como o OACM, porque o animal não fica severamente debilitado permitindo, assim, que melhoras funcionais sutis sejam observadas.

Sendo assim, torna-se um modelo experimental atraente para testes de drogas ou fármacos, ou mesmo terapia celular, que promovam neuroproteção e recuperação funcional do membro afetado (BARBOSA, 2013; SOARES, 2012).

8.5 O AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL PROVOCOU DÉFICIT MOTOR NA PATA ANTERIOR AFETADA

A indução isquêmica experimental provocada pelas micro-injeções de ET-1 promoveu monoparesia da pata anterior contralateral à lesão, com alteração da função do membro afetado e flexão deste membro quando o animal era sutilmente elevado pela cauda. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (BEDERSON *et al.*, 1986; CENCI *et al.*, 2002).

No teste da escada horizontal, sensível para avaliar o desempenho motor do animal, os animais apresentaram menor quantidade de acertos (FIGURA 23) e maior quantidade de ajustes (FIGURA 25) e erros (FIGURA 27) ao realizar a travessia da escada horizontal após a lesão isquêmica, semelhante ao que foi encontrado por outros autores (METZ; WHISHAW, 2009; SOLEMAN *et al.*, 2012). Liebigt *et al.* (2012) em modelo experimental de fototrombolismo de M1 encontraram prejuízo na coordenação motora dos animais para o teste da escada horizontal, os quais mostraram um aumento significativo de erros após a lesão, quando comparados com seus respectivos baselines.

De acordo com Nudo e colaboradores (2001), pequenos infartos podem causar déficits sensório-motores transitórios com recuperação funcional espontânea (total ou parcial). Neste trabalho, observamos recuperação espontânea dos animais do grupo controle onde o desempenho motor deles, 21 dias após a lesão, ficou semelhante ao desempenho motor pré-

lesão, sendo que esta evolução de melhora se deu a partir do 14º dia pós-lesão (FIGURA 23). Evolução semelhante aconteceu no grupo ChABC+Exercício (FIGURA 23). No grupo ChABC, esta melhora do desempenho motor aconteceu precocemente, a partir do 3º dia após a lesão. Enquanto que no grupo tratado somente com Exercício não houve recuperação espontânea ao final da sobrevida (FIGURA 23).

Portanto, ao contrário do exercício físico, a degradação dos PGSCs das RPNs foi eficaz para promover a melhora precoce do déficit sensório-motor, pois os animais submetidos a este procedimento apresentaram melhora no desempenho motor da pata anterior afetada pelo AVC experimental já em 3 dias após a lesão isquêmica (grupo ChABC). Já o grupo ChABC + Exercício apresentou melhora funcional apenas 14 após o evento isquêmico (FIGURA 23). Os animais do grupo ChABC tiveram sempre melhor evolução da recuperação motora ao longo do tempo que os demais grupos experimentais analisados (FIGURA 24).

A melhora funcional precoce observada no grupo ChABC pode estar relacionada à degradação dos PGSCs das redes perineuronais. Estudos com administração intermitente ou injeção de ChABC no local da lesão, em modelo de lesão da medula espinhal, também mostraram melhora na recuperação motora (BRADBURY *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2006). Neste último estudo, os autores encontraram re-crescimento axonal associado a melhora funcional significativa (HUANG *et al.*, 2006). A degradação dos PGSCs das redes perineuronais torna o tecido nervoso lesionado mais permissivo à formação de novas sinapses, o que pode explicar tanto o crescimento axonal nos resultados de Huang e colaboradores (2006) quanto a recuperação funcional no nosso modelo experimental e nos resultados de Bradburry e colaboradores (2002). Entretanto, ainda são necessários experimentos que analisem especificamente a formação de novas sinapses em nosso modelo experimental.

Outro fator que pode ter contribuído para a melhora funcional encontrada em nosso modelo experimental é que os PGSCs começaram a ser degradados imediatamente após a lesão isquêmica. Cafferty e colaboradores (2008) encontraram melhor recuperação funcional nos animais que foram submetidos à degradação dos PGSCs imediatamente após lesão da medula espinhal, comparados aos animais cuja degradação dos PGSCs aconteceu tardiamente. Estudos envolvendo lesão parcial da medula espinhal e degradação dos PGSCs, associada a um programa de exercícios de reabilitação específicos para o membro afetado, demonstraram que a degradação precoce dos PGSCs foi mais eficiente em promover melhora funcional. Os resultados destes estudos sugerem que a degradação dos PGSCs das RPNs pode abrir uma janela de oportunidade (efeito semelhante à reabertura do período crítico de plasticidade,

tornando o tecido nervoso mais sensível a estímulos externos) e, se associada a exercícios físicos específicos, promove recuperação funcional mais eficaz do membro afetado (GARCIA-ALIAS; FAWCETT, 2012; GARCIA-ALIAS, et al., 2009; GARCIA-ALIAS, et al., 2008; LEE, et al., 2008).

Porém, no presente estudo o exercício físico associado à degradação dos PGSCs das RPNs não promoveu a recuperação funcional precoce do grupo ChABC + Exercício quando comparado ao grupo ChABC. O grupo Exercício, submetido somente ao protocolo de exercício físico, não apresentou melhora funcional precoce da pata afetada em nosso modelo experimental.

Trabalhos que associam o exercício físico com outras terapias (uso de drogas anti-inflamatória, por exemplo) demonstraram que houve recuperação funcional significativa em contraste com os grupos que receberam somente terapia com exercício físico após isquemia focal no córtex cerebral e o mesmo fenômeno foi observado em modelo experimental de contusão da medula espinhal (ICHIYAMA et al., 2009; LIEBIGT et al., 2012). De acordo com Ichiyama e colaboradores (2009), a terapia de radiação localizada pode manipular o ambiente patológico após a lesão pela eliminação específica de algumas células no sítio de lesão, facilitando a cicatrização e reparo tecidual. Para Liebigt e colaboradores (2012), a utilização de anti-inflamatórios (minociclina e indometacina) diminuiu a proliferação microglial e esta diminuição foi relacionada com melhora funcional. Isso porque após uma isquemia, a micróglia apresenta funções complexas, que envolvem reparo tecidual com a secreção de moléculas neuroproteras, ou indução de moléculas citotóxicas promovendo dano do tecido nervoso. A utilização da minociclina, um anti-inflamatório, modulou a microgliose através do declínio de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (LIEBIGT *et al.*, 2012). A indometacina também inibiu a indução de citocinas pró-inflamatórias e levou a um equilíbrio entre sobrevivência e morte celular no ambiente inflamatório (LIEBIGT *et al.*, 2012). No presente trabalho utilizamos a enzima ChABC que tem a função de degradar os PGSCs das RPNs, porém não se conhece sobre a existência de manipulação do ambiente inflamatório e da cicatriz pela enzima. Pesquisas em nosso laboratório mostraram que a utilização da enzima não influenciou a quantidade de astrócitos na região peri-infarto (dados não publicados). Em nosso Laboratório, ainda estamos investigando os efeitos da degradação dos PGSCs das redes perineuronais na atividade microglial.

Neste trabalho, o exercício físico realizado foi do tipo forçado que, ao contrário do exercício voluntário, impede o animal de escolher o momento e dosagem do exercício, e

usualmente depende de um estímulo aversivo para condicionar o comportamento, o que cria um ambiente estressante para o animal (LANDERS *et al.* 2013).

Em nosso modelo experimental, os animais dos grupos ChABC + Exercício e Exercício, antes da indução da lesão, foram submetidos à restrição alimentar e treinados diariamente na tarefa de alcance e preensão das bolas de açúcar, em um aparato com dimensões pequenas, que evitava a livre circulação do animal (agente estressor). Este treino ocorria duas vezes por dia, e o primeiro momento acontecia durante o ciclo claro (momento em que o animal está menos ativo), que associado à restrição alimentar pode contribuir ainda mais para o ambiente já estressante do exercício forçado.

Howells e colaboradores (2005) realizaram um estudo para determinar se o estresse pode influenciar no efeito neuroprotetor do exercício voluntário em modelos experimentais de doença de Parkinson. Os autores utilizaram como agentes estressores restrição alimentar, imobilização e alteração do ciclo claro/escuro dos animais, e encontraram que o exercício voluntário foi realmente neuroprotetor e que o estresse anulou estes efeitos neuroprotetores.

Portanto, o ambiente estressante que o animais dos grupos ChABC + Exercício e Exercício foram submetidos antes da indução da isquemia pode ter contribuído para a piora do desempenho motor já em 3 dias após a lesão quando comparados aos grupos Controle e ChABC (FIGURA 24). Por isso, a associação de exercício físico com a degradação dos PGSCs (grupo ChABC + Exercício) ou somente o protocolo de exercício físico (grupo Exercício) não foi capaz de promover melhora funcional da pata anterior afetada após a lesão em nosso modelo experimental.

O protocolo de exercício físico utilizado tinha duração de 20 minutos, iniciou-se precocemente (4 dias após a lesão) e consistiu na extensão da pata anterior (alcance) e preensão das bolas de açúcar (movimento de flexão dos dedos), sendo considerado de máxima intensidade (média de 80 repetições) e curta duração (menor que 30s cada movimento), realizado intermitentemente em intervalos pequenos sugerindo uma contribuição do sistema aeróbio (FRANCHINI *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos sugerem que espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente produzidas durante metabolismo aeróbico e a modulação de níveis de ERO induzida por exercício físico pode desempenhar um papel importante na formação proteica e na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), resultando em melhor função e aumento da neurogênese. No entanto, a contribuição do sistema aeróbio neste modelo de exercício físico pode levar a produção de altos níveis de ERO, que ultrapassa a tolerância adaptativa da célula nervosa, resultando em significativo dano oxidativo, apoptose e necrose da área de

lesão (RADAK *et al.*, 2013). Portanto, nesta situação o exercício físico pode aumentar o dano oxidativo e a neurodegeneração, prejudicando a recuperação do desempenho motor, o que pode, pelo menos em parte, explicar nossos resultados.

No trabalho de Smith e colaboradores (2009), o protocolo de reabilitação física aplicado precocemente (3 dias após a lesão) foi menos efetivo do que quando iniciado tardiamente (2 semanas após a lesão). Segundo esses autores, o comprometimento da recuperação funcional pela reabilitação precoce ocorreu devido a mecanismos que podem estar relacionados a um, ou mais, eventos de lesão secundária ocorridos na fase aguda pós-lesão. Foud e colaboradores (2000), também relataram que o treinamento diário na esteira precocemente aplicado não melhorou a recuperação locomotora dos animais após lesão da medula espinhal. Como nosso modelo experimental utilizou exercício físico iniciado ainda na fase aguda da inflamação pós-lesão isquêmica, a reabilitação funcional dos animais do grupo ChABC + Exercício e do grupo Exercício pode ter sido prejudicada por isso. Futuros experimentos cujo exercício físico inicie somente após o fim da fase aguda da inflamação podem ajudar a explicar qual o melhor momento para se realizar intervenção por exercício físico em modelo experimental de AVC.

9 CONCLUSÕES

- A remoção dos PGSCs das redes perineuronais associada ao exercício físico precoce não aumentou o tamanho da área de lesão, e melhorou o desempenho motor do membro afetado após isquemia experimental no córtex sensório-motor, porém essa melhora foi tardia;
- O exercício físico aplicado precocemente após isquemia experimental no córtex sensório-motor não influenciou no tamanho da área de lesão, porém prejudicou o desempenho motor do membro afetado;
- A remoção dos PGSCs das redes perineuronais não influenciou no tamanho da área de lesão, e melhorou precocemente o desempenho motor do membro afetado após isquemia experimental no córtex sensório-motor.

REFERÊNCIAS

- ADKINS, D. L.; VOORHIES, A. C.; JONES, T. A. Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. *Neuroscience*, v. 128, p. 473– 486, 2004.
- BARBOSA, M. S. J. Alterações funcionais em modelo de lesão isquêmica focal do córtex sensorio-motor. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Modalidade Biologia Instituto de Ciências Biológicas/ UFPA.
- BARTUS, K. *et al.* Chondroitin sulphate proteoglycans: Key modulators of spinal cord and brain plasticity. *ExpNeurol*, v. 235, n. 1, p. 5-17, 2012.
- BEDERSON, J. B. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, v. 17, p. 472-476, 1986.
- BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J. Neurosci.*, v. 21, p. 5272–5280, 2001.
- BRADBURY *et al.* Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, v. 416, p. 636-640, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SVS - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM)., 2009. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 22 mar. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SVS - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM). Departamento de informática do SUS (DATASUS). Rede Interagencial de Informações Para a Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 22 mar. 2013.
- BRENNEMAN, M. *et al.* Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. *J Cer Blo Flo Met.*, v. 30, p. 140-149, 2010.
- CAFFERTY, W. B. J. Chondroitinase ABC-mediated plasticity of spinal sensory function. *J Neurosci*, v. 28, p. 11998-12009, 2008.
- CAGGIANO, A. O. *et al.* Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurotrauma*, v. 22, p. 226-239, 2005.
- CARDOSO, M. M. Bloqueio microglial e transplante endovenoso de células da fração mononuclear da medula óssea após isquemia estriatal. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/UFPA. 85 f. Fev. 2010.
- CARMICHAEL, S. T. *et al.* New patterns of intracortical projections after Focal Cortical stroke. *Neu Disea.*, v. 8, p. 910-922, 2001.
- _____. Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist*, v. 9, p. 64-75, 2003.

_____. *et al.* Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol.*, v. 193, n.2, p. 291-311, 2005.

_____. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: Making waves. *Ann Neurol.*, v. 59, p. 735-742, 2006.

_____. Themes and strategies for studying the biology of stroke recovery in the post stroke epoch. *Stroke*, v. 39, p. 1380-1388, 2008.

CASTRO-ALAMANCOS, M. A.; BORREL, J. Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of cortex. *Neuroscience*, v. 68, n.3, p. 793-805, 1995.

CENCI, M. A.; WHISHAW, I. Q.; SCHALLERT, T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*, v. 3, p. 574-579, 2002.

CHEATWOOD, J. L. *et al.* Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat. *Stroke*, v. 39, p. 2091–2098, 2008.

CHEN, J. *et al.* Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, v. 32, p. 1005–1011, 2001.

CHEN, H.; EPSTEIN, J.; STERN, E. Neural plasticity after acquired brain injury: Evidence from functional neuroimaging. *Phys Med Rehabil.*, v. 10, n. 2, p. 306-312, 2010.

CHEN, X. *et al.* Neuroprotective effect of chondroitinase ABC on primary and secondary brain injury after stroke in hypertensive rats. *Brain Res.*, v. 543, p. 324-333, 2014.

CORVETTI, L.; ROSSI, F. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact purkinje axons in the cerebellum of the adult rat. *J. Neurosci.*, v. 25, n.31, p. 7150–7158, 2005.

CRESPO, D. *et al.* How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol.*, v. 206, n.2, p. 159-171, 2007.

DAYAN, E.; COHEN, L. G. Neuroplasticity subserving motor skill learning. *Neuron*, v. 72, p. 443-451, 2011.

DI FILIPPO, M. *et al.* Plasticity and repair in the post-ischemic brain. *Neuropharm.*, v. 55, p. 353-362, 2008.

DING, Y. H. *et al.* Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia / reperfusion injury in stroke. *Cur Neurovasc Res.*, v. 1, n. 5, p. 411-420, 2004.

_____. *et al.* Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropat.*, v. 109, n. 3, p. 237-246, 2005.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* v. 22, p. 391–397, 1999.

DITYATEV, A.; SCHACHNER, M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, p. 456-468, 2003.

DITYATEV, A.; SCHACHNER, M.; SONDEREGGER, P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci*, v. 11, n.11, p. 735-746, 2010.

DROMERICK, A. W. *et al.* Very Early Constraint-induced movement during stroke rehabilitation (VECTORS). *Neurol.*, v. 73, p. 195-201, 2009.

ENDRES, M. *et al.* Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol.*, v. 54, n. 5, p. 582–590, 2003.

ERICKSON, K. I.; GILDENGERS, A. G.; BUTTERS, M. A. Physical activity and brain plasticity in late adulthood. *Dialogues Clin Neurosci.*, v. 15, n. 1, p. 99-108, 2013.

FARR, T. D. *et al.* Bilateral alteration in stepping pattern after unilateral motor cortex injury: A new test strategy for analysis of skilled limb movements in neurological mouse models. *J Neuro Metho.*, v. 153, n. 1, p. 104-113, 2006.

FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New insights into neuron-glia communication. *Science' S Comp.*, v. 298, p. 556-562, 2002.

FITCH, M. T.; SILVER, J. CNS Injury, Glial Scars, and Inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.*, v. 209, n. 2, p. 294-301, 2008.

FOX, C. *et al.* Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Cer Blood Flow & Metab.*, v. 25, n. 9, p. 1138-1149, 2005.

FUXE, K. *et al.* Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport.*, v. 8, n. 11, p. 2623-2629, 1997.

GALTREY, C. M.; FAWCETT, J. W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev*, v. 54, n.1, p. 1-18, 2007.

GAGLIARDI, R. J. Hipertensão arterial e AVC. *Com Ciência*, n.109, Campinas 2009.

GARCIA-ALIAS, G. *et al.* Therapeutic time window for the application of chondroitinase ABC after spinal cord injury. *Exp Neurol*, v. 210, p. 331-338, 2008.

GARCIA-ALIAS, G. *et al.* Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci*, v. 12, p. 1145-1151, 2009.

GARCIA-ALIAS, G.; FAWCETT, J. W. Training and anti-CSPG combination therapy for spinal cord injury. *Exp Neurol*, v. 235, p. 26-32, 2012.

GAUTHIER, L. V. *et al.* Remodeling the brain plastic structural brain changes produced by different motor therapies after stroke. *Stroke*, v. 39, n. 5, p. 1520-1525, 2008.

GERTZ, K. *et al.* Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res.*, v. 99, p. 1132-1140, 2006.

GOMES-LEAL, W; CORKILL, D. J.; PICANÇO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. *Brain Res.*, v. 1066, p. 57-70, 2005.

GRIESBACH, G.S.; GOMEZ-PINILLA, F.; HOVDA, D.A. The upregulation of plasticity-related proteins following TBI is disrupted with acute voluntary exercise. *Brain Res.*, v. 1016, p. 154–162, 2004.

HARRIS, N. G. *et al.* Traumatic brain injury results in disparate regions of chondroitin sulfate proteoglycan expression that are temporally limited. *J Neur Res.*, v. 87, n. 13, p. 2937-2950, 2009.

_____. *et al.* Pericontusion axon sprouting is spatially and temporally consistent with a growth-permissive environment after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol.*, v. 69, n. 2, p. 139-164, 2010.

HENSCH, T. K.; BILIMORIA, P. M. Re-opening windows: manipulating critical periods for brain development. *Cerebrum*, 2012.

HESS, G; DONOGHUE, J. P. Long-term potentiation and long-term depression of horizontal connections in rat motor cortex. *Acta Neurobiol.*, v. 56, p. 397-405, 1996a.

_____. Long-term depression of horizontal connections in rat motor cortex. *Eur J Neuro.*, v. 8, p. 658-665, 1996b.

HESS, G.; AIZENMAN, C. D.; DONOGHUE, J. P. Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J N Physiol.*, v. 75, n. 5, p. 1765-1778, 1996.

HOSP, J. A.; LUFT, A. R. Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke. *Neu Plast.*, p. 1-9, 2011.

HUANG, W-C. *et al.* Chondroitinase ABC promotes axonal re-growth and behavior recovery in spinal cord injury. *Bioc Biop Res Com.*, v. 349, p. 963-968, 2006.

HUBEL, D. H.; WIESEL, T. N. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol*, v. 206, n.2, p. 419-436, 1970.

HUGHES, P. M. *et al.* Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *J Neuropathol Exp Neurol.*, v. 62, n. 12, p. 1276-1286, 2003.

HYATT, A. J. T. *et al.* Controlled release of chondroitinase ABC from fibrin gel reduces the level of inhibitory glycosaminoglycan chains in lesioned spinal cord. *J Cont Rel.*, v. 147, p. 24–29, 2010.

JOHNSTON, M. V. Plasticity in the developing brain: Implications for rehabilitation. *Dev Disabil Res Rev.*, v. 15, p. 94-101, 2009.

JONES, T. A. *et al.* Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *J Neur.*, v. 19, n. 22, p. 10153-10163, 1999.

_____. *et al.* Importance of behavioral manipulations and measures in rat models of brain damage and brain repair. *ILAR J.*, v. 44, n. 2, p. 144-152, 2003.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S. *et al.* Chondroitinase and growth factors enhance activation and oligodendrocyte differentiation of endogenous neural precursor cells after spinal cord injury. *Plos One*, v. 7, n. 5, p. 1-16, 2012.

KATSMAN, D. *et al.* Tissue microenvironments within functional cortical subdivisions adjacent to focal stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.*, vol. 23, n. 9, p. 997-1009, 2003.

KOLB, B.; TESKEY, G. C.; GIBB, R. Factors influencing cerebral plasticity in the normal and injured brain. *Front Human Neuros.*, v. 4, n. 204, p. 1-12, 2010.

KWOK, J. C. F. *et al.* Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Develop Neurob.*, v. 71, p. 1073-1089, 2011.

_____; WARREN, P.; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 44, n.4, p. 582-586, 2012.

LEE, H.; LEAMEY, C. A.; SAWATARI, A. Rapid reversal of chondroitin sulfate proteoglycan associated staining in subcompartments of mouse neostriatum during the emergence of behaviour. *PLoS One*, v. 3, p. e3020, 2008.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neu.*, v. 4, p. 399-415, 2003.

LUFT, A. R. *et al.* Repetitive bilateral arm training and motor cortex activation in chronic stroke. *Jama*, v. 292, n. 15, 2004.

METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and coordination. *J Neur Meth.*, v. 115, p. 169-179, 2002.

METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *J Vis Exp*, v. 28, 2009.

MOON, L.D. *et al.* Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci.*, v. 4, p. 455–466, 2001.

MONTOYA, C. P. *et al.* The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching

and grasping abilities in rats. *J Neur Meth.*, v. 36, p. 219-228, 1991.

MUNOZ-CESPEDES, J. M. *et al.* Functional neuroimaging studies of cognitive recovery after acquired brain damage in adults. *N Psychol Rev.*, v. 15, n. 4, p. 169-183, 2005.

MURPHY, T.H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.*, v. 10, n.12, p. 861-872, 2009.

NUDO R. J.; PLAUTZ, E. J.; FROST, S. B. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve*, v. 24, p. 1000-1019, 2001.

NUDO, R. J. Adaptive plasticity in motor cortex: implications for rehabilitation after brain injury. *J Rehabil Med., Suppl.* 41, p. 7-10, 2003.

PAGNUSSAT, A. S. *et al.* Skilled forelimb reaching in wistar rats: Evaluation by means of Montoya staircase test. *J Neurosc Meth.*, v. 177, p. 115-121, 2009.

PAPADOPOULOS, C. M. *et al.* Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization. *Cereb Cortex*, v. 16, p. 529-536, 2006.

PERENO, G. I.; BELTRAMINO, C. A. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity. *Brain Res.*, v. 1328, p. 130-138, 2010.

PIZZORUSSO, T. *et al.* Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, v. 298, n.5596, p. 1248-1251, 2002.

_____. *et al.* Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 103, n.22, p. 8517-8522, 2006.

PLOUGHMAN, M. *et al.* Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia. *Eur J Neurosc.*, v. 25, p. 3453-3460, 2007.

RECINOS, P. F. *et al.* Controlled release of lipopolysaccharide in the subarachnoid space of rabbits induces chronic vasospasm in the absence of blood. *Surg Neurol*, v. 66, p. 463-469, 2006.

RHODES, K. E.; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat*, v. 204, n.1, p. 33-48, 2004.

SÁ, A. L. *et al.* Tratamento com condroitinase abc induz plasticidade e Recuperação funcional no sistema somestésico. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 76 f. Fev. 2010.

SACCO, K. *et al.* Reorganization and enhanced functional connectivity of motor areas in repetitive ankle movements after training in locomotor attention. *Brain Research*, v. 1297, p. 124-134, 2009.

SCHALLERT, T. *et al.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *N Pharmacol.*, v. 39, n.5, p. 777-787, 2000.

SCHMIDT, W. *et al.* Train the vessel, gain the brain: physical activity and vessel function and the impact on stroke prevention and outcome in cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis.*, v. 35, p. 303-312, 2013.

SMITH, A. L.; CORDERY, P. M.; THOMPSON, I. D. Manufacture and release characteristics of Elvax polymers containing glutamate receptor antagonists. *J Neurosci Methods*, v. 60, p. 211-217, 1995.

SOARES, S. C. S. Indução de plasticidade cerebral por remoção da matriz extracelular após lesão isquêmica no córtex sensorio-motor de ratos. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/UFPA. 78 f. Jan. 2013.

SOLEMAN, S. *et al.* Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats. *Brain*, v. 135, p. 1210-1223, 2012.

STROEMER, R. P.; KENT, T. A.; HULSEBOSCH, C. E. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*, v. 26, p. 2135-2144, 1995.

_____. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with d-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke*, v. 29, p. 2381-2395, 1998.

TAKAHASHI, C. D. *et al.* Robot-based hand motor therapy after stroke. *Brain*, v. 131, p. 425-437, 2008.

TAKEUCHI, N.; IZUMI, S. Maladaptive plasticity for motor recovery after stroke: mechanisms and approaches. *Neu Plast.*, p. 1-9, 2012.

TAUB, E.; USWATTE, G.; ELBERT, T. New treatments in neurorehabilitation founded on basic research. *Nat.*, v. 3, p. 228-236, 2002.

TONI, N. *et al.* LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nat.*, v. 402, p. 421-425, 1999.

WANG, D.; FAWCETT, J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tis Res.*, v. 349, n.1, p. 147-160, 2012.

WARD, N. S.; COHEN, L. G. Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Arch Neurol.*, v. 61, p. 1844-1848, 2004.

WHO. World Health Organization publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic. *Indian J Med Sci*, v. 58, n.9, p. 405-406, 2004.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W. W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, v. 41, n. 3, p. 1017-1028, 1985.

YAMAGUCHI, Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.*, v. 57, n.2, p. 276-289, 2000.

YUEWEN, M.; QIANG, L.; HE, M. Exercise therapy augments the ischemia-induced proangiogenic state and results in sustained improvement after stroke. *Int J Mol Sci.*, v. 14, p. 8570-8584, 2013.

YRJANHEIKKI, J. *et al.* A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *PNAS.*, v. 96, n. 23, p. 13496-13500, 1999.