



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA**

**Modificações astrogliais induzidas pela tarefa de habilidade do alcance e preensão
contribuem para a recuperação sensório-motora após a hemorragia intracerebral
experimental**

RÉGIS GEMERASCA MESTRINER

PORTO ALEGRE

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**Modificações astrogliais induzidas pela tarefa de habilidade do alcance e preensão
contribuem para a recuperação sensório-motora após a hemorragia intracerebral
experimental**

RÉGIS GEMERASCA MESTRINER

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em fisiologia

PORTO ALEGRE

2010

“A biologia é, verdadeiramente, uma terra de possibilidades ilimitadas. Podemos esperar que ela nos forneça as informações mais surpreendentes e não podemos imaginar que respostas nos dará dentro de poucas dezenas de anos. [...] Poderão ser de um tipo que ponha por terra toda a nossa estrutura artificial de hipóteses”.

Sigmund Freud

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos derramadas diariamente e pela graça de fazer-me enxergar, através da ciência, as maiores evidências da sua existência.

Aos meus pais, Paulo Roberto Mestriner e Maria Lúcia Gemerasca Mestriner, por serem os melhores pais do mundo, por tudo o que representam para mim e por nunca terem poupado esforços para que, incondicionalmente, eu pudesse me dedicar aos estudos e à realização de todos os meus sonhos. Vocês estão guardados eternamente em meu coração!

Ao magnífico mestre Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação, pelos sólidos ensinamentos e pela admirável capacidade que possui de conciliar todas as suas inúmeras atividades da reitoria com uma orientação extremamente sábia e objetiva.

À Prof^a Dr^a Aline de Souza Pagnussat por ter colaborado intensamente com o trabalho em todas as suas etapas, pelos valiosos e extensivos ensinamentos que me fizeram não somente “deslanchar” em frente à bancada, mas também crescer muito como pesquisador. Obrigado pela amizade, paciência e pelos ótimos momentos de convivência no laboratório.

À Prof^a Dr^a Matilde Achaval, pelos preciosos ensinamentos “morfológicos” e pela oportunidade concedida de realizar minha iniciação científica em seu laboratório.

Aos meus colegas do programa de pós-graduação, pela amizade, alegria e companheirismo característicos da nossa turma. Um brinde aos mais novos “mestres”!

Aos professores integrantes da Comissão de Pós-Graduação do PPG Fisiologia, não somente pelos ensinamentos, mas pelos esforços que fazem diariamente para tornar esse curso de pós-graduação cada vez melhor.

Aos queridos colegas do laboratório 35, pelos ótimos momentos de partilha, convívio, aprendizado e crescimento. Em especial à Lígia Simões Braga Boisserand, Marilucia Santos e Janine Anastácio pela ajuda com as avaliações e à Lauren Valentim por todos os ensinamentos e disponibilidade.

Ao Alexis Boisserand por ter desenvolvido uma das “ferramentas” que possibilitaram a avaliação morfológica dos astrócitos, um especial obrigado.

À equipe do CME-UFRGS, em especial ao Henrique Biehl pelo auxílio no manejo do microscópio confocal e à Prof^a Dr^a Letícia Pettenuzzo pela paciência e ensinamentos.

À minha família por todo o amor, carinho e doação, de um modo particular aos meus avós Sérgio Mestriner e Maria Faccin; Natal Gemerasca (*In memorian*) e Anna Tedesco Gemerasca, além dos meus padrinhos Renato Sperling e Tereza Gemerasca Sperling, demais tios e primos. Todos vocês fazem parte da minha trajetória e cada conquista se deve também a vocês!

À minha noiva Raquel Jeanty de Seixas por alimentar comigo um amor que cresce mais a cada dia, pela cumplicidade, carinho, atenção, paciência, respeito, compreensão e incentivo incondicional em todos os momentos.

A todos os demais integrantes da família Seixas, Paulo Henrique Gomes de Seixas, Louise Marguerite Jeanty de Seixas e Ana Luisa Jeanty de Seixas pelo carinho, amizade e incentivo. E um obrigado especial à Ana pela modelagem das “caixinhas dos ratos”.

Aos professores do curso de fisioterapia da PUCRS, de modo especial ao Prof. Dr. Léder Leal Xavier, Prof. Dr. Denizar da Silva Melo, Prof. Dr. Márcio Vinícius Donadio e Prof. Dr. Fabrício Macagnan, por terem despertado, de modo particular, minha paixão pela fisiologia durante o período da graduação.

A todos que de forma direta ou indireta incentivam e apóiam a pesquisa e o desenvolvimento do nosso país.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e ao CNPq pela oportunidade e pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMO	IX
1.1 Hemorragia Intracerebral: aspectos fisiopatológicos	2
1.2 Aspectos sobre o controle e o aprendizado motor	4
1.2.1 Tarefas de habilidade e de não-habilidade do membro anterior	5
1.3 Recuperação funcional: aspectos pós-AVC	12
1.4 Astrócitos e neuroplasticidade: aspectos morfofisiológicos	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Desenho experimental	20
3.2 Modelo de hemorragia cerebral induzida por colagenase	21
3.3 Tarefas motoras	23
3.3.1 Tarefa de habilidade do alcance e preensão	23
3.3.2 Tarefa de não-habilidade	24
3.4 Avaliação comportamental	25
3.4.1 Teste do “Staircase”	25
3.4.2 Teste da escada horizontal	26
3.4.3 Teste do cilindro	28
3.5 Análise morfológica	29
3.5.1 Perfusão	29
3.5.2 Volume da lesão	29
3.5.3 Imunofluorescência	30
3.5.4 Densidade numérica dos astrócitos GFAP+	31
3.5.5 Análise morfológica dos astrócitos	31
3.6 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Volume da lesão	34
4.2 Teste do Staircase	35
4.3 Teste do Cilindro	36
4.4 Teste da escada horizontal	37

4.5 Morfologia dos astrócitos GFAP+	37
4.5.1 Densidade de astrócitos GFAP+	40
4.5.2 Número de processos primários	41
4.5.3 Comprimento médio dos processos primários GFAP+	42
4.5.3.1 Córtex sensório-motor	42
4.5.3.2 Estriado dorsolateral	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	55
7 PERSPECTIVAS	56
8 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascata de danos neurais iniciada pela HIC _____	04
Figura 2. Cortes encefálicos demonstrando o córtex motor (M1 e M2), área cortical de representação sensorial primária do membro anterior (S1FL) e o estriado (CPu) _____	07
Figura 3. Curso da plasticidade do córtex motor de roedores durante o aprendizado de tarefa motora de habilidade _____	08
Figura 4. Reorganização do mapa cortical motor após 10 dias de treinamento de uma tarefa de habilidade (alcance e preensão) e de não habilidade (repetição de um movimento de baixa complexidade) _____	09
Figura 5. Representação simplificada das principais conexões dos núcleos da base _____	11
Figura 6. Desenho experimental _____	21
Figura 7. Aparato empregado para a realização da tarefa de habilidade do alcance e preensão _	24
Figura 8. Esteira motorizada empregada para a realização da tarefa de não-habilidade _____	25
Figura 9. Teste do <i>Staircase</i> _____	25
Figura 10. Teste da escada horizontal _____	27
Figura 11. Teste do cilindro _____	28
Figura 12. Imagem ilustrativa de um astrócito GFAP+ antes e após a colocação dos círculos concêntricos de Sholl _____	32
Figura 13. Volume da lesão 4 semanas após a cirurgia _____	34
Figura 14. Sucesso (%) do alcance e preensão no teste do <i>staircase</i> _____	35
Figura 15. Uso assimétrico dos membros anteriores no teste do cilindro _____	36
Figura 16. Erros de colocação dos membros anteriores no teste da escada horizontal _____	37
Figura 17. Representação das diferentes regiões encefálicas de interesse _____	38
Figura 18. Representação de astrócitos GFAP+ isolados a partir das regiões de interesse nos diferentes grupos experimentais. _____	39
Figura 19. Densidade de astrócitos GFAP+ / mm ³ _____	40
Figura 20. Número de processos primários por astrócito GFAP+ _____	41
Figura 21. Comprimento médio dos processos primários GFAP+ _____	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AcbC: Núcleo Accumbens

AE: Ambiente Enriquecido

AMS: Área Motora Suplementar

ANOVA: Análise de Variância

AOI: Área de Interesse

APM: Área Pré-Motora

AQ4: Aquaporina 4

AVC: Acidente Vascular Cerebral

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

CFA: Área Cortical Caudal de Representação do Membro Anterior

CPu: Núcleos Caudado e Putâmen (Estriado)

DA: Densidade dos Astrócitos GFAP+

FGF-2: Fator de Crescimento Fibroblástico do Tipo 2

Fr: Isocórtex Frontal

Fr1: Isocórtex Frontal Área 1

Fr2: Isocórtex Frontal Área 2

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida

GFAP+: Marcação Imunoistoquímica Positiva para a Proteína Glial Fibrilar Ácida

HIC: Hemorragia Intracerebral

HIC-ST: Hemorragia Intracerebral Sem Treinamento

HIC-TH: Hemorragia Intracerebral + Treinamento da Tarefa de Habilidade do Alcance

HIC-TNH: Hemorragia Intracerebral + Treinamento da Tarefa de não-habilidade

Is: Intervalo Entre Secções

LGP: Globo Pálido Lateral

M1: Córtex Motor Primário

MD: Núcleo Médio-dorsal do Tálamo

Nast: Número Total de Astrócitos Presentes no VOI

NGS: Soro Normal de Cabra

Ns: Número de Secções

PF: Núcleo Parafascicular do Tálamo

PFA: Paraformaldeído

RFA: Área Cortical Rostral de Representação do Membro Anterior

S1FL: Área Cortical de Representação Sensorial Primária Do Membro Anterior

SC: Colículo Superior

SNC: Sistema Nervoso Central

SNC: Substância *Nigra Pars Compacta*

S-ST: Sham Sem Treinamento

S-TH: Sham + Treinamento da Tarefa de Habilidade do Alcance

S-TNH: Sham + Treinamento da Tarefa de não-habilidade

TF: Tampão Fosfato

TNF α : Fator de Necrose Tumoral α

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

VH: Volume de um Hemisfério

VL: Núcleo Ventro-lateral do Tálamo

VM: Núcleo Ventro-medial do Tálamo

VOI: Volume de Interesse

VPT: Volume de Perda Tecidual

VRHL: Volume Remanescente do Hemisfério Lesado

VRHN: Volume Remanescente do Hemisfério Normal

RESUMO

Evidências sugerem que o aprendizado e a realização de tarefas motoras de habilidade podem induzir mudanças comportamentais e neurofisiológicas, o que ocorre tanto em animais intactos quanto naqueles submetidos às lesões do SNC. Nesse sentido, alguns trabalhos evidenciam uma possível participação dos astrócitos GFAP+ na plasticidade induzida por experiências comportamentais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho sensorio-motor e aspectos morfológicos de astrócitos GFAP+ em estruturas encefálicas importantes para o controle motor, tais como o córtex sensorio-motor (área de representação do membro anterior) e o estriado dorsolateral, em ratos controles ou submetidos à HIC e aos treinamentos de habilidade do alcance (TH) ou ao treinamento de não-habilidade (TNH). Para tanto, ratos *Wistar* adultos foram inicialmente adaptados às diferentes tarefas motoras empregadas ao longo de três semanas. Após, os mesmos foram submetidos às cirurgias de indução da hemorragia intracerebral (HIC) por meio da administração intra-estriatal de colagenase tipo IV ou sham. Em seguida, os animais dos grupos S-TH e HIC-TH foram submetidos ao treinamento da tarefa de habilidade do alcance e preensão, os animais dos grupos S-TNH e HIC-TNH foram submetidos ao treinamento da tarefa de não-habilidade e os animais S-ST e HIC-ST não receberam nenhum tipo de treinamento durante 4 semanas. Ao longo desse período, os animais foram testados quanto ao desempenho sensorio-motor ao final de cada semana de treinamento (exceto o teste do cilindro, realizado apenas nos períodos pré-cirurgia, pós-cirurgia e pós-treinamento). Encerrado o período de treinamento, os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos e tiveram seus encéfalos processados para a análise morfológica. Os resultados demonstram que a realização da tarefa de habilidade do alcance e preensão foi capaz de aumentar o comprimento dos processos primários em astrócitos GFAP+, o que ocorreu em estruturas cerebrais importantes para o controle motor, tais como o córtex sensorio-motor (bilateralmente) e o estriado dorsolateral (perilesional), tanto em animais lesados pela HIC quanto em animais não-lesados. De modo particular, essas modificações astrogliais foram aumentadas quando ocorreu a associação da HIC com o treinamento de habilidade do alcance. Além disso, a referida tarefa de habilidade, mas não o treinamento de não-habilidade, foi capaz de promover uma melhor recuperação sensorio-motora, avaliada pelos testes comportamentais. Sendo assim, nossos resultados sugerem que as modificações morfológicas em astrócitos GFAP+ poderiam fazer parte dos mecanismos neurobiológicos que medeiam a plasticidade induzida pela tarefa de habilidade, tanto em animais que sofreram uma HIC quanto em animais não-lesados, além de possivelmente contribuírem para a recuperação sensorio-motora.

1 INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é definido, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como um quadro clínico de perturbação focal ou global da função cerebral, de rápido desenvolvimento, supostamente de origem vascular, com sintomas que perduram 24 horas ou mais, ou que levam à morte sem outra causa aparente a não ser de origem vascular (WHO, 1988).

As classificações existentes para o AVC são geralmente definidas com base na etiologia do distúrbio que acomete a vascularização cerebral. Em geral, trata-se de um evento isquêmico ou hemorrágico, resultando, freqüentemente, em prejuízo das vias sensitivas e motoras (SHARP & BROUWER, 1997).

A hemorragia intracerebral (HIC) consiste em um extravasamento sanguíneo espontâneo e agudo do leito vascular para o interior do parênquima cerebral (MAYER & RINCON, 2005), sendo uma situação relativamente comum e um problema de saúde pública (QURESHI et al., 2001), com incidência anual estimada em 10-30 casos a cada 100.000 pessoas, o que representa cerca de 10% a 15% (SUDLOW & WARLOW, 1997; LABOVITZ et al., 2005) dos 15 milhões de casos de AVC que ocorrem anualmente em todo o mundo (AHA, 2004). No Brasil, as doenças cerebrovasculares estão entre as principais causas de óbito e dependência, observando-se uma incidência anual de 156 casos a cada 100.000 habitantes (RADANOVIC, 2000).

Estima-se que mais de 60% dos indivíduos que sofreram um AVC permanecem, após seis meses, com dificuldades motoras relacionadas à habilidade manual, mesmo quando submetidos a algum tipo de reabilitação, o que acaba por afetar as atividades diárias e o retorno às suas vidas profissionais (KOLOMINSKY-RABAS et al., 2001). Além disso, esta enfermidade também traz grandes custos para a sociedade, em função das despesas hospitalares, da necessidade crônica de cuidado com os indivíduos acometidos e da perda de funcionalidade. Esses valores estão estimados em, aproximadamente, US\$ 125.000 por paciente ao ano, representando um custo total de US\$6 bilhões anuais somente aos cofres americanos (TAYLOR et al, 1996).

Sendo assim, observa-se uma necessidade socioeconômica de desenvolver e implementar novas estratégias de reabilitação neurobiologicamente fundamentadas (NOWAK et al., 2009) que possam contribuir para o tratamento das disfunções neuromotoras correlatas às diferentes formas de AVC.

1.1 Hemorragia Intracerebral: aspectos fisiopatológicos

O conhecimento acerca da fisiopatologia da HIC tem evoluído muito nos últimos anos, sendo agora não mais entendido como um simples extravasamento sanguíneo para o parênquima cerebral, mas como um evento complexo, dinâmico e que envolve uma série de fatores distintos (MAYER & RINCON, 2005).

A HIC comumente acomete os lobos cerebrais, os núcleos da base (cerca de 50% dos casos), o tálamo, o tronco encefálico (principalmente a ponte) e o cerebelo (QURESHI et al., 2001; QURESHI et al., 2007). A ruptura de vasos sanguíneos, principalmente as bifurcações de pequenas arteríolas penetrantes que se originam das artérias basilar ou cerebrais anterior, média e posterior, normalmente está associada a diversos fatores. Dentre esses, destacam-se os processos degenerativos decorrentes da hipertensão, da angiopatia amilóide, de origem congênita (TAKEBAYASHI & KANEKO, 1983) ou do uso de anticoagulantes orais. Nesse caso, os pacientes portadores de vasculopatias são os principais acometidos, já que os anticoagulantes, de um modo geral, podem contribuir para a exacerbação de alguns fatores associados à doença de base facilitando, assim, a ocorrência da HIC (HART, 2000).

Em relação às regiões adjacentes aos hematomas (decorrentes da ruptura vascular) podemos constatar a presença de edema, células em apoptose e/ou necrose e células inflamatórias (QURESHI et al., 2003a). Nesse sentido, o hematoma pode induzir danos morfofisiológicos em função da deformação tecidual mecânica, que acarreta no afastamento de neurônios e células gliais (QURESHI et al., 2001), despolarização da membrana, liberação de neurotransmissores e disfunção mitocondrial (GRAHAM et al., 2000; QURESHI et al., 2003b, LUSARDI et al., 2004). A depender da severidade da referida disfunção, pode ocorrer tanto uma supressão metabólica temporária (fase de hibernação) quanto um aumento do volume celular e necrose (QURESHI et al., 2009). De modo adicional, uma cascata secundária é iniciada pelos produtos da coagulação e do metabolismo da hemoglobina, em particular a trombina, a qual é capaz de ativar células microgliais cerca de 4h após o início do evento hemorrágico. Por sua vez, a microglia ativada libera mediadores que levam à disfunção da barreira hemato-encefálica, ao surgimento de edema vasogênico e à apoptose neuronal e glial (NAKAMURA et al., 2005; XI et al., 2006; WAGNER, 2002) (Fig. 1).

Em relação à hemostase, a mesma é iniciada pela ativação local de cascatas de coagulação e pelo tamponamento mecânico (FUJI et al., 2001; BRODERICK et al., 2007). Aproximadamente 73% dos pacientes avaliados dentro das 3 primeiras horas após o início dos sintomas apresentam apenas alguma evidência de crescimento do hematoma, o que é resultado do estabelecimento do

processo inflamatório (JAMES et al., 2007), e somente cerca de 35% deles apresentam um crescimento clinicamente significativo nesse período. Hoje, entretanto, sabemos que esse fenômeno pode ocorrer até mesmo em períodos superiores a 12 horas após o início da HIC (DAVIS et al., 2006). No tecido adjacente ao hematoma, o volume do edema pode aumentar cerca de 75% nas primeiras 24h após o evento hemorrágico (GEBEL et al., 2002a; GEBEL et al., 2002b), alcançando um pico por volta do 5° ou 6° dia, perdurando por aproximadamente 14 dias (INAJI et al., 2003; BUTCHER et al., 2004). Nessas regiões, tem-se reportado uma fase hipometabólica e de baixa perfusão tecidual com disfunção mitocondrial e falha energética. De modo interessante, essa hipoperfusão regional, tanto em estudos clínicos (ZAZULIA et al., 2001; SCHELLINGER et al., 2003) quanto em experimentais (QURESHI et al., 1999; ORAKCIOGLU et al., 2005), nem sempre atinge níveis suficientes para ocasionar um fenômeno isquêmico e talvez seja secundária ao hipometabolismo. Entretanto, na presença de elevada pressão intracraniana e baixa perfusão cerebral, o risco da ocorrência de uma isquemia global é bastante elevado. Ainda em relação à perfusão cerebral, existem evidências de que o fenômeno de normalização do fluxo ou de reperfusão se estabeleça entre o 2° e o 14° dia, seguido de uma fase normalização, em todas as regiões encefálicas viáveis após esse período (QURESHI et al., 2009).

Além de todos estes fatores, uma série de outros mecanismos contribui para o desenvolvimento dos danos teciduais pós-HIC. Isto inclui: a ativação do sistema complemento – componente da resposta imunológica particularmente importante no edema pós-hemorrágico (SAYAH et al., 1999); a ativação de metaloproteinases de matriz - que são uma família de endopeptidases que degradam a matriz extracelular (ROSENBERG et al., 2007); e a participação de espécies reativas de oxigênio - provenientes da hemoglobínlise, as quais são capazes de aumentar os efeitos danosos do estresse oxidativo, além de participar indiretamente de diversas vias envolvidas neste processo (WAGNER et al., 2003; HEO et al., 2005).

Apesar de todos os mecanismos fisiopatológicos atualmente descritos, ainda muito pouco é conhecido sobre a HIC. Alguns estudos demonstram que apenas cerca de 16% dos genes que sofrem regulação nas adjacências de um evento hemorrágico já foram reportados pela literatura (LU et al., 2006; CARMICHAEL et al., 2008), o que evidencia a potencial participação de uma diversidade de outros fatores na fisiopatologia da HIC.

Embora seja considerada uma das formas mais fatais de AVC, quando não fatal, a HIC pode trazer uma série de incapacidades aos indivíduos sobreviventes (BRODERICK et al., 1999). Em 40% dos casos a HIC é acompanhada de hemorragia intraventricular, o que pode resultar em hidrocefalia aguda, aumento da pressão intracraniana e em menor chance de recuperação funcional àqueles que sobrevivem a este insulto (MAYER & RINCON, 2005).

As principais incapacidades funcionais que se observam sob o ponto de vista clínico parecem independem da etiologia do AVC e são decorrentes da hemiparesia, da incoordenação, da hipertonia espástica do membro superior e inferior contralaterais à lesão e da fraqueza ipsilateral e contralateral ao hemisfério lesado (BOHANNON, 1990; BOHANNON, 1995; ANDREWS & BOHANNON, 2000; SCHAECHTER, 2004).

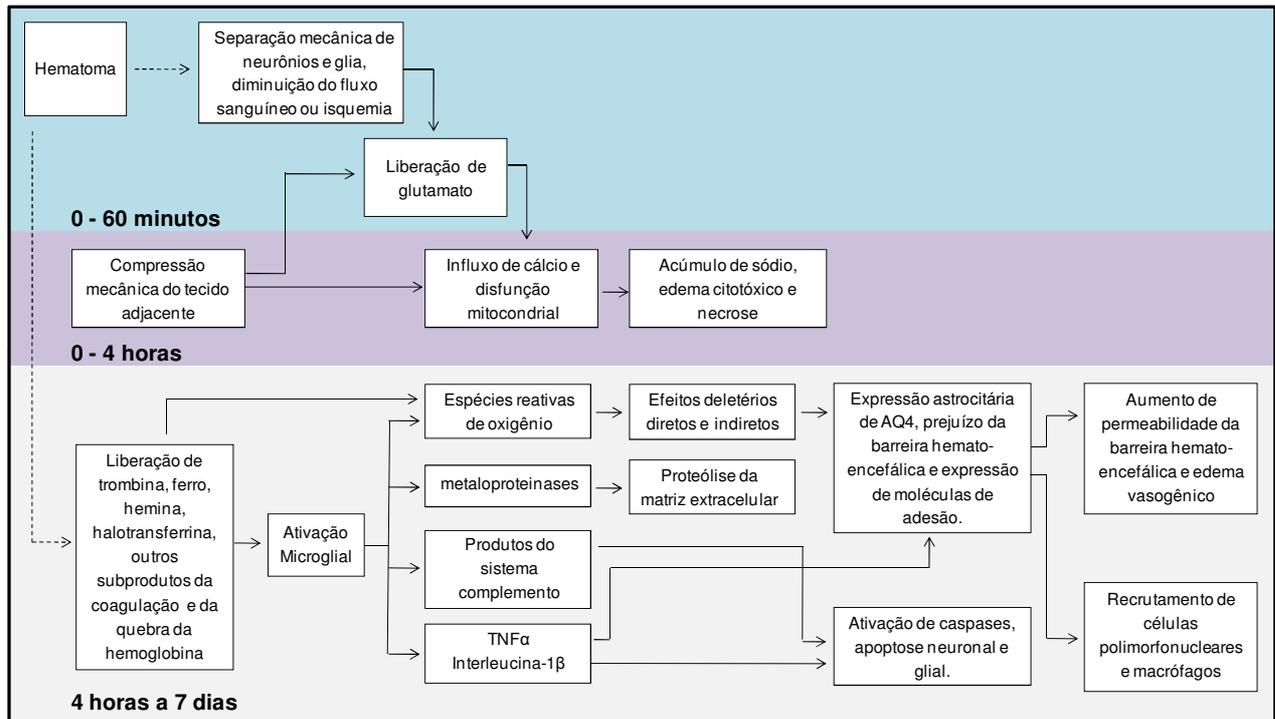


Figura 1. Cascata de danos neurais iniciada pela HIC (adaptada de QURESHI et al. 2009). TNF α : fator de necrose tumoral α ; AQ4: aquaporina 4.

1.2 Aspectos sobre o controle e o aprendizado motor

O termo “controle motor” teve origem nas ciências fisiológicas para representar a neurofisiologia do sistema motor (NEWELL, 1991) e, dessa forma, se refere aos processos que suportam o planejamento e a execução dos movimentos (WILLINGHAM, 1999). Em contrapartida, o termo “aprendizado motor” foi proposto pela psicologia e se reporta, em última análise, ao fenômeno de aumento da acurácia temporal e espacial de um dado movimento, o que geralmente ocorre com a prática do mesmo (NEWELL, 1991; WILLINGHAM, 1999). Tradicionalmente, os estudos sobre o aprendizado motor, em especial o aprendizado das tarefas que envolvem habilidade motora, eram realizados de modo separado das pesquisas relacionadas aos subdomínios neurais do controle e desenvolvimento motor. Somente a partir do final da

década de 70 a inserção de um foco comportamental dentro do estudo do controle motor teve início, sofrendo grande influência do livro intitulado “*Motor control: Issues and trends*”, editado por Stelmach em 1976. Desde então, o estudo de tarefas que envolvem habilidade motora também passou a contemplar aspectos do controle motor. Assim, tanto a fisiologia quanto a psicologia começaram a aumentar as suas visões em comum sobre a inter-relação destes conceitos, de modo que, atualmente, sabe-se que se tratam de fenômenos bastante dependentes (WILLINGHAM, 1999; NEWELL, 1991).

Nesse sentido, a busca pelos substratos neurais que medeiam a aquisição de comportamentos motores complexos tem sido o foco de uma série de estudos, os quais foram iniciados nas últimas décadas (UNGERLEIDER et al., 2002). Tomando por base trabalhos realizados em modelos animais e humanos, sabemos que a integridade de diversas estruturas encefálicas, tais como as regiões corticais motoras, o estriado e o cerebelo, tem se mostrado crítica para a aquisição e retenção de uma série de comportamentos motores complexos (SANES & DONOGHUE, 2000; UNGERLEIDER et al., 2002; DOYON et al., 2003). Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre a dinâmica e os mecanismos celulares específicos que acarretam nas mudanças neurais desencadeadas no sistema motor durante as diferentes fases deste aprendizado (UNGERLEIDER et al., 2002).

1.2.1 Tarefas de habilidade e de não-habilidade do membro anterior

O desenvolvimento de diversas formas de comportamento é uma das principais funções do sistema nervoso, sendo assim, o desempenho em tarefas comportamentais pode ser de grande utilidade para avaliarmos a integridade de funções desse sistema (WHISHAW & PELLIS, 1990).

O termo habilidade motora se refere à proficiência adquirida na realização de tarefas que requerem o emprego de movimentos corporais complexos ou que envolvam elevado grau de coordenação motora (MACKINTOSH & COLMAN, 1995; LUFT & BUITRAGO, 2005). Essa referida proficiência exige uma extensiva integração de informações sensório-motoras, a qual se estabelece por meio da utilização de várias vias neurais, assim como pela repetição e treinamento de uma tarefa específica (LUFT & BUITRAGO, 2005).

Em relação à especificidade ou natureza motora de uma tarefa, foi demonstrado que mecanismos centrais de controle completamente distintos estão envolvidos na realização de gestos motores bastante similares sob o ponto de vista cinemático, o que parece ser dependente dos diferentes contextos comportamentais em que esses movimentos estão inseridos. Isto pode ser evidenciado quando comparamos a realização de uma tarefa voluntária de habilidade do alcance e

preensão com a realização de movimentos que requerem baixo grau de complexidade, tais como os movimentos automatizados do membro anterior necessários para a locomoção (HERMERVAZQUEZ et al., 2004). Estas diferenças podem ser explicadas tendo em vista que os movimentos de habilidade são dependentes de vias supraespinais descendentes que conduzem informações altamente integradas e que devem ser coordenadas para possibilitar o suporte postural e o livre uso dos membros anteriores (ALSTERMARK et al., 1990; WHISHAW & GORNY, 1996; MONFILS et al., 2005). Por outro lado, os movimentos automatizados de repetição ou não-habilidade, tais como a locomoção ou a exploração vertical (*rearing*) são controlados principalmente pelo tronco encefálico e pela medula espinal, embora também possam estar subordinados ao controle cortical (MUIR & WHISHAW, 1999; JUVIN et al., 2005).

Dentre as diversas vias e estruturas chaves envolvidas na execução de um movimento complexo, o córtex motor primário está anatomicamente e fisiologicamente organizado de forma ideal para a aquisição e execução de uma seqüência de movimento. Sabe-se, por exemplo, que a ativação coordenada dessa rede neuronal possibilita um controle multi-articular fino e independente, como o necessário para os complexos movimentos de alcance e preensão (KANDEL et al., 2003; ADKINS et al., 2006).

Em humanos, o córtex motor pode ser dividido em córtex motor primário (M1), área motora suplementar (AMS) e área pré-motora (APM). Enquanto a AMS e a APM estão envolvidas no planejamento da atividade motora, M1 é um dos principais sítios de origem do trato córtico-espinal lateral, sendo uma área que recebe densas aferências da AMS e APM. Além disso, M1 mantém-se organizado em grupamentos neuronais altamente especializados no controle do movimento de cada segmento corporal. Já em roedores, o córtex sensório-motor é denominado isocórtex frontal (Fr). Trata-se de uma estrutura caracterizada pela heterogeneidade celular e que pode ser dividida de acordo com suas características morfológicas, neuroquímicas e de padrões de conexões em três áreas: Fr1 (M1), Fr2 (M2) e Fr3 (Fig. 2). Sob o ponto de vista comparativo, a área M1 corresponde ao córtex motor primário de primatas, a área M2 corresponde à APM e à AMS, enquanto Fr3 seria uma sub-região da representação somatotópica. Essas regiões possuem uma estrutura organizada em camadas celulares, conferindo um padrão de organização laminar. No córtex sensório-motor as camadas celulares II e V são as mais proeminentes (PALOMERO-GALLAGHER & ZILLES, 2004; PAXINOS & WATSON, 2004).

As bases neurofisiológicas para a execução de diversos gestos motores podem ser explicadas, ao menos em parte, pelos padrões de conectividade intracortical. Esses padrões são altamente dinâmicos e capazes de sofrer rápida reorganização, o que está relacionado com uma maior eficiência sináptica no interior dessas vias (HESS, 2002, MONFILS et al., 2005).

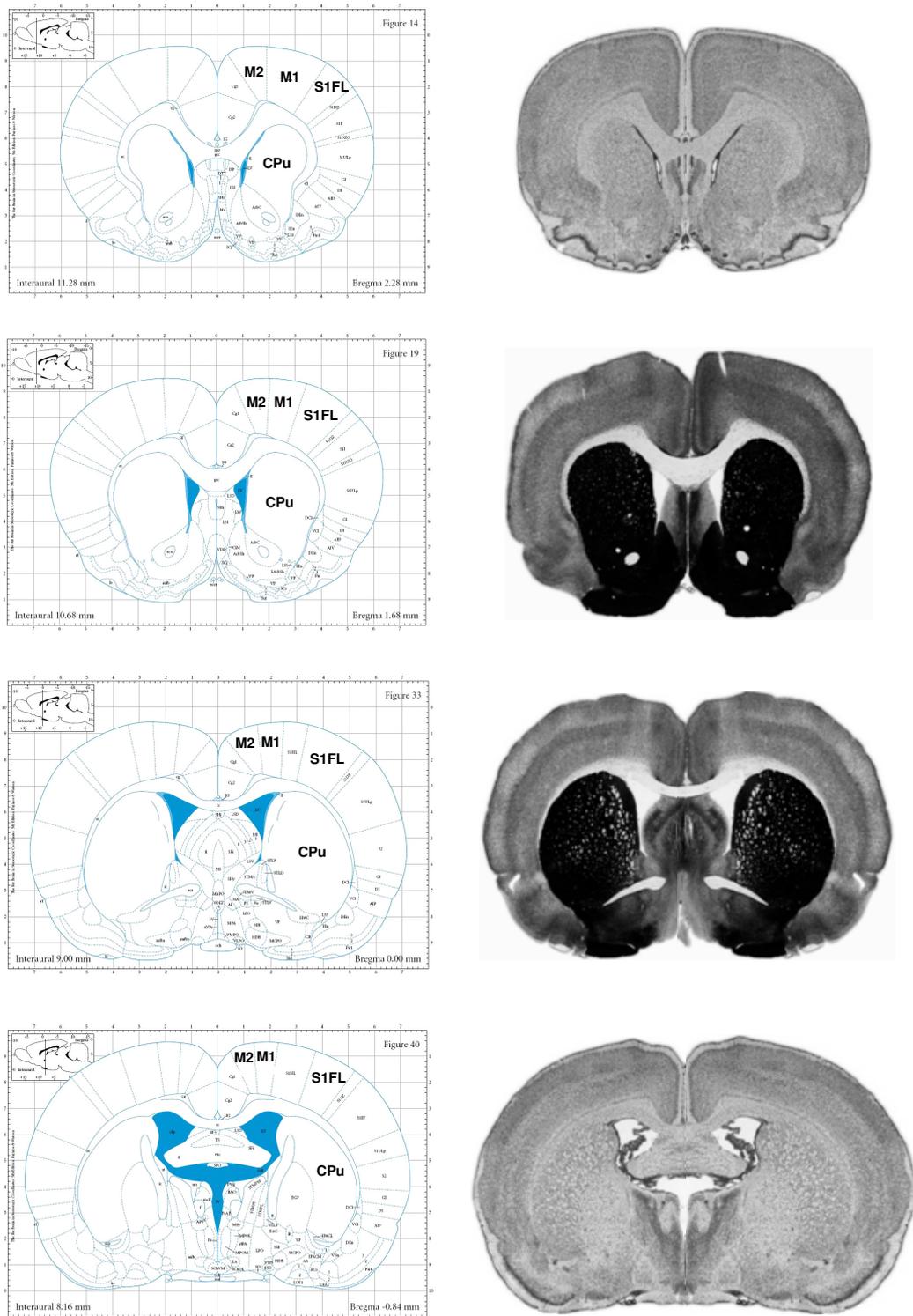


Figura 2. Cortes encefálicos demonstrando o córtex motor (M1 e M2), área cortical de representação sensorial primária do membro anterior (S1FL) e o estriado (CPu) (adaptado de PAXINOS & WATSON, 2004).

Sendo assim, postula-se que os padrões de ativação correlatos ao aprendizado de um movimento de habilidade podem ser codificados no interior do córtex motor por meio de mudanças nas conexões entre as regiões corticais que controlam as sinergias musculares necessárias à realização da tarefa (MONFILS, 2005). Dados experimentais demonstram que a realização de uma tarefa complexa, tal como o treinamento de habilidade do alcance e preensão, resulta no aumento da síntese protéica, da sinaptogênese e da reorganização dos mapas corticais de forma coordenada ao longo do tempo, objetivando a aquisição e o aperfeiçoamento motor (Fig. 3). Podemos observar que o desempenho motor ascende rapidamente durante os primeiros dias de treinamento, acompanhado de um aumento na síntese protéica e, à medida que as sessões decorrem, a melhora da habilidade motora pode ser visualizada conjuntamente com o aumento da sinaptogênese e reorganização dos mapas corticais (ADKINS et al., 2006).

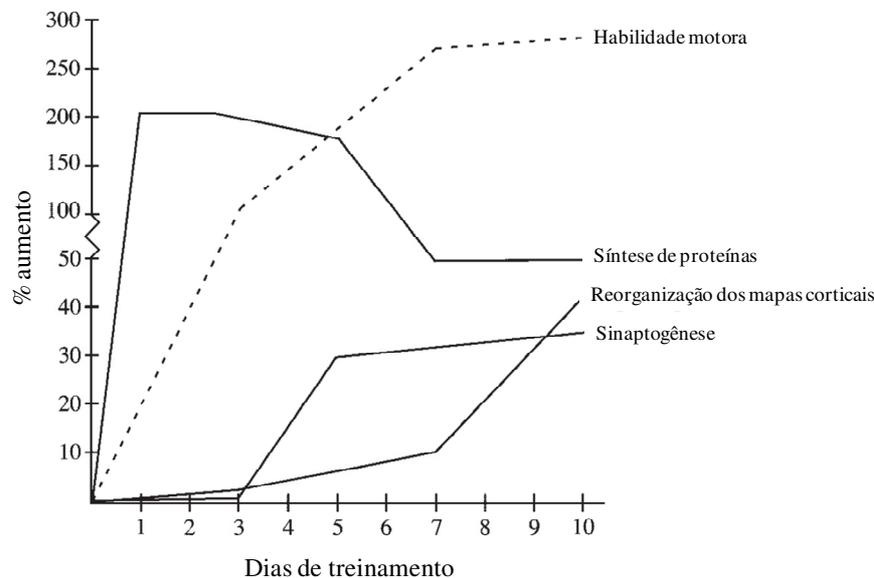


Figura 3. Curso da plasticidade do córtex motor de roedores durante o aprendizado de tarefa motora de habilidade. As medidas são expressas como porcentagem em relação aos níveis pré-treino, obtidos de animais intactos (adaptado de ADKINS et al., 2006).

De modo interessante, experimentos em roedores utilizando tarefas de habilidade do alcance do membro anterior também têm revelado que o aprendizado das mesmas leva à expansão das áreas de representação referentes ao punho e dedos dentro da área M1 correlata ao ombro e cotovelo. Essa expansão ocorre de forma paralela ao melhor desempenho motor do animal durante a realização da tarefa de habilidade proposta, o que também tem sido evidenciado em primatas (KLEIM et al., 1998). Entretanto, pode-se verificar que o aumento no uso do membro anterior, representado pela simples repetição de uma tarefa de baixa complexidade, não é capaz de

promover reorganização cortical. Essas evidências foram observadas em uma série de trabalhos onde roedores submetidos a diferentes condições, tais como pressionar uma barra (recebendo alimento como recompensa) (KLEIM et al., 1998), exercício em rodas de corrida (*running wheel*) (KLEIM et al., 2002) ou após sessões de fortalecimento do membro anterior (REMPLE et al., 2001), não apresentaram qualquer alteração significativa nos mapas corticais motores de representação somatotópica. Contudo, muitos dos mecanismos celulares específicos que fundamentam a plasticidade sináptica e a concomitante alteração dos mapas corticais ainda não foram completamente elucidados (MONFILS et al., 2005), principalmente na presença de lesões ou doenças que comprometam estruturas encefálicas importantes para o controle motor.

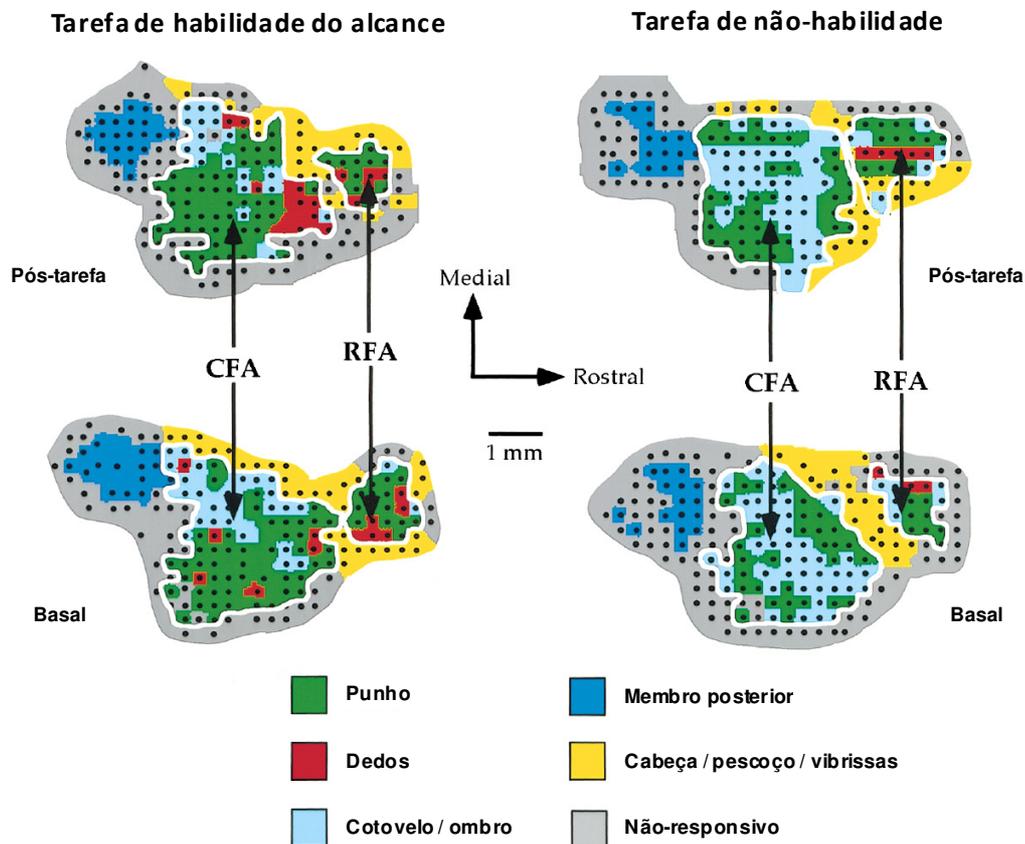


Figura 4. Reorganização do mapa cortical motor após 10 dias de treinamento de uma tarefa de habilidade (alcance e apreensão) e de não habilidade (repetição de um movimento de baixa complexidade). As áreas de representação do punho e dedos (em verde e vermelho, respectivamente) expandem-se dentro da área de representação do ombro e do cotovelo (em azul) nos animais que realizaram tarefa de habilidade do alcance o que não é evidenciado nos animais que realizam a simples repetição de um movimento de baixa complexidade. CFA: Área cortical caudal de representação do membro anterior. RFA: Área cortical rostral de representação do membro anterior (adaptado de KLEIM et al., 1998).

Além das áreas corticais sensório-motoras, uma série de trabalhos demonstram a participação de sistemas sub-corticais, tais como as alças córtico-basal e córtico-cerebelar, durante a aquisição, retenção e realização de movimentos de habilidade. Essas evidências surgiram principalmente a partir das observações de estudos clínicos e experimentais envolvendo doenças, tais como o mal de Parkinson, a coreia de Huntington e as disfunções cerebelares (DOYON et al., 2003) o que evidencia a importância da atuação conjunta desses sistemas com o córtex motor.

Os núcleos da base mantêm conexões com o córtex sensório-motor e o cerebelo, controlando os movimentos por meio da regulação de impulsos neurais que auxiliam no planejamento e na execução de movimentos seqüenciados. De forma simplificada, as informações originadas no córtex são transmitidas por meio do estriado, globo pálido e tálamo, de onde retornam novamente ao córtex cerebral (HANDLEY et al., 2009). Durante o aprendizado dos movimentos e mesmo em movimentos aprendidos, os núcleos da base exercem importante função relacionada à formulação do comportamento motor adaptativo (GRAYBIEL et al., 1994; JUEPTNER & WEILLER, 1998).

Dentre os núcleos da base, o estriado (formado pelos núcleos caudado e putâmen) atua como a porção receptora da maioria das projeções provenientes de diversas regiões corticais, tendo particular importância na integração de informações necessárias à realização do movimento voluntário normal e, talvez, para o aprendizado sensório-motor (BROWN & SHARP, 1995). Experimentos utilizando a injeção estriatal de inibidores de síntese protéica demonstram que a referida inibição é capaz de prejudicar a aquisição de tarefas que envolvem a habilidade motora, sugerindo a participação da plasticidade estriatal, assim como a integridade dos circuitos que envolvem os núcleos da base, como um componente fundamental neste processo (WÄCHTER et al., 2010).

Dados provenientes de várias linhas de investigação sugerem que o estriado apresenta uma efetiva contribuição para a execução das tarefas motoras de habilidade do alcance, incluindo componentes da atenção (VANVLEET et al., 2002; KARNATH et al., 2002), da orientação espacial (BROWN et al., 1989), da percepção sensório-motora (JEYASINGHAM et al., 2001), da motivação (CARDINAL et al., 2002) e da seleção dos movimentos que compõem o gesto motor (REDGRAVE et al., 1999). Outra função estriatal importante é a finalização de programas motores relacionados a metas, tais como alcançar e segurar um objeto.

Assim como no córtex cerebral, alguns mapas de representação estriatal já foram propostos, embora suas características sejam bastante diferenciadas em relação ao primeiro (GROENEWEGEN, 2003). Nos roedores as projeções corticais sensório-motoras chegam até o estriado dorsolateral e, nessa região, um mapa somatotópico que inclui o membro anterior

(ventrolateralmente), o membro posterior (dorsomedialmente) e as vibrissas (medialmente), parece estar organizado (BROWN & SHARP, 1995). Esses mesmos autores demonstraram também que a estimulação cortical unilateral é capaz de induzir um aumento na atividade estriatal de modo bilateral, o que é esperado, tendo em vista que as projeções oriundas do córtex sensório-motor projetam-se bilateralmente ao estriado de roedores (CANTERAS et al., 1988; McGEORGE et al., 1989). Sendo assim, as alças de retroalimentação corticais e subcorticais apresentam grande importância para o controle dos movimentos, enviando informações sobre o gesto motor pretendido até os sítios de controle onde ocorrem a correção, a adequação e o aperfeiçoamento do mesmo, para posteriormente reenviar essas informações às estruturas corticais (Fig. 5).

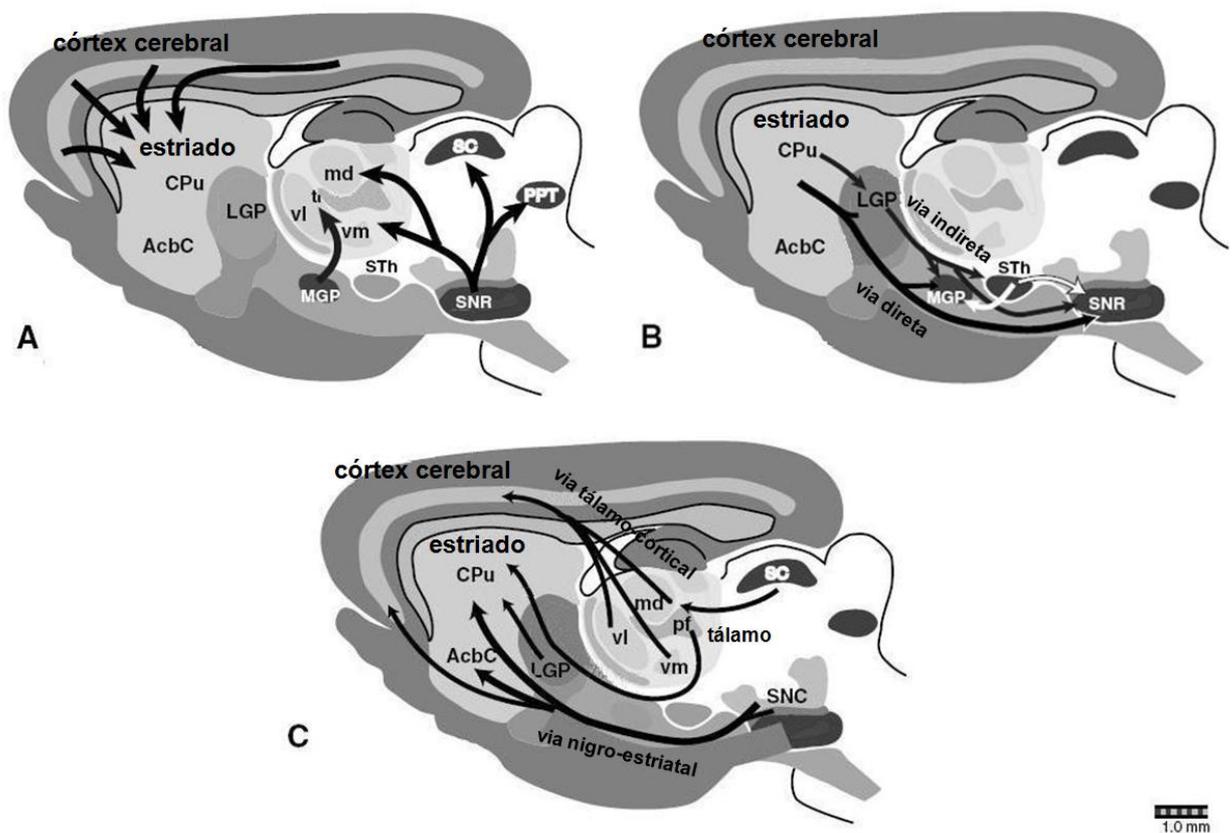


Figura 5. Representação simplificada das principais conexões dos núcleos da base. (A) aferências e eferências dos núcleos da base; (B) vias estriatais direta e indireta; (C) alças de retroalimentação. CPu: estriado; AcbC: núcleo accumbens; LGP: globo pálido lateral; vl, vm, md e pf: núcleos ventro-lateral, ventro-medial, médio-dorsal e parafascicular do tálamo, respectivamente; SC: colículo superior; SNc: substância *nigra pars compacta* (adaptado de GERFEN, 2004).

1. 3 Recuperação funcional: aspectos pós-AVC

A função do membro superior é crítica para o desempenho eficiente e independente nas atividades diárias e a reabilitação da extremidade superior após o AVC mantém-se como um alvo de estudo, uma vez que esta se mostra resistente à recuperação funcional (NAKAYAMA et al., 1994). Esse fato se deve principalmente aos distúrbios que envolvem a motricidade fina, importante aspecto da preensão e funcionalidade manual, e que pode ser prejudicado por lesões do sistema nervoso, comprometendo, dessa forma, a capacidade de gerar e controlar os movimentos (FARR & WHISHAW, 2002).

Assim como em humanos, as lesões que acometem o sistema nervoso central (SNC) de roedores, principalmente o córtex sensório-motor e o estriado lateral, são capazes de prejudicar os movimentos do membro anterior e dos dedos. Logo, observa-se um comprometimento do movimento funcional de habilidade do alcance, pois a lesão destes sítios fundamentais na rede neural que regula os movimentos finos acarreta em danos cinemáticos dos movimentos que compõem o referido gesto motor (WHISHAW et al., 1986; CIFU & LORISH, 1994; MACLELLAN et al., 2006). Dessa forma, o sucesso na realização de um alcance e preensão pode depender de movimentos compensatórios, o que ocorre tanto em modelos de HIC como de isquemia focal (FARR & WHISHAW, 2002; MACLELLAN et al., 2006).

Nesse contexto, o desempenho na realização da tarefa de habilidade e os aspectos inerentes a esse movimento podem ser avaliados e quantificados utilizando-se a análise do comportamento. Uma das tarefas comportamentais mais utilizadas na avaliação quantitativa e qualitativa da extensão do prejuízo sensório-motor, em animais, é o estudo do alcance e da preensão de comida (WHISHAW et al., 1986; SCHALLERT et al., 2000; FARR & WHISHAW, 2002; MACLELLAN et al., 2006; AURIAT et al., 2009), particularmente relevante no estudo de fenômenos relacionados ao dano e regeneração do SNC (NIKKHAH et al., 1998; BURY & JONES, 2002; BIERNASKIE et al., 2005). O emprego do membro anterior no comportamento alimentar representa uma integração complexa de funções sensoriais e motoras e envolve a ativação de circuitos corticais e subcorticais (NIKKHAH et al., 1998).

Embora a maioria dos trabalhos da literatura, tanto clínicos como experimentais, abordem preferencialmente o AVC isquêmico em relação ao AVC hemorrágico, muitas características comportamentais se mostram presentes em ambos os casos. Uma delas é que os animais apresentam assimetrias motoras e alterações sensoriais contralaterais à lesão (DeBOW et al., 2003; MACLELLAN et al., 2006). No modelo de HIC induzido pela injeção estereotáxica estriatal de colagenase, a habilidade no movimento do membro anterior contralateral ao hemisfério lesado é

prejudicada, não sendo recuperada mesmo no decorrer de duas a seis semanas após o dano hemorrágico, a depender da gravidade do mesmo (MACLELLAN et al., 2006). Este fato pode ser observado por no mínimo 15 dias em modelos isquêmicos mais brandos até a completa incapacidade de realizar a tarefa de alcance após utilização de protocolos mais agressivos, com lesão isquêmica simultânea do córtex sensório-motor e do estriado (WINDLE et al., 2006).

Embora o dano cerebral possa ser devastador para os indivíduos que sofrem um AVC, seja esse de natureza isquêmica ou hemorrágica, muitos pacientes sobrevivem ao evento inicial e experimentam algum grau de recuperação espontânea, a qual pode ser aumentada por intervenções terapêuticas (WHISHAW, 2000; GONZALEZ & KOLB, 2003; REGLODI et al., 2003; DEBOW et al., 2003; MACLELLAN et al., 2006; AURIAT et al., 2006; MURPHY & CORBETT, 2009) que visam otimizar os fenômenos neuroplásticos presentes nesse período, o que poderia contribuir para a melhor recuperação funcional (LIEPERT et al., 2000; GRIESBACH et al., 2004; BIERNASKIE et al., 2005; MACLELLAN et al., 2006). Alguns estudos em humanos evidenciam também que essa recuperação funcional espontânea, que ocorre durante os primeiros meses após o AVC, é um processo atribuído a uma série de fatores que incluem mudanças compensatórias no hemisfério lesado; organização funcional do tecido cortical que circunda a área lesada; ativação de áreas motoras do hemisfério não lesado; e a ativação aumentada de áreas motoras “não primárias”, tais como a AMS, córtex parietal inferior, cíngulo, insula e cerebelo (CAURAUGH & SUMMERS, 2005; MACCIOCCHI et al., 1998).

Além das áreas encefálicas envolvidas no processo de restauração da função sensório-motora após o AVC, dois fenômenos conceitualmente distintos parecem ser importantes: a recuperação funcional - processo de restabelecimento dos padrões neurofisiológicos sensoriais e motores que estavam presentes antes do referido insulto; e as compensações motoras comportamentais - estratégias alternativas durante a realização de uma tarefa, que permitem que um objetivo funcional seja alcançado. Nesse caso, podemos citar as mudanças posturais, tais como as rotações de tronco e ombro, as quais podem auxiliar na realização de tarefas motoras (MURPHY & CORBETT, 2009). Apesar destes conceitos, os protocolos para a avaliação motora e comportamental utilizados atualmente, raramente são suficientemente sensíveis para discernir se a causa de um melhor desempenho se deve à recuperação funcional, às compensações motoras comportamentais ou à contribuição de ambos os fatores (WHISHAW, 2000; MURPHY & CORBETT, 2009). Por esta razão, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura considera simplesmente a melhora no desempenho sensório-motor, sem distingui-lo entre graus de compensação ou recuperação “verdadeira” (MURPHY & CORBETT, 2009).

Nesse contexto, as intervenções sensório-motoras tais como o enriquecimento ambiental, as tarefas de habilidade do alcance e preensão ou a associação das mesmas demonstram ser capazes de promover algum grau de recuperação funcional após modelos de AVC em roedores (BIERNASKIE et al., 2005; AURIAT et al., 2006, MURPHY & CORBETT, 2009). Em humanos que sofreram AVC, a terapia orientada à tarefa de habilidade se baseia no re-treinamento de atividades funcionais por meio da utilização e inter-relação de múltiplos sistemas, incluindo o músculo-esquelético, perceptivo e cognitivo (SCHAECHTER, 2004; ADKINS et al., 2006). Existem evidências indicando que o restabelecimento funcional que ocorre em indivíduos hemiparéticos aconteça devido à plasticidade neural adaptativa nas regiões motoras não acometidas, compreendendo áreas cerebrais corticais e subcorticais (LIEPERT et al., 2000). Estudos de neuroimagem também sugerem que após eventos isquêmicos, os ganhos funcionais obtidos por meio do treinamento orientado à tarefa possivelmente aconteçam devido ao restabelecimento do controle exercido pelo córtex sensório-motor ipsilateral à lesão. Nesses casos, ocorreria um aumento na atividade dos córtices sensorial e motor primários ipsilesionais adjacentes e uma redistribuição da atividade em diversas áreas da rede sensório-motora (CONNER et al., 2003; SCHAECHTER, 2004; ADKINS et al., 2006).

Apesar das diferenças fisiopatológicas, processos neurais bastante parecidos aos que fundamentam a reorganização dos mapas corticais durante o aprendizado de tarefas motoras de habilidade no encéfalo intacto talvez também possam estar engajados durante o reaprendizado das funções sensório-motoras no encéfalo lesado (KLEIM & JONES, 2008; NOWAK et al., 2009). Nesse sentido, a realização de movimentos de habilidade orientados à tarefa com o membro anterior afetado, após a lesão experimental (NUDO et al., 1996) e a terapia induzida por constrição do membro ipsilateral a lesão (LIEPERT et al., 2000) resultam na modificação dos mapas corticais e promovem uma melhor recuperação funcional (NUDO, 2003; WARD et al., 2003). Em roedores, observa-se que com o progresso da recuperação do membro anterior contralateral à lesão ocorre crescimento dendrítico em áreas do hemisfério não-lesado (FORGIE et al., 1996). Além disso, estudos realizados em pacientes submetidos à terapia de habilidade, empregando ressonância magnética funcional, demonstraram que áreas motoras bilaterais também podem ser recrutadas durante movimentos do membro ou mão afetados (WEILLER et al., 1993). Isto indica que esse tipo de tratamento poderia induzir adaptações na circuitaria neuronal em tecidos próximos e longínquos à lesão e que tal reorganização contribuiria na recuperação de funções motoras comprometidas (BIERNASKIE & CORBETT, 2001). Dessa forma, talvez a única maneira de obtermos uma recuperação verdadeira seja através do restabelecimento dos

circuitos destruídos, fato que poderia ocorrer mediante o reaprendizado da realização das tarefas motoras prejudicadas pelo AVC (WHISHAW, 2000).

Alguns estudos comportamentais em humanos evidenciam que existem diferenças na recuperação e nas limitações funcionais de indivíduos que sofreram AVC hemorrágico frente aos que sofreram AVC isquêmico de semelhante gravidade. Isso provavelmente está relacionado com as diferentes respostas do SNC às particularidades de cada dano (STURM et al., 2002; KELLY et al., 2003) o que ainda precisa ser elucidado. Sabe-se, porém, que independente da abordagem e terapia utilizada, o início do tratamento deve ser suficientemente precoce a fim de maximizar os ganhos possíveis e, no entanto, não tão imediato a ponto de exacerbar possíveis danos celulares (RISEDAL et al., 1999; HUMM et al., 1998).

Apesar de todos os fatores anteriormente mencionados, muito pouco é conhecido acerca dos mecanismos envolvidos na plasticidade neural (FORGIE et al., 1996; NUDO, 2003; ADKINS et al., 2006), principalmente no que diz respeito à participação do mais novo integrante sináptico: a astróglia (KEINER et al., 2008).

1.4 Astrócitos e neuroplasticidade: aspectos morfofisiológicos

As células que circundam os neurônios do sistema nervoso são conhecidas coletivamente pelo nome de células gliais ou neuroglia e podemos dividi-las em dois grupos: a microglia – células com função fagocítica; e a macroglia – composta pelos oligodendrócitos (presentes no SNC), células de Schwann (presentes no sistema nervoso periférico) e astrócitos (ARAQUE et al., 2001, VOLTERRA & MELDOLESI, 2005; ARAQUE, 2008).

A denominação neuroglia significa “cola nervosa” e foi dada por Robert Virchow, em meados do século XIX fazendo uma alusão à possível função de “cola” ou suporte conectivo exercido por essas células (ARAQUE et al., 2001; VOLTERRA & MELDOLESI, 2005). Durante o período inicial de documentação das características celulares encefálicas, uma maior importância foi dada aos neurônios, já que a excitabilidade elétrica dessas células poderia permitir a condução de informações dentro do SNC, o que não acontecia com as células gliais (SONTHEIMER et al., 1996; ARAQUE et al., 2001). De fato, os primeiros estudos eletrofisiológicos demonstraram que as células gliais eram eletricamente inexcitáveis e apenas respondiam passivamente à atividade neuronal, atuando no tamponamento e manutenção dos níveis de potássio extracelular (ARAQUE et al., 2001; VOLTERRA & MELDOLESI, 2005).

Apesar das observações feitas em 1899 por Santiago Ramón y Cajal no trabalho intitulado “*Contribución al conocimiento de la neuroglia del cérebro humano*” que alertavam para a

importância dessas células, somente com o advento tecnológico ocorrido nas últimas décadas, que uma série de funções gliais potencialmente dinâmicas começaram a ser apreciadas (ARAQUE et al., 2001; ARAQUE, 2008). Sendo assim, o aumento das investigações envolvendo a macroglia, resultou na demonstração de que os astrócitos possuem uma série de funções no SNC (VOLTERRA & MELDOLESI, 2005). Essas evidências acerca das íntimas relações astrocitárias com os neurônios levaram Araque e colaboradores a cunharem o termo sinapse tripartite (ARAQUE et al., 1999), o qual busca substancializar a comunicação entre os terminais pré e pós-sinápticos com o astrócito circundante. Dessa forma, foi reconhecido que o mesmo pode atuar decisivamente no processamento sináptico através de várias funções, dentre elas a liberação dos chamados gliotransmissores, e, assim, exercer influência sobre a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (PEREA et al., 2009; ARAQUE, 2008).

Além de colaborarem ativamente na regulação da informação sináptica, fato que sugere fortemente o envolvimento dos mesmos no processamento das informações no SNC, os astrócitos também desempenham outras funções fundamentais para a fisiologia do SNC, estando envolvidos no suporte trófico e metabólico dos neurônios, na sobrevivência e diferenciação neuronal, no crescimento dos neuritos, na sinaptogênese e na manutenção da homeostase (ARAQUE et al., 1999; ARAQUE, 2008; PEREA et al., 2009).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma proteína integrante do citoesqueleto astrocitário que faz parte da classe III de filamentos intermediários gliais e provavelmente está implicada com uma série de modificações na estrutura e função dessas células (RUTKA et al., 1997; ARAQUE, 2008). Trata-se de uma proteína que fornece estabilidade além de atuar na manutenção da estrutura e definição da forma celular (RUTKA et al., 1997). Esta proteína é expressa em astrócitos maduros e sua detecção ainda pode ser utilizada como um dos principais marcadores astrocitários no SNC, embora apresente expressão heterogênea dentre as diferentes regiões encefálicas (ZILLES et al., 1991; TAFT et al., 2005). Sabe-se, entretanto, que as mudanças na expressão ou fosforilação desta proteína podem acarretar em modificações na morfologia astrocitária, o que geralmente ocorre em paralelo com mudanças neuronais (THEODOSIS et al., 2008), e poderia estar implicado em alterações das propriedades funcionais das regiões encefálicas envolvidas (GOMES et al., 1999; VIOLA et al., 2009).

Até a década de 90, os pesquisadores encontravam grande dificuldade na observação de possíveis mudanças na expressão de GFAP, assim como na morfologia astrocitária. Esse fato se devia principalmente à análise observacional puramente qualitativa, onde a qualidade das técnicas imunohistoquímicas e a experiência prévia do observador eram fatores determinantes para o resultado dessas observações, nem sempre claras e conclusivas. Porém, graças à utilização de

técnicas estereológicas aplicadas à análise de imagens (HOWELL et al., 2002; XAVIER et al., 2005; DALL'OGGIO et al., 2008), uma análise quantitativa de maior precisão e acurácia tem contribuído para a elucidação de uma série de aspectos morfofuncionais de várias células do SNC, entre estas, os astrócitos GFAP positivos (GFAP+) (VIOLA et al., 2009).

Em animais saudáveis, já foi demonstrado que os astrócitos talvez possuam um papel importante na plasticidade neural induzida pela experiência, o que é evidenciado pelo aumento da expressão de GFAP após manipulações comportamentais e ambientais, tais como o ambiente enriquecido (SIREVAAG & GREENOUGH, 1991), o condicionamento olfatório (MATSUNI & LEON, 1993), a privação sensorial (HAWRYLAK & GREENOUGH, 1995) e a atividade motora (GÓMEZ-PINILLA et al., 1998). Além disso, também já foi demonstrado que a exposição de animais intactos ao ambiente enriquecido é capaz de induzir alterações morfológicas no hipocampo de roedores, onde ocorre hipertrofia e aumento no número de células gliais (SIREVAAG & GREENOUGH, 1991) assim como um aumento no número, comprimento e ramificações dos processos primários (VIOLA et al., 2009). Em geral essas alterações morfológicas ocorrem na mesma escala temporal em que se observam alterações neuronais (MARKHAM & GREENOUGH, 2004) e corroboram a idéia de que as modificações nas redes de astrócitos são parte integral dos processos plásticos que ocorrem no SNC (VIOLA et al., 2009).

Por outro lado, diversos trabalhos já demonstraram exaustivamente que os danos encefálicos resultam em um aumento na expressão de GFAP, sendo a mesma considerada como um marcador de astrogliose reativa (RIDET et al., 1997). Essa astrogliose é classicamente vista como um dos principais contribuintes para formação da cicatriz glial, fenômeno que poderia prejudicar o crescimento axonal e a recuperação funcional pós-lesão (ALONSO & PRIVAT, 1993; RIDET et al., 1997; HUDGINS & LEVISON, 1998). Nesse sentido, muitas estratégias experimentais já foram estudadas ao longo dos anos com o intuito de disponibilizar fármacos supostamente “neuroprotetores” que atuem na inibição da astrogliose reativa (HORNBERGER & GAGE, 2000; FAWCETT & ASHER, 1999; SILVER & MILLER, 2004; LI et al., 2005). Entretanto, um elegante estudo utilizando camundongos *GFAP-knockout* demonstrou que esses animais apresentavam uma pior recuperação funcional após um modelo de excitotoxicidade induzida por trauma crânio-encefálico do que os animais lesionados que expressavam GFAP (OTANI et al., 2006). Adicionalmente, Hayakawa e colaboradores (2009) demonstraram que a astrogliose reativa, presente no córtex cerebral adjacente à lesão em modelo de isquemia focal, talvez contribua para uma melhor recuperação funcional espontânea e participe do remodelamento neurovascular, de modo que muitas respostas gliais possivelmente sejam benéficas e visem uma melhor recuperação funcional pós-AVC (HAYAKAWA et al., 2009). Portanto, a concepção de que a astrogliose

reativa é um processo puramente danoso talvez não seja completamente correta e, nesse sentido, o balanço entre o dano e o reparo induzido pela mesma, possivelmente dependa do tempo e das experiências ambientais que estão presentes no período pós-AVC (LO, 2008).

Nesse sentido, Briones e colaboradores (2006) demonstraram que tanto a isquemia cerebral global quanto o ambiente enriquecido eram capazes de aumentar a expressão de GFAP por astrócitos reativos, porém quando os animais isquêmicos eram submetidos ao enriquecimento ambiental uma resposta astrogliol ainda mais intensa foi observada. Embora a razão para esse aumento não esteja completamente clara, é possível que o fenômeno observado decorra da tentativa de viabilizar a promoção de um micro-ambiente favorável e que, possivelmente, contribua para a recuperação funcional e restabelecimento das funções comportamentais (BRIONES et al., 2006). Da mesma forma, diferenças quanto à proliferação e a sobrevivência de células gliais adjacentes a um infarto cortical também foram encontradas após a realização de um protocolo de reabilitação que utilizava a tarefa de habilidade do alcance ou o enriquecimento ambiental (KEINER et al., 2008).

Assim, é possível que as respostas astrocitárias aumentadas no período pós-lesão do SNC visem facilitar a recuperação funcional, principalmente na presença de estratégias sensório-motoras, embora muito pouco ainda seja conhecido sobre o papel dessas alterações morfofisiológicas e suas relações com a recuperação sensório-motora e funcional. Contudo, que seja de nosso conhecimento, não existem trabalhos publicados até o presente momento demonstrando possíveis alterações morfológicas diferenciais em astrócitos GFAP+ no córtex sensório-motor e estriado após os treinamentos de habilidade do alcance e preensão ou de não-habilidade do membro anterior, tampouco as implicações comportamentais que possivelmente possam ser desencadeadas por essas alterações morfológicas, tanto em animais intactos quanto em animais submetidos à HIC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a recuperação motora funcional, volume da lesão, assim como aspectos correlatos à morfologia de astrócitos GFAP+ do córtex sensório-motor e estriado, bilateralmente, em ratos *Wistar* adultos, submetidos à HIC induzida por colagenase e ao treinamento da tarefa de habilidade ou de não-habilidade do membro anterior.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a recuperação motora funcional dos membros anteriores contralateral e ipsilateral à lesão de ratos *Wistar* adultos, submetidos à HIC, por meio do teste do *Staircase*, teste da escada horizontal e teste do cilindro;

2. Avaliar morfologicamente o volume da lesão produzida pelo modelo de HIC, nos diferentes grupos experimentais;

3. Estimar a densidade dos astrócitos GFAP+ no córtex sensório-motor e estriado dorsolateral, bilateralmente, utilizando a microscopia confocal, nos diferentes grupos experimentais;

4. Avaliar morfologicamente o número e o comprimento dos processos primários de astrócitos GFAP+ no córtex sensório-motor e estriado dorsolateral, bilateralmente, utilizando o método dos círculos concêntricos de Sholl associado à microscopia confocal, nos diferentes grupos experimentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Foram utilizados 64 ratos *Wistar*, adultos provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com 60 dias de vida ao início dos experimentos. Os animais permaneceram em grupos de no máximo cinco, em caixas de *Plexiglass* sob condições padrão (ciclo de 12 h claro/escuro) e controle da temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$). Água e comida foram fornecidas à vontade, exceto durante a realização dos testes comportamentais, como será descrito na sessão específica.

Os animais foram adaptados durante três semanas para a realização do teste do *Staircase* e durante uma semana para a realização do teste da escada horizontal. Nas 12h precedentes ao dia de início do período de adaptação, os animais permaneceram em restrição alimentar total a fim de aumentar o interesse pelo alimento novo fornecido. A partir do primeiro dia de adaptação, os animais entraram em regime de restrição parcial de alimento, quando foi fornecido cerca de 15g a 20g de ração padrão por animal todos os dias, ao final do dia. O peso dos animais foi controlado semanalmente, a fim de que não ultrapassasse o limite inferior de 85% do peso corporal quando em alimentação livre.

A aclimação à caixa utilizada para o treinamento da tarefa de habilidade e à esteira (utilizada para a tarefa de não-habilidade) foi realizada ao final da semana anterior ao procedimento cirúrgico, de modo que todos os animais receberam uma única sessão de cada modalidade. Nos quatro dias anteriores à indução da HIC todos os animais foram avaliados nas tarefas comportamentais (teste do *Staircase*, escada horizontal e teste do cilindro). Infelizmente, ao final das três semanas de adaptação, quatro animais foram excluídos por não terem atingido o critério de inclusão estabelecido para o teste do *staircase*. Depois disso, os animais foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais de acordo com o desempenho pré-cirúrgico apresentado no teste do *Staircase*. Isso foi realizado de modo que não existissem diferenças, sob o ponto de vista da habilidade motora fina, entre os diferentes grupos antes da indução da HIC. Sendo assim, estabeleceram-se os seguintes grupos experimentais:

- (a) Sham sem treinamento [S-ST] (n=08)
- (b) Sham + Treinamento da Tarefa de Habilidade do Alcance [S-TH] (n=08)
- (c) Sham + Treinamento da Tarefa de não-habilidade [S-TNH] (n=08)
- (d) HIC sem treinamento [HIC-ST] (n=12)

- (e) HIC + Treinamento da Tarefa de Habilidade do Alcance [HIC-TH] (n=12);
- (f) HIC + Treinamento da Tarefa de não-habilidade [HIC-TNH] (n=12).

Nas 48 h anteriores ao procedimento cirúrgico os animais retornaram à alimentação *ad libitum*. As avaliações comportamentais referentes ao desempenho no pós-cirúrgico foram realizadas no quinto e sexto dias após a cirurgia. No sétimo dia pós-operatório teve início o período de treinamento. Ao longo de quatro semanas, os animais pertencentes ao grupo STH e HTH foram submetidos à tarefa de habilidade do alcance e preensão e os animais pertencentes aos grupos SNH e HNH à tarefa de marcha na esteira. Os grupos S-ST e H-ST foram manipulados, permaneceram sob o mesmo regime de restrição alimentar, e receberam a mesma quantidade média de alimento doce que os grupos tratados. A avaliação comportamental foi repetida, semanalmente, até o fim do período de treinamento. Todas as mensurações, tanto referentes aos testes comportamentais quanto aos aspectos morfológicos, foram realizadas por avaliadores cegos em relação aos grupos experimentais e aos resultados paralelos.



Figura 6. Desenho experimental.

3.2 Modelo de hemorragia cerebral induzida por collagenase

A injeção de collagenase derivada de *clostridium histolyticum* no parênquima cerebral é um método bastante empregado atualmente com a finalidade de reproduzir a HIC, em especial nos núcleos da base. Introduzido no início dos anos 1990, acredita-se que este modelo possa reproduzir experimentalmente, de modo satisfatório, os efeitos da HIC espontânea em humanos (ROSENBERG et al., 1990). Particularmente, os danos sensoriais e motores decorrentes da HIC causada pela injeção estriatal de collagenase são úteis para o estudo do treinamento de habilidade, pelo fato do estriado dorsolateral contribuir tanto para a iniciação quanto para a execução da tarefa de habilidade do alcance (WHISHAW et al., 1986).

As collagenases são uma família de enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise do colágeno, sendo este um componente fundamental presente na membrana basal da barreira

hemato-encefálica. A injeção de colagenase promove a dissolução da matriz extracelular ao redor dos capilares cerebrais, resultando em uma “hemorragia espontânea” no local da aplicação. As vantagens deste modelo incluem a simplicidade, a reprodutibilidade dos resultados, extensão hemorrágica dose-dependente e fácil adaptação do modelo para aplicação em várias espécies animais, incluindo ratos, camundongos e suínos. Desta forma, este modelo apresenta relevância clínica por promover a ruptura de pequenos vasos com baixa variabilidade técnica, obtendo-se uma hemorragia de extensão controlada (JAMES et al., 2007; MACLELLAN et al., 2006; MACLELLAN et al., 2008).

Os animais foram anestesiados com halotano (indução 4%, manutenção de 1,5% a 2%, em 70% de N₂O e 30% de O₂) utilizando-se um aparato de anestesia inalatória (Narcosul) e, após profundamente anestesiados, foram colocados em posição ventral no aparelho estereotáxico. Assim, realizou-se a tricotomia da região central da calvária do animal, a assepsia com álcool etílico e, com o auxílio de um bisturi cirúrgico, uma incisão na linha média de aproximadamente 0,5cm sobre a pele para exposição óssea do crânio. Após, utilizou-se uma broca odontológica especial (Beltec LB100) para realizar uma pequena trepanação que permitiu a passagem da seringa de injeção estereotáxica (Hamilton[®], n.º 26, USA). A HIC foi induzida no estriado contralateral ao membro anterior de preferência do animal, de acordo com a avaliação pré-operatória, considerando-se o teste do *Staircase*. Isto foi realizado por meio da micro-injeção de 0,2 U de colagenase tipo IV, derivada de *clostridium histolyticum*, diluídas em 1µl de salina estéril, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas: 0.0 mm anterior ao Bregma, ±3.6 mm lateral ao Bregma e -6.0 mm ventral a partir do crânio (PAXINOS & WATSON, 2004; SZYMANSKA et al., 2006). O volume foi injetado ao longo de 5 minutos e, antes da retirada da seringa, esperou-se adicionais 5 minutos a fim de minimizar possível refluxo (SZYMANSKA et al., 2006). Nos animais dos grupos S, STH e SNH foi injetado o mesmo volume do diluente. Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram com água e comida *ad libitum* até 24h antes do início dos treinamentos. A HIC foi realizada mediante controle de temperatura retal (Letica, Espanha), de modo a não ultrapassar os limites de 36.5 a 37.5°C. Imediatamente após a sutura com fio de nylon cirúrgico, os animais receberam uma aplicação tópica de lidocaína 10% (Xilocaína[®]) e tiveram o comportamento monitorado. Caso necessário, os animais recebiam um reforço desta aplicação, respeitando os limites posológicos do medicamento.

Após a cirurgia, os animais foram examinados quanto ao sucesso do procedimento cirúrgico e ao conseqüente prejuízo motor. Todos os animais injetados com colagenase deveriam exibir déficit motor do membro anterior contralateral ao hemisfério lesado (DeBOW, 1993; MACLELLAN et al., 2006) além de apresentar rotação espontânea na direção contralateral ao

hemisfério lesado quando fossem suspensos pela cauda (WHISHAW et al., 1986). Caso o comportamento acima descrito não fosse evidenciado, o animal seria excluído do estudo.

A localização topográfica da hemorragia, a qual tipicamente inclui região lateral do estriado, bem como a extensão da lesão, foi evidenciada pela avaliação histológica utilizando-se a técnica de coloração por hematoxilina-eosina, como será descrito posteriormente.

3.3 Tarefas motoras

3.3.1 Tarefa de habilidade do alcance e preensão

Essa tarefa foi realizada por meio da utilização de caixas desenvolvidas para o treinamento do alcance e preensão de comida, chamadas de caixas de reabilitação (*rehabilitation boxes*) (BIERNASKIE & CORBETT et al., 2001). As referidas caixas são confeccionadas em acrílico, possuindo uma plataforma central e uma bandeja de cada lado, que podem ser preenchidas com alimento (Fig. 7). As dimensões do aparato permitem somente o uso independente do membro ipsilateral à bandeja em questão, não permitindo o alcance cruzado do animal. Dessa forma, a bandeja situada abaixo do membro não-afetado permaneceu vazia enquanto a bandeja situada abaixo do membro afetado foi preenchida com pequenas esferas comestíveis (15g por sessão, glóbulos inertes n° 7 - 4,6 mm; 65 mg \pm 10%; Farmacopéia Brasileira Homeopática). A quantidade dessas esferas foi estabelecida de modo a prevenir o alcance das mesmas com a língua do animal ou um possível sucesso utilizando o membro não-lesado, conforme descrito pelos autores citados.

Para realizar a sessão de habilidade do alcance e preensão, os animais eram removidos das suas caixas moradia e colocados individualmente em caixas semelhantes que continham o referido aparato. As sessões tinham duração de 40 minutos e eram realizadas uma vez por dia (durante o ciclo claro, entre as 12 h e 16 h), cinco dias por semana durante 4 semanas após a cirurgia. Ao final de cada sessão, os animais eram devolvidos às caixas moradia e a quantidade de esferas remanescentes era pesada com a finalidade de verificar a adesão do animal à tarefa. O tempo de duração da sessão e o ciclo de realização da tarefa foram escolhidos de modo a possibilitar uma maior comparação entre as tarefas propostas, tendo por base dados oriundos de um experimento piloto.

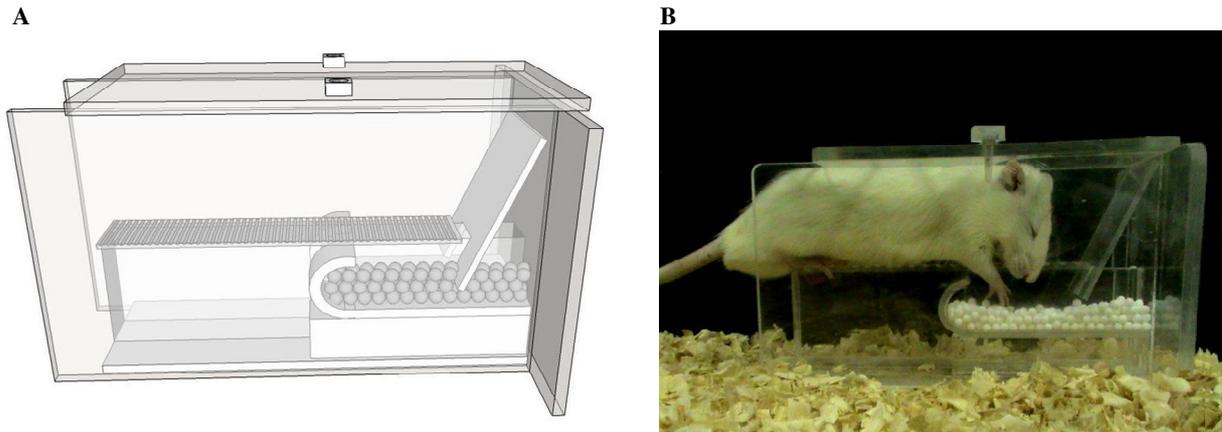


Figura 7. Aparato empregado para a realização da tarefa de habilidade do alcance e preensão. (A) ilustração da caixa de alcance e preensão; (B) rato realizando a referida tarefa. Fonte: o autor.

3.3.2 Tarefa de não-habilidade

A tarefa de não-habilidade ou repetição simples foi realizada utilizando-se uma esteira motorizada (HERMER-VAZQUEZ et al., 2004) desenvolvida para roedores (INBRAMED, Porto Alegre, Brasil) (Fig. 8). Decorridos cinco dias da cirurgia, os animais eram tratados da mesma forma que na sessão de habituação: durante quarenta minutos (entre 12 h e 16 h), cinco dias por semana, ao longo de quatro semanas consecutivas. A escolha do gesto da marcha, utilizado no presente estudo como tarefa de não-habilidade, se deve em função do seu caráter automatizado, de baixa complexidade e relativa similaridade cinemática em relação ao movimento de habilidade do alcance (utilizado nos animais que realizaram a tarefa de habilidade), mas que está inserido em um contexto comportamental diferente (HERMER-VAZQUEZ et al., 2004). A velocidade utilizada foi de 1,8 m/min, sendo esta, a menor velocidade permitida pela esteira. Essa velocidade mínima foi determinada pelos autores a fim de limitar possíveis efeitos do condicionamento aeróbico sobre as variáveis estudadas, servindo apenas como um estímulo ao movimento da marcha (PAGNUSSAT, 2009).



Figura 8. Esteira motorizada empregada para a realização da tarefa de não-habilidade (modificado de CECHETTI, 2007).

3.4 Avaliação comportamental

3.4.1 Teste do “Staircase”

O teste *Staircase* possibilita a avaliação quantitativa da habilidade funcional do animal, exigindo que o mesmo exerça um controle motor preciso do membro anterior a fim de apanhar esferas comestíveis (Fig. 9) (MONTROYA et al., 1991; PAGNUSSAT et al., 2009).

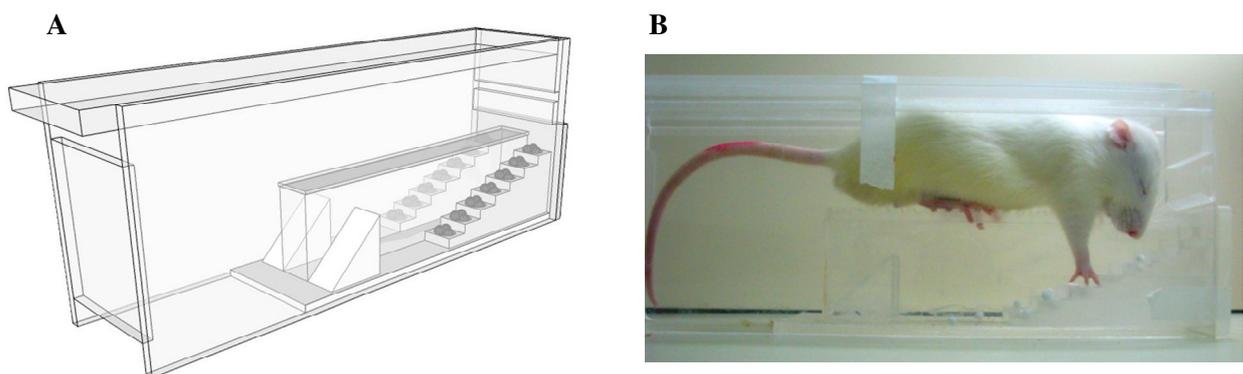


Figura 9. Teste do *Staircase*. (A) ilustração da caixa utilizada para o teste; (B) representação da posição do animal na caixa para o teste do *Staircase* (modificado de PAGNUSSAT et al., 2009).

Este teste tem sido utilizado para buscar estabelecer correlações entre o déficit funcional e a área de lesão, seja essa isquêmica (WINDLE et al., 2006) ou hemorrágica (MACLELLAN et al.,

2006), assim como para avaliar o desempenho motor após estratégias de reabilitação (BIERNASKIE & CORBETT, 2001; BIERNASKIE et al., 2004; BIERNASKIE et al., 2005).

Cada caixa para o teste do *Staircase* contém sete degraus, com espaço para três esferas comestíveis em cada degrau (Glóbulos Inertes nº 7 - 4,6 mm; 65 mg \pm 10%; Farmacopéia Brasileira Homeopática – Brasil). É necessário que o rato suba em uma plataforma central para que possa alcançar as esferas localizadas na escada. A mesma fica disposta em ambos os lados do animal, possibilitando que o mesmo consiga apanhá-las somente com o membro anterior ipsilateral à mesma. O número de esferas apanhadas (total de 21 esferas de cada lado) é usado para quantificar a habilidade de preensão do membro anterior (MONTROYA et al., 1991) tendo sido estabelecido um critério de inclusão de pelo menos 14 esferas apanhadas e consumidas na média dos 4 *trials* da avaliação pré-cirurgia.

3.4.2 Teste da escada horizontal

O teste da escada horizontal tem sido empregado para avaliar a coordenação e a habilidade na execução da marcha, principalmente em estudos que envolvem danos ao SNC, como por exemplo, na HIC e nas alterações do envelhecimento, possibilitando a avaliação dos erros de colocação dos membros anteriores que ocorrem durante a marcha de roedores (METZ & WHISHAW, 2002). O aparato para a realização do referido teste consiste em duas paredes de acrílico transparente (1 m de largura por 20 cm de altura) e traves de metal (3 mm de diâmetro cada) que são inseridas inferiormente, entre as paredes, com uma distância mínima de 1cm entre elas, caracterizando, assim, a forma que confere o nome de escada horizontal ao teste (Fig. 10). A escada permanece elevada 30 cm do solo, existindo um refúgio escuro para o animal ao final da sua extensão. A largura do aparato é ajustada ao tamanho do animal, permanecendo cerca de 1cm mais larga que o mesmo, de modo a evitar que o animal caminhe em torno de si ou vire-se no sentido contrário ao teste (METZ & WHISHAW, 2002).

A dificuldade do teste pode ser modificada pela variação na posição das traves de metal. Um padrão regular das traves permite que o animal aprenda a posição das mesmas ao longo de várias sessões de treino, e dessa forma, antecipe a colocação dos membros. Modificando-se esse padrão regular para um padrão irregular, entre as diferentes tentativas, prevenimos o aprendizado do animal quanto à pré-localização da distribuição das traves. Na forma de arranjo regular (utilizada nas sessões de aclimatação), as traves eram espaçadas em intervalos de dois centímetros. Para o padrão irregular (utilizado nas avaliações), as traves eram espaçadas em intervalos de um a cinco centímetros. Ao total, foram utilizadas cinco distribuições irregulares diferentes, porém as

mesmas distribuições foram empregadas para todos os animais com a finalidade de padronizar a dificuldade do teste e aumentar a comparabilidade dos resultados. Todas as sessões de avaliação (3 *trials* por animal em cada avaliação) foram filmadas e a mensuração do desempenho foi realizada por meio da análise do número de erros, expressa em percentual de erros (MACLELLAN et al., 2006). A padronização dos movimentos que configuram erros ou acertos foi realizada conforme escala previamente descrita, a qual, resumidamente, apresenta 7 tipos de situações (6 formas de erros e 1 acerto) (METZ & WHISHAW, 2002; MACLELLAN et al., 2006).

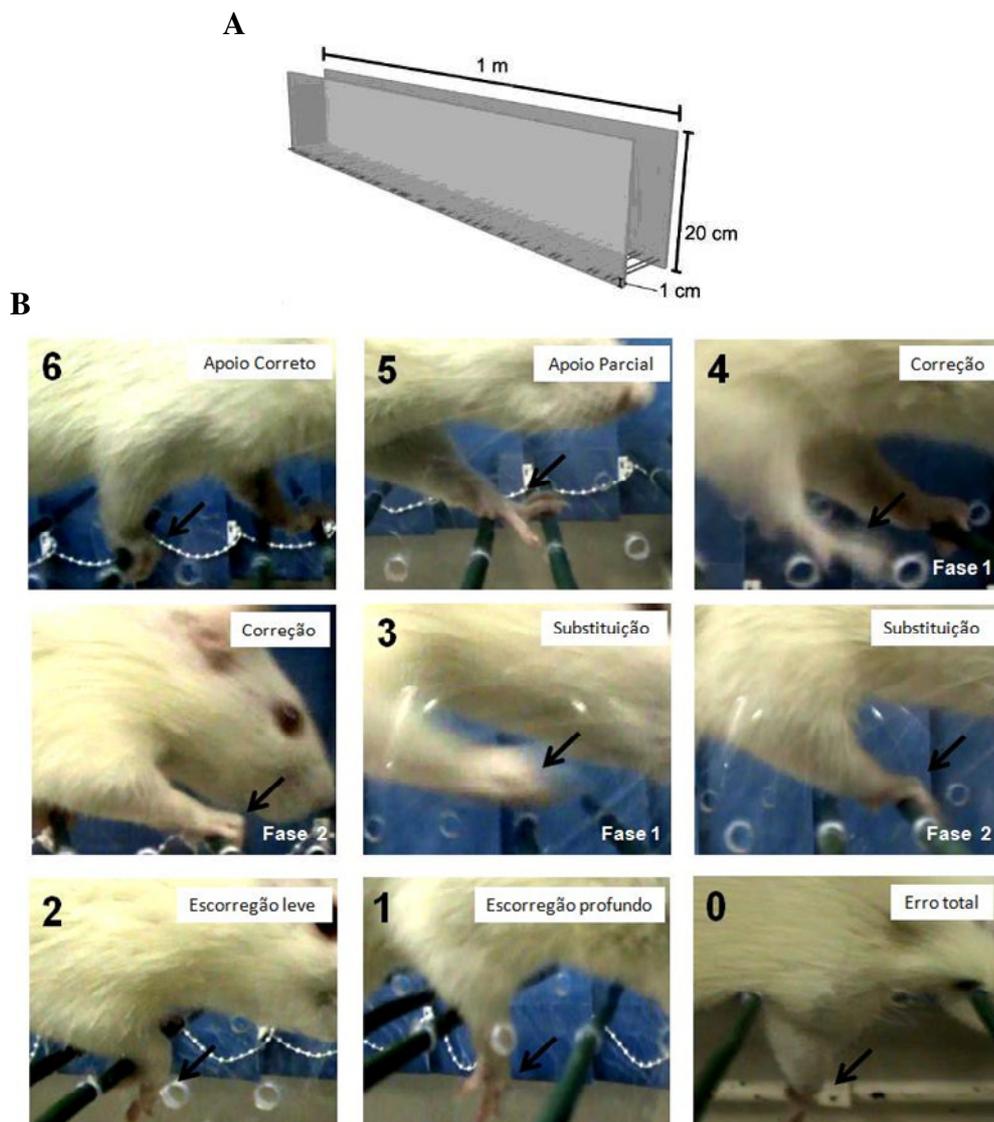


Figura 10. Teste da escada horizontal. (A) ilustração do aparato utilizado para a realização do teste da escada horizontal (adaptado de METZ & WHISHAW, 2002). (B) escore de contagem de erros: 0- erro total; 1- escorregão profundo; 2- escorregão leve; 3- substituição; 4- correção; 5- colocação parcial; 6- colocação correta (acerto). Fonte: o autor.

3.4.3 Teste do cilindro

O teste do cilindro visa avaliar o uso assimétrico dos membros anteriores durante a realização de uma tarefa de exploração e suporte corporal (SCHALLERT et al., 2006; WOODLEE et al., 2005; MACLELLAN et al., 2006). Para tanto, os animais foram colocados no interior de um cilindro acrílico de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura, situado sobre um tampo de mesa de vidro (Fig. 11). Após, foi realizada a filmagem de cada animal, individualmente (durante 5-6 minutos), através de um espelho angulado (vista inferior do animal) de modo a possibilitar a observação dos movimentos exploratórios espontâneos dos mesmos. O número de contatos dos membros anteriores com as paredes do cilindro, utilizadas para o suporte corporal durante a exploração, foi computado e os animais que não realizassem pelo menos 12 contatos exploratórios independentes eram excluídos da análise. Para a realização deste teste os animais não foram aclimatados, visto que uma maior exploração por parte do animal pode tornar o mesmo mais fidedigno quanto aos resultados.

A quantificação do uso assimétrico dos membros anteriores foi realizada com base na análise das imagens filmadas em câmera lenta e quadro por quadro (feita por avaliador cego quanto aos grupos experimentais), sendo, posteriormente calculado por meio da fórmula: $[(\text{contatos realizados com o membro anterior contralateral} + \frac{1}{2} \text{ dos contatos bilaterais}) / \text{número total dos contatos realizados com ambos os membros anteriores} \times 100]$ (MACLELLAN et al., 2006).

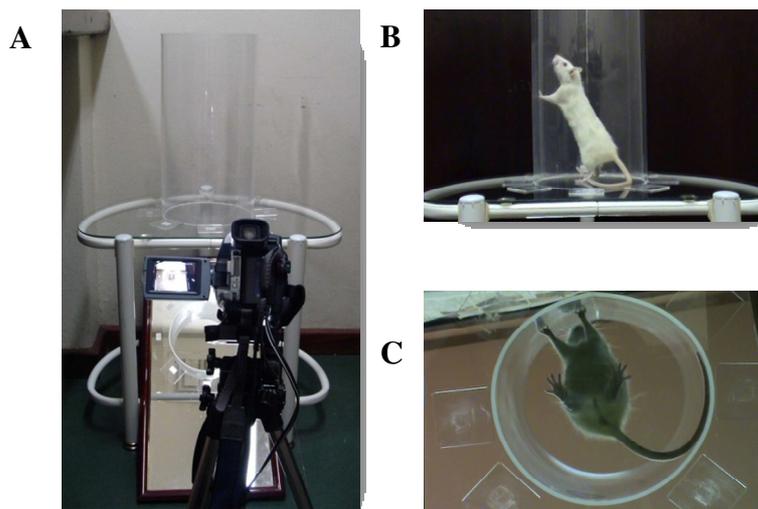


Figura 11. Teste do cilindro. (A) aparato para a realização do teste; (B) vista lateral de animal realizando a exploração; (C) vista inferior do mesmo, utilizada para a análise das imagens (adaptado de PAGNUSSAT, 2009).

3.5 Análise morfológica

3.5.1 Perфуsão

Depois de finalizados os testes comportamentais, os animais foram submetidos aos protocolos histológicos e imunoistoquímicos, como rotineiramente realizado por uma série de estudos relacionados (GHARBAWIE et al., 2005; MACLELLAN et al., 2006; DERKSEN et al., 2007). Para tanto, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral (30%, 10mL/Kg) pela via intra-peritoneal, sendo realizado, posteriormente, a toracotomia com exposição do coração. A seguir, foram injetadas 1000 UI de heparina sódica (Cristália) no ventrículo esquerdo, e por meio de uma incisão neste mesmo ventrículo se inseriu uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (Control Company). Após uma segunda incisão, desta vez, no átrio direito, foi perfundida, inicialmente, uma solução salina (150 ml), para lavagem da árvore vascular e, posteriormente, uma solução fixadora (200 ml) composta de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4. Após esse procedimento, os encéfalos foram retirados por meio da abertura da calota craniana sendo pós-fixados na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão, por mais 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, eles foram crioprottegidos pela imersão em sacarose 30% diluída em TF a 4°C, onde permaneceram até submergirem. Depois de realizar a crioproteção, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido até a realização das secções (40 µm) em criostato (Leitz).

3.5.2 Volume da lesão

Para a avaliação histológica do volume da lesão, foram selecionadas secções a cada 200 µm, iniciando em Bregma +1,7 mm e terminando em Bregma -4,8 mm (PAXINOS & WATSON, 2004; MACLELLAN, 2006). Depois disso, esses cortes foram corados com a técnica de hematoxilina-eosina. Para tanto, os mesmos foram hidratados e levados à solução de hematoxilina de Mayer por 3 minutos, sendo, posteriormente, lavados em água corrente por pelo menos 20 minutos. Em seguida, os cortes foram levados à solução de eosina a 0,5%, no período de 15 segundos a 1 minuto, com retirada do excesso de Eosina por meio de diversas imersões em álcool 95%. Transcorrido estes procedimentos, deu-se início o processo de desidratação (duas imersões em álcool absoluto, uma imersão em carboxilol, e, por fim uma imersão em xilol). Em seguida, as lâminas foram montadas e cobertas por bálsamo do Canadá e lamínulas.

Ao final do referido processamento histológico, as lâminas foram escaneadas em resolução de 1200 dpi sendo o volume da lesão e atrofia tecidual calculado utilizando o software *Scion Image J 4.0* (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) e as seguintes equações, como previamente descrito (DeBOW et al., 2003; MAcLLELAN et al., 2004):

$$\mathbf{VH = M \times IS \times NS, \text{ onde:}}$$

VH = volume de um hemisfério;

M = (área total da secção coronal do hemisfério – área do ventrículo – área do dano);

IS = intervalo entre secções;

NS = número de secções.

$$\mathbf{VPT = VRHN - VRHL, \text{ onde:}}$$

VPT = volume de perda tecidual;

VRHN = volume remanescente do hemisfério normal;

VRHL = volume remanescente do hemisfério lesado.

3.5.3 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência (*free-floating*) foi realizada utilizando-se secções que continham áreas de representação cortical sensório-motoras do membro anterior e do estriado dorsolateral. Resumidamente, as mesmas foram fixadas em PFA 4%, lavadas em PBS e, após, bloqueadas por 30 min em uma solução contendo 3% de soro normal de cabra (NGS) (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS Triton-X à 0,3% (PBS-Tx) em temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário (anti-GFAP 1:200, Sigma-Aldrich) diluído em PBS-Tx e NGS e mantidas em câmara fria (4°C) sob constante agitação. No dia seguinte, as secções foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente (1:500, *anti-rabbit* IgG Alexa 488, Molecular Probes) diluído em PBS-Tx e NGS por 2 horas em uma sala escura (temperatura ambiente), seguida de lavagem em PBS. Depois disso, os cortes foram montados em lâminas, cobertos com meio de montagem PVA-DABCO (Fluka Analytical) e lamínulas. Para o controle negativo, alguns cortes tiveram a exposição ao anticorpo primário omitida, sendo o mesmo substituído por PBS-Tx durante a realização do protocolo descrito. Todas as amostras foram processadas concomitantemente e incubadas durante o mesmo tempo médio.

Decorrido o procedimento acima descrito, utilizou-se um microscópio confocal (Olympus FV1000) para a visualização das marcações fluorescentes (excitação no comprimento de onda 488 nm) de modo que foram obtidas 12 imagens de eixo-z (x: 317,60 μm ; y: 317,60 μm ; z: 30 μm) por animal (sendo 3 eixos-z do córtex sensorio-motor e 3 eixos-z do estriado em cada hemisfério) obtidos a partir de 3 fatias escolhidas ao acaso.

3.5.4 Densidade numérica dos astrócitos GFAP+

A densidade numérica dos astrócitos GFAP+ no córtex sensorio-motor e estriado dorsolateral foi estimada, selecionando-se uma área de interesse (AOI) medindo 2993,14 μm^2 sobre a imagem resultante da sobreposição das fatias obtidas em eixo-z (aumento de 40X, profundidade padronizada em 30 μm). Dessa forma, os astrócitos localizados dentro da AOI ou que faziam intersecção com as margens inferior e lateral à esquerda eram contabilizados, enquanto que os astrócitos localizados na intersecção das margens superior e lateral à direita eram excluídos da contagem. Durante este processo, os artefatos óbvios e as células que não pudessem ser claramente definidas eram excluídos da análise. Nos casos de dificuldade observacional por sobreposição celular aparente, realizou-se a conferência da seqüência de imagens obtidas ao longo do eixo-z, de modo a minimizar possíveis erros de estimativa. A estimativa da densidade de astrócitos GFAP+ foi realizada por meio da modificação de equação estereológica previamente descrita (HOWELL et al., 2002):

$$DA = (nAST / VOI), \text{ onde:}$$

DA = densidade dos astrócitos GFAP+;

nAST = número total de astrócitos presentes no volume de interesse;

VOI = volume de interesse (obtido pela área da AOI x profundidade total do eixo z).

3.5.5 Análise morfológica dos astrócitos

A análise morfológica dos astrócitos foi realizada utilizando uma adaptação do método dos círculos concêntricos de Sholl, conforme previamente descrito (SHOLL, 1953; VIOLA et al., 2009). Para tanto, 15 astrócitos de cada animal (3 secções, 5 astrócitos por imagem) que se encontravam presentes dentro da mesma AOI utilizada para a estimativa de densidade celular foram avaliados. Nesse sentido, evitou-se a escolha daqueles sobrepostos ou que não se

encontravam bem definidos. Resumidamente, sete círculos virtuais, dispostos concentricamente em intervalos regulares de 2 μm foram dispostos sobre cada astrócito de interesse e o número de intersecções dos processos astrocitários com cada círculo virtual foi quantificado nos quadrantes dorsal, ventral, medial e lateral. A quantificação do comprimento dos processos primários foi realizada iniciando em sua origem no soma e se estendendo em direção aos diferentes quadrantes citados. O prolongamento primário mais longo de cada quadrante e aqueles que eram mais longos que a circunferência total dos círculos foram mensurados manualmente utilizando a ferramenta virtual de traçado, disponível no software Image Pro-Plus 6.0.

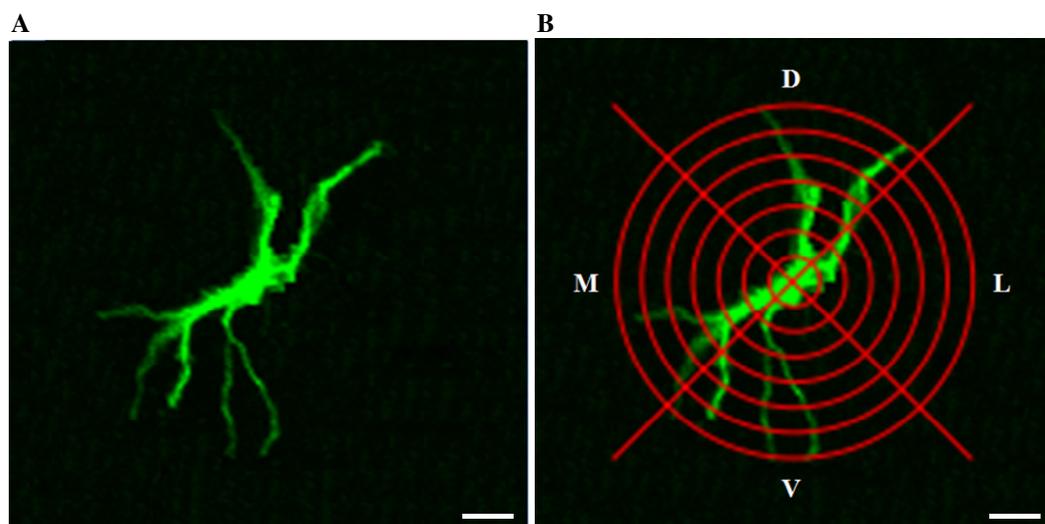


Figura 12. Imagem ilustrativa de um astrócito GFAP+ antes e após a colocação dos círculos concêntricos de Sholl (em vermelho). (A) astrócito GFAP+; (B) astrócito GFAP+ sobreposto pelos círculos concêntricos de Sholl. D: dorsal; V: ventral; M: medial; L: lateral. Barra: 4 μm . Fonte: o autor.

3.6 Análise estatística

No presente estudo, todas as avaliações morfológicas e comportamentais foram realizadas por experimentadores cegos quanto aos grupos experimentais.

Inicialmente, a normalidade dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov, de modo que todas as variáveis estudadas apresentaram distribuição normal ($P > 0,05$). Após esse procedimento, o desempenho dos animais nos diferentes testes comportamentais foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas e os dados relacionados aos aspectos morfológicos foram analisados por meio da ANOVA de duas vias.

Sempre que apropriado, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi empregado em todas as análises realizadas. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Quanto ao “n”, todos os animais incluídos no estudo foram utilizados para as análises comportamentais (n=60) estando os mesmos divididos entre os grupos experimentais conforme descrito anteriormente. Já para a análise morfológica, foram utilizados 30 encéfalos, provenientes dos mesmos animais empregados na análise comportamental, os quais foram divididos igualmente entre os diferentes grupos (5 encéfalos/grupo).

O software SPSS 8.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA) foi utilizado para a análise dos dados.

4 RESULTADOS

Todos os animais submetidos à HIC apresentaram características comportamentais compatíveis com o sucesso cirúrgico, o que inclui uma vigorosa adução do membro anterior contralateral à lesão, assim como uma rotação espontânea em direção ao hemisfério contralateral quando seguros pela cauda (ROSEMBERG et al., 1990; MACLELLAN et al., 2006).

4.1 Volume da lesão

O dano ocasionado pela HIC geralmente incluiu o estriado dorsolateral, entretanto, alguns animais apresentaram danos adicionais ao globo pálido e corpo caloso 4 semanas após o referido insulto (Fig. 13 A). A ANOVA de duas vias demonstrou efeitos significativos somente quanto ao fator “cirurgia” (que inclui os níveis HIC e *sham*) ($F_{(2,30)} = 1504,19$, $P < 0,001$). Após, o teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferenças somente quando os grupos sham eram comparados com os grupos HIC ($P < 0,001$) (Fig. 13 B).

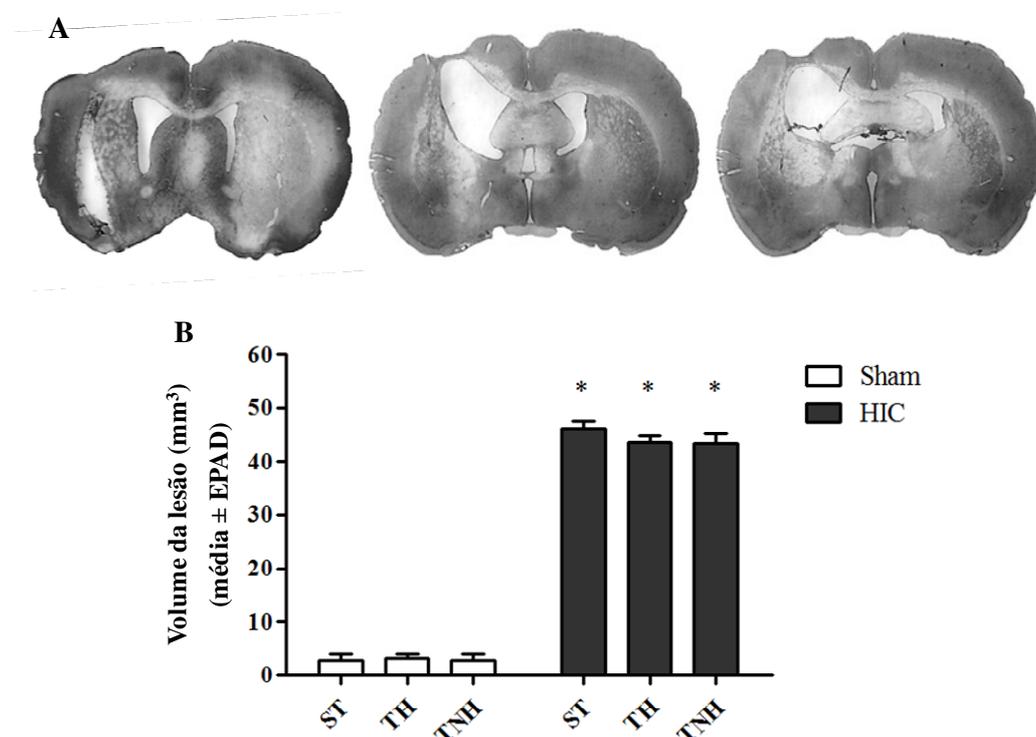


Figura 13. Volume da lesão 4 semanas após a cirurgia. (A) fotomicrografias encefálicas de um animal submetido à HIC. (B) gráfico demonstrando o volume tecidual perdido 4 semanas após a cirurgia em animais sham e ICH. * diferença entre os grupos sham e HIC (independentemente da tarefa realizada) ($P < 0,001$). EPAD: Erro padrão.

4.2 Teste do Staircase

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos relacionados ao fator “tempo” (sessões de avaliações) ($F_{(5,60)} = 124,06, P < 0,001$), além de interações significativas entre os fatores “tempo” x “cirurgia” ($F_{(5,60)} = 70,36, P < 0,001$) e “tempo” x “cirurgia” x “tarefa” ($F_{(10,60)} = 2,17, P < 0,03$). Todos os animais submetidos à HIC apanharam menos glóbulos comestíveis do que os animais *sham* desde o pós-operatório à semana 4, independentemente da tarefa realizada ($P < 0,003$). Diferenças significativas também foram encontradas entre os grupos HIC-TH e HIC na semana 2 ($P < 0,03$), semana 3 ($P < 0,01$) e semana 4 ($P < 0,001$). Adicionalmente, diferenças entre os grupos HIC-TH e o grupo HIC-TNH foram evidenciadas nas avaliações da semana 3 e semana 4 ($P < 0,04$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais *sham* independentemente da tarefa realizada ($P > 0,08$) (Fig. 14A).

Em relação ao membro ipsilateral à lesão os animais submetidos à HIC não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos animais *sham*, não tendo sido evidenciado nenhum efeito das tarefas propostas ($P > 0,08$) (Fig. 14B).

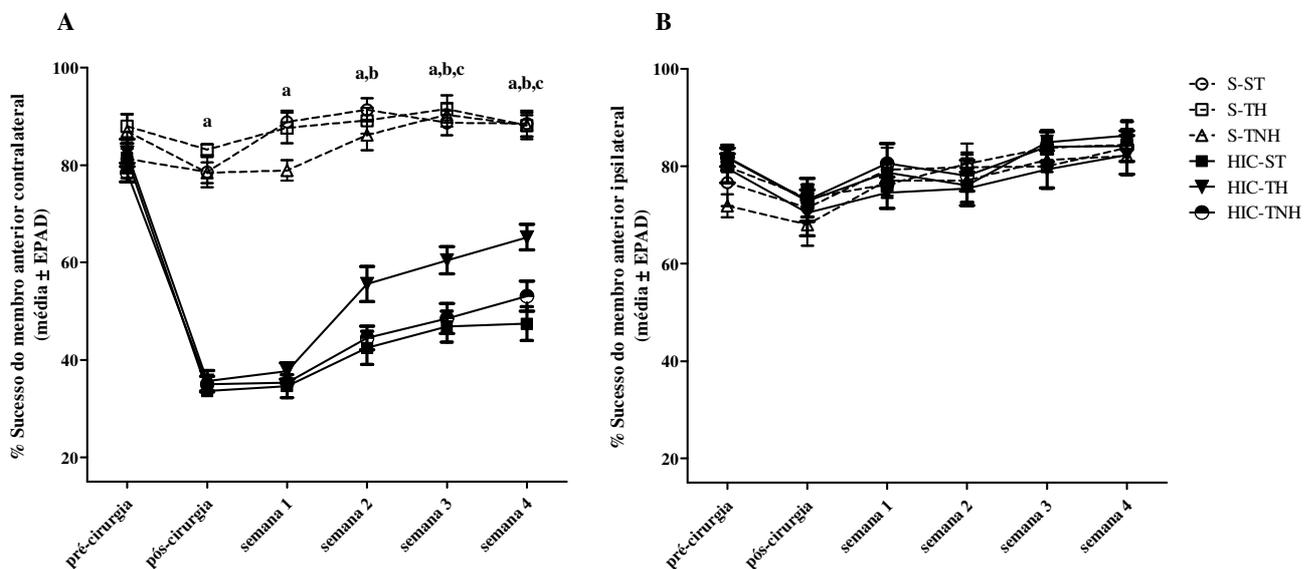


Figura 14. Sucesso (%) do alcance e preensão no teste do *staircase*. (A) membro anterior contralateral à injeção estereotáxica; (B) membro anterior ipsilateral à injeção estereotáxica. “a”: diferença entre todos os grupos *sham* e HIC ($P < 0,001$); “b”: diferença entre os grupos HIC-TH e HIC-ST ($P < 0,001$); “c”: diferença entre os grupos HIC-TH e HIC-TNH ($P < 0,04$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos *sham* ($P > 0,06$), assim como em relação ao desempenho com o membro ipsilateral à injeção estereotáxica. EPAD: Erro padrão.

4.3 Teste do Cilindro

Em relação ao teste do cilindro a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos do “tempo” ($F_{(2,60)} = 275,18$, $P < 0,001$) além da interação entre os fatores “tempo” x “cirurgia” ($F_{(2,60)} = 260,83$, $P < 0,001$), “tempo” x “tarefa” ($F_{(4,60)} = 5,86$, $P < 0,001$) e “tempo” x “cirurgia” x “tarefa” ($F_{(4,60)} = 7,02$, $P < 0,001$). Após, os testes de comparações múltiplas evidenciaram diferenças na avaliação pós-operatória somente entre os grupos *sham* e HIC ($P < 0,001$) demonstrando que nenhum dos grupos, tanto os submetidos à HIC quanto os animais *sham*, apresentavam melhor desempenho motor antes do início do treinamento das tarefas propostas. Já na avaliação pós-treinamento (semana 4) o grupo HIC-TH apresentou uma maior simetria no uso exploratório dos membros anteriores quando comparado aos grupos HIC ($P < 0,03$) e HIC+TNH ($P \leq 0,001$). (Fig. 15)

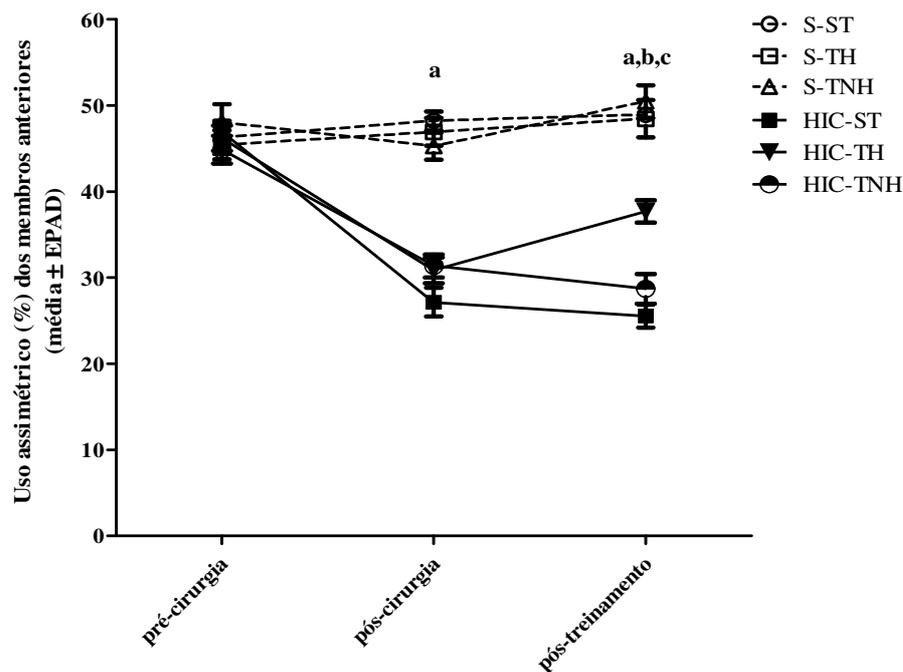


Figura 15. Uso assimétrico dos membros anteriores no teste do cilindro. (a) diferença entre todos os grupos *sham* e HIC ($P < 0,001$); (b) diferença entre os grupos HIC-TH e HIC ($P < 0,01$); (c) diferença entre os grupos HIC-TH e HIC-TNH ($P < 0,03$). Não foram evidenciadas diferenças relacionadas às tarefas motoras na comparação entre todos os grupos *sham* ($P > 0,8$). EPAD: Erro padrão.

4.4 Teste da escada horizontal

A análise do teste da escada horizontal para o membro contralateral à injeção estereotáxica revelou efeitos significantes do fator “tempo” ($F_{(5,60)} = 31,54, P < 0,001$) além da interação entre os fatores “tempo” x “cirurgia” ($F_{(5,60)} = 12,33 P < 0,001$). Os testes de comparações múltiplas demonstraram que todos os grupos HIC tiveram mais erros na colocação do referido membro quando comparado com os grupos *sham*, desde a avaliação pós-operatória à semana 4 ($P < 0,05$), de forma independente à tarefa realizada. Entretanto, diferenças entre os grupos HIC+TH e HIC-ST foram encontradas nas semanas 3 e 4 ($P < 0,03$), assim como entre os grupos HIC+TH e HIC-TNH na semana 4 ($P < 0,02$). Nenhuma diferença foi evidenciada em relação aos grupos *sham* (Fig. 16A).

Em relação ao membro anterior ipsilateral à lesão não existiram diferenças em relação aos grupos experimentais. (Fig. 16B).

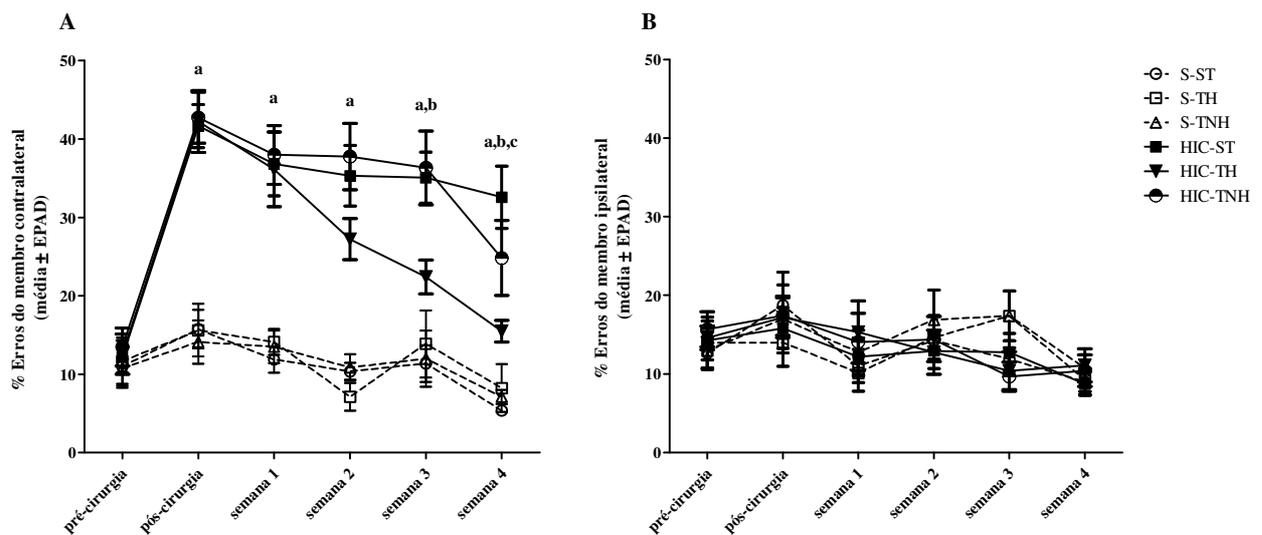


Figura 16. Erros de colocação dos membros anteriores no teste da escada horizontal. (A) membro anterior contralateral; (B) membro anterior ipsilateral. “a”: diferença entre todos os grupos *sham* e HIC ($P < 0,05$); “b”: diferença entre os grupos HIC-TH e HIC-ST ($P < 0,03$); “c”: diferença entre os grupos HIC-TH e HIC-TNH ($P < 0,02$). Não foram evidenciadas diferenças entre os grupos em relação ao membro ipsilateral à injeção estereotáxica. EPAD: Erro padrão.

4.5 Morfologia dos astrócitos GFAP+

As imagens referentes aos astrócitos GFAP+ marcados pela técnica de imunofluorescência são demonstradas abaixo (Fig. 17 e 18).

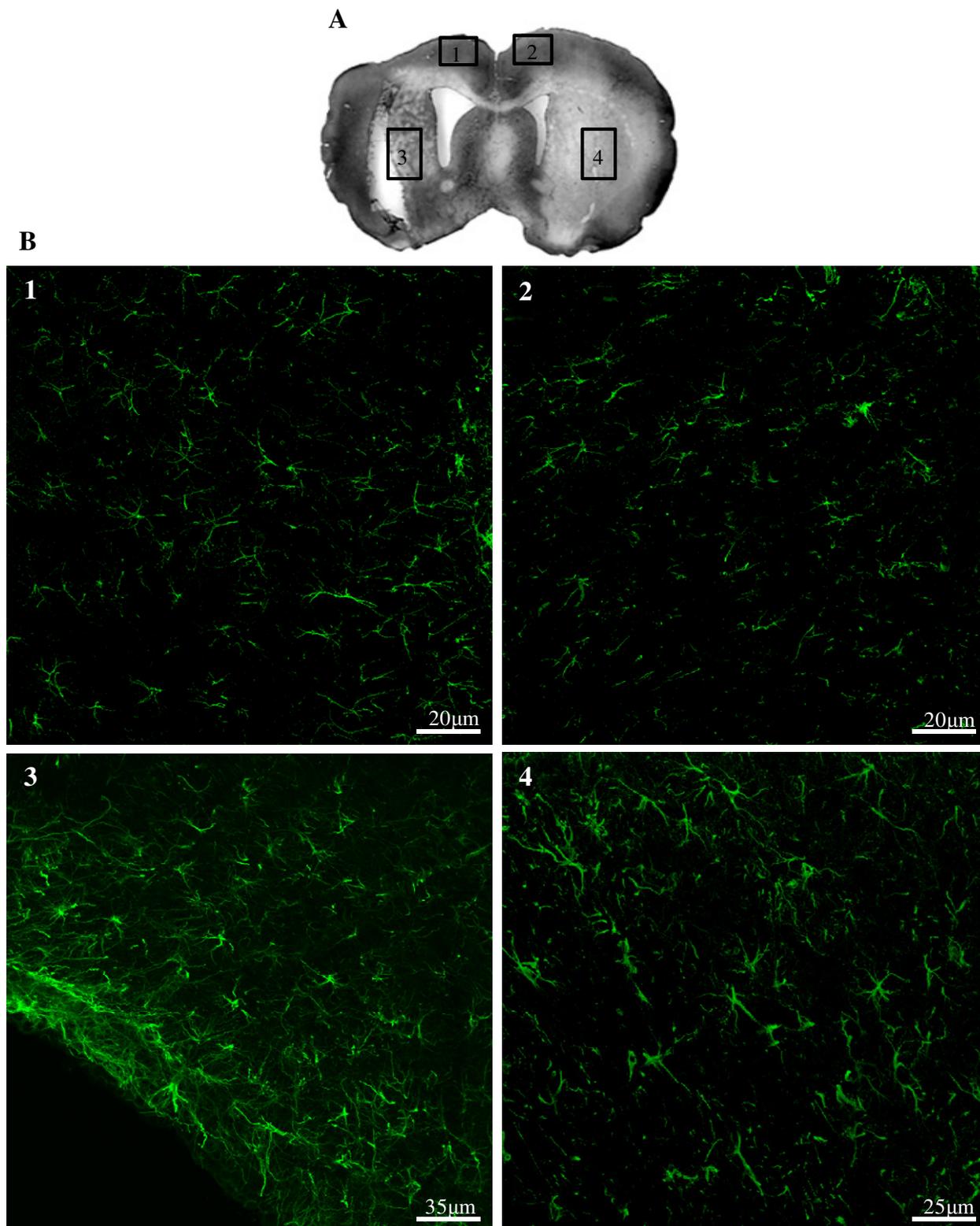


Figura 17. Representação das diferentes regiões encefálicas de interesse. (A) fotomicrografia demonstrando as regiões de interesse; (B) marcação imunofluorescente de astrócitos GFAP+ (verde) nas regiões estudadas. “1”: córtex sensório-motor ipsilateral à injeção estereotáxica; “2”: córtex sensório-motor contralateral à injeção estereotáxica; “3”: estriado dorsolateral ipsilateral à injeção estereotáxica; “4”: estriado contralateral à injeção estereotáxica.

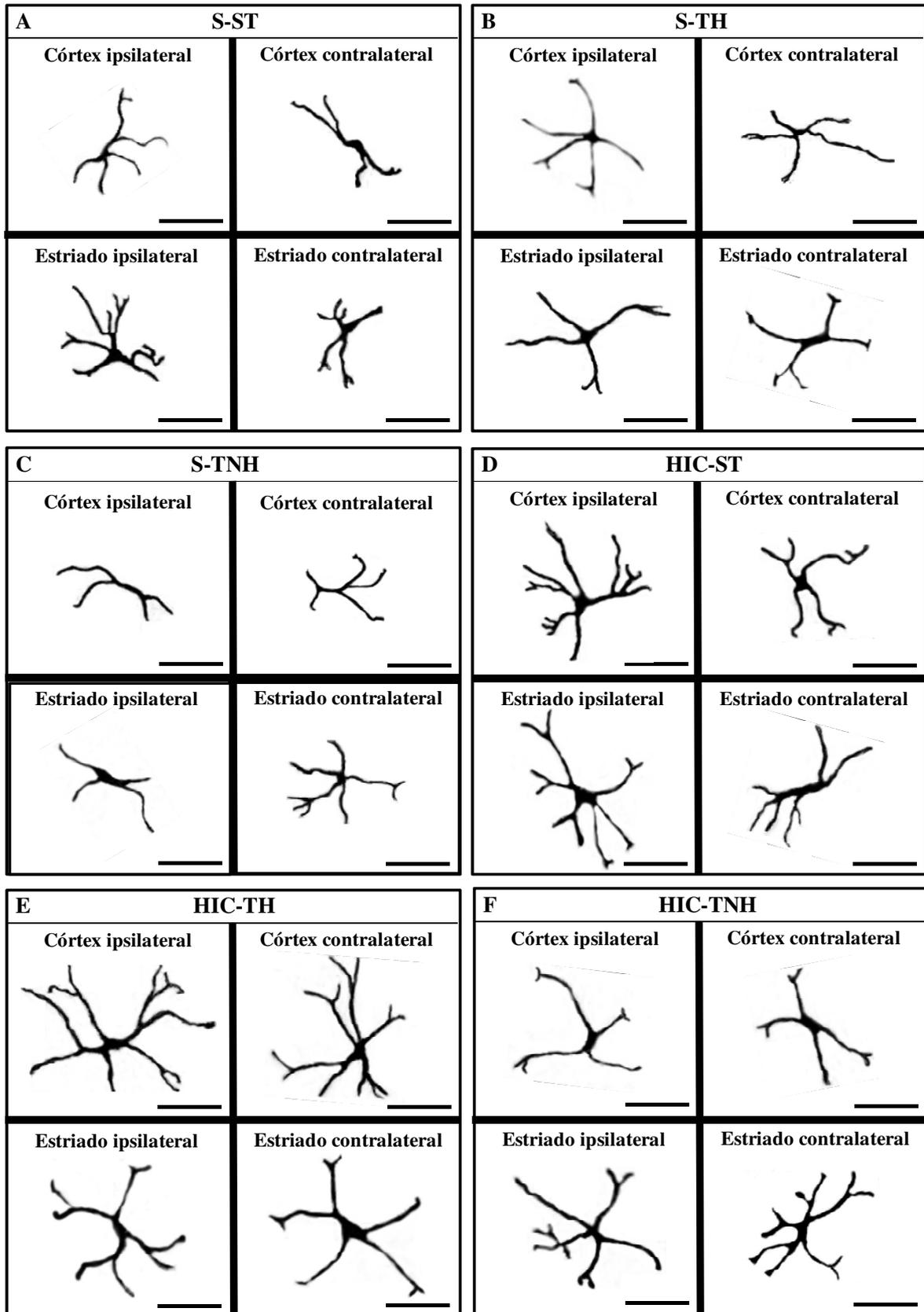


Figura 18. Representação de astrócitos GFAP+ isolados a partir das regiões de interesse nos diferentes grupos experimentais. (A) S-ST; (B) S-TH; (C) S-TNH; (D) HIC-ST; (E) HIC-TH; (F) HIC-TNH. Barra: 13 μ m.

4.5.1 Densidade de astrócitos GFAP+

A análise da densidade de astrócitos GFAP+ revelou uma interação entre os fatores “tipo de treinamento” x “cirurgia” em diversas estruturas encefálicas tais como o estriado dorsolateral adjacente à injeção estereotáxica ($F_{(2,30)} = 963,94$ $P < 0,001$), estriado contralateral à mesma ($F_{(2,30)} = 640,69$ $P < 0,001$), córtex sensório-motor ipsilateral ($F_{(2,30)} = 595,49$ $P < 0,001$) e contralateral ($F_{(2,30)} = 500,29$ $P < 0,001$) à referida injeção. Entretanto, não foram evidenciados efeitos de nenhuma das tarefas propostas sobre a densidade astrogliar ($P > 0,4$) nos testes de comparações múltiplas. Como demonstrado abaixo (Fig. 19) todos os grupos submetidos à HIC tiveram mais astrócitos GFAP+ por volume tecidual do que os grupos *sham* ($P < 0,04$) em todas as regiões estudadas.

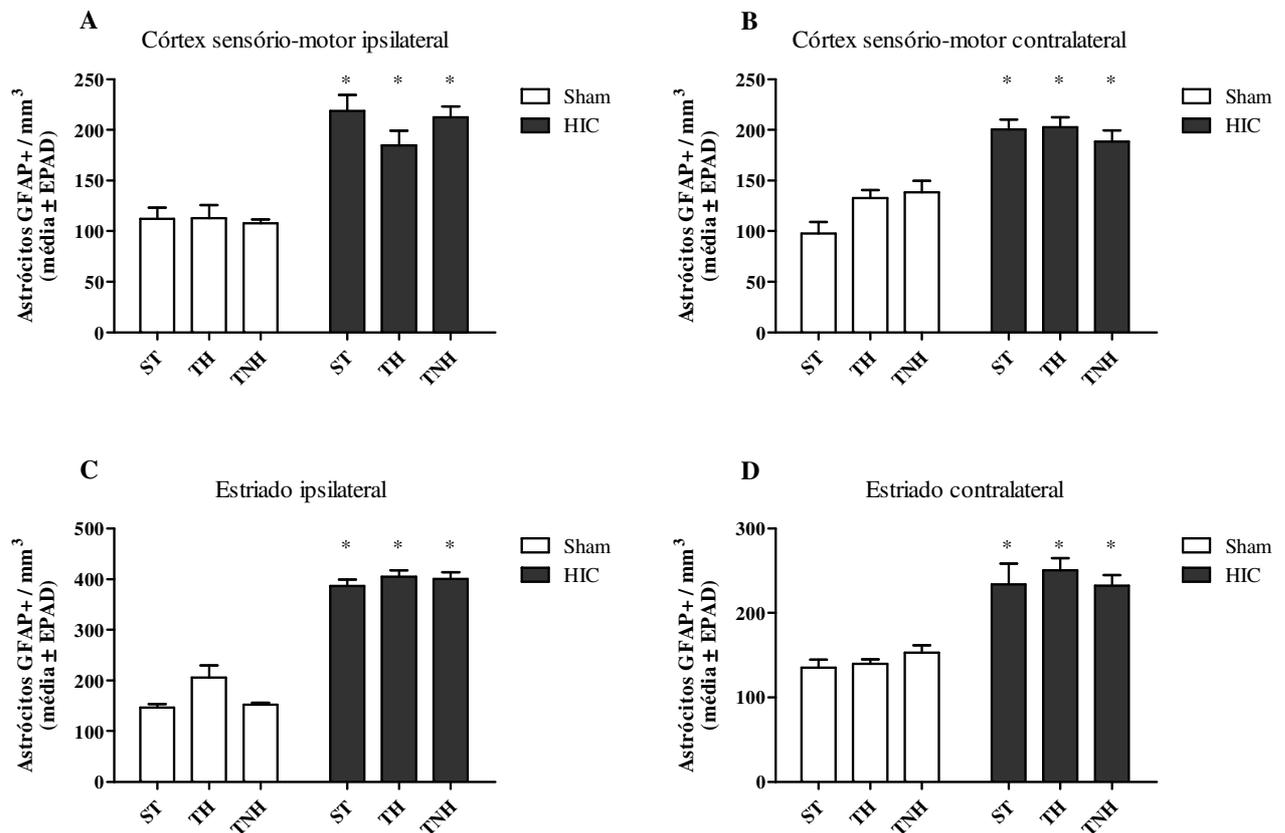


Figura 19. Densidade de astrócitos GFAP+ / mm³. (A) córtex sensório-motor ipsilateral à injeção estereotáxica; (B) córtex sensório-motor contralateral à injeção estereotáxica; (C) estriado ipsilateral à injeção estereotáxica; estriado contralateral à injeção estereotáxica; (D) estriado contralateral à injeção estereotáxica. “*”: diferença entre todos os grupos *sham* e HIC ($P < 0,05$). EPAD: Erro padrão.

4.5.2 Número de processos primários

A contagem do número de processos por astrócito GFAP+ demonstrou diferenças somente no córtex ipsilateral à injeção ($F_{(2,30)} = 7,54$ $P < 0,003$). Nessa região, todos os grupos submetidos à HIC apresentaram um maior número de processos primários por astrócito do que o grupo S ($P < 0,05$). Não foram identificados efeitos relacionados às tarefas motoras empregadas, tampouco diferenças adicionais entre os grupos nas demais regiões estudadas ($P > 0,2$).

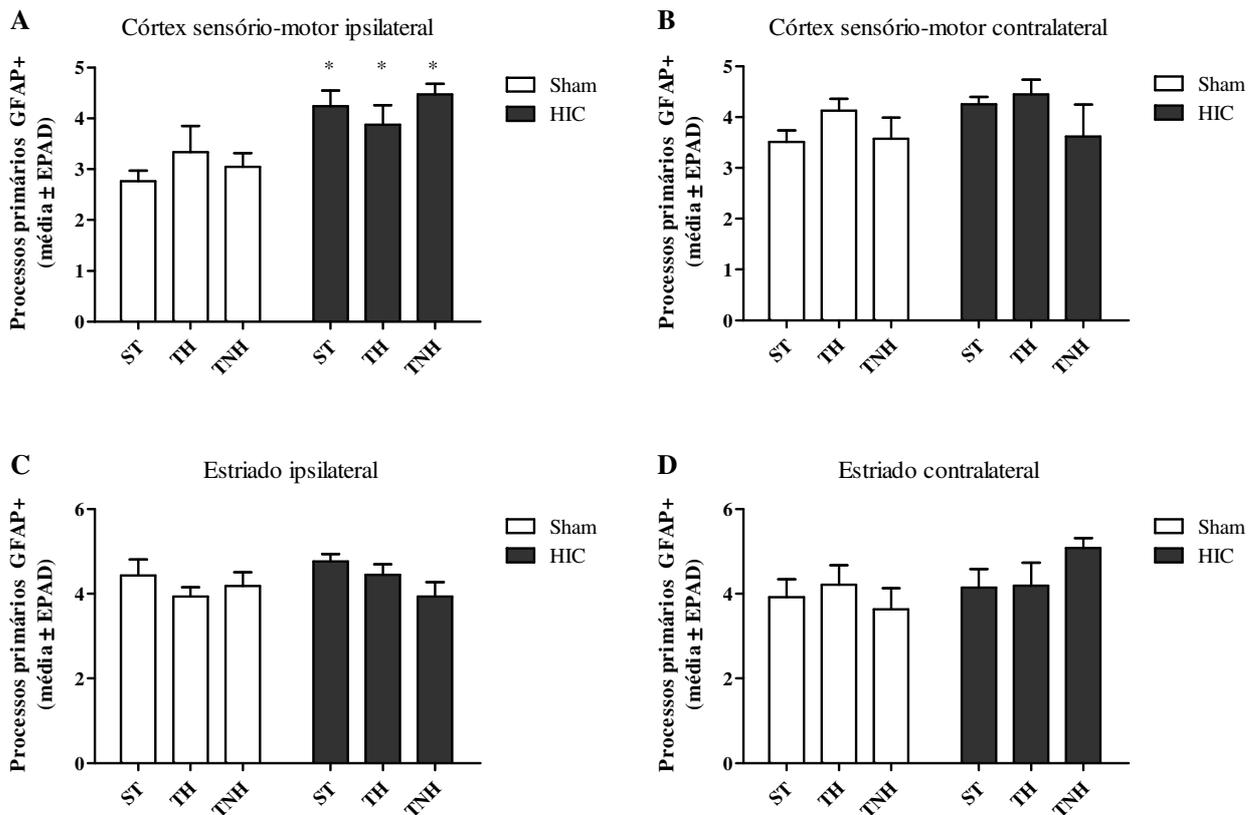


Figura 20. Número de processos primários por astrócito GFAP+. (A) córtex sensório-motor ipsilateral à injeção estereotáxica; (B) córtex sensório-motor contralateral à injeção estereotáxica; (C) estriado ipsilateral à injeção estereotáxica; estriado contralateral à injeção estereotáxica; (D) estriado contralateral à injeção estereotáxica. * diferença entre o grupo S-ST e os demais grupos submetidos à HIC ($P < 0,05$). EPAD: Erro padrão.

4.5.3 Comprimento médio dos processos primários GFAP+

O comprimento dos processos primários foi avaliado no córtex sensório-motor e estriado dorsolateral (bilateralmente). Dessa forma, os resultados foram separados por região com o intuito de facilitar a interpretação dos mesmos.

4.5.3.1 Córtex sensório-motor

No córtex sensório-motor ipsilateral à injeção estereotáxica foram encontradas diferenças em relação aos fatores “cirurgia” ($F_{(2,30)} = 17,92$ $P < 0,001$) e “tarefa” ($F_{(4,30)} = 9,406$ $P < 0,001$), não sendo, no entanto, observadas interações entre os referidos fatores ($F_{(4,30)} = 0,71$ $P < 0,58$). Os testes de comparações múltiplas evidenciaram que os astrócitos do grupo S-TH possuíam maior comprimento dos processos primários, quando comparado com os grupos S ($P < 0,001$) e S-TNH ($P < 0,001$). Já o grupo HIC-TH apresentou processos mais longos do que todos os demais grupos experimentais ($P < 0,02$). (Fig. 21 A).

Já em relação ao córtex sensório-motor contralateral à injeção estereotáxica também foram encontradas diferenças em relação aos fatores “cirurgia” ($F_{(2,30)} = 14,38$ $P < 0,01$) e “tarefa” ($F_{(4,30)} = 9,50$ $P < 0,01$). Assim como no córtex ipsilateral, não foram observadas interações entre os referidos fatores ($F_{(4,30)} = 0,37$ $P > 0,8$). Os testes de comparações múltiplas evidenciaram que os astrócitos do grupo S-TH também possuíam maior comprimento dos processos primários, quando comparado com os grupos S e S-TNH ($P < 0,01$). Da mesma maneira, o grupo HIC-TH apresentou processos mais longos do que todos os demais grupos experimentais ($P < 0,05$) (Fig. 21 B) o que demonstra um padrão de resposta bastante homogêneo em ambos os córtices.

4.5.3.2 Estriado dorsolateral

Quanto ao estriado adjacente à injeção estereotáxica podemos observamos diferenças significativas quanto aos fatores “cirurgia” ($F_{(2,30)} = 12,48$ $P < 0,01$) e “tarefa” ($F_{(4,30)} = 6,61$ $P < 0,01$), embora não existam diferenças em relação à interação entre esses fatores ($F_{(4,30)} = 0,75$ $P > 0,5$). Nos testes de comparação múltiplas, observa-se diferenças entre os grupo S-TH e os grupos S ($P < 0,01$) e S-TNH ($P < 0,03$), demonstrando que os astrócitos submetidos à TH apresentaram processos primários mais longos também nessa região. Adicionalmente, constataram-se diferenças entre o grupo HIC-TH e os demais grupos experimentais, exceto em relação ao grupo S-TH ($P > 0,22$), demonstrando que os animais submetidos à HIC, mas que

também realizaram a TH igualmente apresentam aumento no comprimento dos processos primários na região perilesional (Fig. 21 C).

Por outro lado, a avaliação do estriado contralateral à lesão não apresentou efeitos significativos quanto aos fatores “cirurgia” ($F_{(3,30)} = 0,91$ $P=0,45$) e “tarefa” ($F_{(6,30)} = 1,55$ $P=0,18$), embora apresente uma interação significativa entre esses fatores ($F_{(6,30)} = 5,04$ $P<0,01$). Não existiram diferenças induzidas pela realização das tarefas motoras entre os grupos *sham* ($P>0,14$). Entretanto, o grupo HIC-TH apresentou processos primários mais alongados em relação ao grupo ICH ($P<0,05$) (Fig. 21 D).

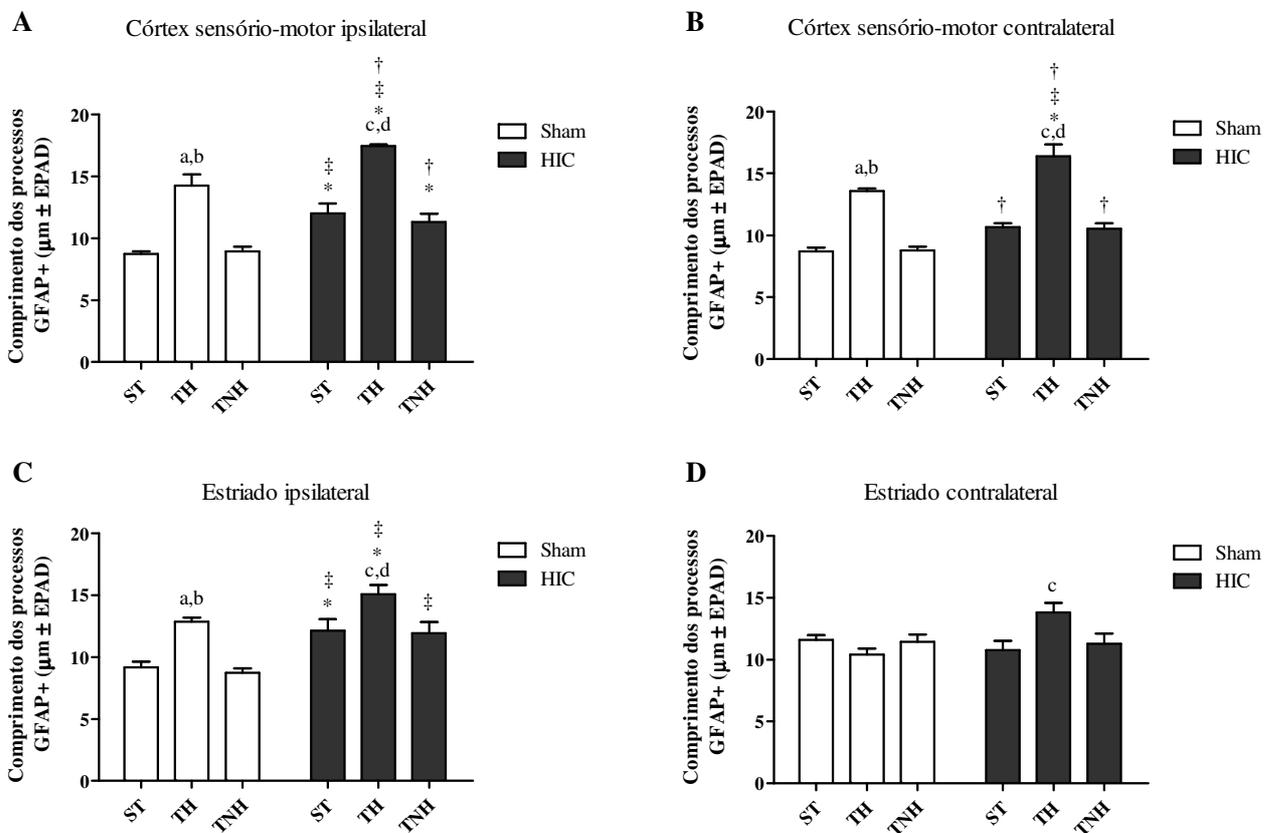


Figura 21. Comprimento médio dos processos primários GFAP+. (A) córtex sensório-motor ipsilateral à injeção estereotáxica; (B) córtex sensório-motor contralateral à injeção estereotáxica; (C) estriado ipsilateral à injeção estereotáxica; (D) estriado contralateral à injeção estereotáxica. “a”: diferença entre os grupos S-TH e S-ST ($P<0,01$); “b”: diferença entre os grupos S-TH e S-TNH ($P\leq 0,03$); “c”: diferença entre os grupos HIC-TH e HIC-ST ($P<0,05$); “d”: diferença entre os grupos HIC-TH e HIC-TNH ($P<0,03$); “*” diferença entre o grupo S-ST e demais grupos HIC ($P<0,04$); “‡”: diferença entre os grupos S-TNH e demais grupos HIC ($P<0,03$); “†”: diferença entre o grupo S-TH e demais grupos HIC ($P<0,01$). EPAD: Erro padrão.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho demonstram que o treinamento da tarefa de habilidade do alcance foi capaz de melhorar a recuperação sensório-motora de animais submetidos ao modelo de HIC, além de aumentar o comprimento dos processos primários de astrócitos GFAP+, o que não foi evidenciado em animais que realizaram a tarefa de não-habilidade. Estas mudanças ocorreram em estruturas importantes para o controle motor, tais como o córtex sensório-motor (área de representação cortical do membro anterior), de modo bilateral, e o estriado dorsolateral (ipsilateral à injeção estereotáxica) tanto em animais que sofreram HIC, quanto em animais não-lesados.

O sistema nervoso é o responsável por dar origem às diferentes formas de comportamento e, sendo assim, a análise comportamental pode ser considerada a maneira mais elementar para a avaliação das funções neurais (WHISHAW et al., 1999). Nesse sentido, os presentes resultados comportamentais sugerem que a reabilitação do membro anterior, realizada através da tarefa de habilidade do alcance, foi capaz de melhorar a recuperação sensório-motora após o evento hemorrágico, o que não foi evidenciado com o treinamento da tarefa de não-habilidade. Especificamente, o treinamento da tarefa de habilidade do alcance pós-HIC foi capaz de melhorar a motricidade fina do membro anterior (avaliada pelo teste do *staircase*); a coordenação no uso bilateral dos membros anteriores e a colocação correta dos mesmos em relação a um objetivo funcional (avaliadas pelo teste da escada horizontal); e a redução de assimetrias no uso dos membros anteriores (avaliada pelo teste do cilindro). Esses achados, sob aspectos gerais, concordam com estudos prévios, os quais têm demonstrado que estratégias de reabilitação são capazes de melhorar a funcionalidade do membro anterior após danos ao SNC (BIERNASKIE & CORBETT, 2001; DEBOW et al., 2003; MACLELLAN et al., 2005; MALDONADO et al., 2008; AURIAT & COLBOURNE, 2009).

Apesar de concordarem com as evidências descritas, nossos dados mostram-se superiores quando comparados a alguns estudos prévios (MACLELLAN et al., 2005; AURIAT & COLBOURNE, 2009). Essas diferenças observadas poderiam estar relacionadas com as características específicas do aparato utilizado (BIERNASKIE & CORBETT, 2001), visto que o referido aparato permite que o animal permaneça, espontaneamente, por mais tempo realizando a tarefa de habilidade do alcance, além de, possivelmente, limitar as compensações de tronco durante a realização da mesma. Esse fato poderia, hipoteticamente, proporcionar um treinamento de maior qualidade e intensidade, ao mesmo tempo em que reduz a interferência do experimentador, quando comparado com o protocolo da tarefa de habilidade que é utilizado na

maioria dos trabalhos prévios (WHISHAW & PELLIS, 1990; DEBOW et al., 2003; MACLELLAN et al., 2005; MALDONADO et al., 2008; AURIAT & COLBOURNE, 2009; PAGNUSSAT, 2009). Nesse contexto, sabemos que um dos principais pontos descritos pela literatura que limitam a recuperação da motricidade e coordenação do membro anterior durante a realização das tarefas de habilidade do alcance é o aprendizado de movimentos compensatórios não favoráveis (*learned-baduse*) (ALAVERDASHVILI et al., 2008). Dessa forma, é possível que as restrições quanto às compensações de movimentos, realizada pelo aparato tenham contribuído para uma recuperação funcional mais eficiente. Outro fato a ser considerado é a similaridade estrutural da tarefa de habilidade empregada com o teste do *staircase*. Tendo em vista a mencionada similaridade, os animais do grupo HIC-TH poderiam ter sido favorecidos no teste comportamental em questão, fato que também pode ter contribuído para um desempenho funcional superior e mais evidente quando comparado com os demais animais submetidos à HIC.

Em relação ao teste da escada horizontal, os presentes resultados concordam parcialmente com o descrito pela literatura (DEBOW et al., 2003; AURIAT & COLBOURNE, 2009). Por exemplo, Auriat & Colbourne (2009) demonstraram que na quarta semana pós-cirúrgica os animais submetidos a um protocolo de reabilitação apresentaram um melhor desempenho em relação aos animais do grupo HIC não submetidos à reabilitação, embora o protocolo utilizado incluísse também a associação com o enriquecimento ambiental. Já DeBow e colaboradores (2003) demonstraram que o treinamento da tarefa de habilidade realizado com o membro anterior contralateral à lesão, associado à constrição do membro anterior ipsilateral, não foi capaz de induzir uma melhor recuperação funcional nesse teste quando comparado ao grupo HIC. Estes dados, embora aparentemente controversos, não podem ser diretamente comparados visto que ambos os trabalhos citados disponibilizaram o acesso à tarefa de habilidade aos animais por apenas 15 e 10 minutos/dia, respectivamente, enquanto que o presente estudo utilizou sessões diárias de 40 minutos. Dessa forma, é possível que a hipótese supracitada, a qual envolve um treinamento mais intensivo associado ao interesse do animal em realizar a tarefa de habilidade, possa ter atuado positivamente sobre o desempenho sensório-motor, resultando em uma melhor recuperação funcional quando comparado aos grupos HIC-ST e HIC-TNH também no teste da escada horizontal, visto que o volume percentual de lesão foi bastante similar entre os estudos mencionados, existindo apenas discretas variações quanto às coordenadas da injeção estereotáxica. Tendo em vista a melhora funcional do grupo HIC-TH verificada no teste da escada horizontal, podemos sugerir que o treinamento da tarefa de habilidade possivelmente contribuiu para aperfeiçoar a coordenação dos movimentos do membro anterior. Esse fato é de especial relevância, visto que a coordenação motora é um dos fatores que contribuem para a recuperação

funcional (WHISHAW & COLES, 1996; VAN VLIET & SHERIDAN et al., 2007; MALDONADO et al., 2008).

Uma das conseqüências mais comuns de uma lesão cortical ou estriatal é a chamada “negligência” ou “obscurecimento” do membro contralateral à lesão (SCHALLERT, 2006). Nesse sentido, os resultados dessa dissertação demonstram que os animais do grupo HIC-TH apresentaram uma maior simetria no uso dos membros anteriores quando comparado aos grupos HIC-ST e HIC-TNH, o que possivelmente deva-se a um menor grau de desuso ou negligência do membro anterior contralateral à HIC (BENTON, 1972; SCHALLERT, 2006). Da mesma forma, os trabalhos anteriores que associaram mais de uma intervenção sensório-motora às sessões de tarefa de habilidade demonstram que os animais apresentam menor grau de assimetria no uso do membro anterior, o que não é facilmente demonstrado quando a tarefa de habilidade é empregada em breves sessões diárias após a HIC experimental (DEBOW et al., 2003; AURIAT & COLBOURNE, 2009).

Adicionalmente, os presentes achados evidenciam que a simples movimentação ou uso forçado do membro anterior não é capaz de promover um melhor desempenho funcional nos animais submetidos à HIC. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Auriat e colaboradores (2006), os quais demonstraram que o uso forçado do membro anterior não foi capaz de melhorar a recuperação sensório-motora após a HIC experimental. Esses autores observaram que a realização de exercícios forçados em rodas de corrida não era capaz de promover recuperação funcional, tampouco redução do volume da lesão, independentemente do momento da realização desse tipo de exercício (antes e/ou depois da HIC). Outros estudos prévios também demonstram que a mera movimentação de um membro não é suficientemente complexa a ponto de promover modificações referentes à plasticidade do SNC (KLEIM et al., 1998; REMPLÉ et al., 2001; KLEIM et al., 2002; KLEIM et al., 2004), pelo menos nas regiões encefálicas responsáveis pelo processamento motor (BLACK et al., 1990; MARKHAM & GREENOUGH, 2004; MALDONADO et al., 2008). Dessa forma, nossos dados corroboram os achados da literatura, evidenciando que o simples uso do membro anterior em tarefas de baixa complexidade não é capaz de promover melhoras funcionais significativas após danos encefálicos.

Em relação à possível influência de diferentes contextos motivacionais na realização das tarefas motoras realizadas, Maldonado e colaboradores (2008) demonstraram que o treinamento de habilidade, mas não a realização de exercícios voluntários em rodas de corrida, foi capaz de melhorar o desempenho sensório-motor após lesão isquêmica unilateral do córtex motor de roedores. Isso sugere que a realização da tarefa de habilidade possivelmente promova efeitos superiores àqueles desencadeados pela realização de movimentos de baixa complexidade após

lesão cortical, independentemente do contexto comportamental em que as referidas tarefas sejam realizadas. Essa hipótese pode ser reforçada pelo trabalho de Plautz e colaboradores (2000), onde primatas que realizavam o alcance de um determinado alimento (fator motivacional) apenas fazendo uso de movimentos de baixa complexidade (repetição simples) não apresentavam alterações nos mapas de representação cortical, enquanto que os animais que necessitavam realizar um movimento de habilidade para ter acesso à recompensa, desenvolviam modificações nas áreas corticais correlatas à mão e dedos. Assim, é provável que a complexidade da tarefa contribua para a plasticidade e recuperação funcional, o que não aconteceria nas situações de uso forçado ou voluntário do membro anterior durante realização de movimentos repetitivos simples, tais como a marcha, mesmo em contextos motivacionais semelhantes.

Um achado inesperado no presente trabalho foi a ausência de diferenças significativas no desempenho funcional entre o grupo S-TH e os demais grupos sham. Uma possível razão para esse achado é que os testes comportamentais utilizados para avaliar a função sensório-motora não teriam sido suficientemente sensíveis para diferir os efeitos das tarefas motoras empregadas em animais não-lesados, visto que os testes empregados foram desenhados visando primariamente a comparação entre animais lesados e controles (MONTROYA et al., 1991; METZ & WHISHAW, 2002; SCHALLERT, 2006).

Em suma, é provável que o grau de exigência cognitivo-motora envolvido na realização de determinadas tarefas potencialmente contribua para as modificações morfofisiológicas que podem estar associadas às respostas comportamentais, o que tem sido sugerido tanto em estudos envolvendo animais (BIERNASKIE & CORBETT, 2001; MALDONADO et al., 2008) quanto seres humanos (McEWEN et al., 2009).

Em relação ao volume do dano, os resultados demonstraram que obtivemos uma lesão moderada, sendo que nenhuma das intervenções propostas foi capaz de reduzi-la. Esse achado está de acordo com estudos prévios (AURIAT et al., 2006; DEBOW et al., 2003; MACLELLAN et al., 2005), embora em alguns casos, o volume da lesão possa ser atenuado após a implementação de estratégias sensório-motoras que incluem a associação de mais de um tipo de reabilitação (DeBOW et al., 2003; AURIAT & COLBOURNE, 2009). Nesse sentido, Maclellan e colaboradores (2006) demonstraram que 30 dias após a HIC experimental induzida pela injeção intra-estriatal de colagenase do tipo IV, o volume da lesão apresenta apenas uma discreta correlação com o desempenho funcional, não podendo ser estabelecido como um preditor da função sensório-motora, ao menos mediante a avaliação de testes comportamentais que também foram utilizados em nosso estudo. Dessa forma, os presentes dados estão de acordo com esses achados prévios, de modo que as repercussões comportamentais verificadas pelo desempenho em

testes sensório-motores habitualmente utilizados nessas circunstâncias nem sempre estão associadas com alguns parâmetros teciduais, tais como o volume do dano induzido pela HIC (MACLELLAN et al., 2006).

Assim como o sistema nervoso apresenta vital importância para a origem das diferentes formas de comportamento, sabe-se que as experiências comportamentais são capazes de induzir mudanças plásticas no sistema nervoso (NUDO et al., 1996). Sendo assim, o aprendizado e a realização de tarefas motoras de habilidade podem induzir mudanças comportamentais e neurofisiológicas, o que ocorre tanto em animais intactos (KARNI ET AL., 1998; KLEIM ET AL., 1998; KLEIM ET AL., 2004; MONFILS ET AL., 2005) quanto em animais que sofreram danos ao SNC (NUDO et al., 1996; MURPHY & CORBETT, 2009). Nesse sentido, embora o entendimento acerca da participação dos astrócitos na regulação da transmissão e plasticidade sináptica tenha aumentando drasticamente nos últimos anos (ARAQUE et al., 1999; ARAQUE et al., 2001), pouco ainda é conhecido acerca dos mecanismos astrogliais que possivelmente contribuem para a aquisição de habilidades motoras, assim como para a reabilitação de funções complexas do membro anterior, tais como, os movimentos de habilidade do alcance e preensão. Sendo assim, é provável que mudanças na morfologia e função dos astrócitos apresentem importante contribuição para a plasticidade encefálica induzida pela experiência, o que tem sido sugerido por estudos anteriores (VIOLA et al., 2009; REICHENBACH et al., 2010; SOFRONIEW & VINTERS, 2010).

Os astrócitos são células gliais especializadas que apresentam elevada heterogeneidade morfológica e fisiológica (EMSLEY & MACKLIS, 2006; MATYASH & KETTENMANN, 2009), tendo sido recentemente divididos em 9 classes distintas, de acordo com seus padrões de marcação imunoistoquímica (EMSLEY & MACKLIS, 2006). A expressão de GFAP, identificada pela imunorreatividade à essa proteína, é considerada um marcador sensível e confiável para astrócitos “ativados”, os quais estão mais pronunciados em situações de lesão do SNC (PEKNY & NILSSON, 2005; MATYASH & KETTENMANN, 2009; SOFRONIEW & VINTERS, 2010). Nossos resultados demonstram que os processos primários GFAP+ podem ser modificados pelo treinamento em tarefas motoras de maior complexidade (tarefa motora de habilidade), tanto em animais lesados (após a HIC), quanto naqueles intactos. Este fato está de acordo com um trabalho recentemente publicado, o qual demonstrou que a exposição ao ambiente enriquecido (AE) é capaz de aumentar a ramificação dos processos primários de astrócitos GFAP+ (VIOLA et al., 2009). Adicionalmente, o AE também foi capaz de aumentar a expressão de GFAP por astrócitos hipocâmpais, o que ocorreu tanto em animais isquêmicos quanto em animais não-lesados (BRIONES et al., 2006). Conjuntamente, esses achados contribuem para a hipótese de que os

astrócitos “reativos” possivelmente representem uma classe astrogliar distinta e potencialmente heterogênea (MATYASH & KETTENMANN, 2009) a qual poderia contribuir não somente para os mecanismos de dano e reparo do SNC, mas também para a plasticidade induzida pela experiência em condições fisiológicas (BRIONES et al., 2006; VIOLA et al., 2009).

Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo demonstrando que o treinamento da tarefa de habilidade do alcance, realizado com o membro anterior contralateral ao hemisfério lesado (membro anterior afetado), aumenta significativamente o comprimento dos processos primários de astrócitos GFAP+, o que foi observado conjuntamente com uma melhor recuperação sensório-motora após a HIC. Embora não existam outros estudos com semelhante desenho experimental para uma adequada comparação, os presentes achados estão de acordo com o trabalho previamente descrito por Briones e colaboradores (2006). O referido trabalho demonstrou que após um modelo de isquemia cerebral global por oclusão de quatro vasos, os animais submetidos a um protocolo de reabilitação baseado no enriquecimento ambiental apresentaram mudanças em astrócitos GFAP+, sugerindo que os referidos astrócitos poderiam mediar, pelo menos em parte, a melhora funcional observada após a reabilitação.

Nossos resultados também evidenciam que a HIC foi capaz de induzir um aumento no comprimento dos processos primários GFAP+ no córtex sensório-motor e no estriado dorsolateral (ipsilaterais ao dano) mesmo na ausência de intervenções sensório-motoras. Trabalhos prévios demonstraram que camundongos *knockout* para a GFAP experimentam uma pior recuperação funcional após um modelo de excitotoxicidade induzida por traumatismo craniano (OTANI et al., 2006), enquanto que a inibição de astrócitos GFAP+ retardam o remodelamento neurovascular e a recuperação sensório-motora pós-AVC (HAYAKAWA et al., 2009). Tendo em vista as evidências supracitadas e os resultados da presente dissertação, podemos sugerir que as modificações morfológicas astrogliais que decorrem após uma HIC talvez façam parte dos mecanismos plásticos que visam o rearranjo da rede astrocitária. Sendo assim, essas modificações poderiam contribuir para o restabelecimento das funções neurais e para uma facilitação da recuperação espontânea, resposta tal que poderia ser aumentada na presença de intervenções sensório-motoras, tais como a tarefa de habilidade do alcance e preensão.

Apesar dos processos astrogliais primários não aturem diretamente sobre a interação neurônio-glia, visto que os referidos processos atravessam o neuropilo e usualmente não fazem contato com as sinapses tripartites (REICHENBACH et al., 2010), estudos prévios vêm demonstrando que as modificações na plasticidade astrocitária podem exercer uma série de funções extra-sinápticas importantes, as quais são mediadas por moléculas secretadas por células microgliais, endoteliais, neurônios e astrócitos circundantes (STEVENS, 2008). Dessa forma, as

mudanças astrogliais observadas em paralelo à recuperação funcional possivelmente sejam devidas às mudanças na unidade neurovascular, a qual compreende as interações dinâmicas entre células endoteliais, glia, neurônios e a matriz extracelular (ARAI et al., 2009).

De particular relevância parece ser a sinalização mediada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o qual participa da promoção do remodelamento dos vasos e talvez contribua para a recuperação pós-AVC (SUN et al., 2003; ARAI et al., 2009). Por exemplo, foi demonstrado em um modelo de isquemia cerebral focal que a infusão intraventricular de VEGF é capaz de estimular a angiogênese, além de reduzir o volume do dano ocasionado pela isquemia (SUN et al., 2003). Nesse sentido, um aumento na angiogênese mediada pelo VEGF em roedores tem sido associado com a redução de danos neurológicos neste mesmo modelo de isquemia (ZHANG et al., 2000). Adicionalmente, manipulações genéticas demonstram que camundongos transgênicos capazes de super-expressar o VEGF apresentam elevada densidade microvascular após a isquemia, sugerindo que esse fator de crescimento é capaz de promover revascularização após um AVC (WANG et al., 2005). Sendo assim, é possível que essas modificações vasculares ocorram em consonância com as alterações astrogliais, visto que ondas sinalizadoras de cálcio ocorrem entre astrócitos e células endoteliais nessas circunstâncias e talvez contribuam para o remodelamento da referida unidade neurovascular (ARAI et al., 2009).

Além disso, também já foi descrito que diversas moléculas envolvidas na sinalização celular, tais como o glutamato, ATP, óxido nítrico (DE SERANNO et al., 2004), epinefrina (NESTOR et al., 2007) assim como fatores neurotróficos, dentre eles, o fator de crescimento fibroblástico do tipo 2 (FGF-2) (FINKLESTEIN et al., 1990; BRIONES et al., 2006), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (OHIRA et al., 2007) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (BRESJANAC & ANTAUER, 2000) poderiam atuar em prol da plasticidade morfológica dos astrócitos. Nesse contexto, é possível que essas moléculas atuem em cascata de motilidade e plasticidade celular que culminariam em mudanças no citoesqueleto astrocitário (VIOLA et al., 2009). De modo particular, o BDNF parece atuar como um dos mais importantes responsáveis pelas modulações plásticas desencadeadas pela tarefa motora de habilidade, visto que o mesmo é capaz de induzir aumentos na ramificação dos astrócitos (OHIRA et al., 2007) ao mesmo tempo em que desempenha um papel crítico para a recuperação funcional induzida pela reabilitação pós-AVC (PLOUGHMAN et al., 2009). Apesar das razões para as modificações morfológicas observadas nos grupos HIC e HIC-TH não serem totalmente compreendidas, é possível que as mesmas visem a promoção de um micro-ambiente permissivo, que suporte o crescimento axonal (RIDET et al., 1997), ou que seja necessário para desencadear os mecanismos envolvidos na reestruturação do SNC pós-lesão (VIOLA et al., 2009). Dessa maneira, é possível

que as modificações nos processos primários de astrócitos GFAP+ induzidas pela tarefa de habilidade do alcance contribuam para modificações nas funções neurovasculares pós-HIC, o que parece auxiliar na facilitação da recuperação funcional.

De modo adicional aos achados morfológicos, os presentes dados demonstram que a HIC foi capaz de aumentar a densidade de astrócitos GFAP+ no córtex sensório-motor, bilateralmente, e no estriado dorsolateral, ipsilateralmente à lesão. Esse achado está de acordo com a literatura e possivelmente deva-se à astrogliose reativa (CLARK et al., 1993; SCHROETER et al., 1995; SOFRONIEW, 2005; WILHELMSSON et al., 2006; WASSERMAN et al., 2008). Por outro lado, nenhuma das tarefas motoras propostas foi capaz de exercer influência sobre a densidade celular. Nesse sentido, o estudo disponível mais similar ao presente trabalho, demonstrou que, após um modelo de infarto cortical por fototrombose, tanto o AE como a tarefa de habilidade do alcance foram capazes de alterar a sobrevivência e a proliferação de diferentes células gliais na zona perilesional (KEINER et al., 2008). Estes autores demonstraram ainda que 6 semanas após o infarto cortical, o treinamento diário da tarefa de habilidade do alcance aumentou a sobrevivência de células recém-geradas, sendo que a maioria delas eram astrócitos GFAP+. Embora aparentemente controversos, esses resultados talvez devam-se há vários fatores, como a natureza da lesão, o local do dano e a extensão do mesmo. Adicionalmente, é possível que os astrócitos recém gerados não perfaçam um número suficiente a ponto de serem percebidos em uma estimativa geral de densidade de astrócitos GFAP+.

No presente estudo também foi evidenciado um aumento no número dos processos primários por astrócito GFAP+, o que ocorreu somente no córtex sensório-motor ipsilateral à HIC e não foi influenciado pela realização de tarefas motoras. Esse achado parece estar relacionado à astrogliose reativa, visto que a mesma é capaz de promover aumentos na imunorreatividade, comprimento e número dos processos GFAP+ (WILHELMSSON et al., 2006), o que poderia contribuir para o rearranjo das redes astrocitárias (BUSHONG et al., 2004). Por outro lado e, inesperadamente, não foram encontradas diferenças significativas no número dos processos primários no estriado adjacente à HIC. No entanto, sabe-se também que as características da astrogliose reativa podem variar conforme a natureza e a severidade do dano, o que inclui alterações moleculares, hipertrofia celular progressiva e a proliferação celular (SOFRONIEW, 2009). Essas mudanças poderiam ser moduladas por uma série de vias de sinalização, as quais acarretariam em respostas astrocitárias modificadas de acordo com o contexto da lesão (SOFRONIEW, 2005; SOFRONIEW, 2009). Dessa forma, é possível que as diferenças fisiopatológicas entre eventos isquêmicos e hemorrágicos contribuam para as características da astrogliose reativa. Como exemplo das prováveis diferenças que envolvem a etiologia de um dado

insulto, já foi demonstrado que somente cerca de 16% dos genes que sofrem uma *up-regulation* no tecido adjacente à HIC foram previamente reportados pela literatura (LU et al., 2006). Dessa forma, outros estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos em diferentes tipos de danos e os padrões de astrogliose reativa que acompanham os mesmos, seja em áreas adjacentes ou longínquas ao sítio primário de lesão.

O padrão de lateralidade das respostas astrogliais decorrentes da HIC e da realização da tarefa de habilidade do alcance também foi avaliada no presente estudo e os resultados demonstraram que tanto a HIC quanto a tarefa de habilidade do alcance induziram mudanças na morfologia dos astrócitos no córtex sensório-motor (bilateralmente) e no estriado ipsilateral, o que sugere a possível participação de redes astrocitárias adjacentes e longínquas ao sítio de lesão primária na plasticidade induzida pelas referidas condições. Apesar da originalidade desses resultados, esse fato vai ao encontro de estudos prévios, os quais demonstram que o córtex cerebral e os núcleos da base apresentam uma forte colaboração recíproca para o planejamento, iniciação e execução dos movimentos, tais como os movimentos direcionados a um objetivo funcional (DOYON et al., 2003; COSTA et al., 2004). Dessa forma, nossos resultados corroboram a corrente visão da participação conjunta dessas regiões encefálicas frente à plasticidade induzida tanto pela tarefa de habilidade do alcance quanto pelas lesões estriatais (DOYON et al., 2003; COSTA et al., 2004; WHISHAW et al., 2007), entretanto com a adicional sugestão da participação dos processos primários de astrócitos GFAP+.

Em relação ao córtex sensório-motor, especificamente, sabe-se que as conexões no período pós-AVC e o re-mapeamento cortical são baseado nos princípios da atividade-dependência e competição (MURPHY & CORBETT, 2009). Nesse contexto, pequenas lesões cerebrais focais (5-15% de um hemisfério) podem ser superadas apenas com mudanças neurofisiológicas no tecido perilesional intacto (WINSHIP & MURPHY, 2008). Por outro lado, nas lesões maiores, as regiões distantes do sítio primário de lesão podem participar da plasticidade funcional, de modo a contribuírem para o remodelamento cortical e re-estabelecimento de vias participantes da integração sensório-motora. Nesse caso, áreas como o córtex pré-motor ipsilateral ou regiões do hemisfério contralateral à lesão poderiam contribuir para esse remodelamento (BIERNASKIE et al., 2005). Dessa forma, é possível que essas mudanças astrocitárias corticais evidenciadas no presente estudo estejam ocorrendo em paralelo com a reorganização neuronal nos córtices lesado e “não-lesado” que ocorre após um AVC (BIERNASKIE et al., 2005).

Além disso, estudos prévios vêm demonstrando que uma série de mudanças na atividade e conectividade entre o córtex sensório-motor e o estriado possivelmente sejam desencadeadas durante a realização das tarefas de habilidade, embora a natureza celular e a dinâmica dessas

mudanças plásticas que ocorrem nas diferentes fases de aprendizado e manutenção de uma tarefa de habilidade motora não tenham sido completamente elucidadas (COSTA et al., 2004). Por exemplo, tem se evidenciado que ambos os estriados poderiam participar dos mecanismos plásticos envolvidos na aquisição e realização de movimentos direcionados a um objetivo funcional, o que ocorre tanto em animais lesados quanto não-lesados (GROENEWEGEN, 2003; FARAJI & METZ, 2007; WHITE, 2009). Contudo, é possível que após a HIC o estriado ipsilateral adjacente à lesão possa participar mais pronunciadamente do que o estriado contralateral quanto às respostas que envolvem a participação de astrócitos GFAP+, embora já tenha sido descrito que a estimulação unilateral do córtex sensório-motor é capaz de ativar circuitos neurais estriatais de modo bilateral em roedores (CANTERAS et al., 1988; McGEORGE & FAULL, 1989; FARAJI & METZ, 2007). Embora as razões para esse achado não estejam claras, podemos supor que modificações neurais que não envolvem a participação de astrócitos GFAP+ possam estar ocorrendo no estriado contralateral, o que ainda precisa ser melhor investigado.

Outro resultado extremamente interessante é que as respostas astrogliais decorrentes do treinamento da tarefa de habilidade do alcance apresentaram um padrão bastante similar, tanto na presença quanto na ausência da HIC, diferindo apenas na magnitude dessas respostas. Assim, esses dados possivelmente indicam que o remodelamento nos circuitos astrocitários faça parte das adaptações neurais que acontecem em ambas as situações, o que já foi sugerido em relação ao hipocampo (BRIONES et al., 2006). Entretanto, embora os movimentos do membro superior resultem na ativação bilateral de diversas regiões encefálicas em situações de lesão, esse padrão geralmente não é observado no SNC intacto (BIERNASKIE et al., 2005; CRAMER et al., 1997). Biernaskie e colaboradores (2005), por exemplo, submetem roedores à cirurgia de oclusão da artéria cerebral média seguida de um protocolo de reabilitação intensiva, onde verificaram um melhor desempenho funcional no decorrer de 4 semanas, efeito que era revertido pela micro-injeção de hidrocloreto de lidocaína no córtex contralateral ao hemisfério lesado, principalmente em animais que apresentavam lesões extensas. Adicionalmente, esses autores também demonstraram que animais com lesões discretas tiveram apenas uma redução leve (cerca de 25%) quanto ao sucesso na realização da tarefa de alcance e preensão após a referida injeção de lidocaína no hemisfério contralateral, o que sugere uma menor participação do hemisfério contralateral à lesão sob essas circunstâncias. Por outro lado, inesperadamente, os animais do grupo S-TH demonstraram um aumento no comprimento dos processos primários GFAP+ em ambos os córtices cerebrais avaliados. Esses resultados nos levam a sugerir que as respostas frente à plasticidade astrocitária não necessariamente acompanhem as respostas neuronais descritas

previamente de modo linear, possivelmente exercendo funções que não interfiram diretamente nessas respostas, o que ainda precisa ser melhor compreendido. Cabe destacar ainda que as mudanças plásticas referentes aos sítios de lesão primária e a fisiopatologia do dano cerebral também poderiam contribuir para as diferenças anteriormente citadas, o que precisa ser avaliado por estudos posteriores.

De qualquer forma, independentemente das vias celulares específicas e das particularidades da participação integrativa entre astrócitos e neurônios, os resultados da presente dissertação corroboram a hipótese de que os mecanismos plásticos envolvidos na reorganização das redes neurais após a realização de tarefas complexas tais como a tarefa de habilidade do alcance e preensão, são bastante semelhantes aos envolvidos durante o aprendizado e na manutenção da referida tarefa motora de habilidade (MALDONADO et al., 2008). Conjuntamente, nossos resultados demonstram que as modificações morfológicas em astrócitos GFAP+ poderiam fazer parte dos mecanismos neurobiológicos que medeiam a plasticidade induzida pela tarefa de habilidade, tanto em animais que sofreram uma HIC quanto em animais não-lesados, além de possivelmente contribuírem para a melhora do desempenho funcional e recuperação sensório-motora pós-HIC.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que:

- O treinamento da tarefa de habilidade do alcance e preensão foi capaz de aumentar o comprimento dos processos primários de astrócitos GFAP+ em estruturas cerebrais importantes para o controle motor, tais como o córtex sensorio-motor (bilateralmente) e o estriado dorsolateral (perilesional), tanto em animais lesados pela HIC quanto em animais não-lesados. De modo particular, essas modificações astrogliais foram potencializadas quando ocorreu a associação da HIC com o treinamento de habilidade do alcance;

- O treinamento da tarefa de habilidade do alcance e preensão, mas não o treinamento de não-habilidade, foi capaz de promover uma melhor recuperação sensorio-motora, avaliada pelos testes do *staircase*, escada horizontal e cilindro, quanto realizado com os animais submetidos à HIC;

- A HIC também foi capaz de aumentar a densidade e o comprimento dos processos primários de astrócitos GFAP+ no córtex sensorio-motor (bilateralmente), assim como no estriado dorsolateral (perilesional), além de elevar o número de processos primários por astrócito no córtex sensorio-motor ipsilateral ao dano nesses animais. Embora essas modificações provavelmente devam-se à astrogliose reativa, é possível que visem uma facilitação da recuperação espontânea;

- Apesar das modificações astrogliais evidenciadas, os animais não-lesados que foram submetidos à realização da tarefa de habilidade não apresentaram um melhor desempenho sensorio-motor quando comparado aos demais grupos não-lesados;

- Nenhuma das tarefas propostas foi capaz de reduzir o volume do dano cerebral.

7 PERSPECTIVAS

- Pesquisar o curso das modificações astrogliais ao longo do treinamento e a possível repercussão funcional correlata;

- Pesquisar o papel de outras estruturas e vias relacionadas à atividade motora, como o cerebelo e a medula espinal, após a HIC e o treinamento de reabilitação do membro anterior;

- Investigar possíveis efeitos da HIC e da reabilitação do membro anterior sobre o perfil bioquímico e morfológico de diferentes tipos celulares do SNC;

- Identificar a possível contribuição de moléculas sinalizadoras, tais como os fatores de crescimento, ao longo do processo de recuperação funcional.

8 REFERÊNCIAS

- ADKINS, D.L.; BOYCHUK, A.; REMPLE, M.S.; KLEIM, J.A. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J Appl Physiol*, 101 (6): 1776-1782, 2006.
- ALAVERDASHVILI, M.; FOROUD, A.; LIM, D.H.; WHISHAW, I.Q. "Learned baduse" limits recovery of skilled reaching for food after forelimb motor cortex stroke in rats: a new analysis of the effect of gestures on success. *Behav Brain Res*, 188 (2): 281-290, 2008.
- ALONSO, G.; PRIVAT, A. Reactive astrocytes involved in the formation of lesional scars differ in the mediobasal hypothalamus and in other forebrain regions. *J Neurosci Res*, 34: 523-538, 1993.
- ALSTERMARK, B.; GORSKA, T.; LUNDBERG, A.; PETTERSSON, L.G. Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 16. Visually guided switching of target-reaching. *Exp Brain Res*, 80 (1): 1-11, 1990.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. "International cardiovascular disease statistics: Cardiovascular disease", 2004.
- <<http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1140811583642>> (10/08/2009).
- ANDREWS, A.W.; BOHANNON, R.W. Distribution of muscle strength impairments following stroke. *Clin Rehabil*, 14 (1): 79-87, 2000.
- ARAI, K.; JIN, G.; NAVARATNA, D.; LO, E.H. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J*, 276 (17): 4644-4652, 2009.
- ARAQUE, A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biology*, 4 (1): 3-10, 2008.
- ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P.G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*, 63: 795-813, 2001.
- ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R.P.; HAYDON, P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledge partner. *Trends Neurosci*, 22: 208-215, 1999.
- AURIAT, A.M.; COLBOURNE, F. Delayed rehabilitation lessens brain injury and improves recovery after intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res*, 1251: 262-268, 2009.
- AURIAT, A.M.; GRAMS, J.D.; YAN, R.H.; COLBOURNE, F. Forced exercise does not improve recovery after hemorrhagic stroke in rats. *Brain Res*, 1109 (1): 183-191, 2006.
- BENTON, A.L.; LEVIN, H.S. An experimental study of 'obscuration'. *Neurology*, 22: 1176-1181, 1972.

- BIERNASKIE, J.; CHERNENKO, G.; CORBETT, D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci*, 24: 1245-1254, 2004.
- BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci*, 21: 5272-5280, 2001.
- BIERNASKIE, J.; SZYMANSKA, A.; WINDLE, V.; CORBETT, D. Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *Eur J Neurosci*, 21 (4): 989-999, 2005.
- BLACK, J.E.; ISAACS, K.R.; ANDERSON, B.J.; ALCANTARA, A.A.; GREENOUGH, W.T. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (14): 5568-5572, 1990.
- BOHANNON, R.W. Measurement, nature, and implications of skeletal muscle strength in patients with neurological disorders. *Clinic Biomech*, 10 (6): 283-293, 1995.
- BOHANNON, R.W. Significant relationships exist between muscle group strengths following stroke. *Clinic Rehab*, 4: 27-31, 1990.
- BRESJANAC, M.; ANTAUER, G. Reactive Astrocytes of the Quinolinic Acid-Lesioned Rat Striatum Express GFRA1 as Well as GDNF *in vivo*. *Exp Neurol*, 164: 53-59, 2000.
- BRIONES, T.L.; WOODS, J.; WADOWSKA, M.; ROGOZINSKA, M.; NGUYEN, M. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. *Behav Brain Res*, 15; 171 (1): 17-25, 2006.
- BRODERICK, J.P.; ADAMS, H.P.; BARSAN, W. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*, 30: 905-915, 1999.
- BRODERICK, J.P.; DIRINGER, M.N.; HILL, M.D.; BRUN, N.C.; MAYER, S.A.; STEINER, T.; SKOLNICK, B.E.; DAVIS, S.M. Determinants of intracerebral hemorrhage growth: an exploratory analysis. *Stroke*, 38: 1072-1075, 2007.
- BROWN, L.L.; SHARP, F.R. Metabolic mapping of rat striatum: somatotopic organization of sensorimotor activity. *Brain Res*, 686 (2): 207-222, 1995.
- BROWN, V.J.; ROBBINS, T.W. Deficits in response space following unilateral striatal dopamine depletion in the rat. *J Neurosci*, 9: 983-989, 1989.
- BURY, S.D.; JONES, T.A. Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the "unaffected" forelimb and training-induced dendritic structural plasticity in the motor cortex. *J Neurosci*, 22: 8597-8606, 2002.

- BUSHONG, E.A.; MARTONE, M.E.; ELLISMAN, M.H. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocytes domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci*, 22: 73-86, 2004.
- BUTCHER, K.S.; BAIRD, T.; MacGREGOR, L.; DESMOND, P.; TRESS, B.; DAVIS, S. Perihematomal edema in primary intracerebral hemorrhage is plasma derived. *Stroke*, 35: 1879–1885, 2004.
- CANTERAS, N.S.; SHAMMAH-LAGNADO, S.J.; SILVA, B.A.; RICARDO, J.A. Somatosensory inputs to the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res*, 458: 53-64, 1988.
- CARDINAL, R.N.; PARKINSON, J.A.; HALL, J.; EVERITT, B.J. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev*, 26: 321-352, 2002.
- CARMICHAEL, S.T.; VESPA, P.M.; SAVER, J.L.; COPPOLA, G.; GESCHWIND, D.H.; STARKMAN, S.; MILLER, C.M.; KIDWELL, C.S.; LIEBESKIND, D.S.; MARTIN, N.A. Genomic profiles of damage and protection in human intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28 (11): 1860-1875, 2008.
- CAURAUGH, J.H.; SUMMERS, J.J. Neural plasticity and bilateral movements: A rehabilitation approach for chronic stroke. *Prog Neurobiol*, 75: 309-320, 2005.
- CECHETTI, F. Efeito Neuroprotetor de diferentes programas de exercício físico regular forçado em modelo de isquemia in vitro. Porto Alegre: UFRGS, Dissertação. Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Neurociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- CIFU, D.X.; LORISH, T.R. Stroke rehabilitation 5. Stroke outcome. *Arch Phys Med Rehabil*, 75 (5): 56-60, 1994.
- CLARK, R.K.; LEE, E.V.; FISH, C.J.; WHITE, R.F.; PRICE, W.J.; JONAK, Z.L.; FEUERSTEIN, G.Z.; BARONE, F.C. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull*, 31 (5): 565-572, 1993.
- CONNER, J.M.; CULBERSON, A.; PACKOWSKI, C.; CHIBA, A.A.; TUSZYNSKI, M.H. Lesions of the Basal Forebrain Cholinergic System Impair Task Acquisition and Abolish Cortical Plasticity Associated with Motor Skill Learning. *Neuron*, 38 (1): 819-829, 2003.
- COSTA, R.M.; COHEN, D.; NICOLELIS, M.A.L. Differential Corticostriatal Plasticity during Fast and Slow Motor Skill Learning in Mice. *Current Biology*, 14: 1124–1134, 2004.
- CRAMER, S.C., NELLES, G., BENSON, R.R., KAPLAN, J.D., PARKER, R.A., KWONG, K.K., KENNEDY, D.N., FINKLESTEIN, S.P. & ROSEN, B.R. A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. *Stroke*, 28: 2518–2527, 1997.

- DALL'OGGIO, A.; GEHLEN, G.; ACHAVAL, M.; RASIA-FILHO, A.A. Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett*, 439 (3): 287-292, 2008.
- DAVIS, S.M.; BRODERICK, J.; HENNERICI, M.; BRUN, N.C.; DIRINGER, M.N.; MAYER, S.A.; BEGTRUP, K.; STEINER, T. Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Neurology*, 66: 1175–1181, 2006.
- DE SERANNO, S.; ESTRELLA, C.; LOYENS, A.; CORNEA, A.; OJEDA, S.R.; BEAUVILLAIN, J.C.; PREVOT, V. Vascular endothelial cells promote acute plasticity in ependymogial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci*, 24, 10353-10363, 2004.
- DeBOW, S.B.; DAVIES, M.L; CLARKE, H.L.; COLBOURNE, F. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. *Stroke*, 34 (4): 1021-1026, 2003.
- DERKSEN, M.J.; WARD, N.L.; HARTLE, K.D.; IVANCO, T.L. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. *Neurobiol Learn Mem*, 87: 404-415, 2007.
- DOYON, J; PENHUNE, V; UNDERLEIDER, LG. Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia*, 41: 252-262, 2003.
- EMSLEY, J. G.; MACKLIS, J.D. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* 2: 175-186, 2006.
- FARAJI, J.; METZ, G.A. Sequential bilateral striatal lesions have additive effects on single skilled limb use in rats. *Behav Brain Res*, 177: 195-204, 2007.
- FARR, T.D.; WHISHAW, I.Q. Quantitative and Qualitative Impairments in Skilled Reaching in the Mouse (*Mus musculus*) After a Focal Motor Cortex Stroke. *Stroke*, 33: 1869-1875, 2002.
- FAWCETT, J.W.; ASHER, R.A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, 49: 377–391, 1999.
- FINKLESTEIN, S.P.; CADAY, C.G.; KANO, M.; BERLOVE, D.J.; HSU, C.Y.; MOSKOWITZ, M.; KLAGSBRUN, M. Growth factor expression after stroke. *Stroke*, 21 (11): III 122-124, 1990.
- FORGIE, M.L.; GIBB, R.; KOLB, B. Unilateral lesions of the forelimb area of rat motor cortex: lack of evidence for use-dependent neural growth in the undamaged hemisphere *Brain Res*, 710 (1-2): 249-259, 1996.
- FUJI, Y.; TAKEUCHI, S.; HARADA, A.; ABE, H.; SASAKI, O.; TANAKA, R. Hemostatic activation in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 32: 883–890, 2001.
- GEBEL, J.M.; JAUCH, E.C.; BROTT, T.G.; KHOURY, J.; SAUERBECK, L.; SALISBURY, S.; SPILKER, J.; TOMSICK, T.A.; DULDNER, J.; BRODERICK, J.P. Natural history of

perihematomal edema in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 33: 2631–2635, 2002a.

GEBEL, J.M.; JAUCH, E.C.; BROTT, T.G.; KHOURY, J.; SAUERBECK, L.; SALISBURY, S.; SPILKER, J.; TOMSICK, T.A.; DULDNER, J.; BRODERICK, J.P. Relative edema volume is a predictor of outcome in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 33 (11): 2636-2641, 2002b.

GERFEN, C.R. Basal Ganglia. In: Paxinos, G. The rat nervous system. 3.ed. Elsevier, 455-508, 2004.

GHARBAWIE, O.A.; GONZALEZ, C.L.; WHISHAW, I.Q. Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats. *Behav Brain Res*, 156 (1): 125-37, 2005.

GOMES, F.C.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*, 32 (5): 619-631, 1999.

GÓMEZ-PINILLA, F.; SO, V.; KESSLAK, J.P. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neurosci*, 85 (1): 53-61, 1998.

GONZALEZ, C.L.; KOLB, B. A comparison of different lowering middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull*, 59: 459-466, 2003.

GRAHAM, D.I.; McINTOSH, T.K.; MAXWELL, W.L.; NICOLL, J.A. Recent advances in neurotrauma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59: 641–651, 2000.

GRAYBIEL, A.M.; AOSAKI, T.; FLAHERTYA, W.; KIMURA, M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, 265: 1826-1831, 1994.

GRIESBACH, G.S.; HOVDA, D.A.; MOLTENI, R.; WU, A.; GOMEZ-PINILLA, F. Voluntary exercise following traumatic brain injury: BDNF upregulation and recovery of function. *Neurosci*, 125: 129-139, 2004.

GROENEWEGEN, H.J. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast*, 10 (1-2): 107-120, 2003.

HANDLEY, A.; MEDCALF, P.; HELLIER, K.; DUTTA, D. Movement disorders after stroke. *Age Ageing*, 38: 260-266, 2009.

HART, R.G. What causes intracerebral hemorrhage during warfarin therapy? *Neurology*, 55: 907–08, 2000.

HAYAKAWA, K.; NAKANO, T.; IRIE, K.; HIGUCHI, S.; FUJIOKA, M.; ORITO, K.; IWASAKI, K.; JIN, G.; LO, E.H.; MISHIMA, K.; FUJIWARA, M. Inhibition of reactive

astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009 – Article in press.

HAWRYLAK, N.; GREENOUGH, W.T. Monocular deprivation alters the morphology of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytes in the rat visual cortex. *Brain Res*, 683: 187-199, 1995.

HEO, J.H.; HAN, S.W.; LEE, S.K. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med*, 39 (1): 51-70, 2005.

HERMER-VAZQUEZ, L.; HERMER-VAZQUEZ, R.; MOXONB, K.A.; KUO, K.H.; VIAUC, V.; ZHANA, Y.; CHAPIN, J.K. Research report Distinct temporal activity patterns in the rat M1 and red nucleus during skilled versus unskilled limb movement. *Behav Brain Res*, 150: 93–107, 2004.

HESS G. Calcium-induced long-term potentiation in horizontal connections of rat motor cortex. *Brain Res*, 952 (1): 142–145, 2002.

HORNER, P.J.; GAGE, F.H. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, 407: 963–970, 2000.

HOWELL, K.; HOPKINS, N.; McLOUGHLIN, P. Combined confocal microscopy and stereology: a highly efficient and unbiased approach to quantitative structural measurement in tissues. *Ex Physiol*, 87 (6): 747-756, 2002.

HUMM, J.L.; KOZLOWSKI, D.A.; JAMES, D.C.; GOTTS, J.E.; SCHALLERT T. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Res*, 783: 286-292, 1998.

INAJI, M.; TOMITA, H.; TONE, O.; TAMAKI, M.; SUZUKI, R.; OHNO, K. Chronological changes of perihematoma edema of human intracerebral hematoma. *Acta Neurochir Suppl*, 86: 445–448, 2003.

JAMES, M.L.; WARNER, D.S.; LASKOWITZ, D.T. Preclinical models of intracerebral hemorrhage: A translational Perspective. *Neurocrit Care*, 9 (1): 139-152, 2007.

JEYASINGHAM, R.A.; BAIRD, A.L.; MELDRUM, A.; DUNNETT, S.B. Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. *Brain Res Bull*, 55(4): 541-8, 2001.

JUEPTNER, M.; WEILLER, C. A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain*, 121: 1437-1449, 1998.

JUVIN L, SIMMERS J, MORIN D. Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion. *J Neurosci*, 25 (25): 6025-6035, 2005.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Princípios da neurociência. 4.ed. São Paulo: Manole, 2003.

KARNATH, H-O.; HIMMELBACH, M.; RORDEN, C. The subcortical anatomy of human spatial neglect: putamen, caudate nucleus and pulvinar. *Brain*, 125: 350–360, 2002.

KARNI, A.; MEYER, G.; REY-HIPOLITO, C.; JEZZARD, P.; ADAMS, M.M.; TURNER, R.; UNGERLEIDER, L.G. The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (3): 861-868, 1998.

KEINER, S.; WURM, F.; KUNZE, A.; WITTE, O.; REDECKER, C. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia*, 56: 516-527, 2008.

KELLY, P.J.; FURIE, K.L.; SHAFQAT, S.; RALLIS, N.; CHANG, Y.; STEIN, J. Functional recovery following rehabilitation after hemorrhagic and ischemic stroke. *Arch Phys Med Rehabil*, 84 (7): 968-972, 2003.

KLEIM, J.A.; BARBAY, S.; NUDO, R.J. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol*, 80: 3321-3325, 1998.

KLEIM, J.A.; COOPER, N.R.; VANDENBERG, P.M. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res*, 26: 934 (1): 1-6, 2002.

KLEIM, J.A.; HOGG, T.M.; VANDENBERG, P.M.; COOPER, N.R.; BRUNEAU, R.; REMPLE, M. Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning. *J Neurosci*, 24 (3): 628-633, 2004.

KLEIM, J.A.; JONES, T.A. Principles of experience-dependent neural plasticity: implications for rehabilitation after brain damage. *J Speech Lang Hear Res*, 51: 225-239, 2008.

KOLOMINSKY-RABAS, P.L.; WEBER, M.; GEFELLER, O.; NEUNDÖRFER, B.; HEUSCHMANN, P.U. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to the TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke*, 32: 2735-2740, 2001.

LABOVITZ, D.L.; HALIM, A.; BODEN-ALBALA, B.; HAUSER, W.A.; SACCO, R.L. The incidence of deep and lobar intracerebral hemorrhage in whites, blacks, and hispanics. *Neurology*, 65: 518–522, 2005.

LI, Y.; CHEN, J.; ZHANG, C.L.; WANG, L.; LU, D.; KATAKOWSKI, M.; GAO, Q.; SHEN, L.H.; ZHANG, J.; LU, M.; CHOPP, M. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*, 49: 407–417, 2005.

LIEPERT, J.; BAUDER, H.; WOLFGANG, R.; MITNER, W.H.; TAUB, E.; WEILLER, C. Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans. *Stroke*, 31: 1210-1216, 2000.

LO, E.H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*, 14: 497–500, 2008.

- LU, A.; TANG, Y.; RAN, R.; ARDIZZONE, T.L.; WAGNER, K.R.; SHARP, F.R. Brain genomics of intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (2): 230-252, 2006.
- LUFT, A.R.; BUITRAGO, M.M. Stages of motor skill learning. *Mol Neurobiol*, 32 (3): 205–216, 2005.
- LUSARDI, T.A.; WOLF, J.A.; PUTT, M.E.; SMITH, D.H.; MEANEY, D.F. Effect of acute calcium influx after mechanical stretch injury in vitro on the viability of hippocampal neurons. *J Neurotrauma*, 21: 61–72, 2004.
- MACCIOCCHI, N.; DIAMOND, P.T.; ALVES, W.M.; MERTZ, T. Ischemic stroke: relation of age, lesion location, and initial neurological deficit to functional outcome. *Arch Phys Med Rehabil*, 79: 1255-1257, 1998.
- MACKINTOSH, N.J. & COLMAN, A.M. (Eds.). Learning and skills. Londres: Longman, 1995.
- MACLELLAN, C.L.; AURIAT, A.M.; MCGIE, S.C.; YAN, R.H.Y.; HUYNH, H.D.; DE BUTTE, M.F.; COLBOURNE, F. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6 (8): 1031-1042, 2006.
- MACLELLAN, C.L.; GRAMS, J.; ADAMS, K.; COLBOURNE, F. Combined use of a cytoprotectant and rehabilitation therapy after severe intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res*, 1063 (1): 40-47, 2005.
- MACLELLAN, C.L.; SILASI, G.; POON, C.C.; EDMUNDSON, C.L.; BUIST, R.; PEELING, J.; COLBOURNE, F. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28 (3): 516-525, 2008.
- MALDONADO, M.A.; ALLRED, R.P.; FELTHAUSER, E.L.; JONES, T.A. Motor skill training, but not voluntary exercise, improves skilled reaching after unilateral ischemic lesions of the sensorimotor cortex in rats. *Neurorehabil Neural Repair*, 22 (3): 250-261, 2008.
- MARKHAM, J.A.; GREENOUGH, W.T. Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Biol*. 1 (4): 351-363, 2004.
- MATSUNI, S.; LEON, M. Elaboration of glial cell processes in the rat olfactory bulb associated with early learning. *Brain Res*, 613: 317-320, 1993.
- MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev*, 2009 – Article in press.
- MAYER, S.A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol*, 4 (10): 662-672, 2005.
- McEWEN, S.E.; HUIJBREGTS, M.P.; RYAN, J.D.; POLATAJKO, H.J. Cognitive strategy use to enhance motor skill acquisition post-stroke: a critical review. *Brain Inj*, 23 (4): 263-727, 2009.

- McGEORGE, A.J.; FAUL, R.L.M. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neurosci*, 29: 503-537, 1989.
- METZ, G.A.; WHISHAW, I.Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and coordination. *J Neurosci Methods*, 115 (2): 169-179, 2002.
- MONFILS, M.H.; PLAUTZ, E.J.; KLEIM, J.A. In search of the motor engram: motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience. *Neuroscientist*, 11 (5): 471-483, 2005.
- MONTOYA, C.P.; CAMPBELL-HOPE, L.J.; PEMBERTON, K.D.; DUNNETT, S.B. The 'staircase test': a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods*, 36: 219-228, 1991.
- MUIR, G.D.; WHISHAW, I.Q. Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behav Brain Res*, 103 (1): 45-53, 1999.
- MURPHY, T.H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 10 (12): 861-872, 2009.
- NAKAMURA, T.; XI, G.; PARK, J.W.; HUA, Y.; HOFF, J.T.; KEEP, R.F. Holo-transferrin and thrombin can interact to cause brain damage. *Stroke*, 36: 348-352, 2005.
- NAKAYAMA, H.; JORGENSEN, H.S.; RAASCHOU, H.O.; OLSEN, T.S. The Copenhagen Stroke Study. *Arch Phys Med Rehabil*, 75: 394-398, 1994.
- NESTOR, M.W.; MOK, L.P.; TULAPURKAR, M.E.; THOMPSON, S.M. Plasticity of neuron-glia interactions mediated by astrocytic EphARs. *J Neurosci*, 27: 12817-12828, 2007.
- NEWELL, K.M. Motor skill acquisition. *Annu. Rev. Psychol*, 42: 213-237, 1991.
- NIKKHAH, G.; ROSENTHAL, C.; HEDRICH, H.J.; SAMI, M. Differences in acquisition and full performance in skilled forelimb use as measured by the 'staircase test' in five rat strains. *Behav Brain Res*, 92 (1): 85-95, 1998.
- NOWAK, D.A.; GREFKES, C.; AMELI, M.; FINK, G.R. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand. *Neurorehabil Neural Repair*, 23 (7): 641-656, 2009.
- NUDO, R.J. Functional and structural plasticity in motor cortex: implications for stroke recovery. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 14 (1): 57-76, 2003.
- NUDO, R.J.; MILLIKEN, G.W.; JENKINS, W.M.; MERZENICH, M.M. Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci*, 16 (2): 785-807, 1996.

OHIRA, K.; FUNATSU, N.; HOMMA, K.J.; SAHARA, Y.; HAYASHI, M.; KANEKO, T.; NAKAMURA, S. Truncated TrkB-T1 regulate the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. *Eur J Neurosci*, 25: 406-416, 2007.

ORAKCIOGLU, B.; FIEBACH, J.B.; STEINER, T.; KOLLMAR, R.; JUTTLER, E.; BECKER, K.; SCHWAB, S.; HEILAND, S.; MEYDING-LAMADÉ, U.K.; SCHELLINGER, P.D. Evolution of early perihemorrhagic changes—ischemia vs edema: an MRI study in rats. *Exp Neurol*, 193: 369–376, 2005.

OTANI, N.; NAWASHIRO, H.; FUKUI, S.; OOIGAWA, H.; OHSUMI, A.; TOYOOKA, T.; SHIMA, K.; GOMI, H.; BRENNER, M. Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. *J Clin Neurosci*, 13: 934-938, 2006.

PAGNUSSAT, A. Aspectos motores e neurais em ratos submetidos à lesão do sistema nervoso central e periférico e tratamento de reabilitação. Porto Alegre: UFRGS, Tese. Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Neurociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

PAGNUSSAT, A.S.; MICHAELSEN, S.M.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A. Skilled forelimb reaching in Wistar rats: evaluation by means of Montoya staircase test. *J Neurosci Methods*, 177 (1): 115-121, 2009.

PALOMERO-GALLAGHER, N.; ZILLES, K. Isocortex. In: The rat nervous system. 3.ed. Elsevier, 729-757, 2004

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 2004.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50 (4): 427-434, 2005.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32 (8): 421-431, 2009.

PLAUTZ, E.J.; MILLIKEN, G.W.; NUDO, R.J. Effects of repetitive motor training on movement representations in adult squirrel monkeys: role of use versus learning. *Neurobiol Learn Mem*, 74 (1): 27-55, 2000.

PLOUGHMAN, M.; ATTWOOD, Z.; WHITE, N.; DORE, J.J.E.; CORBETT, D. Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia. *Eur J Neurosci*, 25: 3453–3460, 2007.

PLOUGHMAN, M.; WINDLE, V.; MACLELLAN, C.; WHITE, N.; DORÉ, J.J.; CORBETT, D. Brain-Derived Neurotrophic Factor Contributes to Recovery of Skilled Reaching After Focal Ischemia in Rats. *Stroke*, 40: 1490-1495, 2009.

QURESHI, A.I.; ALI, Z.; SURI, M.F.; SHUAIB, A.; BAKER, G.; TODD, K.; GUTERMAN, L.R.; HOPKINS, L.N. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Crit Care Med*, 31: 1482–1489, 2003a.

- QURESHI, A.I.; MENDELOW, A.D.; HANLEY, D.F. Intracerebral Haemorrhage. *Lancet*, 373: 1632-1644, 2009.
- QURESHI, A.I.; SURI, M.F.; OSTROW, P.T.; KIM, S.H.; ALI, Z.; SHATLA, A.A.; GUTERMAN, L.R., HOPKINS, L.N. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery*, 52: 1041–1047, 2003b.
- QURESHI, A.I.; SURI, M.F.K.; NASAR, A.; KIRMANI, J.F. ; EZZEDDINE, M.A. ; DIVANI, A.A. ; GLES, W.H. Changes in cost and outcome among US patients with stroke hospitalized in 1990 to 1991 and those hospitalized in 2000 to 2001. *Stroke*, 38: 2180–2184, 2007.
- QURESHI, A.I.; TUHRIM, S.; BRODERICK, J.P.; BATJER, H.H.; HONDO, H.; HANLEY, D.F. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*, 344: 1450-1460, 2001.
- QURESHI, A.I.; WILSON, D.A.; HANLEY, D.F.; TRAYSTMAN, R.J. No evidence for an ischemic penumbra in massive experimental intracerebral hemorrhage. *Neurology*, 52: 266–272, 1999.
- RADANOVIC, M. Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário. *Arq Neur Psiq*, 58 (1) 99-106, 2000.
- REDGRAVE, P.; PRESCOTT, T.J.; GURNEY, K. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neurosci*, 89: 1009-1023, 1999.
- REGLODI, D.; TAMAS, A.; LENGVARI, I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.Bull*, 59: 459–466, 2003.
- REICHENBACH, A.; DEROUICHE, A.; KIRCHHOFF, F. Morphology and Dynamics of Perisynaptic Glia. *Brain Res Rev*, 2010 – Article in press.
- REMPLE, M.S.; BRUNEAU, R.M.; VANDENBERG, P.M.; GOERTZEN, C.; KLEIM, J.A. Sensitivity of cortical movement representations to motor experience: evidence that skill learning but not strength training induces cortical reorganization. *Behav Brain Res*, 23 (2): 133-41, 2001.
- RIDET, J.L.; MALHORTA, S.K.; PRIVATE, A.; GAGE, F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological functions. *Trends Neurosci*, 20: 570-577, 1997.
- RISEDAL, A.; ZENG, J.; JOHANSSON, B.B. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 19: 997-1003, 1999.
- ROSENBERG, G.A.; ESTRADA, E.Y.; MOBASHERY, S. Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood–brain barrier opening in rodents: Differences in response based on strains and solvents. *Brain Res*, 1133 (1): 186-192, 2007.
- ROSENBERG, G.A.; MUN-BRYCE, S.; WESLEY, M.; KORNFELD, M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 21 (5): 801-807, 1990.

- RUTKA, J.T.; MURAKAMI, M.; DIRKS, P.B.; HUBBARD, S.L.; BECKER, L.E.; FUKUYAMA, K.; JUNG, S.; TSUGU, A.; MATSUZAWA, K. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg*, 87 (3): 420-430, 1997.
- SANES, J.N.; DONOGHUE, J.P. Plasticity and Primary Motor Cortex. *Annu Rev Neurosci*, 23: 393-415, 2000.
- SAYAH, S.; ISCHENKO, A.M.; ZHAKHOV, A.; BONNARD, A.S.; FONTAINE, M. Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J Neurochem*, 72 (6): 2426-2436, 1999.
- SCHAECHTER, J.D. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog Neurobiol*, 73: 61-72, 2004.
- SCHALLERT, T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx*, 3 (4): 497-504, 2006.
- SCHALLERT, T.; FLEMING, S.M.; LEASURE, J.L.; TILLERSON, J.L.; BLAND, S.T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacol*, 39: 777-787, 2000.
- SHELLINGER, P.D.; FIEBACH, J.B.; HOFFMANN, K.; BECKER, K.; ORAKCIOGLU, B.; KOLLMAR, R.; JUTTNER, E.; SCHRAMM, P.; SCHWAB, S.; SARTOR, K.; HACKE, W. Stroke MRI in intracerebral hemorrhage: is there a perihemorrhagic penumbra? *Stroke*, 34: 1674-1679, 2003.
- SCHROETER, M.; SCHIENE, K.; KRAEMER, M.; HAGEMANN, G.; WEIGEL, H.; EYSEL, U.T.; WITTE, O.W.; STOLL, G. Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. *Exp Brain Res*, 106 (1): 1-6, 1995.
- SHARP, S.A.; BROUWER, B.J. Isokinetic strength training of the hemiparetic knee: effects on function and spasticity. *Arch Phys Med Rehabil*, 78: 1231-1236, 1997.
- SHOLL, D.A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87 (4): 387-406, 1953.
- SIREVAAG, A.M.; GREENOUGH, W.T. Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environment. *Brain Res*, 540: 273-278, 1991.
- SOFRONIEW, M. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*, 11 (5): 400-407, 2005.
- SOFRONIEW, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 326(12): 638-647, 2009.
- SOFRONIEW, M.V.; VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119 (1): 7-35, 2010.

SONTHEIMER, H.; BLACK, J.A.; WAXMAN, S.G. Voltage-gated Na channels in glia: Properties and possible functions. *Trends Neurosci*, 19: 325-331, 1996.

STEVENS, B. Neuron–astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals*, 16: 278-288, 2008.

STURM, J.W.; DEWEY, H.M.; DONNAN, G.A.; MACDONELL, R.A.L.; McNEIL, J.J.; THRIFT, A.G. Handicap after stroke: how does it relate to disability, perception of recovery, and stroke subtype?: North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). *Stroke*, 33 (3): 762-768, 2002.

SUDLOW, C.L.; WARLOW, C.P. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. *Stroke*, 28: 491–499, 1997.

SUN, Y.; JIN, K.; XIE, L.; CHILDS, J.; MAO, X.O.; LOGVINOVA, A.; GREENBERG, D.A. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*, 111: 1843-1851, 2003.

SZYMANSKA, A.; BIERNASKIE, J.; LAIDLEY, D.; GRANTER-BUTTON, S.; CORBETT, D. Minocycline and intracerebral hemorrhage: Influence of injury severity and delay to treatment. *Exp Neurol*, 197: 189-196, 2006.

TAFT, J.R.; VERTES, R.P.; PERRY, G. W. Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain. *Intern J Neuroscience*, 115: 1333–1343, 2005.

TAKEBAYASHI, S.; KANEKO, M. Electron microscopic studies of ruptured arteries in hypertensive intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 14: 28–36, 1983.

TAYLOR, T.N.; DAVIS, P.H.; TORNER, J.C.; HOLMES, J.; MEYER, J.W.; JACOBSON, M.F. Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke*, 27: 1459-1466, 1996.

THEODOSIS, D.T.; POULAIN, D.A.; OLIET, S.H.R. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev*, 88: 983-1008, 2008.

UNGERLEIDER, L.G.; DOYON, J.; KARNI, A. Imaging brain plasticity during motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem*, 78: 553-564, 2002.

VAILLANT, A.R. ; ZANASSI, P. ; WALSH, G.S. ; AUMONT, A. ; ALONSO, A. ; MILLER, F.D. Signaling Mechanisms Underlying Reversible, Activity-Dependent Dendrite Formation. *Neuron*, 34: 985-998, 2002.

VAN VLIET, P.M.; SHERIDAN, M.R. Coordination between reaching and grasping in patients with hemiparesis and healthy subjects. *Arch Phys Med Rehabil*, 88 (10): 1325-1331, 2007.

VANVLEET, T.M.; HELDT, S.A.; GUERRETTAZ, K.R.; CORWIN, J.V.; REEP, R.L. Unilateral destruction of the dorsocentral striatum in rats produces neglect but not extinction to bilateral simultaneous stimulation. *Behav Brain Res*, 136: 375–387, 2002.

VIOLA, G.G.; RODRIGUES, L.; AMÉRICO, J.C.; HANSEL, G.; VARGAS, R.S.; BIASIBETTI, R.; SWAROWSKY, A.; GONÇALVES, C.A.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M.; SOUZA, D.O.; AMARAL, O.B. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res*, 1274: 47-54, 2009.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6 (8): 626-640, 2005.

WÄCHTER, T.; RÖHRICH, S.; FRANK, A.; MOLINA-LUNA, K.; PEKANOVIC, A.; HERTLER, B.; SCHUBRING-GIESE, M.; LUFT, A.R. Motor skill learning depends on protein synthesis in the dorsal striatum after training. *Exp Brain Res*, 200: 319-323, 2010.

WAGNER, K.R.; PACKARD, B.A.; HALL, C.L.; SMULIAN, A.G.; LINKE, M.J.; DE COURTEN-MYERS, G.M.; PACKARD, L.M.; HALL, N.C. Protein oxidation and heme oxygenase-1 induction in porcine white matter following intracerebral infusions of whole blood or plasma. *Dev Neurosci*, 24: 154-160, 2002.

WAGNER, K.R.; SHARP, F.R.; ARDIZZONE, T.D.; LU, A.; CLARK, J.F. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23 (6): 629-652, 2003.

WANG, Y.; KILIC, E.; KILIC, U.; WEBER, B.; BASSETTI, C.L.; MARTI, H.H.; HERMANN, D.M. VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain*, 128, 52-63, 2005.

WARD, N.S.; BROWN, M.M.; THOMPSON, A.J.; FRACKOWIAK, R.S. Neural correlates of outcome after stroke: a cross-sectional fMRI study. *Brain*, 126 (6): 1430-1448, 2003.

WASSERMAN, J.K.; YANG, H.; SCHLICHTER, L.C. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. *Euro Jour Neurosci*, 28: 1316-1328, 2008.

WEILLER, C.; RAMSAY, S.C.; WISE, R.; FRISTON, K.J.; FRACKOWIACK, R.S.J. Individual patterns of functional reorganization in the human cerebral cortex after capsular infarction. *Ann Neurol*, 33: 181-189, 1993.

WHINSHIP IR; MURPHY TH. In vivo calcium imaging reveals functional rewiring of single somatosensory neurons after stroke. *J. Neurosci*, 28: 6592-6606, 2008.

WHISHAW, I.Q. Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. *Neuropharmacol*, 39: 788-805, 2000.

WHISHAW, I.Q.; COLES, B.L. Varieties of paw and digit movement during spontaneous food handling in rats: postures, bimanual coordination, preferences, and the effect of forelimb cortex lesions. *Behav Brain Res*, 77 (1-2): 135-148, 1996.

- WHISHAW, I.Q.; GORNY, B. Does the red nucleus provide the tonic support against which fractionated movements occur? A study on forepaw movements used in skilled reaching by the rat. *Behav Brain Res*, 74 (1-2): 79-90, 1996
- WHISHAW, I.Q.; HAUN, F.; KOLB, B. Analysis of Behavior in Laboratory Rodents. In: Windhorst, U.; Johansson, H. *Modern Techniques in neuroscience*. Springer: Berlin, 1243-1275, 1999.
- WHISHAW, I.Q.; O'CONNOR, W.T.; DUNNETT, S.B. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain*, 109 (5): 805-843, 1986.
- WHISHAW, I.Q.; PELLIS, S.M. The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. *Behav Brain Res*, 41 (1): 49-59, 1990.
- WHISHAW, I.Q.; ZEEB, F.; ERICKSON, C.; McDONALD, R. J. Neurotoxic lesions of the caudate-putamen on a reaching for food task in the rat: acute sensorimotor neglect and chronic qualitative motor impairment follow lateral lesions and improved success follows medial lesions. *Neuroscience*, 146: 86-97, 2007.
- WHITE, N.M. Some highlights of research on the effects of caudate nucleus lesions over the past 200 years. *Behav Brain Res*, 199: 3-23, 2009.
- WILHELMSSON, U.; BUSHONG, E.A.; PRICE, D.L.; SMARR, B.L.; PHUNG, V.; TERADA, M.; ELLISMAN, M.H.; PEKONY, M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (46): 17513-17518, 2006.
- WILLINGHAM, D.B. The neural basis of motor skill learning. *Curr dir psychol sci*, 8 (6): 178-182, 1999.
- WINDLE, V.; SZYMANSKA, A.; GRANTER-BUTTON, S.; WHITE, C.; BUIST, R.; PEELING, J.; CORBETT, D. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol*, 201: 324-334, 2006.
- WOODLEE, M.T.; ASSEO-GARCIA, A.M.; ZHAO, X.; LIU, S.J.; JONES, T.A.; SCHALLERT, T. Testing forelimb placing "across the midline" reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats. *Exp Neurol*, 191: 310-317, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Project Investigators: The World Health Organization - MONICA Project (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease). *J Clin Epidemiol*, 41: 105-114, 1988.
- XAVIER, L.L., VIOLA, G.G., FERRAZ, A.C., DA CUNHA, C., DEONIZIO, J.M., NETTO, C.A., ACHAVAL, M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine

hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc*, 16: 58-64, 2005.

XI, G.; KEEP, R.F.; HOFF, J.T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol*, 5: 53-63, 2006.

ZAZULIA, A.R.; DIRINGER, M.N.; VIDEEN, T.O.; ADAMS, R.E.; YUNDT, K.; AIYAGARI, V.; GRUBB, R.L.Jr.; POWERS, W.J. Hypoperfusion without ischemia surrounding acute intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21: 804–810, 2001.

ZHANG, Z.G.; ZHANG, L.; JIANG, Q.; ZHANG, R.; DAVIES, K.; POWERS, C.; BRUGGEN, N.; CHOPP, M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood–brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*, 106: 829-838, 2000.

ZILLES, K.; HAJÓS, F.; KÁLMÁN, M.; SCHLEICHER, A. Mapping of glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in the rat forebrain and mesencephalon by computerized image analysis. *J Comp Neurol*, 308: 340-355, 1991.