



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

Soanne Chyara da Silva Soares

**INDUÇÃO DE PLASTICIDADE CEREBRAL POR REMOÇÃO DA
MATRIZ EXTRACELULAR APÓS LESÃO ISQUÊMICA NO CORTEX
SENSÓRIO-MOTOR DE RATOS.**

**BELÉM – PA
2012**

Soanne Chyara da Silva Soares

**INDUÇÃO DE PLASTICIDADE CEREBRAL POR REMOÇÃO DA
MATRIZ EXTRACELULAR APÓS LESÃO ISQUÊMICA NO CORTEX
SENSÓRIO-MOTOR DE RATOS.**

Dissertação apresentada 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 título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior, e co-orientação do Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia. Área de Concentração: Neurociências.

**BELÉM – PA
2012**

Soanne Chyara da Silva Soares

**INDUÇÃO DE PLASTICIDADE CEREBRAL POR REMOÇÃO DA
MATRIZ EXTRACELULAR APÓS LESÃO ISQUÊMICA NO CORTEX
SENSÓRIO-MOTOR DE RATOS.**

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: Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior, Instituto do Cérebro – UFRN.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior – Orientador
Instituto do Cérebro – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia – Co-orientador
Instituto das Ciências da Saúde – Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena – 1º Avaliador
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará

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

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal – Suplente
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará

**BELÉM – PA
2012**

À Deus

AGRADECIMENTOS

À Deus, que com seu infinito amor tudo me proporcionou. Por sua presença constante na minha vida, que foi minha motivação e força nos momentos de maior dificuldade. Espero ter feito bem a Tua vontade;

Aos meus pais, José Soares e Rejani, que foram exemplo e inspiração em todos os aspectos da vida. Aos meus irmãos, João Paulo, João Henrique e Yanne Cynara que estiveram sempre me apoiando, consolando, alegrando. À todos os meus familiares, em nome dos meus amados avós, João Pereira e Reny Araújo, que torceram e souberam compreender minha ausência em tantos momentos. Essa conquista é nossa;

Ao meu digníssimo orientador Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior, por compartilhar seus projetos e idealizações. Por acreditar na ciência, por me ajudar a fazer ciência, por ser exemplo de dedicação naquilo que faz;

Ao meu ilustre co-orientador Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, por sempre estar por perto, sendo o meu pilar na ciência, mais que um co-orientador, um amigo. Nos momentos de maior dificuldade, você soube me dar palavras corretas. Ajudou-me a acreditar que era possível em todos os momentos;

Aos meus amados amigos da minha terra natal, de Belém e do Brasil, em nome de Aline Cavalcante Crizanto e Naila Provenzano cujo adjetivo “amigo” dispensa comentários;

À minha segunda família, família espiritual, membros do Movimento dos Focolares. Em especial, agradeço aos jovens, em nome de Lygia Nassar. Vivemos juntos e intensamente cada momento dessa conquista, tanto fisicamente e quanto espiritualmente;

Aos meus ilustres amigos de trabalho do CESUPA, em nome de Prof. Leny Silene Castro, Walther Carvalho, Celice Cordeiro, Wiviane Matos, Rita Cotta, Solimar Cardoso e Wellington Oliveira que me ajudaram tornar esse sonho real.

À todos os membros do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE) na UFPA, sem vocês eu não sei o que seria de mim. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, chefe do laboratório. Agradeço em nome dos doutorandos a Marcelo Cardoso que tanto me ensinou. Agradeço em nome dos mestrandos aos meus parceiros de batalha Igor Negrão, Otávio Folha e Ketlin Castro. Agradeço em nome dos alunos de iniciação científica ao digníssimo Mário Santos (que merecia uma página inteira de agradecimentos), Thayrine Damasceno, Renata Pimentel, Ariane Souza e Antônia Iracy vocês foram muito mais que alunos. Agradeço ainda e de maneira especialíssima às amigas Celice Cordeiro e Rosana Lopes, que souberam manter-me no essencial, dando suporte espiritual e científico para que esta etapa se concretizasse.

Ao Instituto do Cérebro da UFRN, especificamente em nome de Andrea Sá, por viabilizar a ChABC utilizada neste estudo.

Ao apoio financeiro do órgão de fomento, CNPq, sem o qual não haveria material necessário aos experimentos desse estudo.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a terceira maior causa de mortalidade e incapacidade no mundo e a principal causa de mortes no Brasil. Após a lesão isquêmica, pela capacidade limitada do Sistema Nervoso Central (SNC) se regenerar, os déficits funcionais geralmente são incapacitantes e permanentes. A incapacidade de regeneração decorre, dentre outros fatores, do acúmulo de proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSC) no local da lesão, inibindo a plasticidade no microambiente extracelular. A enzima condroitinase ABC (ChABC) tem se mostrado eficiente para degradar os PGSC, proporcionando plasticidade. Esta pesquisa se propõe a avaliar o efeito da remoção de PGSC após uma lesão isquêmica no córtex sensorio-motor primário de ratos. Para tal, utilizou-se 20 ratos Wistar, em 4 grupos experimentais, controle e tratado, com tempo de sobrevivência de 7 e 14 dias. Induziu-se uma lesão isquêmica através de microinjeções do vasoconstritor ET-1 (Endotelina-1) no córtex sensorio-motor, implantou-se um polímero de Etileno vinil acetato saturado com ChABC (tratado) ou BSA (controle). Morfologicamente, avaliamos a área de lesão, que se mostrou sem diferença estatística entre grupo controle 7 dias (média de $1653,8 \pm 162,57\text{mm}^2$), tratado 7 dias (média de $2067,3 \pm 235,42\text{mm}^2$), controle 14 dias (média de $1267,16 \pm 280,6\text{mm}^2$), tratado 14 dias (média de $1323,8 \pm 297,05\text{mm}^2$) após lesão; a quantidade de astrócitos, que também se mostrou sem diferença estatística entre grupo controle 7 dias (média de $16,6 \pm 4,67$ células/campo), tratado 7 (média de $21,07 \pm 1,87$ células/campo) e controle 14 (média de $17,46 \pm 0,80$ células/campo), tratado 14 (média de $18,51 \pm 2,60$ células/campo) dias após lesão; e a expressão de controitin degradado, que qualitativamente foi mais expresso nos ratos tratados 7 e 14 dias após lesão. Comportamentalmente, no teste do cilindro, animais tratados tiveram índice de assimetria menor já em 7 dias após lesão, com diferença significativa entre os grupos. No teste da escada horizontal, os animais tratados tiveram menor diferença intragrupo que os controles. Em 7 dias após lesão, já estavam com o mesmo desempenho funcional que seu pré-cirúrgico. Os dados comportamentais demonstram que a ChABC foi eficaz na melhora do desempenho funcional de maneira precoce, o que significa que a degradação das PGSC abre uma janela plástica na lesão isquêmica cortical, sem influenciar no tamanho da lesão e quantidade de astrócitos na cicatriz glial, porém com melhora do desempenho funcional de maneira precoce. Novos estudos devem ser realizados, associando a ChABC a terapêuticas adjuvantes no tratamento de lesões isquêmicas experimentais.

Palavras-chaves: Acidente Vascular Encefálico, Neuroplasticidade, Matriz Extracelular.

ABSTRACT

Stroke is the third major cause of mortality and disability in whole world and the major cause of death in Brazil. After ischemic injury, functional deficits are generally severe and permanent, because Central Nervous System has a limited capacity of regeneration. This limited regeneration is caused, among other factors, by chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG) accumulation in injury site, what causes inhibition of plasticity in extracellular microenvironment. Chondroitinase-ABC enzyme (ChABC) has been studied to remove CSPG, showing good results in increasing plasticity. This research aimed to evaluate effects of CSPG removing in rats submitted to ischemic injury in sensory-motor cerebral cortex. To achieve the aim, there were used 20 Wistar rats, divided in 4 experimental groups (control and treated) of 7 and 14 days of surviving times. There was induced ischemic injury in sensory-motor cortex by microinjections of endothelin-1 (ET-1), a vasoconstrictor peptide. Treatment was done with an implantation of an ethyl-vinyl-acetate polymer saturated with ChABC (treated-group) or BSA (control group). In morphological analysis, we evaluated injury area. There was no significant difference between treated and control groups, as can be seen in means of each group: control 7 days ($1653,8 \pm 162,57\text{mm}^2$), treated 7 days ($2067,3 \pm 235,42\text{mm}^2$), control 14 days ($1267,16 \pm 280,6\text{mm}^2$), treated 14 days ($1323,8 \pm 297,05\text{mm}^2$). Number of astrocytes was evaluated too, but there was no significant difference between treated and control groups, as we can see in means: control 7 days ($16,6 \pm 4,67$ cells/field), treated 7 days ($21,07 \pm 1,87$ cells/field) control 14 days ($17,46 \pm 0,80$ cells/field), treated 14 days ($18,51 \pm 2,60$ cells/field). The expression of degraded chondroitin was evaluated in qualitative analysis, showing major expression in treated-groups, 7 and 14 days after injury. In behavioral analysis, we have done two functional tests. In cylinder test, treated animals had less asymmetry in 7 days after injury, with significant difference in relation to control group. In horizontal ladder test, treated animals had less difference between surviving groups than control animals. In 7 days after injury, treated animals had the same performance of pre-operated baseline. Behavioral performances showed that ChABC was efficient in to increase performances in earlier times of surviving. This means that CSPG removing opens plastic window in ischemic injuries, without influence in injury size or number of astrocytes in glial scar, but with functional increment. New studies have to be done, associated ChABC to supporting therapies in ischemic injuries treatment.

Key-words: Stroke, Neuroplasticity, Extracellular matrix

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DESENHO ESQUEMÁTICO DO ENCÉFALO HUMANO	14
FIGURA 2	MAPA DAS ÁREAS CITOARQUITETÔNICAS DE BRODMANN	15
FIGURA 3	ORGANIZAÇÃO SOMATOTÓPICA DO CÓRTEX MOTOR PRIMÁRIO	16
FIGURA 4	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CÓRTEX SENSORIO-MOTOR DE RATO	17
FIGURA 5	MOLÉCULAS QUE COMPÕE A MEC DO SNC	18
FIGURA 6	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO PGSC	19
FIGURA 7	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PGSC MAIS ABUNDANTES NO SNC	20
FIGURA 8	DESENHO ESQUEMÁTICO DA INTERAÇÃO ENTRE AS LECTINAS, TENASCINA E HIALURONANA NO SNC	21
FIGURA 9	IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS COMPONENTES DA RPN EM HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS	22
FIGURA 10	NEURÔNIO COM RPN E SUAS RESTRIÇÕES DE PLASTICIDADE	24
FIGURA 11	REPRESENTAÇÃO TEMPORAL DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA ISQUEMIA ENCEFÁLICA	27
FIGURA 12	RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA EM ENCÉFALO DE RATOS 7 HORAS APÓS ISQUEMIA POR OACM	28
FIGURA 13	DESENHO ESQUEMÁTICO DA CAVIDADE DA LESÃO E CICATRIZ GLIAL APÓS LESÃO NO SNC	30
FIGURA 14	TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA EVIDENCIANDO A ATIVAÇÃO CEREBRAL EM ÁREA SENSORIO-MOTORA PRIMÁRIA	32
FIGURA 15	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE GÊNICA DOS FATORES INIBITÓRIOS E FACILITADORES DO CRESCIMENTO AXONAL APÓS AVC	34
FIGURA 16	PLASTICIDADE ESTRUTURAL INDUZIDA PELA CHABC	36

FIGURA 17	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA PESQUISA AO LONGO DO TEMPO (EM DIAS DA ESQUERDA PARA A DIREITA).....	38
FIGURA 18	DESENHO ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS	40
FIGURA 19	APARATO DO CILINDRO	41
FIGURA 20	DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESCADA HORIZONTAL	43
FIGURA 21	FOTOGRAFIAS ILUSTRANDO AS CATEGORIAS DE POSICIONAMENTO DA PATA ANTERIOR NAS BARRAS DA ESCADA HORIZONTAL.....	45
FIGURA 22	SECÇÕES SEQUENCIALMENTE AGRUPADAS EM SÉRIES DE LÂMINAS DE 1 A 6	46
FIGURA 23	DELIMITAÇÃO DA ÁREA DE LESÃO EVIDENCIADA PELA COLORAÇÃO DE VIOLETA DE CRESILA NO CÓRTEX CEREBRAL	51
FIGURA 24	ANÁLISE QUANTITATIVA DA ÁREA DE LESÃO DO GRUPO TRATADO E CONTROLE AO LONGO DO TEMPO	52
FIGURA 25	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA C4S EVIDENCIANDO AUSENCIA E PRESENÇA DE MARCAÇÃO NO GRUPO CONTROLE E GRUPO TRATADO RESPECTIVAMENTE.....	53
FIGURA 26	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA GFAP, EVIDENCIANDO MARCAÇÃO DE ASTRÓCITOS DO GRUPO TRATADO E CONTROLE AO LONGO DO TEMPO	54
FIGURA 27	MÉDIA DAS CÉLULAS GFAP+ NA REGIÃO DE PENUMBRA ISQUÊMICA POR TEMPO DE SOBREVIDA.....	55
FIGURA 28	ÍNDICE DE ASSIMETRIA NO TESTE DO CILINDRO PARA GRUPO CONTROLE E TRATADO COM CHABC	56
FIGURA 29	PORCENTAGEM DA QUALIDADE DO MOVIMENTO EM GRUPO CONTROLE E TRATADO NO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL AO LONGO DO TEMPO DE SOBREVIDA	57
TABELA 1	GRUPOS EXPERIMENTAIS, DESCRIÇÃO E QUANTIDADE DE ANIMAIS POR GRUPO	38
TABELA 2	DESCRIÇÃO DA ANÁLISE COMPORTAMENTAL DO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hemato-encefálica
BSA	Albumina de soro bovino
C4S	Sulfato 4 de condroitin
ChABC	Condroitinase ABC
DAB	Diaminobenzidina
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
EVA	Etileno vinil acetato
GAG	Glicosaminoglicanas
GFAP	Proteína de astrócitos fibrilares
M1	Córtex motor primário
MEC	Matriz extracelular
PG	Proteoglicanas
PGSC	Proteoglicanas de sulfato de condroitina
RPN	Redes perineuronais
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CORTEX CEREBRAL NORMAL	14
1.1.1 Organização do córtex cerebral	14
1.1.2 MEC e RPN no sistema nervoso central	18
1.1.3 Plasticidade no córtex cerebral normal	23
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CEREBRO ISQUÊMICO	23
1.2.1 AVC: conceitos e epidemiologia	25
1.2.2 Fisiopatologia do AVC	26
1.2.3 Plasticidade cerebral no córtex isquêmico	31
1.2.3.1 Reorganização do mapa motor	31
1.2.3.2 Plasticidade estrutural na região peri-infarto	33
1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CONDROITINASE ABC NA REMOÇÃO DA MEC APÓS LESÕES NO SNC	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 GERAL	37
2.2 ESPECIFICOS	37
3 MÉTODO	38
3.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	38
3.2 PREPARAÇÃO DA MATRIX DE POLÍMERO SATURADO	39
3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	39

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	40
3.4.1 Teste da exploração vertical	41
3.4.2 Teste da escada horizontal	42
3.5 PERFUSÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS	46
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	47
3.7.1 Marcação de corpos celulares e análise de área de lesão	47
3.7.2 Degradação da MEC	47
3.7.3 Astrócitos	48
3.7.4 Método de análise	49
4 RESULTADOS	50
4.1 ACIDENTE VASCULAR ISQUÊMICO INDUZIU A MORTE TECIDUAL EM ANIMAIS CONTROLES E TRATADOS.....	50
4.2 ChABC FOI EFICIENTE EM PROMOVER DEGRADAÇÃO DE PGSC DURANTE 14 DIAS	52
4.3 A ChABC NÃO INFLUENCIOU NA QUANTIDADE DE ASTRÓCITOS DA REGIÃO PERI-INFARTO	53
4.4 A ChABC INFLUENCIOU NA MELHORA FUNCIONAL DA PATA AFETADA APÓS ISQUEMIA NO CÓRTEX MOTOR	55
5 DISCUSSÃO	58
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	58
5.2 A ChABC NÃO INFLUENCIOU NO TAMANHO DA ÁREA DE LESÃO	59
5.3 ChABC FOI EFICIENTE EM PROMOVER DEGRADAÇÃO DE PGSC DURANTE 14 DIAS	60
5.4 A ChABC NÃO INFLUENCIOU NA QUANTIDADE DE ASTRÓCITOS DA REGIÃO PERI-INFARTO	60

5.5 A ChABC INFLUENCIOU NA MELHORA FUNCIONAL DA PATA AFETADA APÓS ISQUEMIA NO CÓRTEX MOTOR	61
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a terceira causa de mortalidade no mundo (WHO, 2004) e a primeira no Brasil. Sendo ainda considerada a primeira causa de incapacidade no país. Com o desenvolvimento tecnológico há uma tendência de diminuição da incidência de mortalidade e aumento da incapacidade, já que os indivíduos sobrevivem, mas frequentemente apresentam sequelas decorrentes do AVC (LOTUFO, 2005).

Um desafio para os neurocientistas é buscar terapêuticas que favoreçam a melhoria da qualidade de vida desses indivíduos, diminuindo sua incapacidade funcional. Uma das formas é utilizando a capacidade do sistema nervoso central (SNC) de se adaptar a novas demandas, a capacidade plástica. Após uma lesão o SNC abre-se um período de plasticidade, uma oportunidade para reorganização de novas conexões, que pode refletir em melhora funcional do indivíduo. Porém esta janela de plasticidade é limitada, limitando consequentemente a melhora do déficit funcional (MURPHY; CORBETT, 2009).

O principal fator limitante da plasticidade tanto no cérebro normal quanto isquêmico, é a matriz extracelular (MEC), especificamente as redes perineuronais (RPN). Estas são especialidades da MEC e têm a importante função de estabilizar as sinapses, limitando a plasticidade no SNC. Por um aspecto, esta limitação da plasticidade é benéfica, pois mantém a organização e funcionamento correto do SNC, porém em situações patológicas, como o AVC, impede que novas sinapses sejam realizadas, limitando adaptações que poderiam ser benéficas para o indivíduo (CARMICHAEL, *et al.*, 2005; GALTREY; FAWCETT, 2007).

Nesta pesquisa, utilizou-se o modelo experimental de isquemia no córtex cerebral de ratos, e aplicou-se uma enzima que degrada a MEC, especificamente as RPN, proporcionando um “ambiente” mais plástico após lesão. Para avaliar a efetividade da terapia aplicada, verificaram-se alguns dos aspectos histológicos do tecido cerebral, além do comportamento funcional da pata com déficit sensorio-motor, a fim de compreender se este ambiente mais plástico no SNC reflete no comportamento do animal.

É a primeira vez que se estudam os efeitos morfológicos e comportamentais da degradação da MEC em uma lesão isquêmica como a proposta neste projeto. Estudos desta natureza são de grande valia, podendo ao longo prazo, influenciar positivamente na qualidade de vida dos indivíduos após AVC, e nos aspectos socioeconômicos da população em geral.

1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CORTEX CEREBRAL NORMAL

1.1.1 Organização do córtex cerebral

O córtex dos mamíferos é a parte mais externa do telencéfalo (FIGURA 1) e é dividido filogeneticamente em alocórtex e isocórtex. O isocórtex (ou neocórtex) é a região filogeneticamente mais recente, organizado em seis camadas de células, possuindo uma superfície de aproximadamente 2600 cm², com cerca de 28 x 10⁹ neurônios e aproximadamente o mesmo número de células gliais (KAAS, 1995; MOUNTCASTLE, 1997). No isocórtex, neurônios com propriedades funcionais semelhantes são organizados verticalmente em colunas (BUXHOEVEDEN; CASANOVA, 2002; KELLER, 1993; MOUNTCASTLE, 1997; SCHIEBER, 2001). Cerca de 10¹² sinapses conectam os neurônios corticais entre si e com neurônios de outras regiões do SNC, formando uma vasta rede de conexão. O isocórtex é responsável pelo controle voluntário do movimento, interpretação de sensações e funções como memória, atenção, consciência e linguagem (MOUNTCASTLE, 1997).

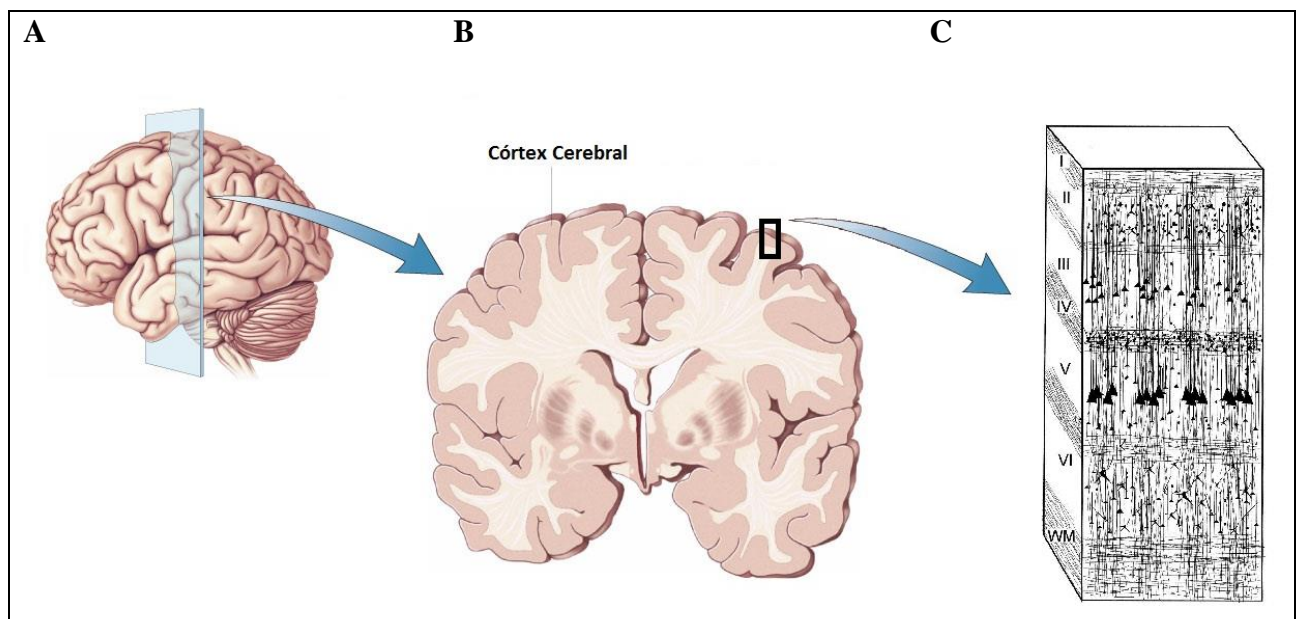


Figura 1 – Desenho esquemático do encéfalo humano em perspectiva lateral (A) e corte coronal (B) evidenciando a camada mais externa do telencéfalo, o córtex cerebral, além das seis camadas corticais (C).

Fonte: Adaptado (A e B) de BEAR *et al*, 2007 e (C) de MARTIN, 2003.

A área motora primária de humanos está localizada no giro pré-central no lobo frontal e corresponde a área 4 de Brodmann (FIGURA 2). É uma área cortical agranular (camada laminar II e IV pouco evidentes), caracterizado pela presença de células piramidais gigantes, principalmente na camada V e que formam o trato corticoespinhal (GEYER, *et al.*, 2000).

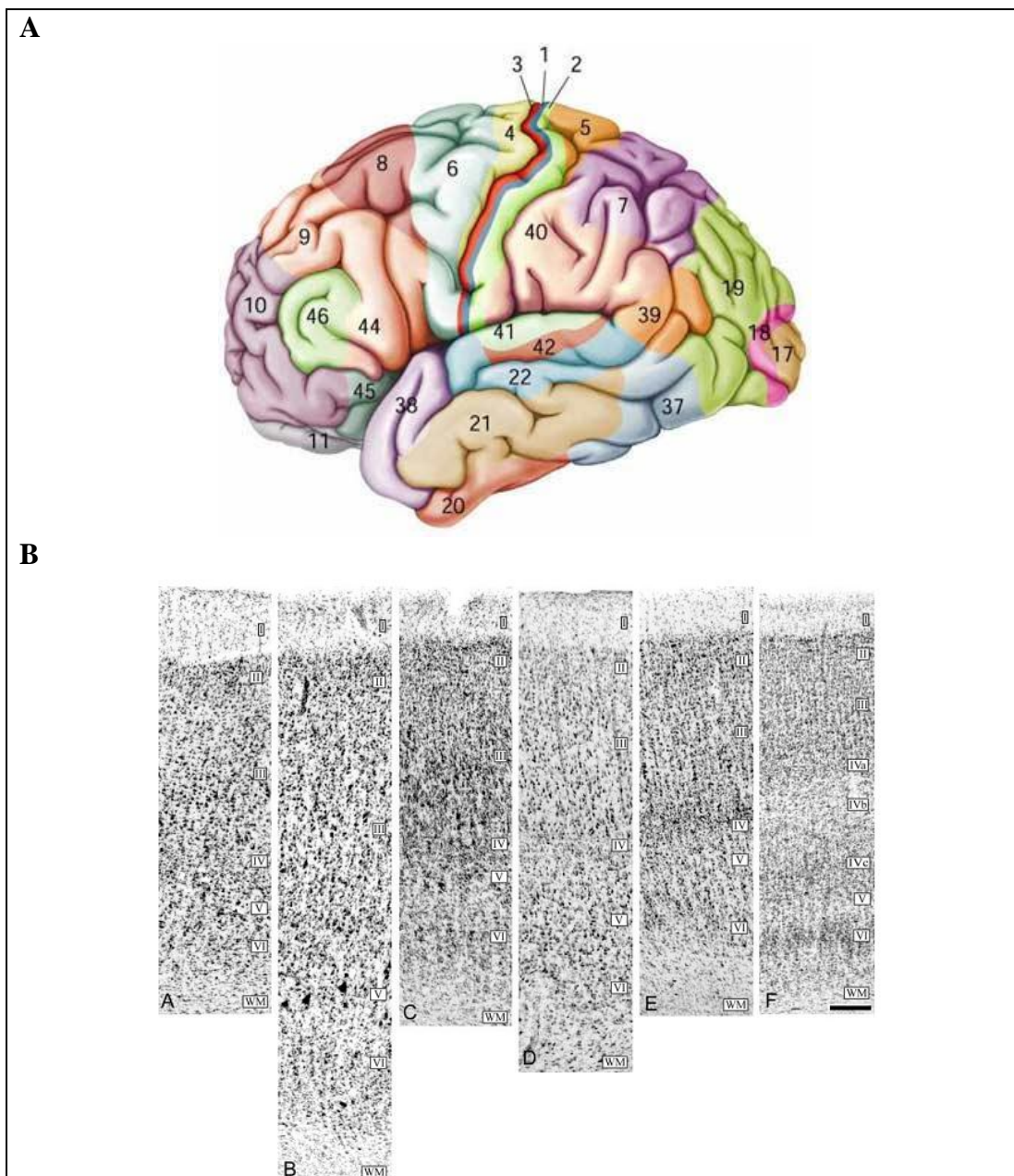


Figura 2 – Mapa das áreas citoarquitônicas de Brodmann (A). Organização em camadas de distintas áreas do córtex cerebral de humanos (B) fotomicrografia de coloração de Nissl. Áreas 10 (A), 4 (B), 3b(C), 22 (D), 18 (E), 17 (F).

Fonte: Adaptado de (A) (BEAR *et al.*, 2005) e (B) (YANEZ, *et al.*, 2005).

espinhal; interconexões horizontais ocorrem entre as fibras distribuindo ainda mais esta representação (NUDO, *et al.*, 2001).

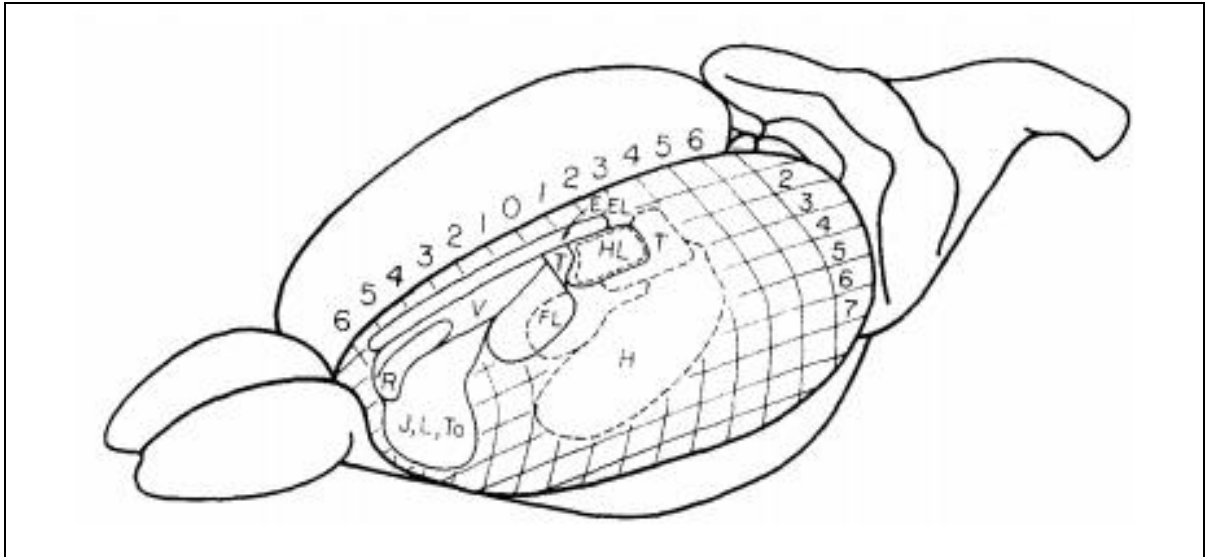


Figura 4 – Diagrama esquemático representando o mapeamento do córtex sensório-motor de rato por estimulação elétrica. Evidencia-se a sobreposição da representação de áreas motoras (linhas sólidas) e somatossensoriais (linhas pontilhadas). E – Olho, EL – pálpebra, FL – membros anteriores, H – cabeça, HL – membros posteriores, J – mandíbula, L – lábios, R – rosto, T – tronco, To – língua, V – vibrissa.

Fonte: HALL E LINDHOLM, 1974.

Já está bem descrito na literatura que este mapa motor é padrão, porém, cada indivíduo, dependendo da experiência de vida, terá uma organização diferenciada. Nem mesmo o mapa entre os dois hemisférios são iguais, ou de um mesmo indivíduo ao longo da vida é igual. Alguns fatores podem alterar esta organização, como aprendizado de uma habilidade motora (ex. tocar um instrumento, praticar um esporte característico, entre outros) ou mesmo lesões tanto no sistema nervoso central (SNC) ou periférico. Esta característica plástica do SNC denota que ao contrário do que se imaginava o córtex motor é altamente dinâmico (SCHIEBER, 2001). Esta plasticidade é consequência não só de eventos a nível celular (formação de novas sinapses), mas das modificações da MEC ao redor das células (WANG; FAWCETT, 2012).

1.1.2 MEC e RPN no sistema nervoso central

Os tecidos do organismo não são constituídos apenas de células. O espaço extracelular é preenchido por uma rede de macromoléculas que constituem a MEC. A MEC é composta de proteínas e polissacarídeos produzidos pelas células locais e que se associam intimamente a elas. No sistema nervoso central (SNC), é sintetizada por neurônios, células gliais e outras células não-neuronais (DITYATEV, *et al.*, 2010).

A organização da MEC no SNC envolve várias moléculas (FIGURA 5), dentre os quais: as glicosaminoglicanas (GAG), que são cadeias de polissacarídeos carregadas negativamente, compostas por unidades de dissacarídeos; proteoglicanas (PG), que são núcleos proteicos associados as GAG; além de proteínas de ligação e moléculas de adesão (GALTREY; FAWCETT, 2007).

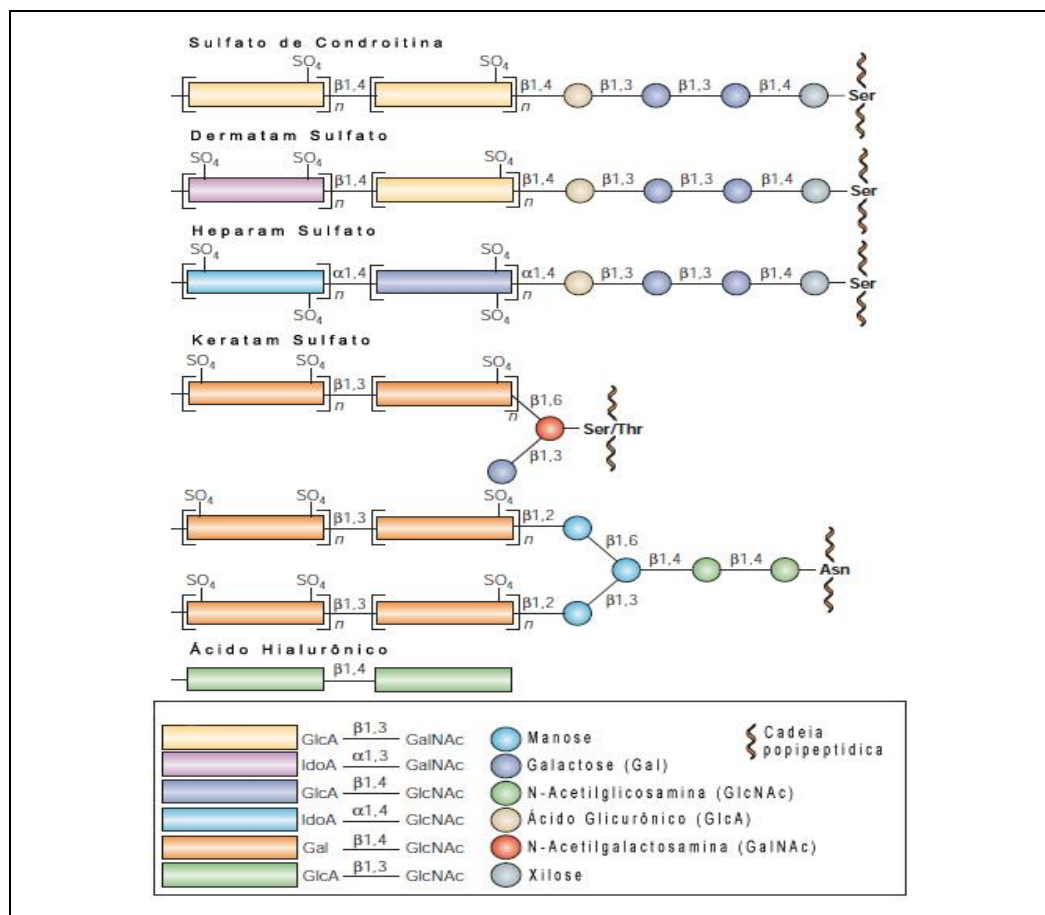


Figura 5 – Moléculas que compõe a MEC do SNC.

Fonte: Adaptado de KLEENE; SCHACHNER, 2004.

As GAG são constituídas por resíduos de hexosamina e de ácido urônico. A hexosamina é um açúcar aminado (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), já o ácido urônico (glicurônico ou idurônico) pode estar ligado aos grupos sulfato e carboxila, são carregados negativamente e divididos em quatro grupos principais: hialuronana (ou ácido hialurônico ou hialuronato); sulfato de condroitina; sulfato de dermatana; sulfato de heparana; e sulfato de queratana. Apenas a hialuronana não está ligada covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanas. As PG estão envolvidas em processos como: sinalização para fatores de crescimento, morfogênese tecidual, homeostasia, divisão celular, cicatrização, infecção e inflamação (BONNEH-BARKAY; WILEY, 2009; CRESPO, *et al.*, 2007; YAMAGUCHI, 2000).

Dentre as PG, o sulfato de condroitina (PGSC) é o mais abundante no SNC de mamíferos (CARULLI, *et al.*, 2005). Os PGSC estão ligados por um resíduo de serina ao núcleo proteico por meio de tetrassacarídeos de ligação; as subunidades de dissacarídeos são caracterizadas por diferentes sulfatações (KWOK, *et al.*, 2012) (FIGURA 6).

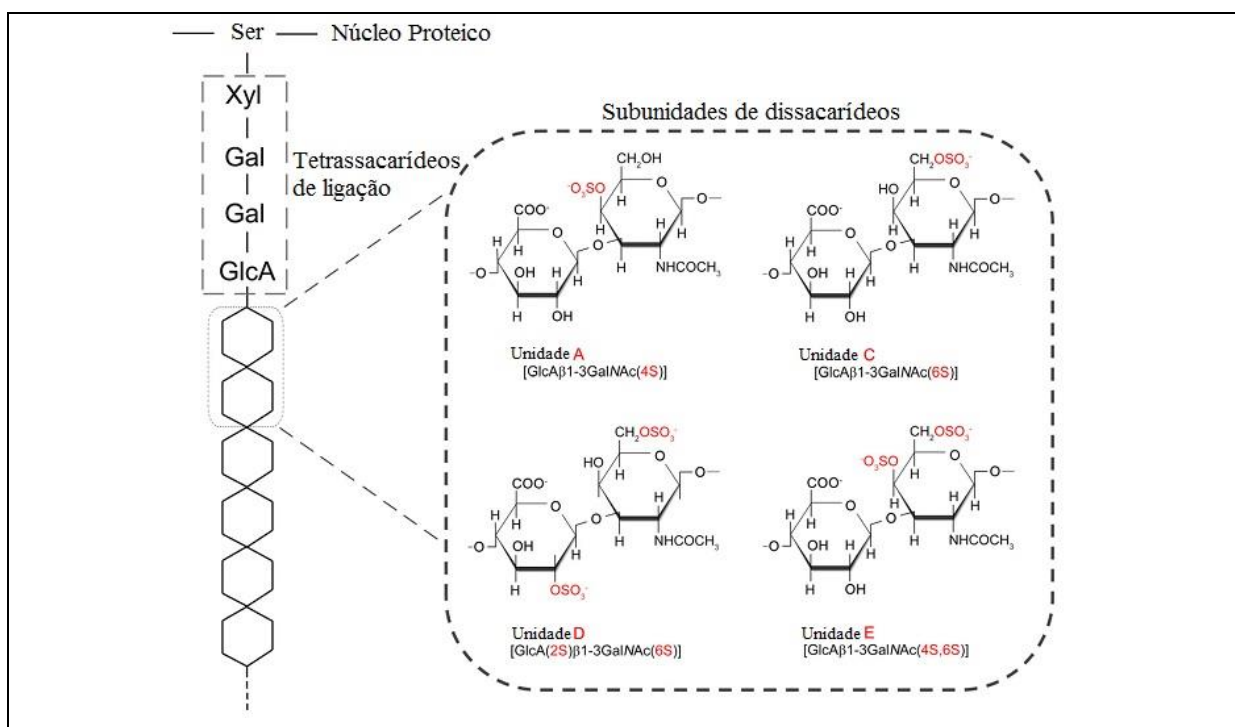


Figura 6 – Diagrama esquemático mostrando a estrutura do PGSC. Xyl: xilose; Gal: galactose; GlcA: ácido glicurônico; GalNAc: N-acetil-galactosamina.

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

Os quatro principais grupos de PGSC são: lectinas (uma família incluindo versicam, agrecam, brevicam e neurocam – sendo que as duas últimas são restritas ao tecido nervoso) (YAMAGUCHI, 2000), fosfacam (GARWOOD, *et al.*, 2003), proteoglicanas ricas em leucinas pequenas (HOCKING, *et al.*, 1998), NG-2 (STALLCUP, 2002) e outras proteoglicanas (OOHIRA, *et al.*, 2004). Das citadas, as lectinas (FIGURA 7) são as mais importantes na organização da MEC do SNC. São expressas de maneira heterogênea tanto durante o desenvolvimento do sistema nervoso quanto em diferentes tipos celulares. Em encéfalo de roedores, agrecam e brevicam aumentam sua expressão entre o 14º dia do período embrionário (E14) até o 150º dia do período pós-natal (P150), enquanto a neurocam alcança seu pico entre P2 e P6, seguido de rápido declínio. Brevicam e versicam são mais abundantes no encéfalo adulto (BOVOLENTA; FERNAUD-ESPINOSA, 2000; MEYER-PUTTLITZ, *et al.*, 1996; YAMAGUCHI, 2000). Quanto ao tipo celular prevalente, a neurocam está presente em neurônios granulares corticais e nas células de Purkinje do cerebelo. Já o brevicam aparece associado à bainhas neurogliais de astrócitos protoplasmáticos da camada granular do cerebelo, em oligodendrócitos imaturos da fímbria hipocampal e nas RPN de neurônios de corpo celular grande (YAMAGUCHI, 2000).

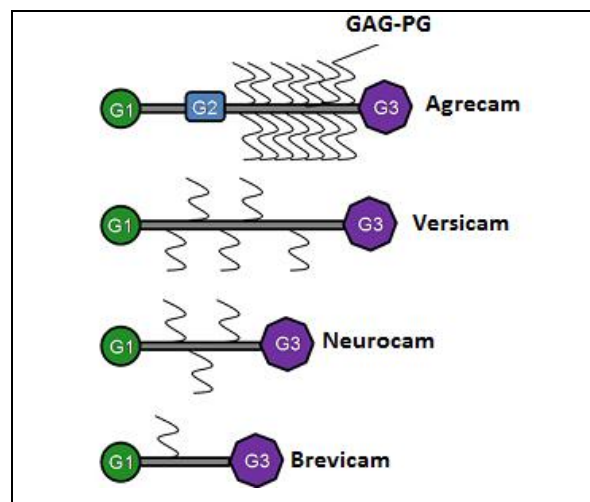


Figura 7 – Representação esquemática das PGSC mais abundantes no SNC. G1: Hialuronana e proteínas de ligação. G3: Tenascina.

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

Em relação às moléculas de adesão e às proteínas de ligação, a tenascina (ligada à laminina e fibronectina) é importante na interação e organização da MEC. Estudos afirmam que a ausência dessa molécula causa a desorganização e ruptura da integridade da MEC (GALTREY; FAWCETT, 2007). Os componentes principais e a estrutura da MEC no SNC estão mostrados na FIGURA 8.

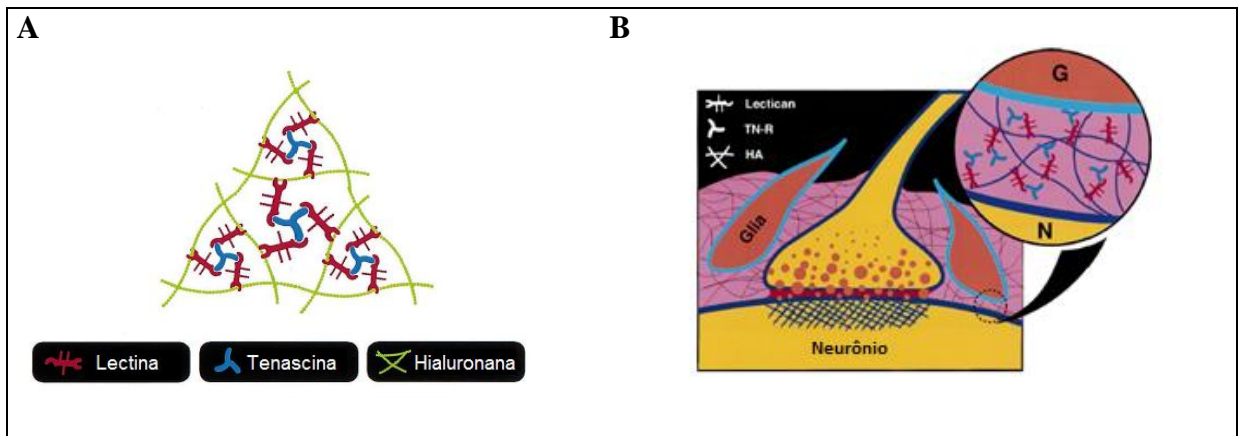


Figura 8 – A: Desenho esquemático da interação entre as lectinas, tenascina e hialuronana, formando o complexo ternário da MEC no SNC; B: Lectican = Lectina, TN-R = Tenascina, HÁ = Hialuronana.

Fonte: Modificado de YAMAGUCHI, 2000.

As RPN são uma das principais especializações da MEC no SNC. Elas formam uma malha reticular que envolve os corpos celulares e dendritos proximais de alguns neurônios (FIGURA 9). Os componentes da MEC que formam as RPN incluem a hialuronana, lectinas e tenascinas. A hialuronana faz o ancoramento da MEC à célula neuronal, as proteínas de ligação mantêm a MEC condensada, as lectinas limitam a plasticidade e as moléculas de tenascina contribuem para a integridade estrutural das RPN (DITYATEV, *et al.*, 2007; WANG; FAWCETT, 2012).

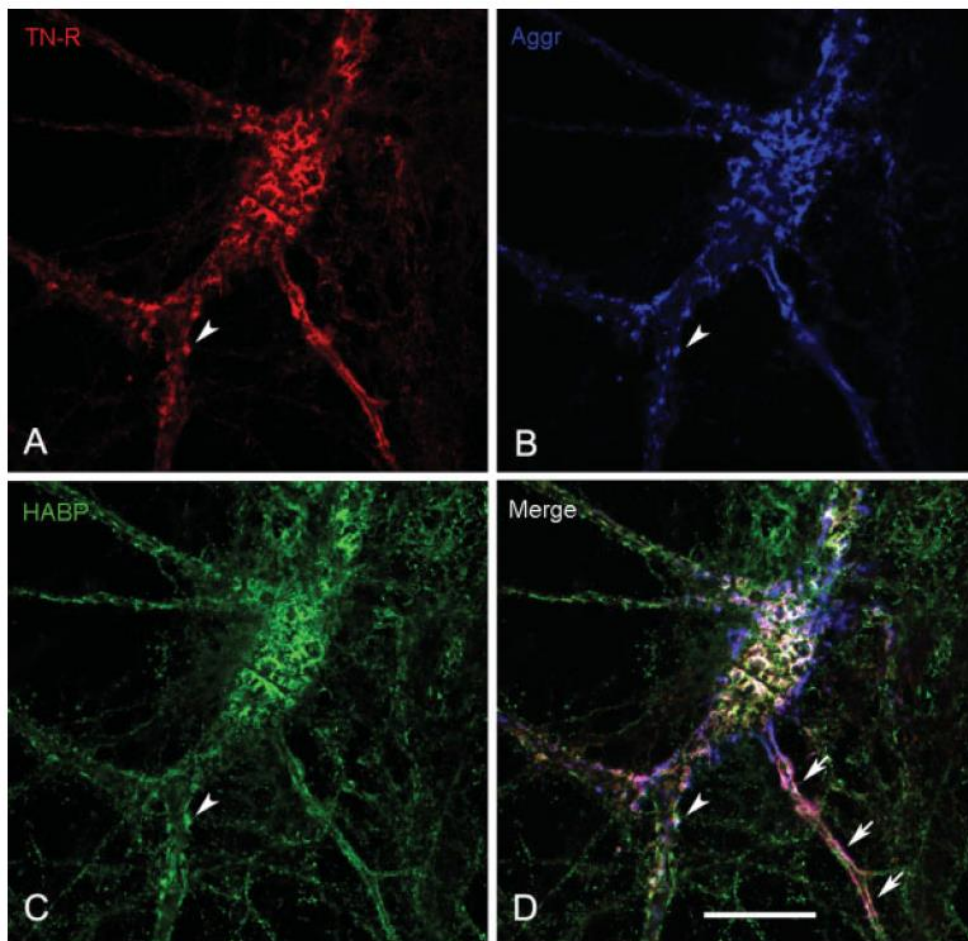


Figura 9 – Imunofluorescência dos componentes da RPN em hipocampo de ratos adultos. A: marcação para tenascina; B: marcação para agregam; C: marcação para hialuronana; D: tripla marcação dos componentes.

Fonte: Adaptado de DITYATEV, 2007.

Em situações normais, têm papel na estabilização sináptica, na neuroproteção (MIYATA, *et al.*, 2005), e no desenvolvimento do SNC, interagindo com vários fatores de crescimento, quimiocinas, e moléculas guia sendo capazes de regular a proliferação (neurogênese e gliogênese, por exemplo), sobrevivência, migração e diferenciação celular (BANDTLOW; ZIMMERMANN, 2000; KWOK, *et al.*, 2012; YAMAGUCHI, 2000). Todos esses eventos são regulados pelas RPN porque estas restringem o crescimento axonal e estabilizam as conexões existentes, ajudando ou limitando, assim, a plasticidade (KWOK, *et al.*, 2012). Em situações patológicas, podem se tornar inibidoras da regeneração neuronal e remielinização e, conseqüentemente, da plasticidade (HOKE, 2005; RHODES; FAWCETT, 2004; WIELOCH; NIKOLICH, 2006).

1.1.3 Plasticidade no córtex cerebral normal

O encéfalo humano adulto era, até pouco tempo atrás, considerado incapaz de alterações plásticas significativas. Porém, várias evidências têm demonstrado uma notável capacidade de adaptação ambiental (plasticidade), corroborando para uma mudança de paradigma científico. Entende-se a plasticidade neural como toda mudança significativa nas conexões sinápticas, tanto aquelas que ocorrem após os estímulos normais do ambiente, quanto as que acontecem após eventos patológicos. É um processo contínuo, que aperfeiçoa o funcionamento das redes neuronais por meio do remodelamento sináptico (MURPHY; CORBETT, 2009).

O entendimento dos fenômenos plásticos neuronais foi influenciado pelo trabalho pioneiro de Donald Hebb, nos anos 1940 e 1950. Hebb observou que os ratos que cresceram em sua casa tinham capacidade de aprendizado superior aos animais que cresceram no laboratório. Intuiu, então, que o aprendizado é influenciado diretamente pela quantidade de conexões inter-neuronais, que são incrementadas pelo ambiente (HEBB, 1947 apud WARD; FRACKOWIAK, 2006).

As intercorrências ambientais podem causar mudanças estruturais adaptativas no SNC, gerando conseqüentemente modificações comportamentais. Vários experimentos demonstram que animais criados em ambiente enriquecido apresentam mudanças estruturais significativas no cérebro (maior complexidade dos dendritos, por exemplo), além de melhor desempenho funcional (KOLB; WHISHAW, 1998).

Estes estímulos ambientais também podem ser representados por treinos de uma habilidade específica. Macacos treinados para uma habilidade manual específica extensivamente por 50 dias tiveram modificação do mapa motor, com aumento da área da pata anterior. Após 4 meses sem praticar, o mapa motor retornou ao padrão pré-treino, denotando que este mapa é altamente dinâmico dependendo diretamente dos estímulos ao qual são submetidos (NUDO, *et al.*, 1996).

A plasticidade neural tem relação estreita com as RPN (FIGURA 10), tanto do ponto de vista do desenvolvimento normal quanto em situações patológicas (MURPHY; CORBETT, 2009). Nos estágios iniciais do desenvolvimento, durante o período crítico, o cérebro é mais plástico, pois as RPN ainda não estão bem estruturadas. Com a progressão do desenvolvimento as RPN condensam e estabilizam as sinapses (BAHIA, *et al.*, 2008; MURPHY; CORBETT, 2009; WANG; FAWCETT, 2012).

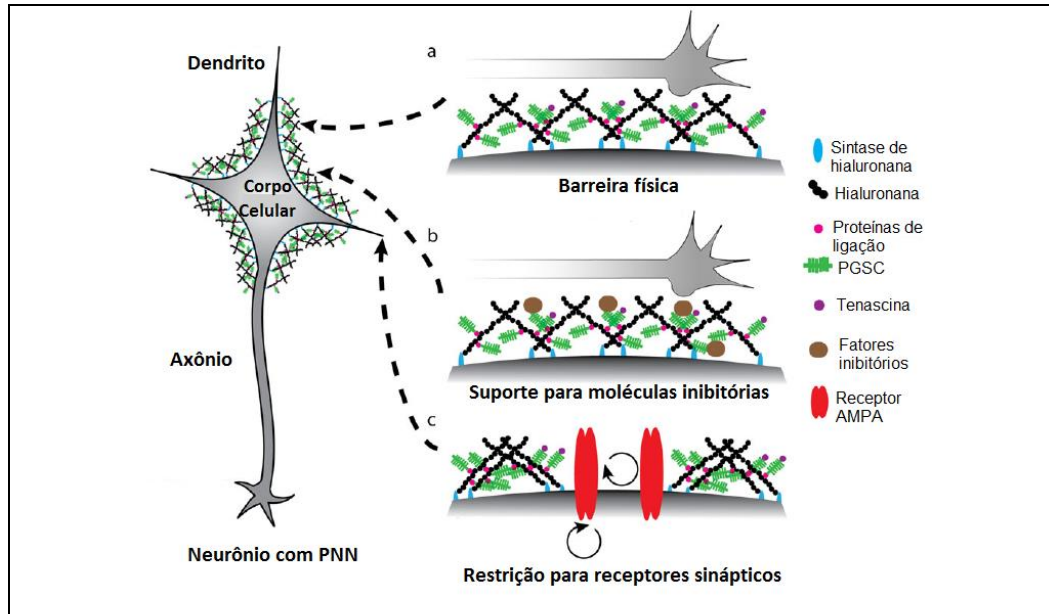


Figura 10 – Neurônio com RPN e possíveis formas de restrição da plasticidade pelas RPN.

(A) Barreira física entre neurônios e axônios em crescimento. (B) Suporte estrutural para moléculas inibidoras da plasticidade. (C) Restrição aos receptores sinápticos.

Fonte: Adaptado de WANG; FAWCETT, 2012.

Os circuitos sinápticos corticais são mais sensíveis a influências sensoriais e motoras durante intervalos definidos do período de desenvolvimento pós-natal, chamados de períodos críticos de plasticidade (PIZZORUSSO, *et al.*, 2002). As bases neurais deste evento foram estabelecidas inicialmente na década de 70, em estudos de privação visual em gatos. Demonstrou-se a existência de uma janela temporal nos primeiros meses de vida que é essencial para permitir a organização adequada do córtex visual, baseada nas informações ambientais. Animais que foram privados de informação ambiental adequada durante esse período apresentaram circuitaria corticais aberrantes (HUBEL; WIESEL, 1970).

Durante o período crítico, a circuitaria neuronal é refinada pelos *inputs* sensoriais e a ausência de experiências sensorio-motoras adequadas leva a formação de conexões neurais aberrantes (WANG; FAWCETT, 2012). Após o fechamento da janela temporal, a plasticidade fica bastante reduzida (OOHIRA, *et al.*, 2004).

Estudos sobre plasticidade neuronal são necessários para o entendimento do desenvolvimento normal do SNC, além de possibilitarem o aprofundamento sobre os fenômenos de regeneração em casos patológicos, proporcionando o desenvolvimento de novas terapias para as doenças do SNC (KOLB, *et al.*, 2003).

Embora os mecanismos moleculares não estejam claros, há evidências de que, a partir da modulação das RPN, alguns tipos neuronais de áreas motoras primárias se reconectam com neurônios localizados na área motora suplementar ou pré-motora, promovendo assim, melhora funcional do membro afetado (MCNEAL, *et al.*, 2010; NUDO, 2011).

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CEREBRO ISQUÊMICO

1.2.1 AVC: conceitos e epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004), o AVC é causado por uma interrupção do suprimento sanguíneo para o encéfalo, podendo ocorrer por bloqueio (AVC isquêmico) ou ruptura de um vaso sanguíneo (AVC hemorrágico). Em 2002, o AVC foi a terceira causa de mortalidade no mundo (10% ou 5,5 milhões de pessoas), estando atrás apenas das doenças coronárias (13% ou 7,2 milhões de pessoas) e do câncer (12% ou 7,1 milhões de pessoas) (WHO, 2004).

Nos Estados Unidos, a cada ano, aproximadamente 795000 pessoas sofrem um AVC sendo que destes mais de 75% são novos casos. Estes dados apontam que a cada 40 segundos alguém sofre um AVC naquele país. Outro dado relevante é que a taxa de mortalidade após um AVC caiu de 34,8% (1998 até 2008) para 19,4% (na atualidade), sendo esta a maior causa de incapacidade em diversos países (ROGER, *et al.*, 2012; WHO, 2004).

No Brasil, as doenças cérebro-vasculares foram causa mais frequente de mortalidade em 2004, correspondendo a 10,1% da mortalidade geral (OPAS, 2007; GARRITANO, *et al.*, 2012). O AVC é considerado a maior causa de morte e incapacidade no País, gerando grande impacto econômico e social (LOTUFO, 2005).

Em 2010, a Comunidade Européia gastou mais de 64 bilhões de euros com o tratamento de pacientes com AVC (cerca de 8% de todos os gastos relacionados a doenças do SNC) (OLESEN, *et al.*, 2012). Já nos Estados Unidos, os gastos com as doenças vasculares (incluindo AVC) entre 2012 e 2030 serão triplicados, podendo chegar a 834 bilhões de dólares. Em relação ao Brasil, o Ministério da Saúde investirá 437 milhões de reais até 2014 para ampliar a assistência às vítimas de AVC no Brasil (BRASIL, 2011).

Os impactos sociais do AVC estão relacionados, principalmente, com as consequências físicas e psicológicas do evento. Atualmente, há uma tendência para a redução da mortalidade por AVC pelo avanço em procedimentos de prevenção, diagnóstico e tratamento. Com a diminuição no número de mortes, aumenta a morbidade relacionada. Cerca de 30% das pessoas que sobrevivem ao AVC nos EUA apresentam incapacidade permanente, podendo comprometer várias funções como a fala, visão, motricidade, dificultando na realização de atividades de vida diária simples. Os pacientes acometidos por AVC necessitam de cuidados especiais permanentes, o que altera não só a rotina do próprio paciente, mas da família e da sociedade (GARRITANO, *et al.*, 2012; SACCO, *et al.*, 2012)

Em relação às medidas preventivas emergenciais recomendadas pela OMS, podem ser destacadas o combate aos fatores de risco comportamentais, também chamados fatores modificáveis (tabagismo, etilismo, sedentarismo, hábitos alimentares não saudáveis) e metabólicos (hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, obesidade). Outros fatores de risco ainda são descritos como pobreza, baixo nível educacional, idade avançada, gênero feminino, predisposição genética, fatores psicológicos (estresse). Classe socioeconômica alta, ou mesmo habitantes de regiões globalizadas e urbanizadas, estão pré-dispostos a estas doenças, decorrente dos hábitos de vida não saudáveis (WHO, 2012).

1.2.2 Fisiopatologia do AVC

O encéfalo representa 2% do peso corporal, porém consome 20% do oxigênio disponível na corrente sanguínea (DOYLE, *et al.*, 2008). Cerca de 70% do consumo de energia é gasto na fosforilação oxidativa para a formação de adenosina trifosfato (ATP). Uma restrição do suprimento sanguíneo declina os níveis de oxigênio e glicose no encéfalo que, dependendo do tempo e espaço, levam a eventos fisiopatológicos que lesionam neurônios, células gliais e células endoteliais (BROUNS; DE DEYN, 2009; DOYLE, *et al.*, 2008).

Após a isquemia, a hipóxia e falta de glicose levam à morte das células nervosas. Em uma área denominada centro isquêmico, poucos minutos após uma isquemia, eventos inter-relacionados (desequilíbrio iônico, excitotoxicidade, acidose) causam morte celular por necrose decorrente do baixo suprimento sanguíneo. Posteriormente, a área peri-infarto ou penumbra isquêmica, sofre morte celular (principalmente por apoptose) decorrente de eventos inter-relacionados, como despolarização peri-infarto, estresse oxidativo e inflamação,

umentando a área lesionada ao longo do tempo (FIGURA 11) (LIU, *et al.*, 2010). Esta área não está condenada à morte celular, mas apresenta risco em potencial ao longo do período pós-lesão. Este período, dito refratário, é alvo de muitos estudos, já que pode se tornar uma janela terapêutica importante (BROUGHTON, *et al.*, 2009; BROUNS; DE DEYN, 2009; DIRNAGL, *et al.*, 1999; WOODRUFF, *et al.*, 2011). Esses eventos serão explorados adiante.

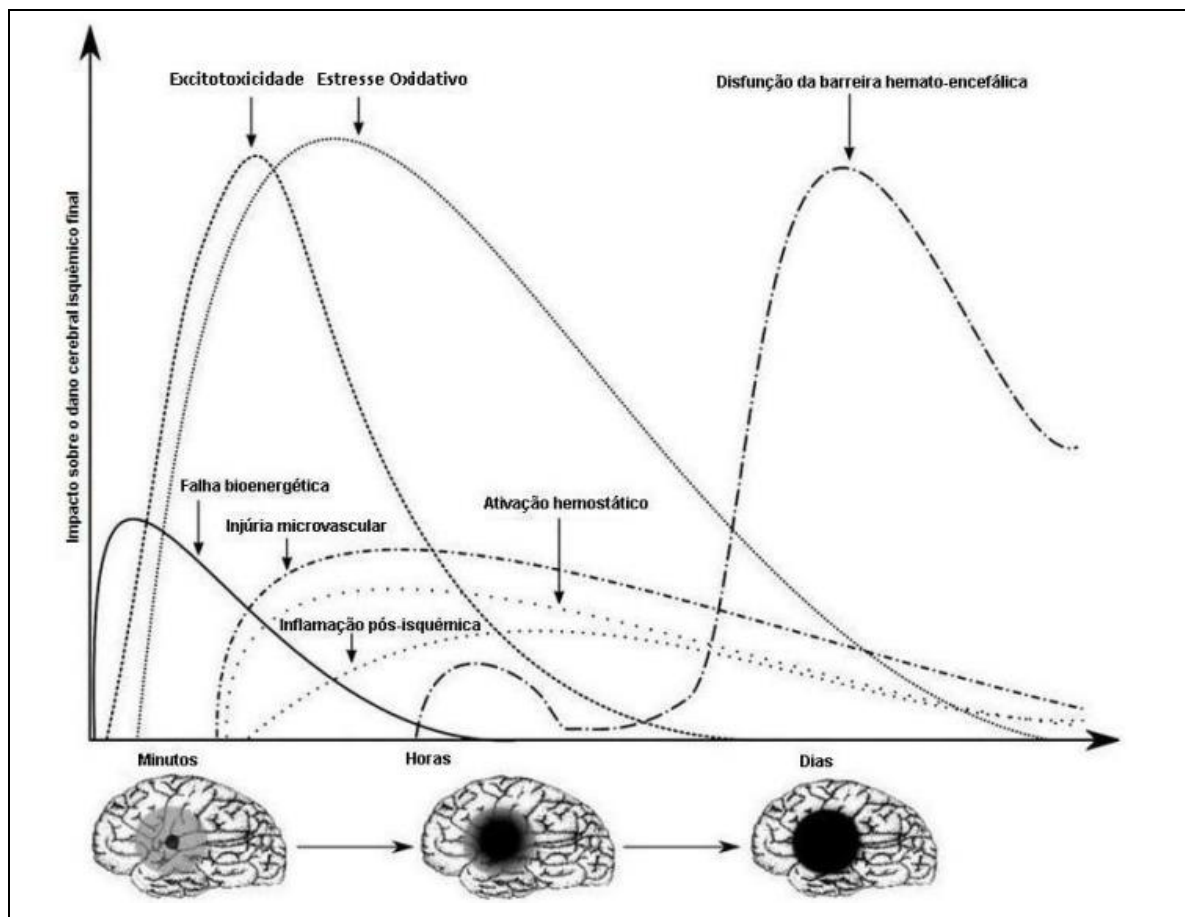


Figura 11 – Representação temporal dos mecanismos fisiopatológicos da isquemia encefálica. Centro (cinza escuro) e penumbra (cinza claro) isquêmica ao longo do tempo.

Fonte: Adaptado de (WOODRUFF, *et al.*, 2011).

No centro isquêmico, em poucos minutos, os níveis de oxigênio e glicose diminuem bruscamente, comprometendo a síntese de ATP nas células nervosas. Com a falência energética, o transporte ativo de íons necessário para manter o potencial de repouso da membrana não ocorre, impossibilitando a manutenção do equilíbrio iônico. Obedecendo o gradiente de concentração, há influxo de Na^+ e efluxo de K^+ e os neurônios e células gliais despolarizam (WOODRUFF, *et al.*, 2011).

A despolarização, por sua vez, aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} , que ativa enzimas líticas (proteases, lipases e DNases), levando a morte celular por catabolismo (SCHIEBER, 2001). Além da ativação de enzimas, o Ca^{2+} ajuda na liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, gerando mais danos às células afetadas (excitotoxicidade) (HOSSMANN, 1996; SIMS; MUYDERMAN, 2010).

Decorrente ainda da despolarização neuronal, especificamente do influxo de sódio, ocorre passivamente o influxo de água, resultando em edema, alterações osmóticas e lise da célula, que pode afetar ainda mais a perfusão da região peri-infarto (MERGENTHALER, *et al.*, 2004; SIMS; MUYDERMAN, 2010).

Com a falha do metabolismo celular aeróbico, o metabolismo anaeróbico é ativado de maneira exacerbada, aumentando os níveis de lactato no meio intracelular. A presença exagerada de lactato e de cálcio provocam acidose celular, prejudicando ainda mais os processos metabólicos celulares (BACK, *et al.*, 1994) (FIGURA 12).

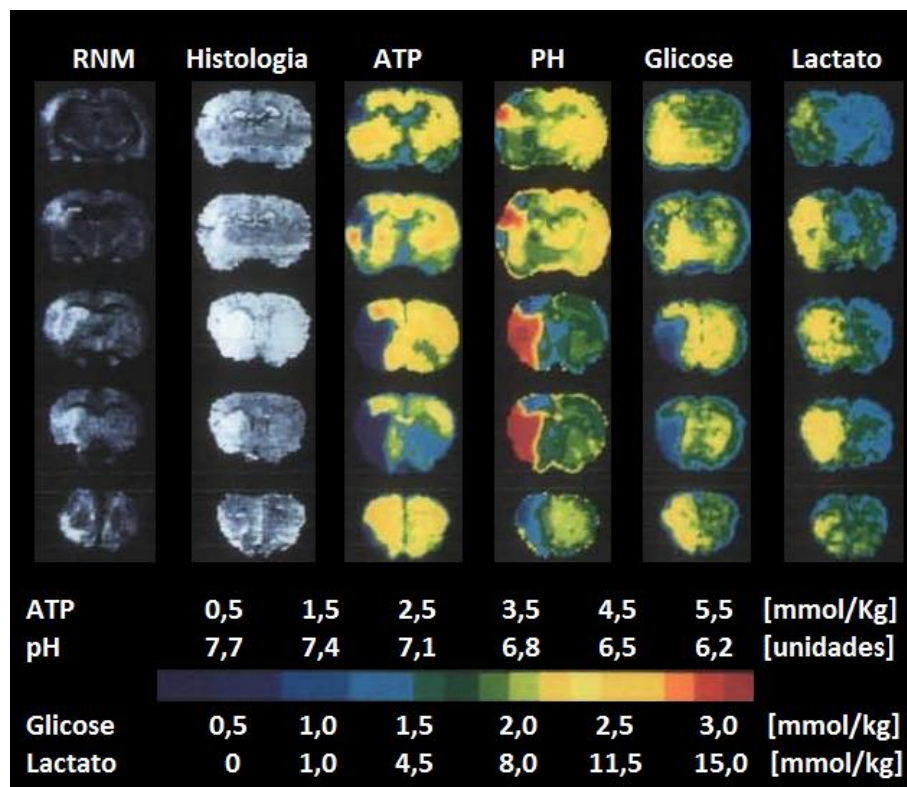


Figura 12 – Encéfalo de ratos 7 horas após isquemia por oclusão da artéria cerebral média. A morte celular está evidente na ressonância magnética nuclear (RNM); na histologia, observa-se “palor” na região de infarto. A diminuição do metabolismo na região infartada é observado pelo decréscimo do ATP, pH, glicose e aumento do lactato.

Fonte: Modificado de BACK, 1994.

Na fase aguda, as células da penumbra isquêmica estão funcionalmente inativas, mas não mortas e o ATP gerado é suficiente apenas para manter o potencial de membrana. Se não houver a reperfusão, as células morrerão lentamente (LO, 2005). Alguns eventos fisiopatológicos ocorrem de forma semelhante aos do centro isquêmico. As sucessivas despolarizações e a excitotoxicidade que ocorrem no centro isquêmico geram um processo denominado de depressão alastrante, que afeta negativamente as células dessa região, aumentando o dano (DIRNAGL, *et al.*, 1999; DOYLE, *et al.*, 2008).

A homeostasia de alguns processos celulares fica comprometida após a lesão. Em condições normais, espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) são geradas, mas mantidas em baixos níveis por mecanismos antioxidantes endógenos. Após a lesão, há um aumento de ERO derivado de superprodução do mesmo, inativação de enzimas antioxidantes e consumo dos antioxidantes disponíveis. Este aumento é a principal causa de lesão celular, pois inviabiliza ainda mais o funcionamento das células afetadas (destrói proteínas, lipídios e DNA). A interação de ERO com o tecido lesionado leva a produção de outros radicais livres. A reperfusão tecidual deve ocorrer de uma maneira gradual, pois as células da região peri-infarto que não estão totalmente lesionadas podem produzir ERO de maneira exacerbada na mitocôndria, liberando proteínas sinalizadoras de apoptose, podendo a célula, mesmo com restabelecimento do fluxo sanguíneo, morrer (BROUGHTON, *et al.*, 2009; DOYLE, *et al.*, 2008; MORITA-FUJIMURA, *et al.*, 2001; SZETO, 2008; WOODRUFF, *et al.*, 2011).

Paralelamente aos eventos fisiopatológicos iniciais, uma resposta inflamatória é gerada envolvendo diferentes células, mediadores e receptores celulares. O efeito benéfico ou maléfico da resposta inflamatória após AVC é intensamente discutido, pois depende do estágio temporal da lesão, componente inflamatório envolvido e magnitude da resposta inflamatória (DOYLE, *et al.*, 2008).

Por muitos anos, concebeu-se que o SNC estava isolado da influência do sistema imune, contudo, moléculas e células do sistema imune têm transito de entrada e saída em situações normais e patológicas (LAKHAN, *et al.*, 2009). Vários tipos celulares contribuem para gerar a resposta inflamatória após isquemia. As primeiras células residentes ativadas são as células microgлияis e os astrócitos (GOMES-LEAL, 2012). As células microgлияis, além de realizar a secreção de mediadores inflamatórios, transformam-se em fagócitos e, dependendo do seu nível de ativação, pode ter efeito citotóxico ou citoprotetor. Os astrócitos, além da capacidade de secretar mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico, são responsáveis pela ruptura e alteração da permeabilidade da BHE (BROUNS; DE DEYN, 2009; LAKHAN, *et al.*, 2009).

Após a ruptura da BHE, as células inflamatórias não residentes passam a agir na lesão. As primeiras células recrutadas são os neutrófilos, cerca de meia hora após a lesão. Essas células secretam mediadores inflamatórios e radicais livres de oxigênio. Além disso, são importantes na agregação de algumas moléculas de adesão, responsáveis pela obstrução da BHE, que causa aumento de lesão. Os mediadores inflamatórios acabam atraindo outras células inflamatórias para o sítio de lesão. A partir da atração dos mediadores inflamatórios, os linfócitos são recrutados para a área da lesão 24 horas após o evento isquêmico, que contribuem para o aumento da lesão (DOYLE, *et al.*, 2008).

A resposta inflamatória induz a formação de cicatriz em torno do tecido lesionado, composta por componentes celulares e MEC (FIGURA 13). Células da glia, principalmente os astrócitos, tornam-se reativos e se acumulam em torno da lesão. O componente fibrótico é produzido por células residentes (em geral, astrócitos, que aumentam a produção da MEC) e por fibroblastos invasores, que produzem elementos como colágeno e fibronectina (FITCH; SILVER, 2008; KAWANO, *et al.*, 2012).

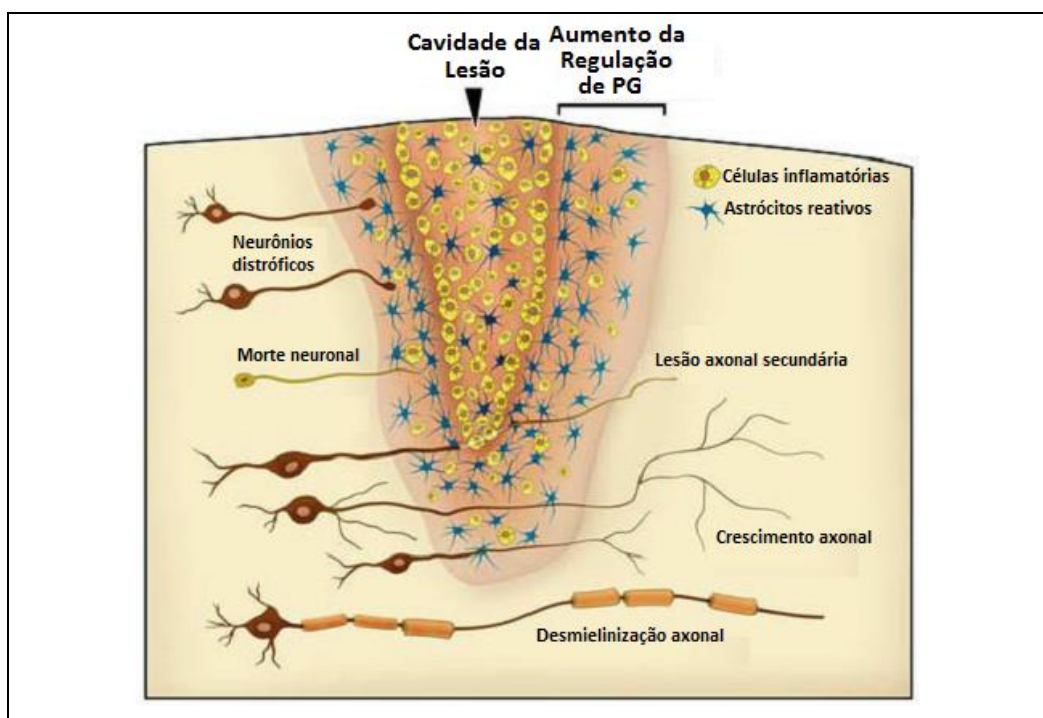


Figura 13 – Desenho esquemático demonstrando a cavidade da lesão, a cicatriz glial formada perilesão (com componentes celulares – essencialmente astrócitos – e componentes fibróticos, incluindo o aumento na regulação de PG), e os danos secundários como a inibição do crescimento axonal.

Fonte: Adaptado de (FITCH; SILVER, 2008).

Esta cicatriz, denominada cicatriz glial, tem a função de restringir a lesão, impedindo seu alastramento para o tecido sadio, além de reparar a integridade da barreira hematoencefálica. Por outro lado, ela se torna uma barreira física e molecular capaz de bloquear a regeneração do tecido (KAWANO, *et al.*, 2012).

Pode-se concluir que os eventos fisiopatológicos que sucedem à isquemia são necessários às lesões do SNC, porém também representam um fator agravante e maléfico às lesões. Podem, ainda, desencadear mudanças na conformação do tecido que envolve não somente as células nervosas, mas também a MEC, impedindo a regeneração tecidual.

1.2.3 Plasticidade cerebral no córtex isquêmico

Os eventos fisiopatológicos do AVC resultam em morte e disfunção das células nervosas, que em última instância repercutem em déficits neurológicos e conseqüentemente em perdas funcionais (LO, *et al.*, 2003). As perdas funcionais ocorrem de acordo com a organização do mapa somatotópico de M1. Por exemplo, se a lesão ocorrer somente na região lateral do hemisfério, causará paresia ou paralisia do membro superior e face contralateral à lesão; se ocorrer somente na face medial do hemisfério, pode ser manifestado uma monoparesia do membro inferior contralateral (ANDERSON, *et al.*, 1990; MCNEAL, *et al.*, 2010).

É frequente que pacientes após o AVC manifestem certa recuperação espontânea da função perdida. Esta recuperação pode ser funcionalmente descrita como real /verdadeira (em que a função perdida é restabelecida) ou mesmo aparente (em que alguns mecanismos compensam a função perdida). Em todo caso, após a lesão, há um reordenamento espontâneo do mapa motor que está relacionado com as mudanças na circuitaria cerebral (HERMANN; CHOPP, 2012; HOSP; LUFT, 2011)

1.2.3.1 Reorganização do mapa motor

Mesmo se na fase adulta a plasticidade neuronal é bastante limitada, após uma lesão isquêmica abre-se uma “janela de oportunidade plástica”, caracterizada por intenso

crescimento de axônios, capilares e ativação de células gliais (CARMICHAEL, *et al.*, 2005; MURPHY; CORBETT, 2009). Mecanismos de plasticidade pós-lesão acontecem espontaneamente, podendo estar associados com as melhoras funcionais observadas. Estes mecanismos dependem de diversos fatores como: tamanho e fator causal da lesão, processos fisiopatológicos subsequentes, idade, medicação utilizada e experiências sensório-motoras (como exercícios de reabilitação) (CRAMER, 2008).

Após o AVC, a ativação do córtex cerebral contralesional é aumentada. Neste caso, o equilíbrio da interação inibitória entre os dois hemisférios fica comprometido. Algumas hipóteses sugerem que o hemisfério contralesional poderia assumir alguns aspectos da função antes desempenhada pela área lesionada (FIGURA 14) (DIJKHUIZEN, *et al.*, 2003; ROSSINI, *et al.*, 2001; SOHN, *et al.*, 2003). Entretanto, a estimulação magnética transcraniana no hemisfério sadio não resulta na movimentação da mão afetada (PALMER; ASHBY, 1992). Pode ser que a ativação do córtex contralesional seja relevante apenas nos primeiros estágios pós-lesão (CRAMER, 2008). Esta forma de reorganização pós-AVC retorna ao seu nível basal de ativação em até 2 semanas. Este declínio não determina uma piora funcional, pelo contrário, os ganhos obtidos durante o período de ativação contralesional podem ser extremamente benéficos aos pacientes (CRAMER, 2008; CRAMER; CRAFTON, 2006; CRAMER, *et al.*, 2006; DIJKHUIZEN, *et al.*, 2001).

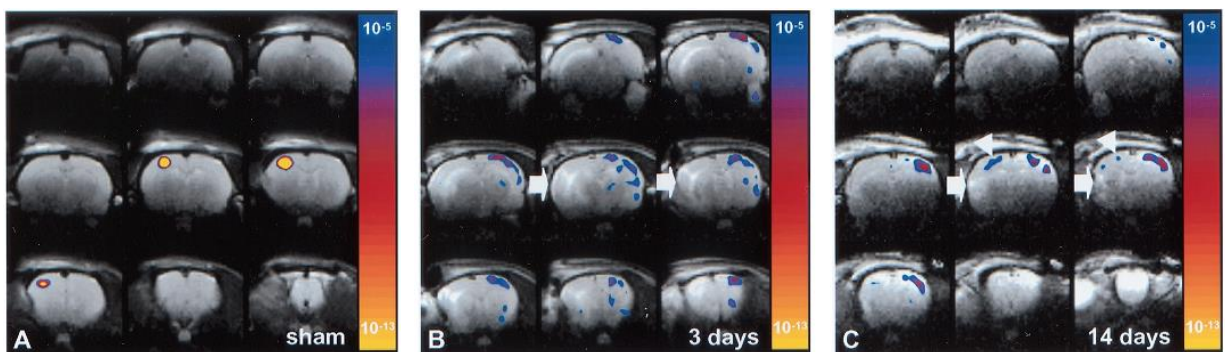


Figura 14: Tomografia computadorizada de encéfalos de ratos evidenciando a ativação cerebral em área sensório-motora primária da representação cortical da pata anterior. Ao estímulo sensorial da pata anterior esquerda do animal, (A) evidencia-se o padrão de ativação normal do córtex direito contralateral ao estímulo; (B) 3 dias após oclusão da artéria cerebral média direita, leva à ativação do córtex à esquerda; (C) 14 dias após AVC a ativação do córtex passa a ser em ambos os hemisférios.

Fonte: Adaptado de DIJKHUIZEN, *et al.*, 2001.

Posteriormente a este período agudo pós-lesão há uma reorganização cortical em regiões adjacentes à isquemia (BENOWITZ; CARMICHAEL, 2010). Mudanças somatotópicas ocorrem sobretudo na área perilesão. Experimentos envolvendo análise de funções executadas após estimulação cortical ou exames de imagem evidenciam este fenômeno. Após lesão na representação cortical motora da pata anterior em ratos, esta se expande para áreas que antes representavam somente a pata posterior (CASTRO-ALAMANCOS; BORREL, 1995).

1.2.3.2 Plasticidade estrutural na região peri-infarto

Mudanças adaptativas estruturais nos circuitos corticais podem ser descritos pelas projeções de espinhas dendríticas, sinaptogênese e crescimento axonal (HOSP; LUFT, 2011). As espinhas dendríticas são pequenas protuberâncias que constituem os principais locais de contato com axônios de outros neurônios e são significativamente reduzidas na região peri-infarto após lesão isquêmica. Entretanto, tornam-se mais longas em um período de até 6 horas após um AVC (BROWN, *et al.*, 2008). Até 6 semanas após lesão, as espinhas dendríticas na região peri-infarto retornam à situação anterior, evidenciando o retorno da função sináptica aos níveis basais (HOSP; LUFT, 2011).

As modificações na circuitaria neural também estão relacionadas ao crescimento axonal. Após lesão em M1, os axônios podem crescer e se expandir, formando novas conexões entre a área peri-infarto, área pré-motora, motora suplementar e somatossensorial (HOSP; LUFT, 2011; LI; CARMICHAEL, 2006; UENO, *et al.*, 2012). O crescimento axonal pós-AVC progride, tendo uma fase de gatilho (1 a 3 dias), em que despolarizações neuronais repetidas induzem o crescimento axonal; uma fase de iniciação e manutenção (7 a 14 dias), na qual novas sinapses são formadas e mantidas; e a fase de maturação, na qual um novo padrão de conexão já está estabelecido (CARMICHAEL, *et al.*, 2005; LI; CARMICHAEL, 2006).

Após um evento isquêmico, ocorre 2 eventos que influenciam diretamente na plasticidade cerebral (FIGURA 15). A primeira é a expressão gênica de fatores de crescimento axonal, em pelo menos três ondas: aguda pela expressão de SPRR1, intermediária pela expressão de p21, Ta1tubulin, L1, MARCKS, tardia pela expressão de SCG10, SCLIP, além de uma onda sustentada demonstrada pela expressão de GAP43, CAP23, c-jun. A segunda é a expressão de fatores que inibem o crescimento axonal, mais

expressivamente representada pelas PGSC. Isto remete ao fato que após lesão, mecanismos para induzir a plasticidade ocorrem, porém, ocorrem também mecanismos inibitórios (CARMICHAEL, *et al.*, 2005)

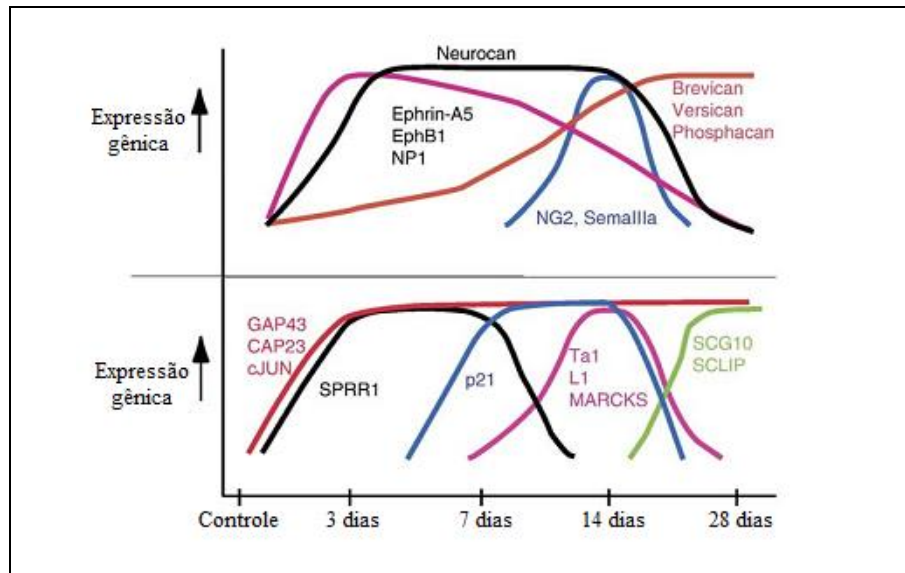


Figura 15– Representação esquemática temporal da expressão gênica dos fatores inibitórios (acima) e fatores facilitadores (abaixo) do crescimento axonal após AVC por oclusão da artéria cerebral média. Dentre os fatores inibitórios, destaca-se o neurocan, um PGSC, que mantém-se elevado até a fase mais crônica pós-lesão.

Fonte: Adaptado de CARMICHAEL, *et al.*, 2005.

A expressão de inibidores do crescimento axonal após AVC, ocorre de maneira diferenciada em duas áreas distintas da região peri-infarto: sem cicatriz glial e com cicatriz glial. Na região peri-infarto adjacente à cicatriz, os níveis das moléculas inibitórias do crescimento axonal está reduzido, favorecendo assim a plasticidade. Na cicatriz glial, embora haja proteínas como GAP43 que favoreçam o crescimento axonal, há também inibição dentre outros pela deposição de PGSC, tornando a plasticidade limitada. (CARMICHAEL, *et al.*, 2005; HOBHOM, *et al.*, 2005; LI; CARMICHAEL, 2006).

A cicatriz glial é considerada a principal barreira para o crescimento axonal e, conseqüentemente, para a formação de novas sinapses (CARULLI, *et al.*, 2005). Fosfacam, neurocan, brevicam e NG2 têm propriedades inibitórias para o crescimento axonal e suas

respectivas produções estão aumentadas após a lesão isquêmica (CARMICHAEL, *et al.*, 2005; TANG, *et al.*, 2003).

Com o aumento no número de células gliais (principalmente de astrócitos – astrocitose), a produção de PGSC também aumenta, sendo estes os fatores determinantes para a redução do crescimento axonal (CARULLI, *et al.*, 2005; SHARMA, *et al.*, 2012). Inúmeras terapias pós-lesão vem sendo propostas a fim de promover o crescimento do axônio. A tentativa de neutralizar ou inibir moléculas da MEC têm demonstrado um efeito positivo para o crescimento axonal pós-lesão em encéfalo ou em medula, permitindo a formação de novas conexões sinápticas.

1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CONDROITINASE ABC NA REMOÇÃO DA MEC APÓS LESÕES NO SNC

A condroitinase ABC (ChABC) é uma enzima capaz de degradar as cadeias de SC, sem alterar o seu núcleo proteico (PROPERZI, *et al.*, 2003). É sintetizada a partir da bactéria *Proteus Vulgaris*. (SUZUKI, *et al.*, 1968). O 'ABC' refere-se às formas 4-S, DS, e 6-S do sulfato de condroitina (LIN, *et al.*, 2008) A degradação da MEC pela enzima tem demonstrado ser capaz de reduzir a ação inibitória dos PGSC, facilitando assim plasticidade neuronal (BUSCH; SILVER, 2007).

Estudos envolvendo a degradação da MEC têm sido realizados em diversos sistemas neuronais, como no córtex visual de ratos maduros (PIZZORUSSO, *et al.*, 2002), em lesões medulares (BRADBURY, *et al.*, 2002) e em lesões no sistema nervoso periférico (KREKOSKI, *et al.*, 2001; ZUO, *et al.*, 2002). Estes estudos têm demonstrado que o tratamento com ChABC, aumenta da plasticidade estrutural após lesão, pelo aumento extensivo das espinhas dendríticas, e regeneração axonal (FIGURA 16) (GALTREY; FAWCETT, 2007; HOKE, 2005; MCKEON, *et al.*, 1995).

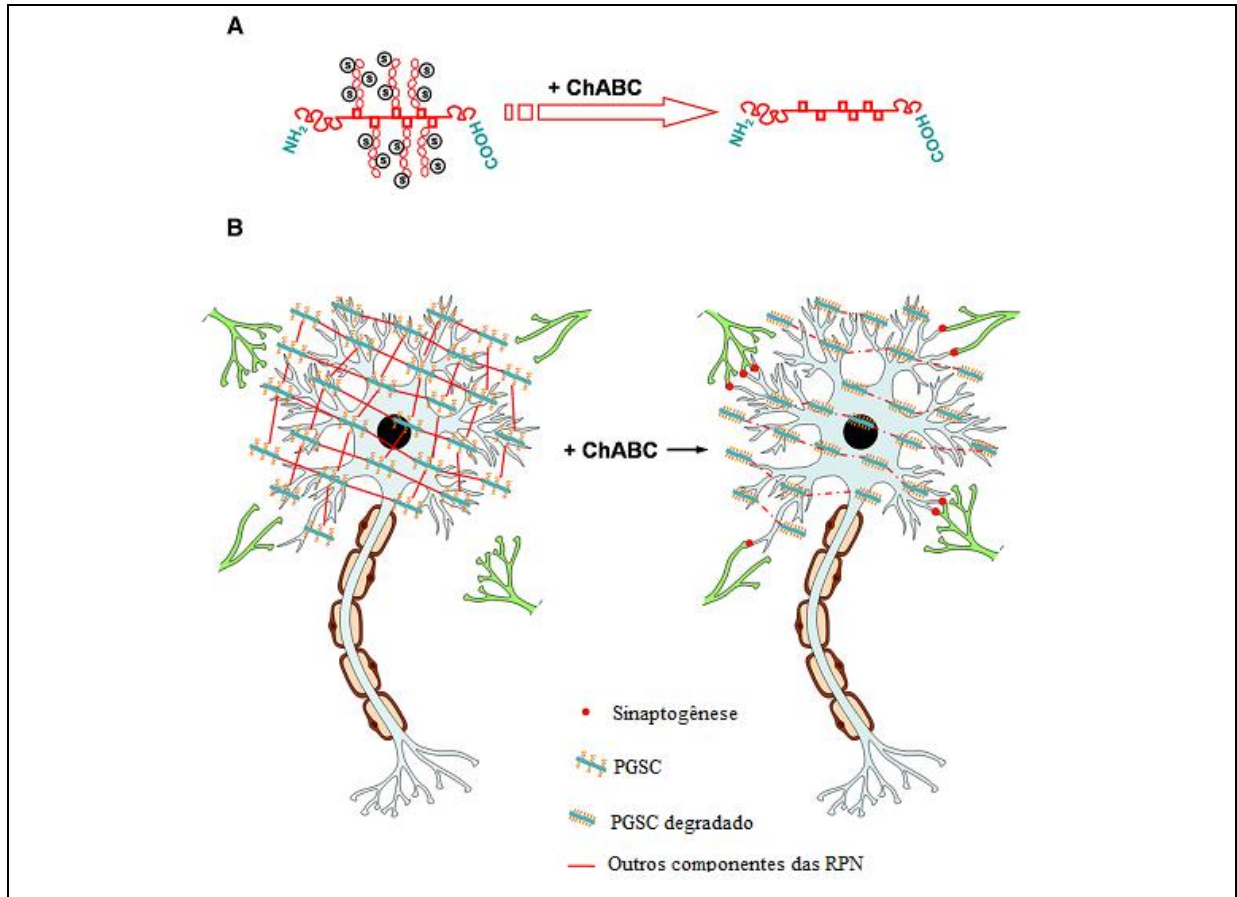


Figura 16 – Plasticidade estrutural induzida pela ChABC. Desenho esquemático representando (A) a quebra das ligações sulfatadas sem alteração dos núcleos proteicos e (B) as RPN limitando (à esquerda) e com a ChABC propiciando (à direita) a plasticidade estrutural.

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

Apesar do aumento da plasticidade estrutural, a recuperação funcional em modelo de lesão traumática do cérebro pode não repercutir em melhora funcional se o treino da habilidade específica não for realizado durante a abertura da janela de plasticidade (HARRIS, *et al.*, 2010). No entanto, experimentos usando técnicas de registro eletrofisiológicos e análises comportamentais evidenciam melhora na plasticidade funcional associada à plasticidade estrutural (CAGGIANO, *et al.*, 2005; KWOK, *et al.*, 2012). Mesmo em ratos senis (cuja a plasticidade já está bastante limitada) e após AVC, a ChABC foi capaz de promover recuperação sensório-motora da pata anterior (SOLEMAN, *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da remoção de PGSC na área sensório-motora primária de ratos em modelo experimental de isquemia do córtex cerebral.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da ChABC sobre o tamanho da área de lesão após isquemia no córtex sensório-motor.
- Avaliar o efeito da ChABC na astrocitose e na degradação da MEC na área de penumbra isquêmica.
- Avaliar o efeito da ChABC no desempenho funcional do membro afetado de ratos em modelo experimental de isquemia cerebral.

3 MÉTODO

3.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 20 ratos *Wistar*, todos machos adultos, com idade entre 3 e 6 meses, divididos em 4 grupos experimentais (TABELA 1), com massa corporal entre 250 e 300g. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) da Universidade Federal do Pará (UFPA), por meio do parecer BIO 0066–12 (ANEXO 1).

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

Grupos	Tratamento	N
BSA 7 dias	Isquemia no córtex sensorio-motor, tratados com Elvax saturado em BSA e perfusão em 7 dias pós-lesão.	05
ChABC 7 dias	Isquemia no córtex sensorio-motor, tratados com Elvax saturado em ChABC e perfusão em 7 dias pós-lesão.	05
BSA 14 dias	Isquemia no córtex sensorio-motor, tratados com Elvax saturado em BSA e perfusão em 14 dias pós-lesão.	05
ChABC 14 dias	Isquemia no córtex sensorio-motor, tratados com Elvax saturado em ChABC e perfusão em 14 dias pós-lesão.	05
Total		20

Para a realização dessa pesquisa (FIGURA 17), os animais foram submetidos à lesão isquêmica no córtex sensorio-motor primário induzido por endotelina-1 (ET-1, Sigma Aldrich®), tratados com um polímero etileno vinil acetato (Elvax®, DUPONT) saturado em Condroitinase ABC (grupo experimental) ou em BSA (grupo controle), e perfundidos em 7 e 14 dias para a análise histológica. A análise comportamental ocorreu por meio do teste da escada horizontal e do cilindro em -1, 3, 7 e 14 dias da lesão isquêmica.

-24 a -17 Habituação	-16 a -2 Treino comportamental	-1 Registro comportamental	0 Lesão e tratamento	3 Registro comportamental	7 Registro comportamental e perfusão	14 Registro comportamental e perfusão
--------------------------------	--	--------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------	--	---

FIGURA 17: Delineamento experimental da pesquisa ao longo do tempo (em dias da esquerda para a direita).

3.2 PREPARAÇÃO DA MATRIX DE POLÍMERO SATURADO

Uma pequena quantidade de Elvax[®] foi previamente lavada com álcool comercial (90-95%), sob agitação constante, durante 24 horas. Em seguida, 200mg do polímero foram dissolvidos em 2ml de diclorometano (Vetec). Alíquotas de 2ml foram separadas em tubos de vidros de 70 X 9mm e adicionadas de 20µl de condroitinase ABC (50U/ml, Sigma Aldrich[®]). O volume resultante foi homogeneizado durante 1 minuto e ultracongelado (-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 então cortadas em fatias de 150 µm com o auxílio de um criostato, com os cortes sendo mantidos a -20°C até o momento do implante (SÁ, *et al.*, 2010).

A concentração de ChABC utilizada foi de 1,5U/ul por fatia. Esta estimativa, é baseada em cálculos de farmacocinética, é de que uma concentração de 0,6U/ul atingiu o tecido após as primeiras 12 horas, uma concentração semelhante à utilizada em diversos trabalhos disponíveis na literatura e que faziam uso de micro-injeções (PIZZORUSSO, MEDINI *et al.*, 2002; PIZZORUSSO, MEDINI *et al.*, 2006; IACI, VECCHIONE *et al.*, 2007; CARTER, STARKEY *et al.*, 2008; GARCIA-ALIAS, BARKHUYSEN *et al.*, 2009; GOGOLLA, CARONI *et al.*, 2009; LEE; MCKEON *et al.*, 2010).

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais 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, foram colocados em um aparelho estereotático (Insight[®], EFF-336). Foi realizada craniotomia, com auxílio de uma broca cirúrgica, para exposição da região cortical do encéfalo e realização de 3 injeções de 0,5µl com 80pMol de ET-1 (endotelina-1, Sigma-Aldrich[®]) diluída em azul de colanil para sinalização das áreas de injeção, utilizando as seguintes coordenadas estereotáticas, respectivamente (todas relativas ao bregma): (-3,0mm ML, -0,5mm AP), (-3,0mm ML, +0,5mm AP), e (-3,0mm ML, +1,5mm AP). Essas coordenadas correspondem ao córtex sensório-motor de ratos wistar (CASTRO-

ALAMANCOS; BORREL, 1995) (FIGURA 18). A micropipeta foi mantida estacionária por 5 minutos, antes e após a injeção, para evitar o refluxo da ET-1.

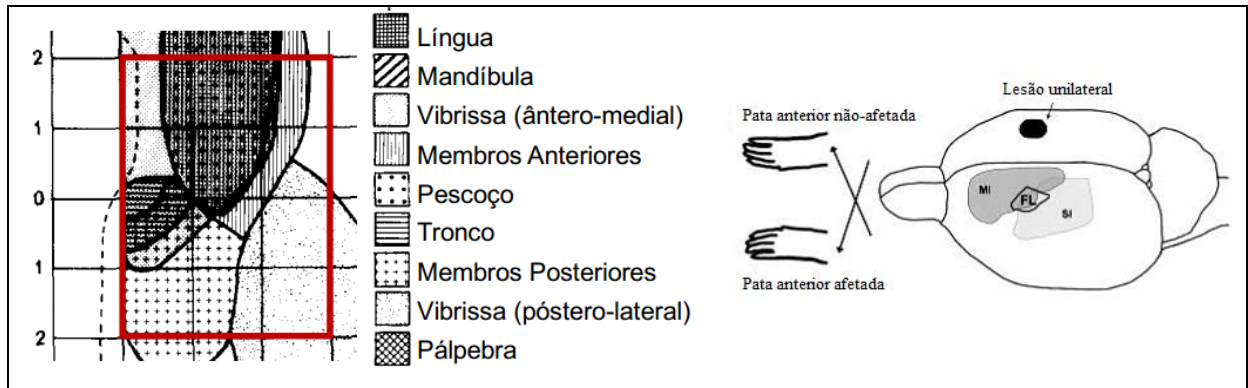


Figura 18- Desenho esquemático da organização do córtex cerebral de ratos (à esquerda); e da lesão unilateral e sua afecção contralateral à lesão. M1: Córtex motor primário; S1: Córtex sensorial primário; FL.: pata anterior.

Fonte: Adaptado de (GIOANNI; LAMARCHE, 1985) e (JONES, SAKATA, 2004)

Imediatamente após as microinjeções de ET-1, uma fatia de 100 μm de polímero saturado com Condroitinase ABC (grupo tratado) ou em BSA (grupo controle) foi posicionada no espaço epidural, sobre a lesão isquêmica do córtex sensório-motor. Em seguida a pele foi suturada e os animais recolocados em suas gaiolas de origem.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para avaliar a habilidade sensório-motora dos animais foram utilizados dois testes comportamentais: teste do cilindro que avalia a assimetria na utilização das patas anteriores do animal no comportamento de exploração vertical (SCHALLERT, *et al.*, 2000) e o teste da escada horizontal que avalia a habilidade sensório-motora mais específica de alcançar uma barra, realizar a preensão, descarregar o peso no membro apoiado na barra e impulsionar para um novo movimento de alcance (METZ; WHISHAW, 2009).

Ambos os testes foram registrados com uma câmera filmadora Sony (Handycam DCR-SR45) e realizados em um ambiente com luz homogênea e com minimização de odores e ruídos. Os registros ocorreram nos dias -1, 3, 7 e 14, referentes ao momento da lesão.

3.4.1 Teste da exploração vertical

O teste da exploração vertical é realizado com um cilindro de vidro de 20 cm de diâmetro por 40 cm de altura (FIGURA 19). Assim que o animal é colocado no aparato, imediatamente começa a explorar o ambiente. O teste avalia a assimetria na utilização das patas anteriores (SCHALLERT, *et al.*, 2000).

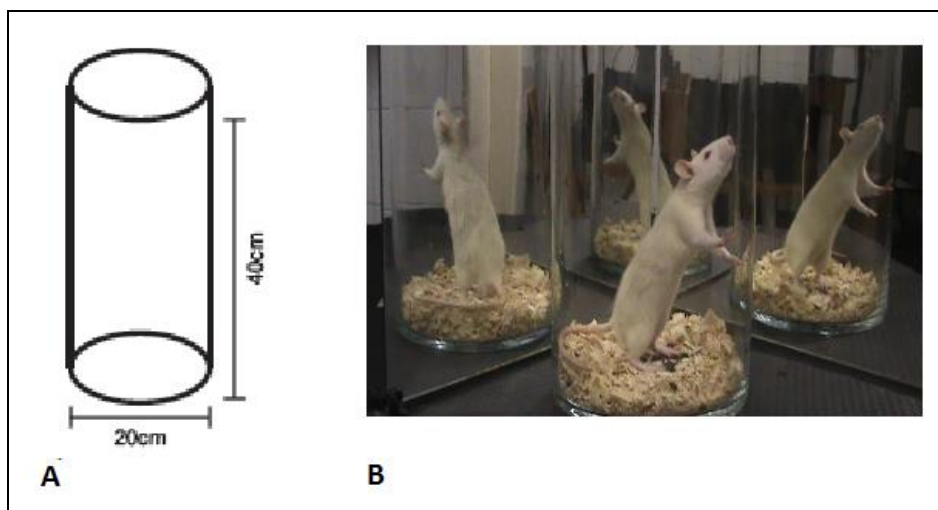


Figura 19- Aparato do cilindro (A) e o registro do teste (B).

O registro de vídeo do teste do cilindro foi realizado na vista anterior por 5 minutos. Para permitir a visualização do animal em todos os ângulos, são adaptados dois espelhos situados em um ângulo reto entre si e colocados atrás do cilindro de vidro. A análise dos registros de vídeo para determinação da assimetria na utilização das patas anteriores foi realizada com o auxílio do programa de computação *VLC media player*.

A quantificação dos resultados baseia-se na preferência manual do animal ao explorar o cilindro e ao retornar ao solo após a exploração, com 3 possibilidades: primeiro contato com a pata esquerda, ou primeiro contato com a direita ou a realização do primeiro contato com ambas as patas.

Os dados foram analisados em valores de porcentagem, seguindo a fórmula para averiguação da assimetria na utilização das patas:

$$\text{Assimetria} = \frac{\% \text{ pata afetada} - \% \text{ pata não afetada}}{\% \text{ pata afetada} + \% \text{ pata não afetada} + \% \text{ ambas}}$$

O valor próximo de zero é o índice mais simétrico que o animal pode obter, e como consequência os extremos, o mais assimétrico, sendo que quanto mais positivo maior a utilização da pata afetada e quanto mais negativo maior a utilização da pata não afetada.

3.4.2 O teste da escada horizontal

O teste da escada horizontal necessita de habituação e pré-treino para a realização de uma tarefa específica, diferente do teste do cilindro que se utiliza de um comportamento instintivo (METZ; WHISHAW, 2009; SCHALLERT, *et al.*, 2000).

Para os procedimentos de habituação e pré-treino os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura à 20°C, com ciclo claro/escuro (12/12h), alimento e água *ad libitum*. Além disso, foram habituados ao ambiente experimental e ao toque humano por 7 dias consecutivos (10 minutos por dia) antes do início dos testes comportamentais.

O teste da escada horizontal é realizado por meio de um aparato composto de duas placas de acrílico interligadas por barras de metal de 3mm de diâmetro (FIGURA 20). As barras podem ser ajustadas com separação variável entre 1 e 5 cm de distância entre elas, facilitando ou dificultando execução do movimento do animal durante o teste. A distância entre as placas de acrílico deve ser cerca de 1 cm mais largo que o tamanho do eixo latero-lateral do animal, dificultando que o animal se vire, caminhando no sentido não desejado. O aparato será colocado a 30 cm de altura de uma superfície, a fim de estimular que o animal tenha um trajeto unidirecional de uma extremidade à outra do aparato (METZ; WHISHAW, 2009).

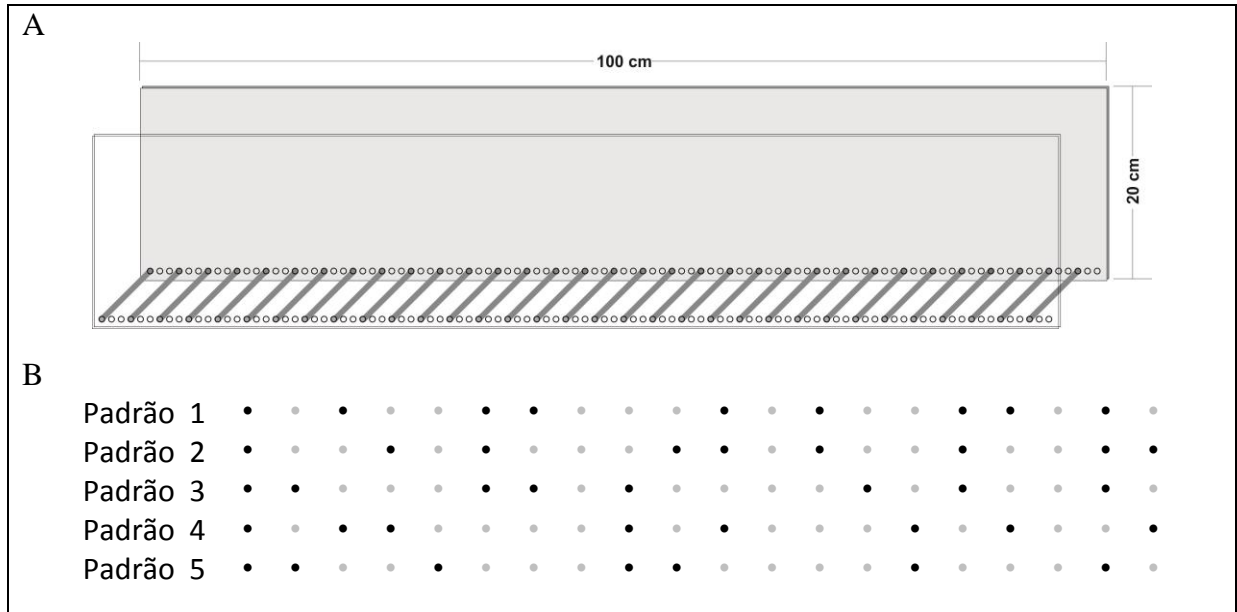


Figura 20 – Desenho esquemático da escada horizontal com padrão regular (A) e irregular utilizado no teste da escada horizontal para todos os animais (B), os pontos pretos e cinzas indicam a presença e ausência das barras respectivamente.

A habituação dos animais consistiu de três fases em dias consecutivos:

- 1º fase (7 dias): animais foram habituados ao toque humano, minimizando reações de estresse e ansiedade.

- 2º fase (5 dias): iniciou-se colocando o animal em uma gaiola neutra em uma das extremidades do aparato e a gaiola que lhe é familiar na outra extremidade. Os animais atravessam o aparato com as barras em um padrão regular (2 em 2 cm) na tentativa de retornar à gaiola em que ele foi habituado, e sem ter a possibilidade de fuga entre as barras. Caso o animal retornasse à gaiola neutra, não mais a encontrava, tendo como única possibilidade seguir o trajeto unidirecional da gaiola neutra à gaiola familiar.

- 3º fase (3 dias): o animal já habituado atravessava o aparato sempre em busca do seu refúgio e as barras estavam em um padrão irregular, dificultando a execução do teste.

Para o teste, o registro de imagem (filmagem) ocorreu na vista lateral ao aparato, permitindo a visualização preferencial do hemisfério esquerdo do animal. Cada animal caminhou em 5 padrões de distribuição das barras de metal (os degraus da escada), dificultando a execução da tarefa para todos os animais.

A análise do teste foi realizada de maneira qualitativa e está descrita na TABELA 2 e ilustrada na FIGURA 21.

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

Pontuação	Nome	Descrição
(0)	Erro total	O membro não faz contato com nenhuma barra, e ocorre uma queda em o membro cai profundamente entre os degraus, perturbando a postura e equilíbrio do animal.
(1)	Queda da pata	O membro faz contato com a barra, e quando ocorre a descarga do peso o membro escorrega e há a queda profundamente entre os degraus, perturbando a postura e equilíbrio do animal.
(2)	“Escorregão”	O membro faz contato com uma barra, e quando ocorre a descarga do peso escorrega, mas não há queda. O animal é capaz de manter o equilíbrio e continuar a marcha coordenada.
(3)	Reposicionamento	O membro faz contato com uma barra, e antes de ocorrer a descarga do peso e queda, reposiciona o membro em outra barra.
(4)	Correção	O membro intencionado a fazer contato com uma barra, mas antes de qualquer contato reposiciona-se e faz contato com uma nova barra; O membro faz contato com o degrau e reposiciona-se levemente sobre ele.
(5)	Apoio parcial	O membro faz contato com uma barra, de forma parcial, ou seja, com um dígito, com o punho ou o calcanhar, e mesmo com a descarga de peso não ocorre a queda.
(6)	Apoio correto	O membro faz contato com a barra, com a palma da pata e os dedos fechados, não ocorre queda com a descarga de peso.

Fonte: Adaptado de (METZ; WHISHAW, 2009; TENNANT; JONES, 2009).

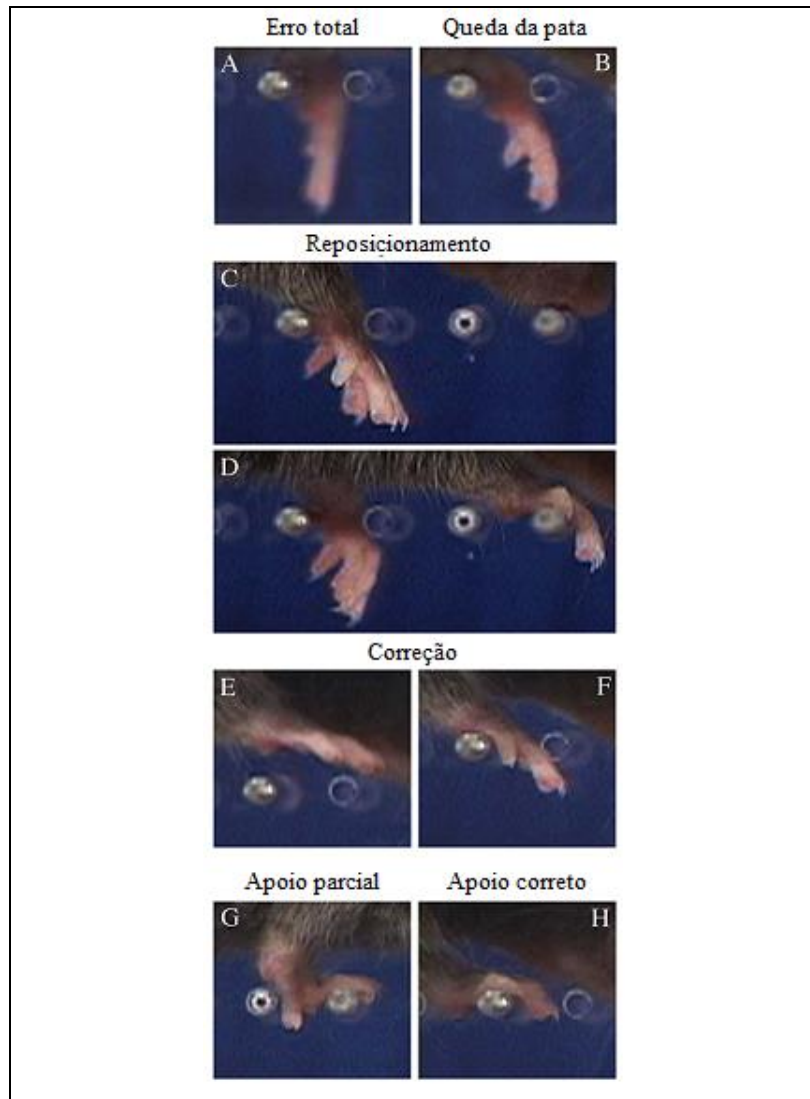


Figura 21 – Fotografias ilustrando as categorias de posicionamento da pata anterior nas barras da escada horizontal.

Fonte: Adaptado de (FARR, *et al.*, 2006)

A análise quantitativa do teste se dá a partir da qualidade do movimento por contagem dos erros (índices 0,1 e 2), compensações (índice 3, 4, 5) e acertos (índice 6). Os dados foram apresentados em porcentagem.

$$\% \text{ erro} = \frac{\text{Número de erros ou compensações ou acertos}}{\text{Número total de passos}} \times 100$$

A análise estatística de ambos os testes comportamentais foram realizadas através de ANOVA, com pós-teste de Tukey. A significância dos dados foi pré-estabelecida em $\alpha < 0,05$.

3.5 PERFUSÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS

Os animais foram perfundidos nos tempos de sobrevivência de 7 e 14 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 crioprotetidos 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 20 e 50 μ m. As lâminas histológicas previamente gelatinizadas foram montadas com 3 secções cada e agrupadas em série de 6, contendo no total 18 secções. Esses cortes foram agrupados sequencialmente, como demonstra a FIGURA 22, e as lâminas conservadas em freezer a -20°C até a realização dos procedimentos histológicos.

Lâmina 1 20 μ m	Lâmina 2 20 μ m	Lâmina 3 20 μ m	Lâmina 4 20 μ m	Lâmina 5 20 μ m	Lâmina 6 50 μ m
1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18

Figura 22- Secções sequencialmente agrupadas em séries de lâminas de 1 a 6.

Fonte: Pesquisa, 2012.

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.6.1 Marcação de corpos celulares e análise de área de lesão

Para observação da área da lesão, foi utilizada técnica de coloração com Violeta de Cresila, que permite a visualização dos corpos celulares de neurônios e células da glia. Foram utilizadas as secções com espessura de 50µm. A região de injeção foi identificada pela presença do corante azul de colanil, usado na diluição da ET-1, ou pelo palor (ausência de corpos neuronais e/ou necrose tecidual) resultante do processo isquêmico.

A partir de imagens capturadas digitalmente (Moticam[®] – 5500 – 5MPixels) em um microscópio óptico (Nikon[®] – ECLIPSE 50i), foi realizada análise quantitativa da área de lesão, com o auxílio do programa de computação *ImageJ*.

3.7.2 Degradação da MEC

Para verificar a remoção da MEC por ChABC, foram marcadas moléculas de PGSC degradados por meio de técnica imunohistoquímica para o anticorpo anti-C4S. O processo de imunohistoquímica consistiu, primeiramente, de lavagem em solução PBS sob agitação constante por 5 minutos. Após isso, as secções foram imersas em tampão borato em temperatura de 65°C (0,2M; pH 9,0; ácido bórico; Nuclear[®]) e resfriadas, na mesma solução, em temperatura ambiente durante 20 minutos. Esse procedimento foi realizado para permeabilização das células, levando a uma melhor qualidade da reação. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em PBS por 5 minutos e imersas em solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (Merck[®]) (1ml de peróxido de hidrogênio/100ml de metanol), inibindo-se, assim, a peroxidase endógena das células do tecido analisado. Na sequência, as lâminas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos cada, sob agitação suave e constante, em solução de PBS-Tween a 0,05% em temperatura ambiente. O bloqueio do tecido foi realizado com solução de caseína por 20 minutos em temperatura ambiente. As secções foram incubadas com anticorpo *anti-chondroitin-4-sulfate* (C4S, Milipore; 1:500 em PBS-T a 0,01%) durante a noite em temperatura ambiente. Após, as secções foram lavadas

sob agitação constante e suave, 3 vezes, com duração de 5 minutos cada em PBS-Tween a 0,05%. Após isso, as secções foram incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário feito em cabra anti-camundongo (goat anti-mouse, Sigma Aldrich[®]; 1:200 em PBS-Tween a 0,01%) em temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram incubadas em ABC (complexo avidina-biotina – Vector[®], kit ABC Vectastain) por 2 horas. Em seguida, segue nova lavagem e revelação. O cromógeno utilizado foi o diaminobenzidina (DAB – Sigma Aldrich[®]). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas.

3.6.3 Astrócitos

Para marcar astrócitos, foi realizada técnica imunohistoquímica para o anticorpo anti-GFAP (*glial fibrillary astrocytes protein* – proteína de astrócitos fibrilares). O processo é semelhante à marcação para anti-C4S. As lâminas montadas foram retiradas do congelamento e secadas em estufa a 37° por 30 minutos. Em seguida, lavadas em solução PBS sob agitação constante por 5 minutos. Após, foram imersas por 20 minutos em tampão borato em temperatura de 65°C (0,2M; pH 9,0; ácido bórico da Nuclear[®]) e resfriadas, na mesma solução, em temperatura ambiente durante 20 minutos. As secções foram lavadas novamente em PBS por 5 minutos e imersas em solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (Merck[®]) (1ml de peróxido de hidrogênio/100ml de metanol). As secções foram, então, lavadas em PBS, dessa vez com Tween[®] por 5 minutos e, em seguida, incubadas em caseína a 10%, durante 1 hora. Após este período, as secções serão incubadas em anticorpo primário (GFAP 1:1000; Sigma Aldrich[®]), durante uma noite, em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as secções foram novamente lavadas com PBS/Tween por 5 minutos e incubadas em anticorpo secundário biotilado feito em cabra anti-coelho (*goat anti-rabbit*; 1:200 – Sigma Aldrich[®]) por 2 horas. Após nova lavagem, foram incubadas em ABC (complexo avidina-biotina–peroxidase; Vector[®], kit ABC Vectastain) por 2 horas. Em seguida, segue nova lavagem e revelação. O cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma Aldrich[®]). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas e montadas.

3.6.4 Método de análise

A análise da imunohistoquímica para anticorpo anti-C4S foi realizada de maneira qualitativa, evidenciando ou não a marcação da estrutura, para RPN e sulfato de condroitin degradado. A análise dos astrócitos marcados com anti-GFAP foi realizada de maneira quantitativa na borda da lesão. A contagem celular foi realizada com um microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse 50i) com objetiva de 40X e gradícula de área 0.0625 mm² acoplada à ocular. Para esta análise, foram utilizadas 3 secções por animal, com 6 campos por secção, e pelo menos 3 animais para cada grupo experimental.

Imagens de secções com campos mais ilustrativos, obtidas de animais isquêmicos e controle foram obtidas com uso de uma câmara digital (Moticam 2500), acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Eclipse 50i).

A análise estatística dos dados quantitativos foi realizada pelo teste de ANOVA, com pós-teste de Tukey. O nível de significância estipulado foi de $\alpha < 0,05$. A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad (Prism 5.0).

4 RESULTADOS

No presente estudo, induzimos AVC isquêmico no M1 do rato, com o peptídeo vasoconstritor ET-1 e implantamos Elvax[®] saturado com BSA (controle) e ChABC (tratado) na superfície cortical. Para verificar a eficácia do tratamento foi realizada análise histológica (área de lesão, expressão de degradado e astrócitos), além de análise comportamental sensório-motora.

4.1 ACIDENTE VASCULAR ISQUÊMICO INDUZIU A MORTE TECIDUAL EM ANIMAIS CONTROLES E TRATADOS.

A área de lesão foi avaliada no programa *ImageJ*, delimitando a área com palor celular ou ainda com azul de colanil (FIGURA 23). Evidencia-se, na avaliação intragrupo, que a área de lesão foi maior 7 dias em relação ao 14 dias após lesão, tendo diferença significativa no grupo tratado ao longo do tempo. Comparando-se os grupos experimentais, utilização da enzima ChABC veiculada por um polímero não interferiu no tamanho da área de lesão (FIGURA 24), já que esta área demonstrou-se sem diferença significativa entre grupo controle e tratado ao longo do tempo observado na pesquisa (7 e 14 dias após lesão).

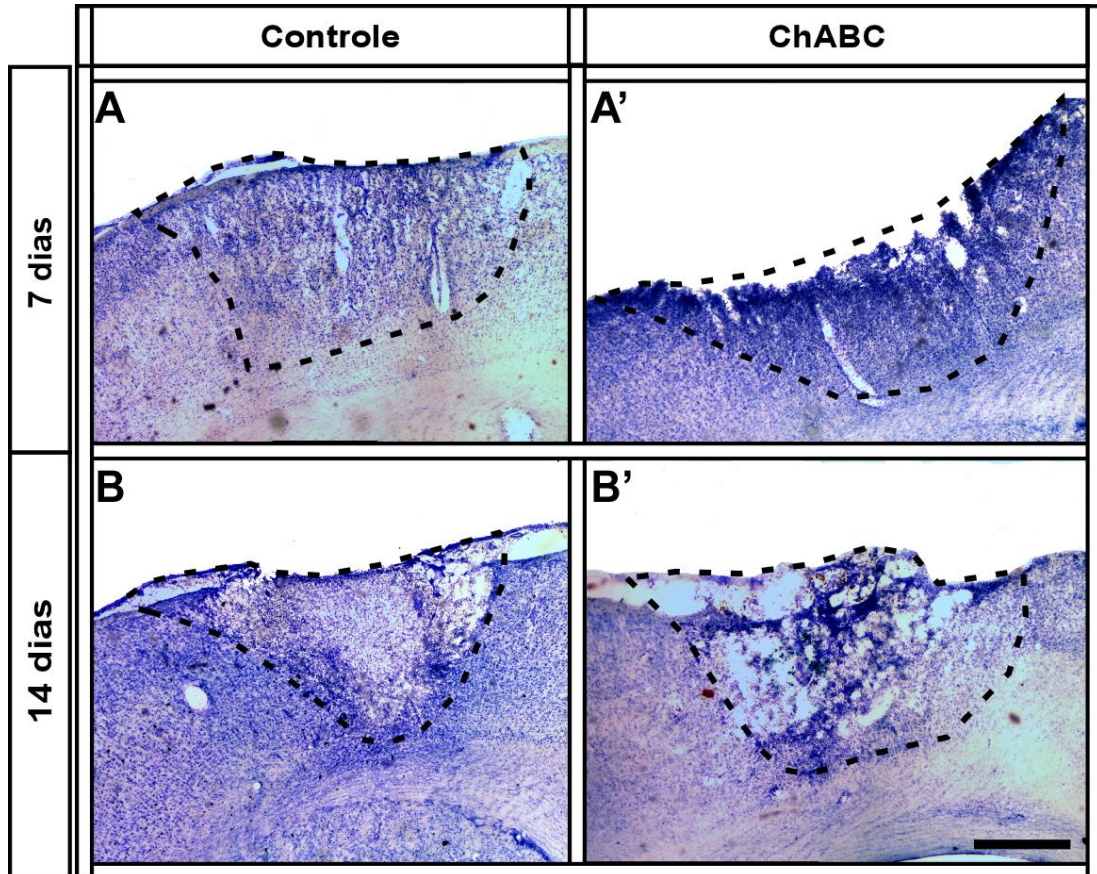


Figura 23 – Coloração de violeta de cresila no córtex cerebral após AVC, no grupo controle e tratado (colunas) ao longo do tempo de sobrevivência (linhas). Em pontilhado, a delimitação da área de lesão. Escala: 200µm.

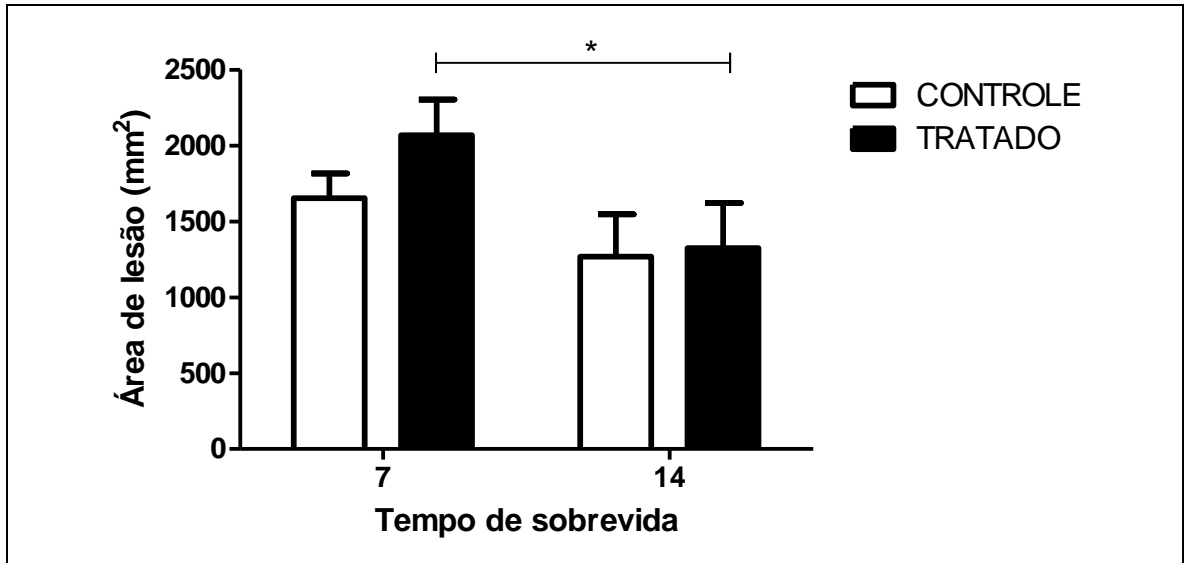


Figura 24 – Análise quantitativa da área de lesão do grupo tratado e controle ao longo do tempo evidenciando, na avaliação intragrupo, maior área de lesão em 7 dias com diferença estatística entre o grupo tratado 7 dias e tratado e controle 14 dias (* $p < 0,05$). Na avaliação intergrupo não houve diferença estatística ao longo do tempo (média e desvio padrão dos grupos experimentais –N=3: controle 7 dias 1653,8±162,576; tratado 7 dias 2067,356±235,423; controle 14 dias 1267,162±280,599; tratado 14 dias 1323,799±297,049). ANOVA, pós-teste de Tukey.

4.2 TRATAMENTO COM CONDRITINASE ABC AUMENTOU A EXPRESSÃO DE CONDRITIN DEGRADADO NA REGIÃO PERI-INFARTO

Somente animais tratados expressaram marcação de sulfato de condroitina degradado nas RPN em 7 e 14 dias na região peri-infarto (FIGURA 25). Este achado demonstra a eficácia da terapêutica com ChABC degradando a MEC e proporcionando um ambiente mais plástico em relação ao controle.

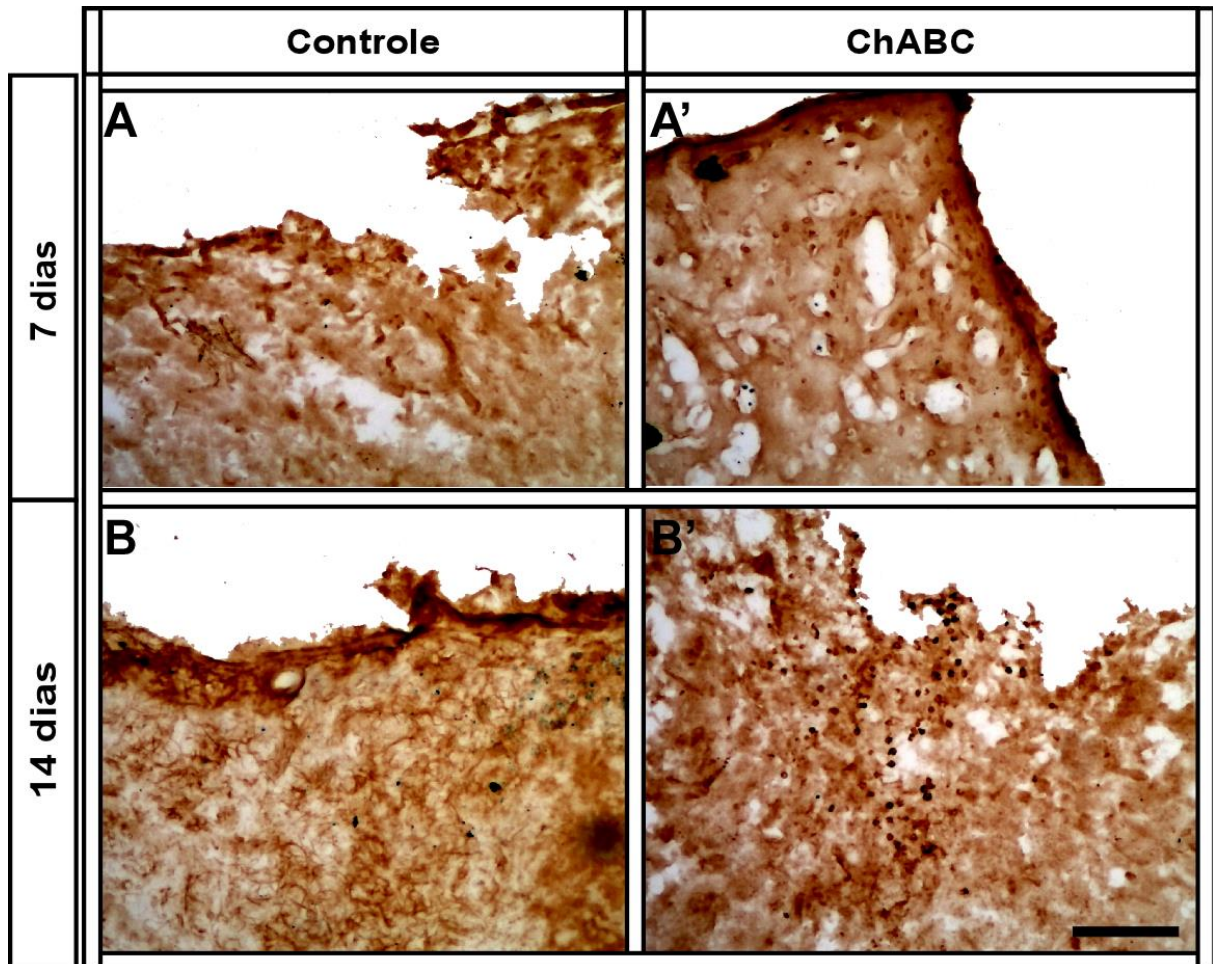


Figura 25 - Imuno-histoquímica para C4S, evidenciando ausência de marcação no grupo controle e presença no grupo tratado ao longo do tempo de sobrevivência. (Escala 10x de 100 μ m).

4.3 TRATAMENTO COM CONDROITINASE ABC NÃO INTERFERIU NA QUANTIDADE DE ASTRÓCITOS NA REGIÃO PERI-INFARTO

O tratamento com ChABC, após lesão isquêmica, não interferiu no número de astrócitos na área de penumbra isquêmica em relação ao controle nos tempos observados na pesquisa (7 e 14 dias após lesão). Dessa forma, o tratamento não interferiu quantitativamente nos astrócitos na área de penumbra (FIGURA 26 e 27).

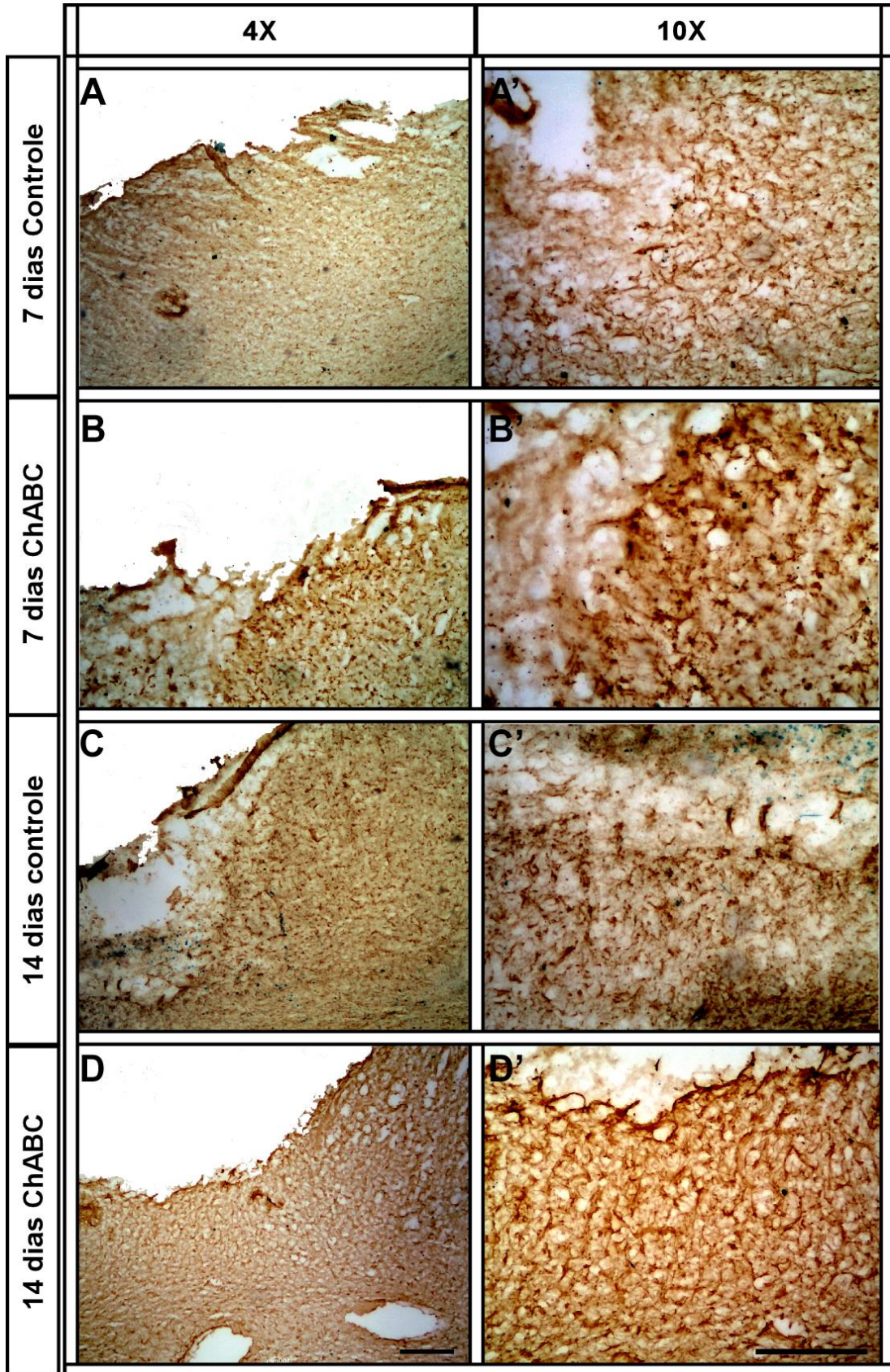


FIGURA 26: Imuno-histoquímica para GFAP, evidenciando marcação de astrócitos no grupo tratado e controle ao longo do tempo de sobrevivência. (Escala 4x de 200 μ m; 10x de 100 μ m).

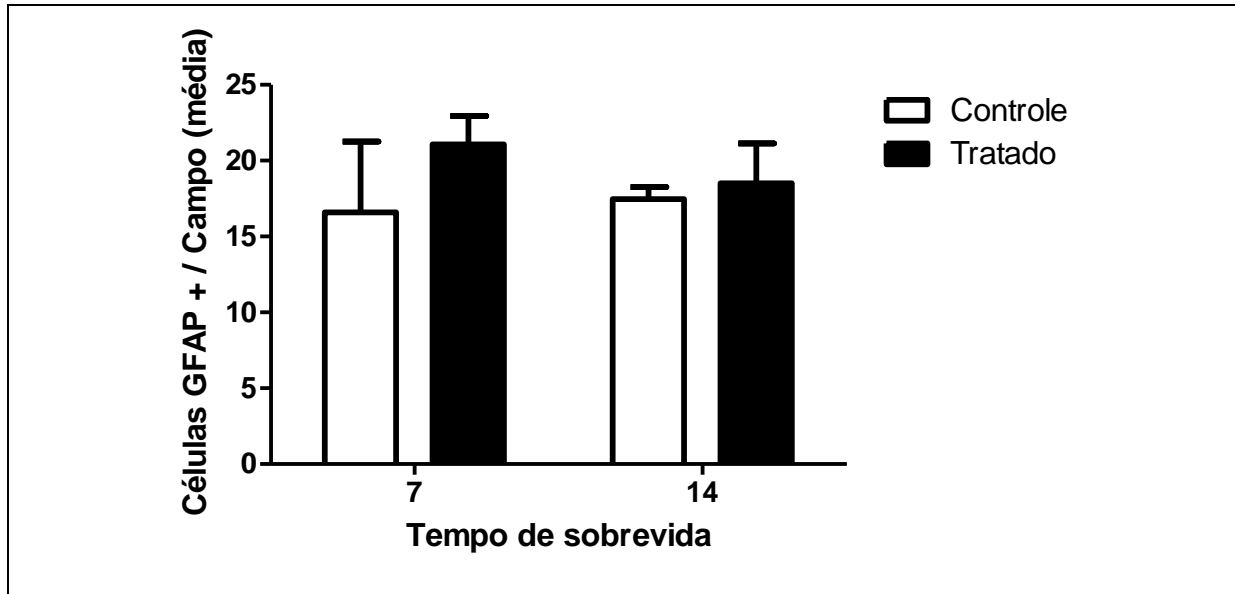


Figura 27 – Média das células GFAP+ na região de penumbra isquêmica por tempo de sobrevivida. Grupos controle e tratado sem diferença significativa em 7 e 14 dias tanto na avaliação intragrupo quanto intergrupo (média e desvio padrão dos grupos experimentais – N=3: controle 7 dias 16.5926±4.6671; tratado 7 dias 21.0663±1.8750; controle 14 dias 17.4630±0.8019; tratado 14 dias 18.5185±2.6066). ANOVA, pós-teste de Tukey.

4.4 TRATAMENTO COM A CONDROITINASE ABC MELHOROU O DESEMPENHO DOS ANIMAIS DE MANEIRA PRECOCE

Para avaliar o efeito da enzima ChABC nos animais ao longo do tempo de sobrevivida, foram realizados dois testes comportamentais: teste do cilindro e teste da escada horizontal.

No teste do cilindro (FIGURA 28), na avaliação intragrupo, evidencia-se ao longo dos tempos de reavaliação um declínio da função em ambos os grupos tratados e controle, já que a utilização da pata afetada foi reduzida neste teste, aumentando assim, o índice de assimetria (mais negativo, justificando pela maior utilização da pata não afetada). Para o grupo controle, o déficit funcional foi mais evidente 7 dias após lesão, tendo diferença altamente significativa ($p < 0,01$) comparando o comportamento pré-lesão e significativa ($p < 0,05$) comparando com 14 dias após lesão. Já para o grupo tratado com ChABC, o índice de assimetria manteve-se semelhante ao comportamental pré-cirúrgico dos animais nos demais tempos avaliados. Na avaliação intergrupo, observamos diferença altamente significativa ($p < 0,01$) entre grupo controle e tratado em 7 dias após lesão, em outras palavras, a remoção da MEC foi eficaz para manter a função normal da pata afetada pelo AVC precocemente a partir de 7 dias após lesão.

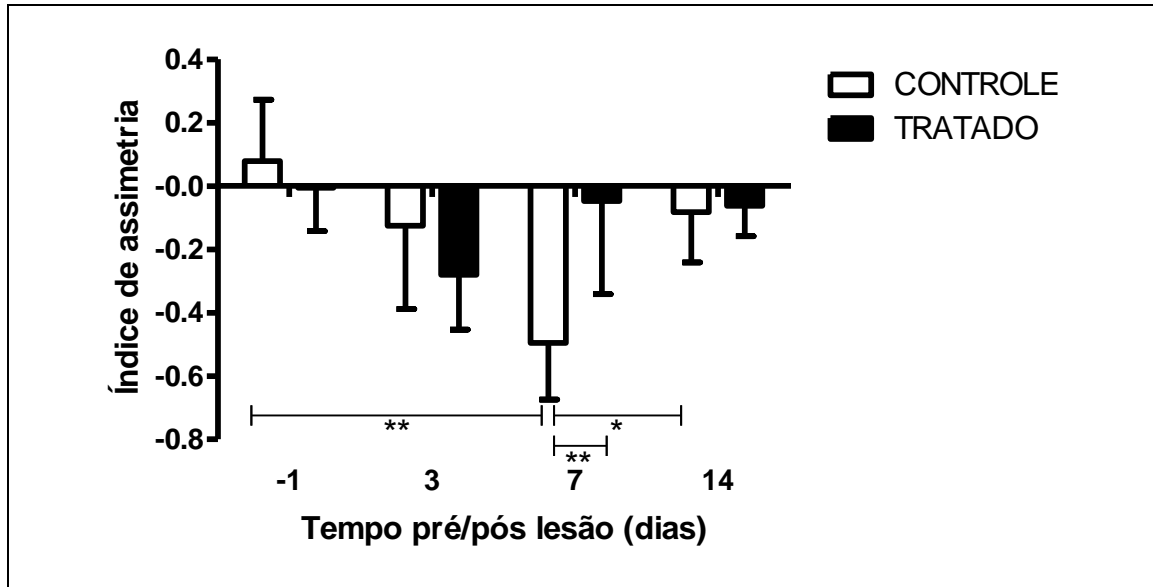


Figura 28– Índice de assimetria no teste do cilindro para grupo controle e tratado com ChABC (Média dos índices e desvio padrão dos grupos experimentais – N=5, ANOVA, pós-teste de Tukey, **p<0,01).

No teste da escada horizontal (FIGURA 29), é possível estabelecer a análise por três parâmetros:

- Acerto (%): Na avaliação intragrupo ao longo do tempo é possível afirmar que houve declínio da função sensório-motora após a lesão para todos os grupos experimentais. Porém, a diminuição na porcentagem de acerto demonstrou-se significativa ($p<0,05$) apenas no 7 dia após lesão isquêmica do animal controle em relação ao seu pré-cirúrgico. Não há diferença na porcentagem de acertos na análise intergrupo (grupo controle e tratado).

- Compensação (%): Na avaliação intragrupo ao longo do tempo é possível afirmar que houve declínio da função sensório-motora após a lesão para todos os grupos experimentais, já que estes aumentaram as compensações ao realizar a tarefa de caminhar sobre a escada horizontal, porém, tanto para a análise intragrupo quanto intergrupo essa diferença não foi significativa.

- Erro (%): Na avaliação intragrupo ao longo do tempo é possível afirmar que houve declínio da função sensório-motora após a lesão para todos os grupos experimentais, já que aumentaram os erros ao realizar a tarefa de caminhar sobre a escada horizontal. Aumentaram significativamente ($p<0,01$) para o grupo controle 3 e 7 dias e tratado 3 dias pós-lesão todos em relação ao seu pré-cirúrgico. Não há diferença na porcentagem de acertos na análise intergrupo (grupo controle e tratado).

A avaliação da qualidade do movimento no teste da escada horizontal demonstra que embora não haja diferença entre os grupos experimentais, há uma melhora do déficit sensório-motor (% erro) da pata afetada precocemente (7 dias após lesão) no grupo tratado, enquanto o grupo controle continua com um déficit acentuado (3 e 7 dias após lesão) quando comparado ao seu pré-cirúrgico, sendo que este déficit é acompanhado de diminuição significativa da porcentagem de acerto em 7 dias após lesão em relação ao seu controle. Dessa forma, a ChABC foi capaz de melhorar precocemente o déficit quando comparado ao controle, porém ao final da sobrevida avaliada (14 dias após lesão), tanto grupo controle e tratado tiveram melhora do déficit sensório-motor.

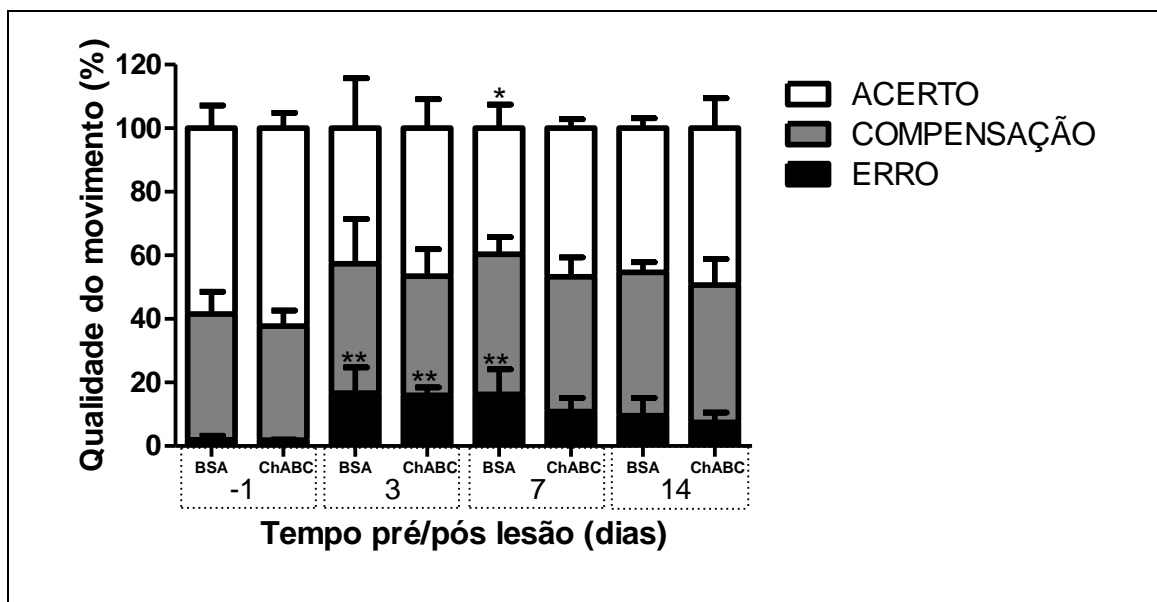


Figura 29 – Porcentagem da qualidade do movimento em grupo controle (BSA) e tratado (ChABC) no teste da escada horizontal ao longo do tempo de sobrevida (ANOVA, pós-teste de Tukey, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente estudo, verificamos a influencia da enzima ChABC em melhorar a recuperação funcional de membros afetados após AVC no M1 de ratos. A indução da isquemia feita pelo peptídeo vasoconstritor ET-1 foi eficaz, pois provocou palor tecidual e, em consequência, déficits funcionais associados à área lesionada como demonstrado anteriormente noutros trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório (CARDOSO, *et al*, 2010; LOPES, *et al* 2010; CORREA, *et al*, 2012). No presente trabalho, a lesão se localizou em M1, com déficits motores na pata anterior contralateral à lesão. Este modelo experimental de lesão, utilizado anteriormente para ratos da linhagem *Lister Hooded* por GILMOUR, *et al.* (2004) e para o presente trabalho, foi adaptado com as coordenadas estereotáxicas de M1 para ratos da linhagem *Wistar* (CASTRO-ALAMANCOS; BORREL, 1995).

Imediatamente após a lesão, implantamos uma fatia do polímero de Elvax[®] saturado com BSA (grupo controle) ou ChABC (grupo tratado) na superfície cortical lesionada. Esta forma de aplicação lenta de drogas, por matrizes do polímero, tem diversas vantagens em relação a outros veículos: os polímeros são biologicamente inertes, não ativando resposta imunológica expressiva; são facilmente saturados com fármacos; são capazes de difundir lentamente a droga no parênquima nervoso, resultando em maior regularidade na entrega e maior tempo de ação e efeito, diferente de técnicas que são limitadas à apenas uma única aplicação; são fáceis de implantar; possuem baixo custo operacional de produção; e evitam o desperdício da droga, quando comparado ao método de gotejamento (RECINOS, *et al.*, 2006; SMITH, *et al.*, 1995, SÁ, *et al.*, 2010)

A capacidade da enzima ChABC de degradar a matriz extracelular, e assim favorecer a plasticidade, vem sendo descrita em estudos realizados em diversas regiões do SN, como: córtex visual, córtex somatosensorial, estriado, amígdala, medula espinhal e nervos periféricos de ratos. A degradação da matriz extracelular pode promover a plasticidade neuronal em uma forma semelhante à observada durante os períodos críticos de plasticidade de diversos sistemas cerebrais. Em animais adultos, considera-se que seu efeito é semelhante à “reabertura” dos períodos críticos e uma nova oportunidade terapêutica para o tratamento de lesões no SN, por exemplo, promovendo recuperação de conectividade, e recuperação

funcional da área lesionada (GOGOLLA, *et al.*, 2009; LEE, *et al.*, 2008; PIZZORUSSO, *et al.*, 2002; PIZZORUSSO, *et al.*, 2006).

Diversos estudos avaliam a nível celular, ou mesmo molecular, de que forma a ChABC proporciona um “ambiente mais plástico”, porém, muitos não avaliam se esta permissividade à plasticidade no SNC se traduz em melhora funcional no comportamento do animal (BARTUS, *et al.*, 2012; GALTREY; FAWCETT, 2007). No presente trabalho, induzimos lesão no córtex motor, especificamente na região da representação cortical da pata anterior, e utilizamos testes comportamentais específicos para avaliar se a reabertura do período crítico se reflete na melhora da performance motora após a lesão isquêmica de M1.

Os déficits funcionais foram os esperados após lesão isquêmica em M1. Em geral foram: hemiparesia contralateral, diminuição da utilização do membro afetado (diminuição da simetria) e flexão da pata anterior afetada quando o animal era elevado sutilmente pela cauda (BEDERSON, *et al.*, 1986; CENCI, *et al.*, 2002). No teste do cilindro, o animal espontaneamente utilizou mais a pata não-afetada para suporte postural no comportamento, apoiando o membro sã no cilindro durante a exploração (SCHALLERT, *et al.*, 2000). No teste da escada horizontal, sensível para avaliar a capacidade motora do animal, houve maior quantidade de erros ao realizar a tarefa após a lesão (METZ; WHISHAW, 2009; SOLEMAN, *et al.*, 2012).

5.2 A ChABC NÃO INFLUENCIOU NO TAMANHO DA ÁREA DE LESÃO

O modelo experimental de lesão causou palor ou perda tecidual em todas as camadas corticais, podendo alastra-se até a substância branca como descrito em outros estudos envolvendo lesão no córtex cerebral por ET-1 (ADKINS, *et al.*, 2004; GILMOUR, *et al.*, 2004). Na avaliação intragrupo ao longo do tempo, nota-se que a área de lesão demonstrou-se maior em 7 dias após a lesão quando comparada com 14 dias após lesão (FIGURA 24). Este dado corrobora com os eventos fisiopatológicos pós-isquêmicos que não se encerram na fase aguda (com eventos que dentre outros envolve a excitotoxicidade, desequilíbrio iônico, acidose), mas se continuam por dias após a lesão tendo dentre os últimos eventos a resposta inflamatória que alcança seu pico em até 7 dias após a lesão (BROUGHTON, *et al.*, 2009; DONNELLY; POPOVICH, 2008; GOMES-LEAL, 2012; GOMES-LEAL, *et al.*, 2004), tendenciando após isto à estabilização ou redução da área de lesão.

Quanto ao tamanho da área de lesão entre grupos, o tratamento com ChABC não influenciou no tamanho da área isquêmica. Após lesão em M1, os PGSC passam a ser superexpressados para formar a cicatriz glial. De acordo com a literatura, uma das funções da cicatriz glial é impedir o alastramento da lesão (BARTUS, *et al.*, 2012; CARMICHAEL, *et al.*, 2005). Entretanto, este fato não ocorreu de forma significativa após a degradação da MEC promovida neste trabalho com a ChABC (FIGURA 24). Resultado semelhante foi encontrado em estudos envolvendo modelo de lesão traumática do encéfalo (HARRIS, *et al.*, 2010) e em modelos de contusão da medula espinhal (CAGGIANO, *et al.*, 2005).

5.3 ChABC FOI EFICIENTE EM PROMOVER DEGRADAÇÃO DE PGSC DURANTE 14 DIAS

No presente trabalho, avaliamos o efeito da ChABC usando o anti-corpo anti-C4S (Milipore) que se liga ao núcleo proteico do PGSC degradado. A referida marcação foi observada apenas nos animais tratados com ChABC, em ambos os tempos de sobrevivência avaliados (7 e 14 dias após AVC) (FIGURA 25). Aparentemente, portanto, a administração da ChABC através do Elvax[®] é mais eficiente e mais prolongada que as outras formas de administração, já que em estudo de trauma encefálico que utilizou ChABC na forma líquida, administrada em apenas uma injeção intraparenquimatosa, a degradação do PGSC foi observada até 7 dias após a lesão (HARRIS, *et al.*, 2010). Aos 14 e 21 dias após a lesão, a ação da enzima não foi mais observada. No presente estudo, a degradação da MEC ficou evidente em até 14 dias após lesão.

5.4 A ChABC NÃO INFLUENCIOU NA QUANTIDADE DE ASTRÓCITOS DA REGIÃO PERI-INFARTO

A cicatriz glial formada após lesão isquêmica é basicamente formada por astrócitos e o CSPG por eles secretado. Esta cicatriz limita o alastramento da lesão no centro isquêmico para a área de penumbra. Um efeito colateral desse processo, entretanto, é a formação de uma

barreira física para o crescimento axonal, influenciando negativamente na plasticidade após a lesão do SNC (BARTUS, *et al.*, 2012; CARMICHAEL, *et al.*, 2005).

Após lesão no tecido nervoso, são produzidas e liberadas várias citocinas e fatores de crescimento no local da lesão, contribuindo para a gliose reativa, influenciando na produção de PGSC. Estudos *in vitro* demonstram que a interleucina-1 β e o fator de crescimento epidérmico aumentam em 539% e 836%, respectivamente, a quantidade de PGSC produzida por astrócitos (SMITH; STRUNZ, 2005).

A reação astrocitária na cicatriz glial após lesão cerebral induz a produção de PGSC, especificamente de neurocam e fosfacam (MCKEON, *et al.*, 1999). O aumento destas moléculas inibitórias do crescimento axonal no tecido lesionado também foi descrito por em um modelo de AVC em que neurocam aumentou mais de 8 vezes sua expressão a partir de 3 dias, mantendo-se elevada até 28 dias após lesão e a fosfacam começa a aumentar significativamente e alcança seu pico de expressão (3,58 vezes em relação ao controle) em 28 dias após a lesão. O aumento de neurocam ainda é descrito por outros autores em modelos de lesão no SNC de mamíferos, como a contusão da medula espinhal (ANDREWS, *et al.*, 2012; MASSEY, *et al.*, 2008), cicatriz glial crônica (MCKEON, *et al.*, 1999) e traumatismo crânio-encefálico (HARRIS, *et al.*, 2010).

Em cultura de células, neurocam tem o efeito de repelir o crescimento axonal, o que é anulado com o uso da ChABC (FRIEDLANDER, *et al.*, 1994). A degradação da matriz extracelular poderia resultar, portanto, em um *feedback* negativo, ou seja, a quebra da matriz extracelular poderia resultar em um mecanismo compensatório de aumento da quantidade de astrócitos. Entretanto, os dados do presente trabalho demonstram que o número de astrócitos não aumentou após a lesão do tecido nervoso e o uso de ChABC, mesmo se o componente da matriz extracelular produzido por eles é degradado (FIGURA 27). Novos estudos devem ser realizados para verificar se a reatividade dos astrócitos se altera, se o número de astrócito se altera na fase crônica da lesão, ou se o número de outras células gliais está alterado após tratamento com ChABC.

5.5 A ChABC INFLUENCIOU NA MELHORA FUNCIONAL DA PATA AFETADA APÓS ISQUEMIA NO CÓRTEX MOTOR

Embora a área de lesão isquêmica tenha sido semelhante entre os grupos experimentais, os animais tratados com ChABC tiveram melhora funcional do membro afetado já em 7 dias após a lesão nos testes comportamentais utilizados. Essa melhora foi significativa entre grupos no teste do cilindro, mas não no teste da escada horizontal. Na avaliação intragrupo, os animais tratados tiveram sempre melhor evolução temporal que o grupo controle para ambos os testes (FIGURA 28 e 29).

A melhora funcional precoce demonstrada no presente trabalho pode estar relacionada ao fato da forma de administração utilizada ser contínua. Observa-se isso em estudos com administração intermitente, no local da lesão, de ChABC em modelo de lesão da medula espinhal (BRADBURY, *et al.*, 2002) ou estudos que utilizam apenas uma injeção da enzima (HARRIS, *et al.*, 2010). Neste último estudo, foi encontrado re-crescimento axonal, porém sem melhora funcional significativa (HARRIS, *et al.*, 2010).

Os efeitos terapêuticos da ChABC são mais evidentes quando a mesma é administrada imediatamente após a lesão isquêmica, resultando em melhora funcional significativa. Esta conclusão é reforçada pela evidência que após lesão da medula espinhal os animais tratados imediatamente com ChABC tiveram melhor recuperação funcional que os tratados tardiamente (CAFFERTY, *et al.*, 2008).

Estudos envolvendo lesão parcial da medula espinhal, no segmento cervical 4 de ratos e tratamento concomitante com ChABC, demonstrou que a enzima foi mais eficiente em promover melhora funcional quando associada a um programa de exercícios de reabilitação específicos para o membro afetado. Os resultados destes estudos sugerem que a ChABC pode abrir uma janela de oportunidade que, se associada à exercícios específicos, promove a recuperação funcional mais eficaz e duradoura do membro afetado (GARCIA-ALIAS; FAWCETT, 2012; GARCIA-ALIAS, *et al.*, 2009; GARCIA-ALIAS, *et al.*, 2008). Embora o nosso estudo não tenha utilizado nenhuma terapia associada a remoção dos PGSC, os resultados funcionais foram significativos. Em nosso modelo experimental de lesão, a remoção dos PGSC associada à atividade física específica pode potencializar os resultados funcionais que obtivemos.

Em nosso modelo experimental, a lesão em questão foi menos severa que a por provocada por oclusão da artéria cerebral média. Optou-se neste estudo, em lesionar a representação cortical da pata anterior em M1 e avaliar especificamente o desempenho deste membro em diferentes tempos de sobrevivência. NUDO, *et al.*, 2001 afirmam que pequenos infartos podem causar déficits sensório-motores transitórios com recuperação funcional espontâneo total ou parcial. Em nosso trabalho, observamos recuperação espontânea, na qual

o desempenho dos animais do grupo controle e tratado 14 dias após lesão ficaram igual ao desempenho motor pré-cirúrgico, sendo que para o grupo tratado esta melhora no desempenho se deu precocemente a partir do 7º dia após lesão (FIGURA 28 e 29). Percebe-se que a administração contínua da ChABC, na fase aguda da lesão, foi eficaz para promover a melhor precoce do déficit sensório-motor.

6 CONCLUSÃO

- O elvax saturado com ChABC foi eficiente para degradar PGSC;
- A remoção de PGSC não influencia no tamanho da área de lesão em modelos de AVC isquêmico;
- A remoção de PGSC não alterou o número de astrócitos da região infartada;
- O tratamento com ChABC influenciou na melhora do desempenho funcional de animais submetidos ao modelo de lesão isquêmica de M1.

REFERÊNCIAS

ANDERSON; DAMASIO; TRANEL. Neuropsychological impairments associated with lesions caused by tumor or stroke. *Arch Neurol*, v. 47, n.4, p. 397-405, 1990.

ANDREWS; RICHARDS; YIN; VIAPIANO; JAKEMAN. Alterations in chondroitin sulfate proteoglycan expression occur both at and far from the site of spinal contusion injury. *Exp Neurol*, v. 235, n.1, p. 174-187, 2012.

BACK; HOEHN-BERLAGE; KOHNO; HOSSMANN. Diffusion nuclear magnetic resonance imaging in experimental stroke. Correlation with cerebral metabolites. *Stroke*, v. 25, n.2, p. 494-500, 1994.

BAHIA; HOUZEL; PICANCO-DINIZ; PEREIRA. Spatiotemporal distribution of proteoglycans in the developing rat's barrel field and the effects of early deafferentation. *J Comp Neurol*, v. 510, n.2, p. 145-157, 2008.

BANDTLOW; ZIMMERMANN. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev*, v. 80, n.4, p. 1267-1290, 2000.

BARTUS; JAMES; BOSCH; BRADBURY. Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Exp Neurol*, v. 235, n.1, p. 5-17, 2012.

BEDERSON; PITTS; TSUJI; NISHIMURA; DAVIS; BARTKOWSKI. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, v. 17, n.3, p. 472-476, 1986.

BENOWITZ; CARMICHAEL. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiol Dis*, v. 37, n.2, p. 259-266, 2010.

BONNEH-BARKAY; WILEY. Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol*, v. 19, n.4, p. 573-585, 2009.

BOVOLENTA; FERNAUD-ESPINOSA. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol*, v. 61, n.2, p. 113-132, 2000.

BRADBURY; MOON; POPAT; KING; BENNETT; PATEL; FAWCETT; MCMAHON. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, v. 416, n.6881, p. 636-640, 2002.

BROUGHTON; REUTENS; SOBEY. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, v. 40, n.5, p. e331-339, 2009.

BROUNS; DE DEYN. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*, v. 111, n.6, p. 483-495, 2009.

BROWN; WONG; MURPHY. Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. *Stroke*, v. 39, n.4, p. 1286-1291, 2008.

BUSCH; SILVER. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, v. 17, n.1, p. 120-127, 2007.

BUXHOEVEDEN; CASANOVA. The minicolumn hypothesis in neuroscience. *Brain*, v. 125, n.Pt 5, p. 935-951, 2002.

CAFFERTY; BRADBURY; LIDIERTH; JONES; DUFFY; PEZET; MCMAHON. Chondroitinase ABC-mediated plasticity of spinal sensory function. *J Neurosci*, v. 28, n.46, p. 11998-12009, 2008.

CAGGIANO; ZIMBER; GANGULY; BLIGHT; GRUSKIN. Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurotrauma*, v. 22, n.2, p. 226-239, 2005.

CARMICHAEL; ARCHIBEQUE; LUKE; NOLAN; MOMIY; LI. 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.

CARULLI; LAABS; GELLER; FAWCETT. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, v. 15, n.1, p. 116-120, 2005.

CARDOSO, MM. 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/UFGA. 85 f. Fev. 2010.

CASTRO-ALAMANCOS; BORREL. 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.

CAUDA; GIULIANO; FEDERICO; SERGIO; KATIUSCIA. Discovering the somatotopic organization of the motor areas of the medial wall using low-frequency BOLD fluctuations. *Hum Brain Mapp*, v. 32, n.10, p. 1566-1579, 2011.

CENCI; WHISHAW; SCHALLERT. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*, v. 3, n.7, p. 574-579, 2002.

CORREA, VC. Perda tecidual, ativação glial, neurogênese e alterações sensório-motoras após isquemia focal no córtex somestésico de ratos adultos. Tese (Doutorado em neurociências). Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/UFPA. 120 f. Out. 2012.

CRAMER. A window into the molecular basis of human brain plasticity. *J Physiol*, v. 586, n.Pt 23, p. 5601, 2008.

CRAMER; CRAFTON. Somatotopy and movement representation sites following cortical stroke. *Exp Brain Res*, v. 168, n.1-2, p. 25-32, 2006.

CRAMER; SHAH; JURANEK; CRAFTON; LE. Activity in the peri-infarct rim in relation to recovery from stroke. *Stroke*, v. 37, n.1, p. 111-115, 2006.

CRESPO; ASHER; LIN; RHODES; FAWCETT. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol*, v. 206, n.2, p. 159-171, 2007.

DIJKHUIZEN; REN; MANDEVILLE; WU; OZDAG; MOSKOWITZ; ROSEN; FINKLESTEIN. Functional magnetic resonance imaging of reorganization in rat brain after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n.22, p. 12766-12771, 2001.

DIJKHUIZEN; SINGHAL; MANDEVILLE; WU; HALPERN; FINKLESTEIN; ROSEN; LO. Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci*, v. 23, n.2, p. 510-517, 2003.

DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, v. 22, n.9, p. 391-397, 1999.

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

DITYATEV; BRUCKNER; DITYATEVA; GROSCHE; KLEENE; SCHACHNER. Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol*, v. 67, n.5, p. 570-588, 2007.

DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, v. 55, n.3, p. 310-318, 2008.

FARR; LIU; COLWELL; WHISHAW; METZ. 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 Neurosci Methods*, v. 153, n.1, p. 104-113, 2006.

FITCH; SILVER. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*, v. 209, n.2, p. 294-301, 2008.

FRIEDLANDER; MILEV; KARTHIKEYAN; MARGOLIS; MARGOLIS; GRUMET. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol*, v. 125, n.3, p. 669-680, 1994.

GALTREY; FAWCETT. 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.

GARCIA-ALIAS; FAWCETT. Training and anti-CSPG combination therapy for spinal cord injury. *Exp Neurol*, v. 235, n.1, p. 26-32, 2012.

GARCIA-ALIAS; BARKHUYSEN; BUCKLE; FAWCETT. Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci*, v. 12, n.9, p. 1145-1151, 2009.

GARCIA-ALIAS; LIN; AKRIMI; STORY; BRADBURY; FAWCETT. Therapeutic time window for the application of chondroitinase ABC after spinal cord injury. *Exp Neurol*, v. 210, n.2, p. 331-338, 2008.

GARRITANO; LUZ; PIRES; BARBOSA; BATISTA. Analysis of the mortality trend due to cerebrovascular accident in Brazil in the XXI century. *Arq Bras Cardiol*, v. n., p. 2012.

GARWOOD; HECK; REICHARDT; FAISSNER. Phosphacan short isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/receptor protein tyrosine phosphatase-beta, interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem*, v. 278, n.26, p. 24164-24173, 2003.

GEYER; MATELLI; LUPPINO; ZILLES. Functional neuroanatomy of the primate isocortical motor system. *Anat Embryol (Berl)*, v. 202, n.6, p. 443-474, 2000.

GIOANNI; LAMARCHE. A reappraisal of rat motor cortex organization by intracortical microstimulation. *Brain Res*, v. 344, n.1, p. 49-61, 1985.

GOGOLLA; CARONI; LUTHI; HERRY. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, v. 325, n.5945, p. 1258-1261, 2009.

GOMES-LEAL. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav*, v. 2, n.3, p. 345-356, 2012.

HARRIS; MIRONOVA; HOVDA; SUTTON. Chondroitinase ABC enhances pericontusion axonal sprouting but does not confer robust improvements in behavioral recovery. *J Neurotrauma*, v. 27, n.11, p. 1971-1982, 2010.

HEBB, DO, 1947. The effects of early experience on problem solving at maturity. *American Psychologist* 2, 737-745 APUD WARD; FRACKOWIAK. The functional anatomy of cerebral reorganisation after focal brain injury. *J Physiol Paris*, v. 99, n.4-6, p. 425-436, 2006.

HERMANN; CHOPP. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. *Lancet Neurol*, v. 11, n.4, p. 369-380, 2012.

HOBOHM; GUNTHER; GROSCHE; ROSSNER; SCHNEIDER; BRUCKNER. Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res*, v. 80, n.4, p. 539-548, 2005.

HOCKING; SHINOMURA; MCQUILLAN. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*, v. 17, n.1, p. 1-19, 1998.

HOKE. Proteoglycans in axonal regeneration. *Exp Neurol*, v. 195, n.2, p. 273-277, 2005.

HOSP; LUFT. Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke. *Neural Plast*, v. 2011, n., p. 871296, 2011.

HOSSMANN. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, v. 8, n.3, p. 195-208, 1996.

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

KAAS. Neurobiology. How cortex reorganizes. *Nature*, v. 375, n.6534, p. 735-736, 1995.

KAWANO; KIMURA-KURODA; KOMUTA; YOSHIOKA; LI; KAWAMURA; LI; RAISMAN. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, v. 349, n.1, p. 169-180, 2012.

KELLER. Intrinsic synaptic organization of the motor cortex. *Cereb Cortex*, v. 3, n.5, p. 430-441, 1993.

KOLB; WHISHAW. Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol*, v. 49, n., p. 43-64, 1998.

KOLB; GIBB; GORNY. Experience-dependent changes in dendritic arbor and spine density in neocortex vary qualitatively with age and sex. *Neurobiol Learn Mem*, v. 79, n.1, p. 1-10, 2003.

KREKOSKI; NEUBAUER; ZUO; MUIR. Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*, v. 21, n.16, p. 6206-6213, 2001.

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

LAKHAN; KIRCHGESSNER; HOFER. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*, v. 7, n., p. 97, 2009.

LEE; LEAMEY; SAWATARI. Rapid reversal of chondroitin sulfate proteoglycan associated staining in subcompartments of mouse neostriatum during the emergence of behaviour. *PLoS One*, v. 3, n.8, p. e3020, 2008.

LI; CARMICHAEL. Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke. *Neurobiol Dis*, v. 23, n.2, p. 362-373, 2006.

LIN; KWOK; CRESPO; FAWCETT. Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. *J Neurochem*, v. 104, n.2, p. 400-408, 2008.

LIU; LEVINE; WINN. Targeting ischemic penumbra: part I - from pathophysiology to therapeutic strategy. *J Exp Stroke Transl Med*, v. 3, n.1, p. 47-55, 2010.

LO; DALKARA; MOSKOWITZ. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n.5, p. 399-415, 2003.

LOPES, RTS. Neurogênese endógena induzida por acidente vascular encefálico experimental após inibição da ativação microglial/macrofágica com o anti-inflamatório indometacina. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 76 f. Fev. 2011.

LOTUFO. Stroke in Brazil: a neglected disease. *Sao Paulo Med J*, v. 123, n.1, p. 3-4, 2005.

MASSEY; AMPS; VIAPIANO; MATTHEWS; WAGONER; WHITAKER; ALILAIN; YONKOF; KHALYFA; COOPER; SILVER; ONIFER. Increased chondroitin sulfate proteoglycan expression in denervated brainstem targets following spinal cord injury creates a barrier to axonal regeneration overcome by chondroitinase ABC and neurotrophin-3. *Exp Neurol*, v. 209, n.2, p. 426-445, 2008.

MCKEON; HOKE; SILVER. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol*, v. 136, n.1, p. 32-43, 1995.

MCKEON; JURYNEC; BUCK. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci*, v. 19, n.24, p. 10778-10788, 1999.

MCNEAL; DARLING; GE; STILWELL-MORECRAFT; SOLON; HYNES; PIZZIMENTI; ROTELLA; VANADURONGVAN; MORECRAFT. Selective long-term reorganization of the corticospinal projection from the supplementary motor cortex following recovery from lateral motor cortex injury. *J Comp Neurol*, v. 518, n.5, p. 586-621, 2010.

MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*, v. 19, n.3-4, p. 151-167, 2004.

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

MEYER-PUTTLITZ; JUNKER; MARGOLIS; MARGOLIS. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol*, v. 366, n.1, p. 44-54, 1996.

MIYATA; NISHIMURA; HAYASHI; OOHIRA. Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. *Neuroscience*, v. 136, n.1, p. 95-104, 2005.

MORITA-FUJIMURA; FUJIMURA; YOSHIMOTO; CHAN. Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke. *Stroke*, v. 32, n.10, p. 2356-2361, 2001.

MOUNTCASTLE. The columnar organization of the neocortex. *Brain*, v. 120 (Pt 4), n., p. 701-722, 1997.

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

NUDO. Neural bases of recovery after brain injury. *J Commun Disord*, v. 44, n.5, p. 515-520, 2011.

NUDO; PLAUTZ; FROST. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve*, v. 24, n.8, p. 1000-1019, 2001.

NUDO; MILLIKEN; JENKINS; MERZENICH. Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci*, v. 16, n.2, p. 785-807, 1996.

OLESEN; GUSTAVSSON; SVENSSON; WITTCHEN; JONSSON. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol*, v. 19, n.1, p. 155-162, 2012.

OOHIRA; SHUO; TOKITA; NAKANISHI; AONO. Neuroglycan C, a brain-specific part-time proteoglycan, with a particular multidomain structure. *Glycoconj J*, v. 21, n.1-2, p. 53-57, 2004.

PALMER; ASHBY. The transcortical nature of the late reflex responses in human small hand muscle to digital nerve stimulation. *Exp Brain Res*, v. 91, n.2, p. 320-326, 1992.

PENFIELD. Some observations on the cerebral cortex of man. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, v. 134, n.876, p. 329-347, 1947.

PIZZORUSSO; MEDINI; BERARDI; CHIERZI; FAWCETT; MAFFEI. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, v. 298, n.5596, p. 1248-1251, 2002.

PIZZORUSSO; MEDINI; LANDI; BALDINI; BERARDI; MAFFEI. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n.22, p. 8517-8522, 2006.

PROPERZI; ASHER; FAWCETT. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans*, v. 31, n.2, p. 335-336, 2003.

RASMUSSEN; PENFIELD. The human sensorimotor cortex as studied by electrical stimulation. *Fed Proc*, v. 6, n.1 Pt 2, p. 184, 1947.

RECINOS; PRADILLA; THAI; PEREZ; HDEIB; TAMARGO. Controlled release of lipopolysaccharide in the subarachnoid space of rabbits induces chronic vasospasm in the absence of blood. *Surg Neurol*, v. 66, n.5, p. 463-469; discussion 469, 2006.

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

ROGER; GO; LLOYD-JONES; BENJAMIN; BERRY; BORDEN; BRAVATA; DAI; FORD; FOX; FULLERTON; GILLESPIE; HAILPERN; HEIT; HOWARD; KISSELA; KITTNER; LACKLAND; LICHTMAN; LISABETH; MAKUC; MARCUS; MARELLI; MATCHAR; MOY; MOZAFFARIAN; MUSSOLINO; NICHOL; PAYNTER; SOLIMAN; SORLIE; SOTOODEHNIA; TURAN; VIRANI; WONG; WOO; TURNER. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, v. 125, n.1, p. e2-e220, 2012.

ROSSINI; TECCHIO; PIZZELLA; LUPOI; CASSETTA; PASQUALETTI. Interhemispheric differences of sensory hand areas after monohemispheric stroke: MEG/MRI integrative study. *Neuroimage*, v. 14, n.2, p. 474-485, 2001.

SÁ, 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; FRIEDEN; BLAKEMAN; JAUCH; MOHL. What the million hearts initiative means for stroke: a presidential advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, v. 43, n.3, p. 924-928, 2012.

SCHALLERT; FLEMING; LEASURE; TILLERSON; BLAND. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, v. 39, n.5, p. 777-787, 2000.

SCHIEBER. Constraints on somatotopic organization in the primary motor cortex. *J Neurophysiol*, v. 86, n.5, p. 2125-2143, 2001.

SHARMA; SELZER; LI. Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS. *Exp Neurol*, v. n., p. 2012.

SIMS; MUYDERMAN. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta*, v. 1802, n.1, p. 80-91, 2010.

SMITH; STRUNZ. Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes. *Glia*, v. 52, n.3, p. 209-218, 2005.

SMITH; CORDERY; THOMPSON. Manufacture and release characteristics of Elvax polymers containing glutamate receptor antagonists. *J Neurosci Methods*, v. 60, n.1-2, p. 211-217, 1995.

SOHN; JUNG; KAELIN-LANG; HALLETT. Excitability of the ipsilateral motor cortex during phasic voluntary hand movement. *Exp Brain Res*, v. 148, n.2, p. 176-185, 2003.

SOLEMAN; YIP; DURICKI; MOON. Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats. *Brain*, v. 135, n.Pt 4, p. 1210-1223, 2012.

STALLCUP. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol*, v. 31, n.6-7, p. 423-435, 2002.

SUZUKI; SAITO; YAMAGATA; ANNO; SENO; KAWAI; FURUHASHI. Formation of three types of disulfated disaccharides from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion. *J Biol Chem*, v. 243, n.7, p. 1543-1550, 1968.

SZETO. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal*, v. 10, n.3, p. 601-619, 2008.

TANG; DAVIES; DAVIES. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res*, v. 71, n.3, p. 427-444, 2003.

TENNANT; JONES. Sensorimotor behavioral effects of endothelin-1 induced small cortical infarcts in C57BL/6 mice. *J Neurosci Methods*, v. 181, n.1, p. 18-26, 2009.

UENO; CHOPP; ZHANG; BULLER; LIU; LEHMAN; LIU; ZHANG; ROBERTS; ZHANG. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke*, v. 43, n.8, p. 2221-2228, 2012.

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

WARD; FRACKOWIAK. The functional anatomy of cerebral reorganisation after focal brain injury. *J Physiol Paris*, v. 99, n.4-6, p. 425-436, 2006.

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

WIELOCH; NIKOLICH. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol*, v. 16, n.3, p. 258-264, 2006.

WOODRUFF; THUNDYIL; TANG; SOBEY; TAYLOR; ARUMUGAM. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener*, v. 6, n.1, p. 11, 2011.

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

YANEZ; MUNOZ; CONTRERAS; GONZALEZ; RODRIGUEZ-VEIGA; DEFELIPE. Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals. *J Comp Neurol*, v. 486, n.4, p. 344-360, 2005.

ZUO; NEUBAUER; GRAHAM; KREKOSKI; FERGUSON; MUIR. Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp Neurol*, v. 176, n.1, p. 221-228, 2002.

ANEXO: Parecer do CEPAE



PARECER BIO066-12

Projeto: INDUÇÃO DE PLASTICIDADE CEREBRAL POR REMOÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR APÓS LESÃO ISQUÊMICA NO CORTEX SENSORIOMOTOR PRIMÁRIO

Coordenador(a): Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

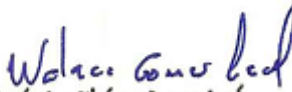
Área Temática: Biologia

Vigência: 03/03/2011 a 12/12/2012

Nº na CEPAE-UFPA: BIO066-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 de fevereiro de 2012


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA