



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências

Expressão da Proteína Associada a Microtúbulo-2 (MAP-2) no córtex motor primário e recuperação motora após o aprendizado de diferentes tarefas em ratos submetidos à hemorragia intracerebral

MARILUCIA VIEIRA DOS SANTOS

PORTO ALEGRE

2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Expressão da Proteína Associada a Microtúbulo-2 (MAP2) no córtex motor primário e recuperação motora após o aprendizado de diferentes tarefas em ratos submetidos à hemorragia intracerebral

MARILUCIA VIEIRA DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval

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

PORTO ALEGRE

2010

"Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como um bronze que soa, ou como um sino que tine. E, ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e tivesse toda a fé até o ponto de transportar montes, se não tivesse amor nada seria".

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e aos meus pais por estarem comigo incondicionalmente durante toda a minha caminhada na realização deste mestrado. Pai e Mãe amo vocês e obrigada por tudo, o sonho tornou realidade e podem ter certeza que vocês colaboraram muito para o meu sucesso.

Um agradecimento em especial ao Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves, pois foi a primeiro professor da pós-graduação em neurociências que me acolheu e ajudou a orientar minhas idéias iniciais sobre a linha de pesquisa a seguir e também porque através dele que conheci o Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto.

Ao magnífico mestre Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto, obrigado pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação e pelos teus sábios ensinamentos objetivo, porém imprescindível para conclusão desta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Matilde Achaval que colaborou para execução deste trabalho, e ainda por tudo que representa ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, com seu imenso conhecimento na ciência morfológica.

À Prof^a Dr^a Aline de Souza Pagnussat, muito obrigado pela tua dedicação, paciência e amizade, que com certeza foram essenciais para elaboração deste trabalho. Com teus ensinamentos científicos aprendei como realmente se faz uma pesquisa.

Ao colega mestre Régis Gemerasca Mestriner, pela importante colaboração, pois muito desse trabalho devo à imensa ajuda e força que me deste.

A todos os colegas do laboratório 35, que de forma direta ou indireta que colaboram ou compartilharam com a minha trajetória durante o mestrado. Em especial à Janine Anastácio, Lígia Simões Braga Boisserand, Fernanda Cechetti, Simone Nardin Weis e Lenir Pereira.

Aos professores da pós-graduação em neurociências que proporcionaram maior conhecimento científico.

A toda minha família, que vibraram, rezaram, torceram e acreditaram no meu potencial; em especial aos meus irmãos e cunhadas.

Ao meu noivo por me dar força em todos os momentos durante essa empreitada da minha vida.

À minhas amigas do coração Fernanda, Catiane, Melissa e Analusia, que compartilharam com todas as minhas conquistas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo esquemático dos mecanismos que levam à formação do edema na HIC.....	07
Figura 2. Representação gráfica e corte encefálico mostrando o córtex motor (M1 e M2), área cortical de representação sensorial primária do membro anterior (S1FL) e o estriado (CPu) no rato.....	10
Figura 3. Remodelação funcional da representação da mão no córtex motor primário após AVE em macacos.....	19
Figura 4. Mudanças morfológicas após aprendizagem de tarefa de habilidade..	22
Figura 5. Desenho experimental.....	28
Figura 6. Aparato empregado para a realização da tarefa de habilidade do alcance e preensão.....	31
Figura 7. Representação dos animais na esteira motorizada empregada para a realização da tarefa de não-habilidade.....	32
Figura 8. Teste do <i>Staircase</i>	33
Figura 9. Imagens digitalizadas do encéfalo de um animal submetido à HIC, 4 semanas após a cirurgia, mostrando as três medidas da espessura cortical em nível + 0,7mm a partir do bregma.....	35
Figura 10. Número de esferas apanhadas nos primeiro degraus (1-4) e nos últimos degraus (5-7) nos diferentes grupos (<i>sham</i> e HIC) e tarefas ao longo	

do tempo no teste do *Staircase*..... 40

Figura 11. (A) Corte encefálico submetido à técnica de imunistoquímica para MAP2, mostrando as áreas de interesse (AOI) utilizadas para a semi-quantificação da imunorreatividade no córtex motor primário. (B) Área representativa mostrando marcação para MAP2 nos dendritos e soma neural. (C e D) Densidade óptica relativa no córtex motor primário ipsilateral e contralateral ao hemisfério lesado repectivamente..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores totais do sucesso de alcance e preensão no teste <i>Staircase</i> , nos diferentes grupos (<i>sham</i> e HIC) e tarefas ao longo do tempo.....	40
Tabela 2. Valores do sucesso de alcance e preensão nos degraus 5-7 no teste do <i>Satircase</i> , nos diferentes grupos ao longo do tempo.....	41
Tabela 3. Valores presentes da área total do hemisfério, espessura cortical e área da lesão.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AE: Ambiente Enriquecido

AMC: Área Motora Cingulada

AMS: Área Motora Suplementar

ANOVA: Análise de Variância

AOI: Área de Interesse

APM: Área Pré-Motora

AVD: Atividade de Vida Diária

AVE: Acidente Vascular Encefálico

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

CPu: Núcleos Caudado e Putâmen (Estriado)

DCNT: Doenças Crônicas não Transmissíveis

EPM : Erro Padrão da Média

Fr: Isocórtex Frontal

Fr1: Isocórtex Frontal Área 1

Fr2: Isocórtex Frontal Área 2

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

IL: Interleucina

MAP's : Proteínas Associadas a Microtúbulos

MAP2: Proteína Associada a Microtúbulo-2

M1: Córtex Motor Primário

NF- κ B: fator nuclear kappa β

NGS: Soro Normal de Cabra

OMS: Organização Mundial de Saúde

PMv: córtex pré-motor ventral

S1: área motora somoestésica

S1FL: Área Cortical de Representação Sensorial Primária Do Membro Anterior

SNC: Sistema Nervoso Central

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: Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

As principais incapacidades funcionais que se observam após o Acidente Vascular Encefálico (AVE), sob o ponto de vista clínico, decorrem da hemiparesia, da incoordenação, da hipertonia espástica dos membros superior e inferior contralaterais à lesão e da fraqueza ipsilateral e contralateral ao hemisfério lesado. 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 a participação da atividade dendrítica, observada pelo aumento da imunorreatividade a MAP2, induzida por experiências comportamentais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho motor e a expressão da MAP2 no córtex motor primário, em ratos *sham* 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, sendo, posteriormente, submetidos à cirurgia de indução da hemorragia intracerebral (HIC) por meio da administração intra-estriatal de colagenase tipo IV ou de veículo (animais *Sham*) (S). 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 pelo teste do *Staircase* quanto ao desempenho motor ao final da 2^o e 4^o semana de treinamento. Encerrado o período de treinamento, os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos e tiveram seus encéfalos processados para a análise imunohistoquímica. Os resultados mostram que a realização da tarefa de habilidade do alcance e preensão foi capaz de aumentar a imunorreatividade da MAP2 no córtex motor primário (M1) em ambos os hemisférios, tanto em animais lesados quanto em animais não-lesados. Além disso, os animais HIC e HIC_TNH apresentaram também aumento da imunorreatividade à MAP2 em ambos os hemisférios. Porém, apenas os animais HIC_TH apresentaram recuperação funcional dos movimentos do membro anterior afetado, avaliados pelo teste comportamental. Concluindo, o presente estudo demonstra que o treino de habilidade induz plasticidade dendrítica no M1 em condições normalidade e lesão e, como estratégia de reabilitação, mostra-se superior ao treino de não-habilidade, na recuperação funcional do membro anterior após a HIC experimental.

Palavras-chave: hemorragia intracerebral, tarefa de habilidade, dendritos, proteína associada ao microtúbulo-2, córtex motor primário.

ABSTRACT

Under clinical view, the main functional impairment observed after stroke is resulting from the hemiparesis, incoordination, spastic hypertonia and from ipsilateral and contralateral weakness. Evidences suggest that learning and achievement of motor tasks ability may induce behavioral and neurophysiological changes, which occur in both intact and injured animals. Accordingly, some studies reveal the participation of dendritic activity, observed by increasing the immunoreactivity to MAP2, induced by behavioral experiences. Thus, the aim of this study was to evaluate the motor performance and the expression of MAP2 in primary motor cortex (M1), in rats submitted or not to the IHC and rehabilitation using skilled (SK) or unskilled (US) training. Animals were initially adapted to different motor tasks employed over three weeks, and, subsequently, submitted to surgery for the induction of intracerebral hemorrhage (IHC) by means of administration of bacterial collagenase type IV or vehicle (animals Sham) (S) into the striatum. Then, animals in groups S_SK and IHC_SK were submitted to the training skilled forelimb reaching, animals in groups S_US and IHC_US were submitted to the training unskilled and animals S and HIC received no type of training during 4 weeks. Throughout that period, the reaching ability was tested using the Staircase test at the end of 2nd and 4th week of training. At the end of the rehabilitation period, animals were deeply anesthetized, perfused and the immunohistochemistry was processed. Results show that the achievement of the task skilled forelimb reaching was able to increase the MAP2 immunoreactivity in primary motor cortex (M1) in both hemispheres, both in injured animals as in intact animals. In addition, animals from IHC and IHC_US groups also presented increased immunoreactivity to MAP2 in both cerebral hemispheres. However, only IHC_SK animals presented functional recovery of movements of the forelimb, evaluated by test behavioral. In conclusion, this study shows that training of skills tasks can induce modifications in M1 under conditions of normality and lesion and, as a strategy of rehabilitation, induced higher plasticity than the unskilled training correlated with functional recovery of the forelimb after IHC experimental.

Keywords: intracerebral hemorrhage, skilled reaching, dendritic, microtubule-associated protein-2, primary motor cortex.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Fisiopatologia da hemorragia intracerebral.....	04
1.2 Controle motor.....	08
1.3 Comprometimento sensório-motor e estratégias de reabilitação.....	13
1.4 Plasticidade no SNC e recuperação motora.....	18
1.5 Proteína Associada a Microcúbulo – 2 (MAP-2).....	22
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Desenho experimental.....	26

3.2 Modelo de hemorragia cerebral induzida por colagenase.....	28
3.3 Treinamentos Comportamentais.....	30
3.3.1 Treinamento da tarefa de habilidade.....	30
3.3.2 Treinamento da tarefa de não-habilidade.....	31
3.4 Avaliação comportamental.....	32
3.4.1 Teste do “Staircase”	32
3.5 Análise morfométrica.....	34
3.6 Análise imunoistoquímica para MAP-2.....	35
3.7 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Análise Comportamental.....	38
4.1.1 Teste do “Staircase”	38
4.2 Análise Morfométrica.....	41
4.3 Análise da imunorreatividade à MAP-2.....	42
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÕES.....	56
7 PERSPECTIVAS.....	57

8 REFERÊNCIAS..... 58

1 INTRODUÇÃO

O perfil das doenças incidentes na população brasileira está sob constante influência dos processos de transição pelos quais o País tem passado. A diminuição nas taxas de natalidade e fecundidade associada ao aumento da expectativa média de vida tem levado ao aumento crescente da população de idosos no país. Por outro lado, o processo de transição nutricional revela a transposição das atenções voltadas aos problemas relacionados à subnutrição para aqueles conjugados ao sobrepeso e à obesidade. Isso tem resultado em um novo perfil de morbimortalidade, no qual as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) lideram as causas de morte e incapacidade (BARRETO *et al.*, 2005). Dados epidemiológicos revelam que esse tipo de doença é responsável por altos custos diretos em saúde, totalizando anualmente 7,5 bilhões de reais em gastos ambulatoriais e internações (MALTA, CEZARIO & MOURA, 2006). Dentre as DCNT's, as doenças cerebrovasculares são as mais prevalentes, observando-se uma incidência anual de 156 casos a cada 100.000 habitantes (RADANOVIC, 2000).

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) 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). Em geral, trata-se de um evento isquêmico ou hemorrágico, resultando, frequentemente, 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), que pode ser consequência de edema por dano isquêmico, ruptura por má formação vascular, angiopatia ou trauma encefálico (XUE e DEL BIGIO, 2000). Embora o AVE hemorrágico represente um importante problema clínico, pouca atenção tem sido dada ao seu tratamento quando comparado ao AVE isquêmico (AURIAT *et al.*, 2006).

Após o AVE, as principais incapacidades funcionais que se observam, sob o ponto de vista clínico, decorrem da hemiparesia, da incoordenação, da hipertonia espástica dos membros superior e inferior contralaterais à lesão e da fraqueza ipsilateral e contralateral ao hemisfério lesado (BOHANNON, 1990; 1995; ANDREWS & BOHANNON, 2000; SCHAECTER, 2004). O período considerado ideal para a realização do tratamento de reabilitação é de até 6 meses após o AVE. Todavia, mesmo mediante tratamento, grande parte desses pacientes permanece, ao menos parcialmente, dependente para realizar as atividades da vida diária (AVD) (STOKES, 2004). Isso ocorre porque a função do membro superior é crítica para o desempenho eficiente e independência nas AVD's e a recuperação desse segmento é mais lenta e complexa quando comparada à recuperação do membro inferior (NAKAYAMA *et al.*, 1994; LEVIN, KLEIM & WOLF, 2009).

A fim de mimetizar o AVE clínico, diversos modelos animais têm sido desenvolvidos para o estudo experimental da hemorragia. Esses modelos servem como ferramenta indispensável, proporcionando maior conhecimento acerca dos mecanismos fisiopatológicos da doença e possibilitando o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento (XUE e DEL BIGIO, 2000; WINDLE *et al.*, 2006; MACLELLAN *et al.*, 2008). Dentre eles, o modelo de injeção estriatal de colagenase derivada de *clostridium histolyticum* no parênquima cerebral (ROSENBERG *et al.*, 1990), provoca dano sensitivo-motor do membro anterior contralateral ao hemisfério

lesado, sendo útil para o estudo da recuperação motora (WHISHAW; O'CONNOR & DUNNET, 1986).

Em relação às estratégias de reabilitação, sabe-se que a execução de tarefas motoras tem a capacidade de induzir sinaptogênese em várias regiões encefálicas, corticais e subcorticais (BLACK *et al.*, 1990; ANDERSON, ALCANTARAA & GREENOUGH, 1996; KLEIM, BALLARD & GREENOUGH, 1997; KLEIM, BARBAY & NUDO, 1998). Ainda, existem dúvidas sobre o significado funcional da modificação no número de sinapses e sua relação com a aprendizagem motora. Existe a hipótese de que a adição ou a redução dos contatos sinápticos represente mudança no padrão de conectividade sináptica, estando relacionado ao desempenho do comportamento motor aprendido (KLEIM *et al.*, 2002). Estudos prévios demonstraram que a terapia motora promove aumento na expressão de BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo), aumento da arborização dendrítica, angiogênese e sinaptogênese no córtex motor, com reorganização da representatividade cortical dos segmentos corporais envolvidos na tarefa (GREENOUGH, 1985; JONES *et al.*, 1999; BIERNASKIE & CORBETT, 2001, KLEIM *et al.*, 2002, KLEIM, COOPER & VANDEBERG, 2002).

Em função da grande prevalência da morbidade resultante do AVE e, conhecendo-se o período restrito para obtenção dos melhores resultados terapêuticos, a escolha adequada do tratamento é fundamental para a máxima recuperação da funcionalidade dos pacientes acometidos por essa doença. Tendo em vista a relação entre modificações morfológicas neuronais e atividade motora, objetivou-se com este estudo verificar as adaptações dendríticas no córtex motor primário após indução experimental de hemorragia e treinamento de diferentes tarefas motoras.

Acredita-se que mudanças fisiológicas, tais como o aumento da densidade dendrítica pós-lesão do SNC, visem facilitar a recuperação funcional, principalmente na presença de estratégias sensório-motoras, embora pouco seja conhecido sobre o papel dessas alterações morfofisiológicas e suas relações com a recuperação sensório-motora e funcional. Além disso, até o presente momento não existem trabalhos publicados mostrando possíveis mudanças dendríticas, relacionados com expressão da proteína associada a microtúbulo-2 (MAP2), no córtex motor primário após os treinamentos de habilidade ou de não habilidade do membro anterior. Tampouco existem relatos sobre as implicações comportamentais que possivelmente possam ser desencadeadas por essas alterações morfológicas em animais intactos e naqueles submetidos à HIC.

1.1 Fisiopatologia da hemorragia intracerebral

Apesar da hemorragia intracerebral (HIC) representar apenas 15% dos diagnósticos de AVE clínico, ela está associada a altos índices de morbi-mortalidade dos indivíduos acometidos. O principal fator determinante da lesão por HIC é o volume de sangue envolvido. Quando o volume da hemorragia excede 150 mL, a pressão da perfusão cerebral cai de forma abrupta para níveis extremamente baixos, levando ao óbito em grande parte dos casos. Quando o volume hemorrágico é menor que 140 mL, muitos pacientes sobrevivem ao insulto inicial, entretanto, o hematoma gerado pode levar a danos secundários, resultando em déficits neurológicos e algumas vezes em óbito (XI, KEEP & HOFF, 2006).

A hipertensão arterial sistêmica é a principal causa espontânea de HIC, podendo causar micro-aneurismas na bifurcação das arteríolas. Estudos mostram

que a elevação da pressão arterial intraluminal persistente causa danos nas paredes de pequenos vasos (FISCHER, 1971;1972). Além da hipertensão, existem outras grandes causas de HIC, que são: angiopatia amilóide, tumores cerebrais, aneurismas, malformação arteriovenosa, angiomas cavernosos e fístulas arteriovenosas (QURESHI *et al.*, 2001). As regiões encefálicas mais acometidas pela HIC são: os núcleos da base (putâmen e caudado), tálamo, cerebelo e ponte. A localização do insulto é importante para saber as causas e consequências da lesão, bem como o potencial para intervenção (XI, KEEP & HOFF, 2006).

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). Dois novos conceitos introduzidos são particularmente importantes. Sabe-se hoje que a maior parte do dano celular e do edema que acontecem dias após a HIC são resultado do processo inflamatório (JAMES, WARNER & LASKOWITZ, 2007), com importante participação dos produtos finais da coagulação (MAYER & RINCON, 2005). Outro conceito importante é que a hemorragia pode continuar aumentando por muitas horas após o início dos sintomas (GEBEL *et al.*, 2002; MAYER & RINCON, 2005). Modelos experimentais de HIC mostram que o pico do edema cerebral está entre o terceiro e o quarto dia depois do evento hemorrágico e a partir desse período declina lentamente (YANG *et al.*, 1994; TOMITA *et al.*, 1994; XI, KEEP & HOFF, 1998). Além disso, esse processo tardio na formação do edema pode ser modificado por intervenções terapêuticas, como aquelas focadas na redução da toxicidade induzida pela hemoglobina (XI *et al.*, 2001). Não se sabe ao certo se a formação do edema peri-hematoma contribui ou não para os déficits neurológicos subsequentes. Porém,

a intensidade do edema próximo ao hematoma está associada com pobre prognóstico, principalmente aqueles com desenvolvimento tardio (ROPPER, 1986; ZAZULIA *et al.*, 1999).

O dano neural decorrente da HIC era considerado de caráter relativamente estático, causado somente pela massa de sangue intracraniano, seguida do desenvolvimento de uma área de penumbra isquêmica circundante (MAYER & RINCON, 2005). Nas últimas décadas, os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos nesse evento foram ampliados, fato que se deve, principalmente, ao desenvolvimento e estudo de diferentes modelos experimentais. Hoje se sabe que há várias fases da formação do edema após a HIC. A fase aguda (primeiras horas) envolve aumento da pressão hidrostática e retração do coágulo, a segunda fase (primeiros dois dias) está relacionada com a cascata de coagulação e a produção da trombina, enquanto que a terceira fase envolve a lise dos eritrócitos e a toxicidade da hemoglobina (Figura 1) (WAGNER *et al.*, 1996; XI, KEEP & HOFF, 2006).

Uma série de mecanismos contribui para o desenvolvimento do dano neural pós-HIC, os quais incluem: (a) vigorosa resposta inflamatória - mediada pela liberação do fator nuclear kappa β (NF- κ β) que se transloca ao núcleo celular e está associada à supra-regulação de uma série de genes envolvidos nos processos inflamatórios e apoptóticos incluindo interleucina1 β (IL-1 β), fatores necróticos tumorais (TNF- α) e trombina (WAGNER *et al.*, 1998); (b) ativação microglial - que participa de uma grande variedade de respostas adaptativas, incluindo a fagocitose de células necróticas e o recrutamento de leucócitos (WANG *et al.*, 2003); (c) ativação do sistema complemento - componente da resposta imunológica particularmente importante no edema pós-hemorrágico (SAYAH *et al.*, 1999); (d) ativação de metaloproteinases de matriz - família de endopeptidases que degradam

a matriz extracelular (ROSENBERG, ESTRADA & MOBASHERY, 2007); (e) produção de espécies reativas de oxigênio como decorrência da hemoglobinólise (WAGNER *et al.*, 2003); e (f) apoptose, a qual se inicia aproximadamente 24 horas após o evento hemorrágico (MAYNE *et al.*, 2001).

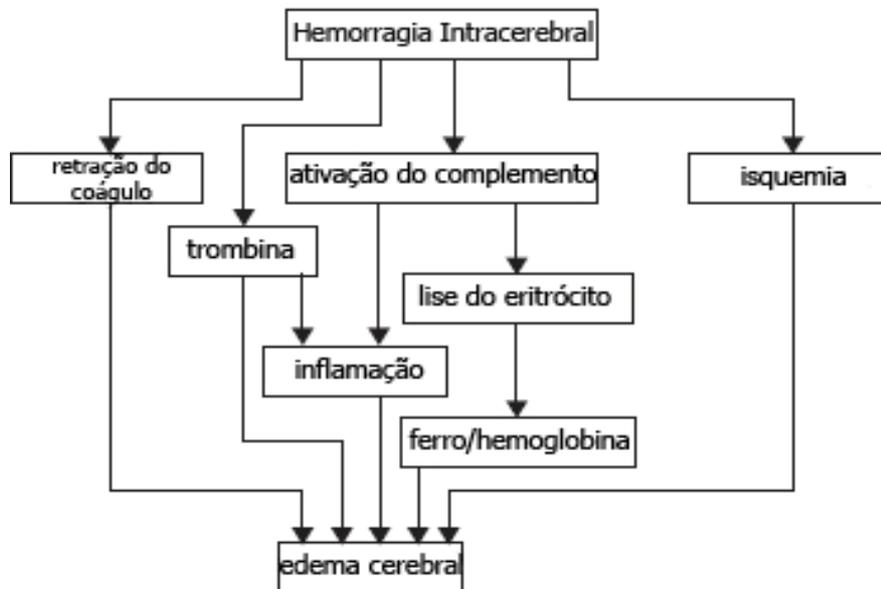


Figura1. Representação esquemática dos mecanismos que levam à formação do edema na HIC (adaptado de Xi, KEEP & HOFF, 2006).

Nas regiões adjacentes ao hematoma pode-se constatar a presença de edema, células em apoptose e/ou necrose e infiltrado inflamatório (QURESHI *et al.*, 2003a). Nesse sentido, o hematoma pode induzir danos morfofisiológicos em função da deformação tecidual mecânica, que acarreta o afastamento entre neurônios e células gliais (QURESHI *et al.*, 2001), despolarização da membrana, liberação de neurotransmissores, disfunção mitocondrial (GRAHAM *et al.*, 2000; QURESHI *et al.*, 2003b; LUSARDI *et al.*, 2004), proliferação e ativação astrocitária na região peri-hematoma (KOWIAŃSKI e.t al., 2003) Além disso, em casos onde o coágulo é muito extenso e a pressão intracraniana muito elevada, pode ocorrer evento isquêmico

secundário (QURESHI, WILSON & TRAYSTMAN, 1999; ZAZULIA *et al.*, 2001; YANG, WANG & WANG, 2003 ; XI, KEEP & HOFF, 2006).

Os indivíduos que sobrevivem à HIC sofrem danos neurológicos e, em sua maioria, permanecem com deficiências sensório-motoras. Sendo assim, há um interesse crescente da pesquisa científica no entendimento das ações de reorganização do SNC e sua recuperação, para desenvolver novas técnicas terapêuticas baseadas nos princípios neurobiológicos, acionados para minimizar os prejuízos fisiológicos (WARD, 2005).

1.2 Controle motor

A capacidade de gerar movimentos corporais coordenados depende da interconexão de uma série de estruturas envolvidas no controle motor. O primeiro passo necessário para a início de um movimento voluntário é a ativação cortical. Em humanos, o córtex motor pode ser dividido em córtex motor primário (M1), área motora suplementar (AMS), área pré-motora (APM) e área motora cingulada (AMC). A área M1, que ocupa o giro pré-central do lobo frontal, possui o menor limiar de estimulação para a produção de movimentos e projeta densos feixes axonais pelas vias descendentes. Essa é a principal região de onde surgem os comandos para os movimentos voluntários, aqueles que irão se sobrepôr aos reflexos, responsáveis pelas reações posturais, início da locomoção e dos movimentos de integração sensório-motora. Por outro lado, a AMS e a APM estão relacionadas ao planejamento dos movimentos voluntários, mais do que ao comando de sua execução, enquanto a AMC possui relações com o sistema límbico e parece participar dos movimentos com conotação emocional (LENT, 2005).

Na superfície cortical as regiões corporais estão representadas de modo ordenado, acompanhando a distribuição corporal, ou seja, uma organização topográfica ordenada conhecida como somatotopia. O homúnculo no giro pré-central indica que regiões da cabeça estão representadas mais lateralmente em M1, mão, braço, antebraço e tronco ficam posicionados mais dorsalmente, enquanto o membro inferior está representado na face medial do hemisfério. As regiões distais dos membros, principalmente as mãos, e as regiões periorais da face apresentam maior representação cortical do que as demais regiões do corpo, o que é coerente com o fato desses segmentos possuírem um repertório mais diversificado de movimentos finos e precisos, e músculos com mais alta razão de inervação (KANDEL, 2003). O mapa somatotópico motor é importante porque a face medial do giro pré-central é irrigada pela artéria cerebral anterior, enquanto a face dorsolateral é irrigada pela artéria cerebral medial. Isso faz com que, dependendo da artéria ocluída, sejam produzidas alterações sensório-motoras em diferentes segmentos corporais (LENT, 2005).

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. 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 (Figura 2). 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).

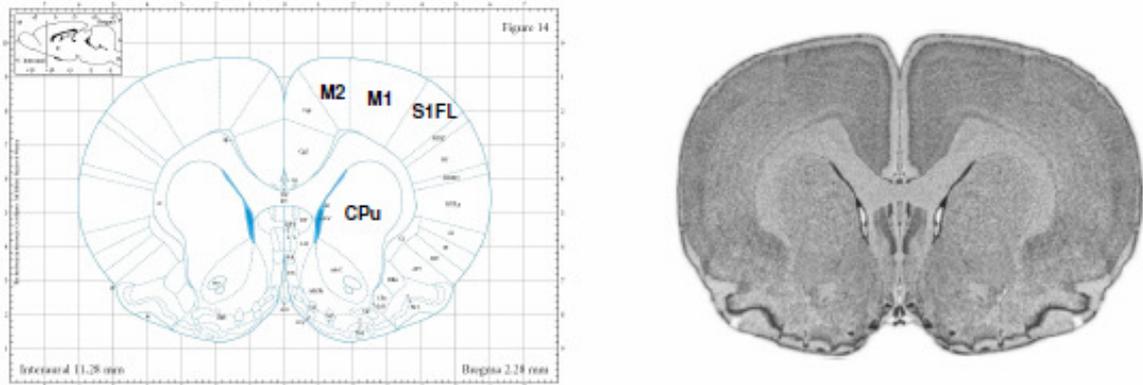


Figura 2. Representação gráfica e corte encefálico mostrando o córtex motor (M1 e M2), área cortical de representação sensorial primária do membro anterior (S1FL) e o estriado (CPu) no rato (adaptado de PAXINOS & WATSON, 2004).

As células do córtex motor são organizadas em colunas verticais, com milhares de neurônios em cada coluna, as quais funcionam como unidades, geralmente estimulando um grupo de músculos sinérgicos, mas algumas vezes estimulando grupamentos musculares únicos. Igualmente, cada coluna tem seis camadas de células distintas, como ocorre em quase todo córtex cerebral. As células piramidais que dão origem às fibras cortico-espinais situam-se na quinta camada, enquanto os sinais de aferência penetram nas camadas 2, 3, e 4. A sexta camada dá origem principalmente às fibras que se comunicam com outras regiões do próprio córtex cerebral (GUYTON & HALL, 2006).

Os neurônios de cada coluna operam como um sistema de processamento integrativo, usando informações de múltiplas fontes de aferências para determinar a resposta de saída da coluna. Ademais, cada coluna pode funcionar como um sistema de amplificação para estimular grande número de fibras piramidais para o mesmo músculo ou para músculos sinérgicos simultaneamente (BEAR, 2002; GUYTON & HALL, 2006).

A representação dos mapas no córtex motor pode ser alterada pela variedade de manipulações, incluindo mudanças nas aferências, estimulação cortical repetitiva e manipulações farmacológicas. Alterações prolongadas dos sinais de entrada proprioceptivas e táteis, associadas aos músculos têm mostrado indução de mudanças plásticas no mapa motor em roedores (NUDO & JENKINS, 1990; SANES & DONOGHUE, 2000). Além disso, a organização do mapa cortical pode ser dependente do treinamento motor, refletindo a natureza da tarefa realizada (MONFILS *et al.*, 2005). Foi observado que o uso de tarefa de habilidade de alcance em ratos provoca expansão da área motora representativa do membro anterior para os movimentos distais do membro (KLEIM, BARBAY & NUDO, 1998; KLEIM *et al.*, 2002). Todavia, a extinção do treino da tarefa de habilidade pode reverter à expansão da área motora representativa (NUDO & MILLIKEN, 1996).

As áreas motoras do córtex cerebral são densamente interconectadas e apresentam também conexões com outras regiões corticais, como área somoestésica primária (S1) e as áreas associativas dos lobos parietal e frontal. Todas as áreas projetam-se para regiões motoras sub-corticais, núcleos da base e cerebelo (LENT, 2005). Além disso, os tratos corticoespinal e corticobulbar são as vias mais importantes utilizadas na execução dos movimentos voluntários. O trato corticoespinal lateral e parte equivalente do trato corticobulbar controlam os movimentos delicados produzidos pelos músculos das extremidades distais contralaterais, da porção inferior da face e da língua. O trato corticoespinal medial e parte do trato corticobulbar, bem como outras vias indiretas, controlam a musculatura do tronco, proporcionando sustentação postural aos movimentos apendiculares voluntários (LEVY, 2006).

O sistema de controle do movimento funciona por meio de uma alça de retroalimentação, a qual leva informação do movimento pretendido até as estruturas de controle que corrigem, adéquam e aperfeiçoam o movimento e reenviam essas informações às estruturas corticais (DELONG & WICHMANN, 2007; HANDLEY *et al.*, 2009). 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). O cerebelo, por sua vez, possui uma grande densidade de aferências, as quais provêm informações sobre sensibilidade somestésica, visual, auditiva e vestibular, além das aferências de origem cortical (PROSKE & GANDENIA, 2009). Do córtex, o cerebelo recebe informações sensório-motoras por meio do trato cortico-ponto-cerebelar. A resposta de correção do movimento, por sua vez, parte dos núcleos cerebelares profundos para o núcleo centro lateral do tálamo e deste para o córtex (HORNE & BUTLER, 1995, HOLSCHINER *et al.*, 2007). Após adequação e correção dos movimentos, a informação é transmitida até a unidade de ordenação. A unidade de ordenação é constituída pelos motoneurônios da medula e do tronco encefálico as quais controlam a excitabilidade muscular por meio dos potenciais de ação transmitidos por meio dos pares de nervos espinhais e cranianos (KANDEL, 2003).

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 (HANDLEY *et al.*, 2009). 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 para a realização do movimento voluntário

normal e, talvez, para o aprendizado motor (BROWN & SHARP, 1995). Experimentos utilizando a injeção estriatal de inibidores de síntese protéica demonstram que essa 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 componentes fundamentais 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, HIMMELBACH, RORDEN, 2002), da orientação espacial (BROWN & ROBBINS, 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. Além disso, estariam envolvidos na finalização de programas motores relacionados a metas, tais como alcançar e segurar um objeto (REDGRAVE, PRESCOTT & GURNEY, 1999).

Em suma, a intensa relação entre as regiões corticais e subcorticas envolvidas no controle motor e as mudanças no mapa de representação cortical dependente do treinamento motor (KLEIM *et al.*, 2002, HOLSCHINER *et al.*, 2007) são alvo de estudo na recuperação da motricidade que ocorre em muitos pacientes após lesão neurológica (LENT, 2005).

1.3 Comprometimento sensório-motor e estratégias de reabilitação

Cerca de 85% dos pacientes que sobrevivem ao AVE apresentam hemiparesia. Desses, 55% a 75% permanecem com déficit funcional do membro

superior mesmo depois de 3 a 6 meses de reabilitação, gerando redução da independência e impacto negativo na qualidade de vida (CLARKE & BLACK, 2005; OLSEN, 1990). Em alguns casos a recuperação ocorre espontaneamente, em outros os prejuízos crônicos, porém causados pelo desuso aprendido dos segmentos afetados causam assimetria motora e alterações sensoriais secundárias (DEBOW *et al.*, 2003).

Estudos clínicos demonstram que a recuperação da função motora no membro superior é menor e/ou mais complexa do que aquela observada no membro inferior. A reabilitação parcial dos movimentos do membro superior geralmente não se traduz em movimentos funcionais, uma vez que o controle da extremidade superior requer um amplo repertório de coordenação com os movimentos do tronco. Além disso, para a realização de um movimento funcional eficaz, há necessidade de coordenação multiarticular entre os vários pontos envolvidos na ação (DUNCAN, 1994; DUNCAN *et al.*, 1994). A avaliação do grau de recuperação também é difícil, uma vez que as escalas disponíveis, na sua maioria, mensuram a recuperação focando principalmente na execução da tarefa e freqüentemente não são suficientemente sensíveis para discriminar entre a execução e o desempenho adequado da tarefa. Sem atenção na qualidade da realização da tarefa, não é possível distinguir entre recuperação e compensação dos padrões motores empregados (LEVIN, KLEIM & WOLF, 2009).

A maioria dos estudos clínicos e experimentais investiga terapias efetivas para indivíduos acometidos por AVE isquêmico (AURIAT *et al.*, 2006). Dadas as diferenças fisiopatológicas (LIPTON, 1999; XI, KEEP & HOFF, 2006), tais como natureza da morte celular, extensão e localização da lesão, é importante investigar

os resultados terapêuticos em modelos de HIC, uma vez que podem não ter os mesmos efeitos observados em modelos de isquemia (AURIAT *et al.*, 2006).

Dentre os modelos de HIC experimental, a injeção de colagenase derivada de *clostridium histolyticum* no parênquima cerebral é um método bastante empregado com a finalidade de reproduzir HIC, em especial nos núcleos da base. Introduzido no início dos anos 90, acredita-se que este modelo possa reproduzir experimentalmente, de modo satisfatório, os efeitos de uma HIC espontânea em humanos (ROSENBERG *et al.*, 1990). Particularmente, os danos sensoriais e motores decorrentes da HIC causada pela injeção estriatal de colagenase 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; O'CONNOR; DUNNET, 1986). Na avaliação cinemática desses animais é demonstrado prejuízo em diversos componentes do movimento do membro anterior contralateral ao hemisfério lesado e não é recuperado mesmo no decorrer de duas a seis semanas após o dano hemorrágico, dependendo da gravidade do mesmo. A realização do alcance com sucesso, quando ocorre, pode ser resultado do uso de movimentos compensatórios. (FARR & WHISHAW, 2002; MACLELLAN, GYAWALI & COLBOURNE, 2006).

O desenvolvimento de diversas formas de comportamento é uma das principais funções do sistema nervoso. Dessa forma, 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 capacidade adquirida na realização de tarefas que requerem a execução de movimentos corporais complexos ou que envolvam elevado grau de coordenação motora. Essa capacidade exige extensiva integração de informações sensório-

motoras (MACKINTOSH & COLMAN, 1995; LUFT & BUITRAGO, 2005), 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).

Uma série de testes comportamentais já foi desenvolvida com a finalidade de avaliação sensório-motora em roedores. Dentre as tarefas comportamentais mais utilizadas na avaliação do prejuízo sensório-motor do membro anterior está o estudo do alcance e da preensão de comida (WHISHAW, O'CONNOR & DUNNETT, 1986; SCHALLERT *et al.*, 2000; FARR & WHISHAW, 2002; MACLELLAN, GYAWALI & COLBOURNE, 2006). O teste do *Staircase* utiliza essa habilidade e permite a avaliação quantitativa da integridade dos movimentos de alcance e preensão em roedores. (MONTROYA, ASTELL & DUNNETT, 1990; MONTROYA *et al.*, 1991; WHISHAW *et al.*, 1997; KLOTH *et al.*, 2006; MILMAN *et al.*, 2006; AGO *et al.*, 2007; CLARKE, PLOUGHMAN & CORBETT, 2007).

Estudos em roedores intactos (sem lesão encefálica) demonstram que a reorganização da área de representação do membro superior no córtex motor ocorre em resposta ao desenvolvimento dos movimentos de habilidade e não simplesmente pelo uso repetido do membro (KLEIM *et al.*, 2002). De forma semelhante, outros tipos de intervenções terapêuticas também possuem potencial na promoção da recuperação após isquemia cerebral em roedores, como o enriquecimento ambiental e a prática de exercícios aeróbicos (NUDO & MILLIKEN, 1996; WANG, YANG & YU, 2001; YANG, WANG & WANG, 2003; DING *et al.*, 2004). Praag e colaboradores (1999) observaram que o exercício físico voluntário é suficiente para provocar neurogênese na região do giro denteado no hipocampo em camundongos adultos, além disso, essa mesma atividade pode aumentar a capacidade metabólica nas regiões do córtex motor e estriado (MCCLOSKEY, ADAMO & ANDERSON, 2001). O

tratamento de reabilitação também é benéfico em modelos animais de HIC. A tarefa de habilidade do alcance reduz os prejuízos funcionais após HIC, associados com mudanças estruturais dendríticas no córtex motor e no estriado (AURIAT, WOWK & COLBOURNE, 2010). Ainda, DeBow e colaboradores (2003) demonstraram que movimentos terapêuticos combinados com a contenção do membro superior não comprometido melhoram a função e promovem redução do volume de lesão cerebral, enquanto o exercício aeróbico forçado pode não reduzir a área de lesão, tampouco melhorar a recuperação funcional após HIC (AURIAT *et al.*, 2006).

Quanto ao período ideal para início das tarefas motoras após lesão encefálica, Biernaskie e colaboradores (2004) verificaram que o treinamento após 5 dias do insulto aumenta o ganho funcional e gera mudanças morfológicas nos dendritos. Essa capacidade de adaptação, entretanto, diminui com o tempo, reduzindo-se a eficácia do tratamento e, conseqüentemente, limitando-se a recuperação motora. Em contrapartida, o treinamento precoce e excessivo dos segmentos corporais comprometidos pode aumentar a área da lesão e retardar à recuperação funcional (HUMM *et al.*, 1998; KOSLOWSKI, JAMES & SCHALLERT, 1996; RISEDAL, ZENG & JOHANSSON, 1999).

A atividade coordenada entre os córtices motores primários em ambos os hemisférios pode ser perdida ou prejudicada após a lesão cortical. A utilização de técnicas que induzem o reequilíbrio da excitabilidade em M1 pode ser mais positiva para reabilitação terapêutica e ocasionar melhores resultados funcionais (STINEAR *et al.*, 2008). Estudos realizados em pacientes submetidos à terapia orientada à tarefa, empregando ressonância magnética funcional, demonstraram que áreas motoras relacionadas à tarefa de habilidade podem ser recrutadas durante movimentos sinérgicos do membro superior afetado, e que pode ocorrer ativação do

córtex motor primário (M1) e área motora somatosensorial (S1) no hemisfério contralateral. O desempenho de movimentos não sinérgicos no mesmo membro ativa também a área motora suplementar (AMS) e o córtex pré-motor ventral (PMv) no hemisfério contralateral (SCHAECHTER & PERDUE, 2008). Isso 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).

1.4 Plasticidades no SNC e recuperação motora

As evidências sobre a capacidade de modificação do encéfalo adulto em humanos ou em animais de experimentação após o AVE (NUDO & MILLIKEN, 1996; LIEPERT *et al.*, 2000; YEN *et al.*, 2008) têm instigado a pesquisa a encontrar novas formas de treinamento para os pacientes que apresentam incapacidades crônicas, de modo a maximizar o potencial de adaptação do SNC e, conseqüentemente, a recuperação motora (LEVIN, KLEIM & WOLF, 2009).

Sabe-se que a experiência é capaz de produzir mudanças funcionais em encéfalos adultos normais (KOLB & GIBB, 1991) e lesados (CELNIKA & COHENA, 2004), e que o exercício físico possui a capacidade de induzir aumento na densidade dos vasos sanguíneos no córtex motor, cerebelo e estriado (BLACK *et al.*, 1990; KLEIM, COOPER & VANDENBERG, 2002; SWAIN *et al.*, 2003).

A reabilitação após lesões cerebrais pode ser resultado da reorganização cortical adjacente, alteração do mapa cortical em M1 (Figura 3) (NUDO & MILLIKEN, 1996; NUDO, 1997), expressão de proteínas, tais como: BDNF e MAP2 (PLOUGHMAN *et al.*, 2007) e modificações na morfologia de dendritos (WITHERS &

GREENOUGH, 1989; GREENOUGH, LARSON & WITHERS, 1985; KOLB, 1995; BIERNISKIE & CORBET, 2001). Esse potencial de modificação sináptica e dos circuitos neurais está diretamente relacionado com a recuperação motora das funções perdidas, sendo denominado “neuroplasticidade” ou plasticidade neural (NUDO & MILLIKEN, 1996; CAURAUGH & SUMMERS, 2005).

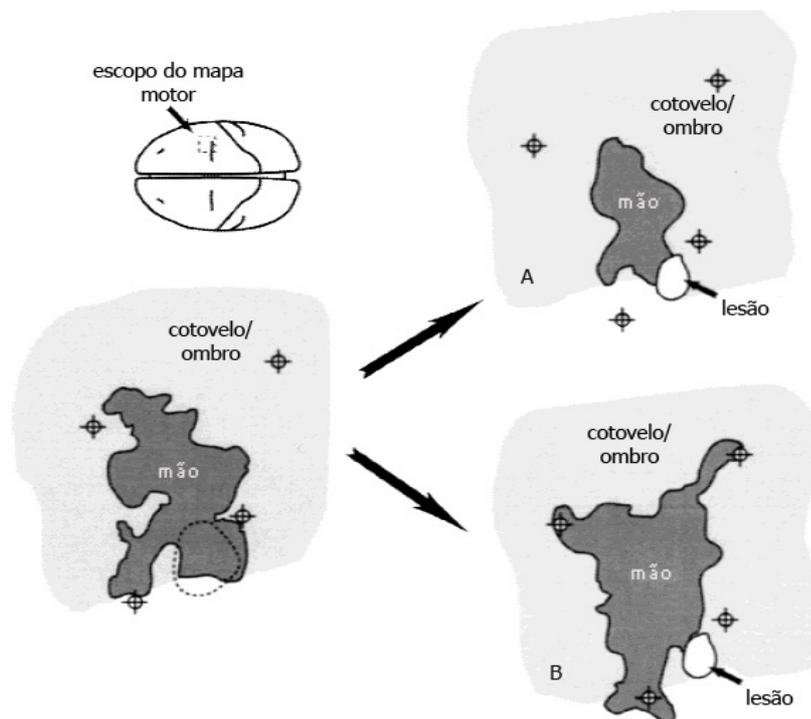


Figura 3. Remodelação funcional da representação da mão no córtex motor primário após AVE em primatas não humanos – (A) diminuição da área cortical representativa da mão no grupo controle; (B) aumento da área cortical representativa da mão, adjacente ao tecido lesado, após técnica de eletroestimulação (adaptado de NUDO, 1997).

De fato, dados experimentais demonstram que o aumento da síntese protéica, a sinaptogênese e a reorganização dos mapas corticais ocorrem de forma coordenada ao longo do tempo, objetivando a aquisição e aperfeiçoamento motor (ADKINS et al., 2006). Luft e colaboradores (2004) demonstraram em suas pesquisas que a aquisição da habilidade motora depende da síntese de novas proteínas no córtex

motor após o treino, porém sugerem investigações adicionais para se ter mais clareza sobre quais proteínas são sintetizadas no córtex motor durante o aprendizado. Zhou e colaboradores (2010) observaram que a eletro-estimulação no córtex motor após a isquemia focal, em modelo animal, foi capaz de aumentar a expressão da proteína associada à microtúbulo-2 (MAP2) no córtex peri-lesional, indicando rearborização dendrítica, a qual contribuiu para melhora do desempenho nos testes comportamentais.

Em contrapartida, o aumento no uso do membro anterior, representado pela simples repetição de uma tarefa de baixa complexidade, parece não ser capaz de promover tal reorganização cortical. Essas evidências foram observadas em trabalhos onde roedores submetidos a diferentes condições, tais como pressionar uma barra (recebendo alimento como recompensa) (KLEIM, BARBAY & NUDO, 1998), exercício voluntário em rodas de corrida (*running wheel*) (KLEIM *et al.*, 2002) ou após sessões de fortalecimento do membro anterior (REMPLE *et al.*, 2001) não apresentaram alteração significativa nos mapas corticais 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, PLAUTZ & KLEIM, 2005), principalmente na presença de lesões ou doenças que comprometam estruturas encefálicas importantes para o controle motor.

Os dendritos são estruturas especializadas na realização de contatos sinápticos e que, em alguns casos, formam estruturas chamadas de espinhos dendríticos, especializados em receber determinados tipos de aferências sinápticas. A estrutura do espinho é sensível ao tipo e à intensidade da conexão, e geralmente

está relacionada com a plasticidade sináptica (NIMCHINSKY, SABATINI & SVOBODA, 2002).

Sabendo-se que a aquisição de habilidades motoras está envolvida com a reorganização dos mapas corticais, essas modificações neurofisiológicas muito provavelmente estão apoiadas em modificações da morfologia neuro-glial (NUDO, PLAUTZ & FROST, 2001). Terapias de reabilitação, como o ambiente enriquecido, têm a capacidade de induzir aumento do peso encefálico e do número de células neuronais, com espessamento da camada cinzenta cortical. Além disso, a estimulação sensório-motora teria ainda a capacidade de aumentar a extensão e complexidade da arborização dendrítica, influenciando o número de espinhos dendríticos e o número e/ou potência de contatos sinápticos por neurônio (Figura 4) (DIAMOND, KRECH & ROSENZWEIG, 1964; DIAMOND, LINDNER & RAYMOND, 1967; VOLKMAR & GREENOUGH, 1972; GLOBUS *et al.*, 1973; CHANG & GREENOUGH, 1982; JONES *et al.*, 1997; JOHANSSON, 2000; NIMCHINSKY, SABATINI & SVOBODA, 2002). O aumento da arborização dendrítica apical dos neurônios piramidais do córtex sensório-motor (contralateral ao membro anterior treinado) em ratos adultos também pode ser visualizada após realização de tarefa motora de habilidade ao longo de várias semanas (GREENOUGH, LARSON & WITHERS, 1985; KOLB, 1995). A terapia de constrição do membro superior não afetado após dano encefálico também induz aumento da arborização dendrítica, todavia esse efeito não é reproduzido em animais intactos forçados a usar somente um dos membros anteriores. Isso sugere que a magnitude ou o tempo de curso do crescimento neural resulta da interação entre mudanças SNC induzidas pela lesão além das mudanças comportamentais (JONES & SCHALLERT, 1994).

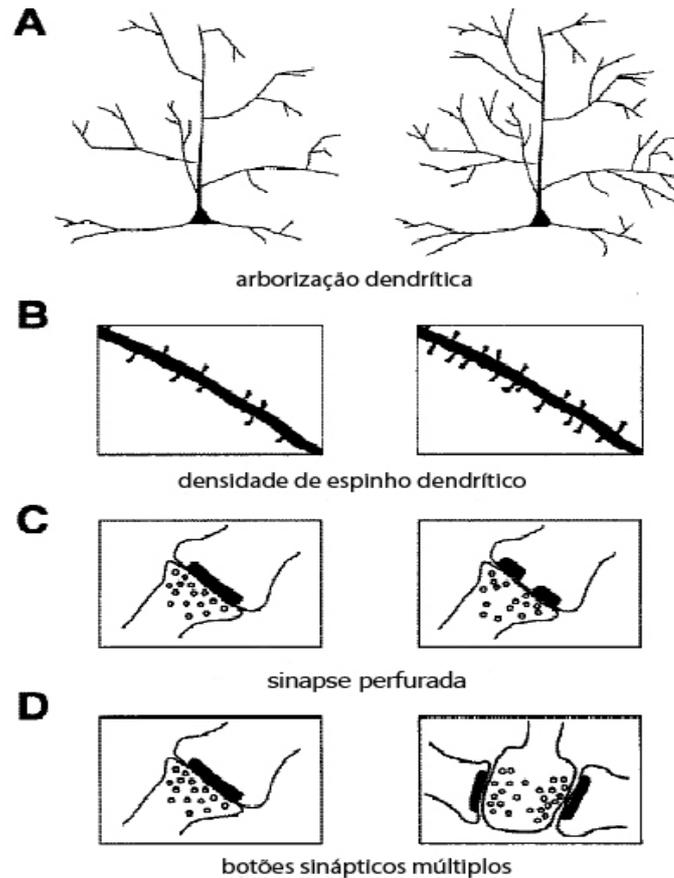


Figura 4. Mudanças morfológicas após aprendizagem de tarefa de habilidade observadas no córtex motor de ratos adultos. (A) Aumento na ramificação dendrítica, (B) Aumento na densidade dos espinhos dendríticos, (C) Aumento do número de sinapses perfuradas, (D) Aumento do número de sinapses com múltiplos botões sinápticos. (adaptado de, NUDO *et al.*, 2001).

1.5 Proteína Associada a Microcúbulo – 2 (MAP-2)

Os microtúbulos são estruturas formadas por subunidades proteicas de tubulina que fazem parte do citoesqueleto das células neurais e desempenham importante papel na fisiologia celular, determinando o posicionamento de organelas delimitadas por membrana e direcionando o transporte intracelular (KIRSCHNER & MITCHISON, 1986, ALBERT, 2010). As proteínas associadas aos microtúbulos (MAP's) são caracterizadas por sua habilidade em promover a polimerização da tubulina e a estabilização dos microtúbulos (KALCHEVA *et al.*, 1995; ULITZUR;

HUMBERT; PFEFFER, 1997). A proteína associada ao microtúbulo – 2 (MAP-2) é uma das MAP's mais abundantes no encéfalo (KALCHEVA *et al.*, 1995), presente na região somatodendrítica neural, porém, predominantemente expressa nos dendritos (MATUS, 1994; CRISTOFANILLI *et al.*, 2004). A MAP-2 regula a extensão dos neuritos (BOUCHER *et al.*, 1999) e está associada com o desenvolvimento da polaridade neuronal (GONZÁLES-BILLAUNT *et al.*, 2002), sendo considerado como um marcador confiável da integridade estrutural envolvido na estabilização morfológica dos processos dendríticos e na modulação do crescimento e plasticidade dos neurônios (MANDELKOW & MANDELKON) . As isoformas da MAP-2 são divididas em dois grupos, dependendo do seu peso molecular. As MAP2 de alto peso molecular incluem MAP-2A e MAP-2B e as de baixo peso molecular incluem MAP-2C e MAP-2D. A expressão das isoformas de MAP-2 é regulada durante o desenvolvimento. A MAP-2A é principalmente expressa no cérebro adulto, enquanto a MAP-2B está presente ao longo de todo o desenvolvimento do sistema nervoso (RIEDERER & MATUS, 1985). Já, a MAP-2C é expressa nas fases iniciais do desenvolvimento, mas também é encontrada na retina e bulbo olfatório, tecidos onde a neurogênese persiste de modo importante no adulto (CHARRIERE-BERTRAND *et al.*, 1991).

O aprendizado motor coincidente com plasticidade dendrítica (BURY & JONES, 2002), sinaptogênese e aumento da expressão de MAP-2 em animais saudáveis (DERKSEN *et al.*, 2007) enquanto ocorre diminuição da expressão de MAP-2 na presença de dano encefálico (BALLOUGH *et al.*, 1995). Estudos têm mostrado o aumento da imunorreatividade da MAP2 no hemisfério contralateral após eventos isquêmicos corticais, associadas ao treinamento específico de habilidade do alcance do membro anterior (BERNASKIE e CORBET, 2001; HSU & JONES, 2006,

PLOUGMANN *et al.*, 2007). Sendo assim, a expressão desta proteína coincide com crescimento, arborização e remodelamento dendrítico pós-lesão, desempenhando um papel significativo na plasticidade neural (JOHNSON & JOPE, 1992, GONZÁLES-BILLAUNT *et al.*, 2002; HSU & JONES, 2006; DERKSEN *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a recuperação motora funcional e a expressão de MAP-2 no córtex motor primário de ratos *Wistar* adultos submetidos à HIC e treinamento de reabilitação.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a função motora de ratos *Wistar* adultos intactos e submetidos à HIC após a realização de diferentes tarefas motoras (de habilidade e não habilidade), por meio do teste do *Staircase*;

2. Avaliar morfológicamente a área da lesão, área total dos hemisférios e a espessura cortical (ipsilateral e contralateral ao hemisfério lesado), nos diferentes grupos experimentais;

3. Analisar a expressão bilateral de MAP-2 no córtex motor de ratos *Wistar* adultos intactos e submetidos à HIC após a realização de diferentes tarefas motoras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

Foram utilizados 48 ratos machos *Wistar*, adultos provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com 60 dias de vida ao início dos experimentos. Os animais permaneceram em grupos de cinco, em caixas de *Plexiglass* sob condições padrão de biotério (ciclo de 12 h claro/escuro), controle da temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$), água e comida *ad libitum*, exceto durante a realização dos testes comportamentais, conforme descrito na sessão específica. O desenho experimental foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa e ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (processo número 2008015) e estava de acordo com as diretrizes para o uso e cuidado dos animais de laboratório adotado pelo Instituto Nacional da Saúde (USA) e pela Federação da Sociedade Brasileira para Experimentos Biológicos.

Todos os animais foram adaptados durante três semanas no teste do *Staircase*. 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 a ser fornecido. A partir do primeiro dia de adaptação, os animais entraram em regime de restrição parcial de alimento, quando recebiam de 12 a 15 g de ração padrão todos os dias, ao final do dia. O peso dos animais foi controlado semanalmente, não ultrapassando 80% do peso corporal quando em alimentação livre.

A aclimatação 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. Quatro dias antes da indução da HIC todos os animais foram avaliados no teste do *Staircase*. Os animais foram igualmente distribuídos nos diferentes grupos experimentais, de acordo com o desempenho pré-cirúrgico no teste do *Staircase*. Isso foi realizado de modo que não houvesse diferenças, sob o ponto de vista da habilidade motora, entre os diferentes grupos antes da indução da HIC. Sendo assim, estabeleceram-se os seguintes grupos experimentais:

- (a) Sham [S] (n=8)
- (b) Sham + Treinamento da Tarefa de habilidade [S_TH] (n=8)
- (c) Sham + Treinamento da Tarefa de não-habilidade [S_TNH] (n=8)
- (d) HIC [H] (n=8)
- (e) HIC + Treinamento da Tarefa de habilidade [H_TH] (n=8);
- (f) HIC + Treinamento da Tarefa de não-habilidade [H_TNH] (n=8).

Nas 48h anteriores ao procedimento cirúrgico, os animais retornaram à alimentação *ad libitum*. A avaliação comportamental do desempenho no pós-cirúrgico foi realizada no quarto e no quinto 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 S_TH e H_TH foram submetidos à tarefa de habilidade (alcance e preensão de alimento) e os animais pertencentes ao grupo S_TNH e H_TNH à tarefa de não-habilidade (marcha lenta em esteira motorizada). Os animais pertencentes aos grupos S e H foram manipulados (brevemente foram retirados da caixa padrão do biotério e recolocados) e permaneceram sob o mesmo regime de restrição alimentar que os demais grupos. Todos os animais receberam a

mesma quantidade de alimento. A avaliação comportamental foi repetida ao final da segunda e da quarta semana de treinamento. A figura abaixo mostra esquematicamente a linha do tempo do desenho experimental (Figura 5).



Figura 5. Desenho experimental.

3.2 Modelo de hemorragia cerebral induzida por collagenase

O modelo HIC induzida por injeção estriatal de collagenase, apresenta relevância clínica por promover a ruptura de pequenos vasos com baixa variabilidade técnica, obtendo-se uma hemorragia de extensão controlada. 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 sangue-cérebro. A injeção de collagenase promove a dissolução da matriz extracelular ao redor dos capilares cerebrais, resultando em “hemorragia espontânea” no local da aplicação. As vantagens deste modelo incluem a simplicidade, a reprodutibilidade dos resultados, a extensão hemorrágica dose-dependente e a fácil adaptação do modelo para aplicação em várias espécies animais (JAMES; WARNER; LASKOWITZ, 2007; MACLELLAN *et al.*, 2008).

Os procedimentos testados para a realização deste modelo experimental foram baseados nos estudos de MACLELLAN *et al.*, 2006 e MACLELLAN *et al.*,

2008. Os animais foram anestesiados com halotano (Brasil); indução a 4%, manutenção a 1,5% - 2%, diluídos em 70% de N₂O e 30% de O₂, por meio de aparato de anestesia inalatória (Narcosul). Após anestesiados e posicionados no aparelho estereotáxico, foi realizada a tricotomia da região central da calvária do animal, a assepsia com álcool etílico e a incisão sobre a pele e exposição óssea do crânio. Utilizando uma broca odontológica especial (Beltec LB100, Brasil) foi realizada uma pequena trepanação, a fim de permitir 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 obtida no teste do *Staircase*. A lesão foi induzida por meio da micro-injeção de 0,2 U de colagenase tipo IV, derivada de *clostridium histolyticum* (Sigma, USA), diluída em 1µL de salina estéril, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas: 0.0 mm anterior, ±3.6 mm lateral e -5.0 mm ventral (PAXINOS & WATSON, 2004). O volume foi injetado ao longo de 5 minutos. A fim de minimizar possível refluxo da droga, esperaram-se adicionais 5 minutos antes da retirada da seringa. Nos animais dos grupos S, STH e SNH foi injetado o mesmo volume do diluente (salina). 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[®], Brasil) e tiveram o comportamento monitorado.

Após a cirurgia, os animais foram examinados quanto ao sucesso do procedimento cirúrgico e ao conseqüente prejuízo motor. Todos os animais injetados com colagenase exibiram déficit motor do membro anterior contralateral ao

hemisfério lesado (DEBOW, 1993; MAcLELLAN, GYWALI & COLBOURNE, 2006) apresentando rotação espontânea na direção contralateral ao hemisfério lesado quando segurados pela cauda (WHISHAW; O'CONNOR; DUNNETT, 1986).

3.3 Treinamentos Comportamentais

3.3.1 Treinamento da tarefa de habilidade

Essa tarefa foi realizada por meio da utilização de caixas desenvolvidas para treinamento do alcance e preensão de comida (BIERNASKIE & CORBETT *et al.*, 2001). As caixas, confeccionadas em acrílico, possuíam uma plataforma central e uma bandeja de cada lado, as quais podiam ser preenchidas com alimento. As dimensões do aparato permitem o uso independente do membro ipsilateral à bandeja em questão, não permitindo que o animal realize alcance cruzado. A bandeja do lado não-afetado permaneceu vazia enquanto a bandeja do lado afetado foi preenchida com pequenas esferas comestíveis (15 g por sessão, glóbulos inertes n° 7 - 4,6 mm; 65 mg \pm 10%; Farmacopéia Brasileira Homeopática). A quantidade das esferas foi estabelecida de modo a evitar que o animal as alcançasse com a língua ou com o membro não-lesado.

Para realizar o treinamento de habilidade, os animais foram removidos de suas caixas e colocados individualmente em caixas semelhantes às caixas moradia contendo as caixas de reabilitação. As sessões tiveram duração de 40 minutos e foram realizadas uma vez por dia (durante o ciclo claro, entre as 12 h e 16 h), cinco dias por semana, durante 4 semanas. 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 (Figura 6).

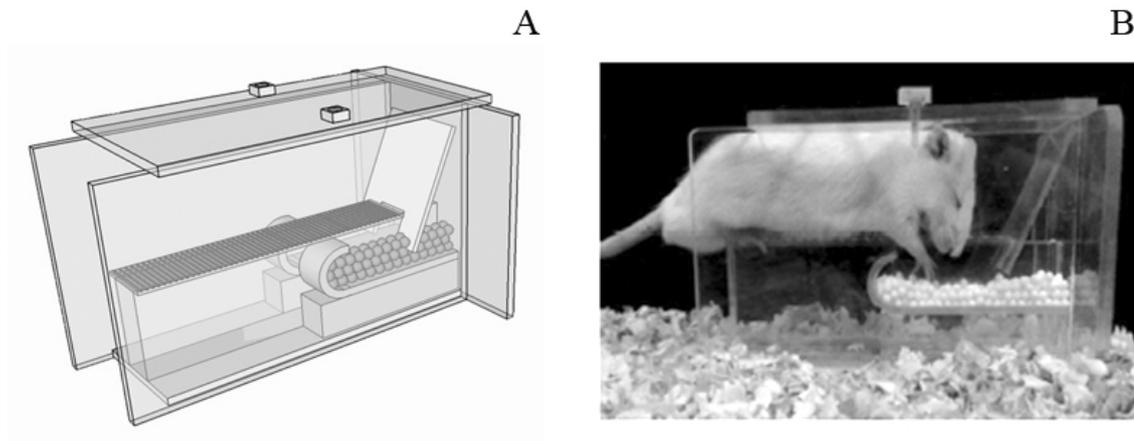


Figura 6. Aparato empregado para a realização da tarefa de habilidade do alcance e preensão. (A) ilustração da caixa de alcance e preensão; (B) rato realizando a tarefa (adaptado de MESTRINER, 2010).

3.3.2 Treinamento da tarefa de não- habilidade

O tratamento da tarefa de não-habilidade foi realizado utilizando uma esteira motorizada desenvolvida para roedores (Figura 7) (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brasil). Após a cirurgia, os animais foram tratados da mesma forma que no período de habituação: durante 40 minutos (entre 12 h e 16 h), 5 dias por semana, durante 4 semanas consecutivas. A velocidade permaneceu em 1,8 m/min durante todo o período. Essa velocidade foi determinada a fim de limitar possíveis efeitos de treinamento aeróbico (PAGNUSSAT, 2009).



Figura 7. Representação dos animais na esteira. (reproduzido de CECHETTI, 2007, com permissão).

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 da pata anterior a fim de apanhar esferas comestíveis (Figura 8) (MONTROYA *et al.*, 1991).

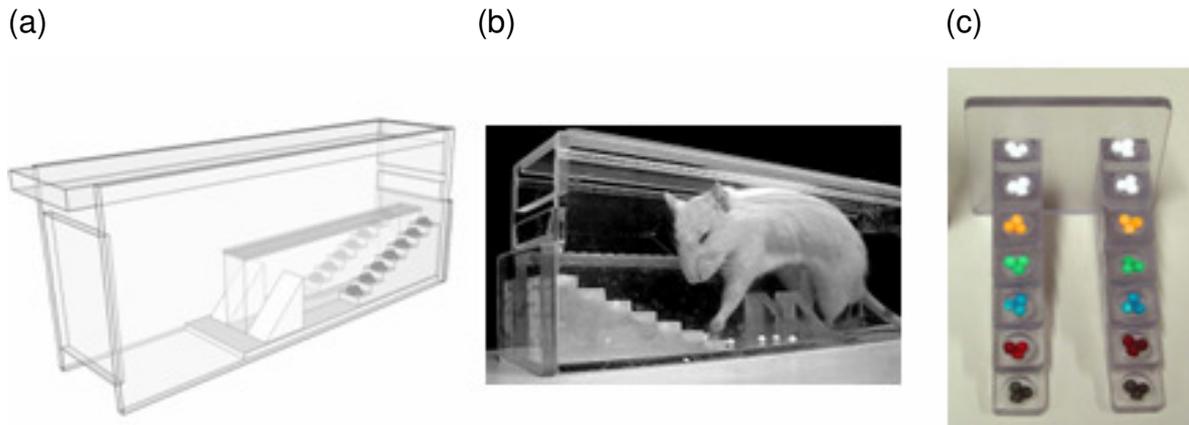


Figura 8. (a) Ilustração da caixa utilizada para o teste; (b) Representação da posição do animal na caixa para o teste do *Staircase*, (c) Disposição dos glóbulos comestíveis coloridos nos degraus (adaptado de Pagnussat *et al.*, 2009).

Este teste tem sido utilizado para estabelecer correlações entre o déficit funcional e a área de lesão, seja isquêmica ou hemorrágica (WINDLE *et al.*, 2006; MACLELLAN *et al.*, 2006), assim como para avaliar o desempenho motor após tratamento de reabilitação (BIERNASKIE & CORBETT, 2001; BIERNASKIE; CHERNENKO & CORBETT, 2004; BIERNASKIE *et al.*, 2005).

A caixa para o teste do *Staircase* contém sete degraus, com espaço para três esferas comestíveis em cada degrau (Glóbulos Inertes n° 7 - 4,6 mm; 65 mg \pm 10%; Farmacopéia Brasileira Homeopática – Brasil). As esferas do terceiro ao sétimo degrau foram coloridas diferentemente, utilizando corante comestível, a fim de permitir maior discriminação quantitativa dos níveis diferentes de dificuldade de alcance e preensão (KLOTH *et al.*, 2006). É necessário que o rato suba uma plataforma central para que possa alcançar as esferas localizadas na escada. A escada fica disposta em ambos os lados, mas possibilita que o animal consiga apanhá-las somente com o membro anterior ipsilateral à mesma. O número de esferas apanhadas é usado para quantificar a habilidade de preensão do membro anterior (MONTROYA *et al.*, 1991).

3.5 Análise Morfométrica

Depois de finalizados os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (Vetec, Brasil), 30%, 10mL/Kg, pela via intra-peritoneal. Foi realizada toracotomia e exposição do coração, injeção de 1000 UI de heparina sódica (Cristália, Brasil) no ventrículo esquerdo, e por meio de uma bomba de perfusão (Control Company, Brasil) foram injetados solução salina 0,9% (200 mL - para lavagem da árvore vascular) e solução fixadora (150 mL) composta por paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato (TF) (Reagen, Brasil) 0,1 M pH 7,4, com a aorta abdominal clampeada. Os encéfalos foram retirados, pós-fixados na mesma solução fixadora por 4 horas à temperatura ambiente, crioprotégidos em sacarose 30% diluída em TF 0,1 M a 4°C, permanecendo até submergirem, após congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e seccionados (40 µm) em criostato (Leitz, Alemanha). Os cortes obtidos do córtex motor primário foram selecionados, tendo como base o Atlas de PAXINOS & WATSON (2004) e armazenados em solução de congelamento (40% PBS 0,1M pH 7,4; 30% etileno glicol e 30% glicol), para posteriormente serem submetidos à técnica de imunohistoquímica.

Para análise da área total dos hemisférios, área da lesão (área do dano tecidual estriatal) e espessura cortical (ipsilateral e contralateral à lesão), foram selecionados os mesmos cortes encefálicos utilizados na técnica de imunohistoquímica, usando uma fatia por animal, n=5 para cada grupo experimental em nível +0,7mm a partir do bregma (PAXINOS & WATSON, 2004). A estimativa da espessura cortical deu-se através da média de três mensurações, que foram estabelecidos a partir da borda superior do corpo caloso até a borda superior dos

hemisférios (Figura 9). As imagens foram escaneadas previamente em 1200dpi e o programa Scion ImageJ 4.0 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) foi utilizado para as referidas estimativas (RODRIGUES *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2007).

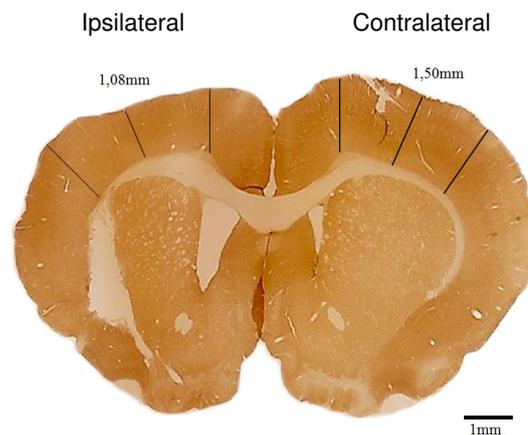


Figura 9. Imagem digitalizada do encéfalo de um animal submetido à HIC, 4 semanas após a cirurgia, demonstrando as medidas da espessura cortical ipsilateral e contralateral à lesão em nível + 0,7mm a partir do bregma .

3.6 Análise Imunoistoquímica para MAP2

O anticorpo utilizado foi anti - MAP2 (M9942, Sigma, USA, monoclonal produzido em camundongo), o qual reage com todas as formas de MAP2 (MAP2a, MAP2b e MAP2c). O processamento da técnica de imunoistoquímica foi realizado em cortes *free-floating*. Resumidamente, os cortes foram primeiramente lavados em tampão fosfato salino (PBS) (duas séries de 5 min), fixados em paraformaldeído 4% por 15 min, lavados em PBS (duas séries de 5 min), incubados com metanol e H₂O₂ 0,3%, lavados em PBS (2 séries de 5 min), bloqueados com soro normal de cabra 5% (Sigma) em PBS contendo 0,5% Triton X-100 (PBS-Tx) por 30 min e incubados com o anticorpo primário na diluição de 1:1000 em PBS-Tx *overnight* a 4°C. Logo, os cortes foram lavados em PBS (duas séries de 5 min), incubados com o anticorpo

secundário biotilado (anti-IgG de camundongo) na diluição de 1:500 em PBS-Tx por 1 h em temperatura ambiente, lavados em PBS (duas séries de 5 min), incubados por 30 min com o Kit Vectastain ABC Elite (Vector Labs), lavados em PBS (duas séries de 5 min) e processados por 5 min em 3,3' diaminobenzidina e H₂O₂ (Sigma). Após lavados, os cortes foram montados em lâminas, desidratados em séries crescentes de álcool, diafanizados em xilol e cobertos com DPX (Sigma) e lamínulas. Cortes controle foram processados simultaneamente omitindo-se o anticorpo primário, a fim de proceder o controle do *background* (LI *et al.*, 1998).

As imagens foram adquiridas usando um microscópio óptico por meio do programa NIS-elements 3.0 (Nikon Instruments), utilizando objetiva de 40X. Foram capturadas imagens dos córtices motor primário ipsilateral e contralateral à HIC de seis animais por grupo (dois cortes por animal). Depois de digitalizadas, as imagens foram analisadas e a densitometria óptica quantificada por meio do programa Image-Pro Plus 6.0.

3.7 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA). A avaliação da homogeneidade das variâncias foi realizada pelo teste de Levine. A análise comportamental foi analisada por meio de Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas. As medidas morfométricas e a densitometria óptica relativa para imunorreatividade à MAP-2 foram analisadas por meio de ANOVA de uma via. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi empregado sempre que apropriado. Os

dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e considerados estatisticamente significantes quando apresentavam $p < 0.05$.

Quanto ao “n”, todos os animais incluídos no estudo foram utilizados para as análises comportamentais (n=48) estando os mesmos divididos entre os grupos experimentais conforme descrito anteriormente. Já para a análise morfológica, foram utilizados 36 encéfalos, provenientes dos mesmos animais empregados na análise comportamental, os quais foram divididos igualmente com n=6 por grupo.

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 rotação espontânea em direção ao hemisfério contralateral quando suspensos pela cauda (ROSEMBERG *et al.*, 1990; MAcLELLAN *et al.*, 2006).

4.1 Análise Comportamental

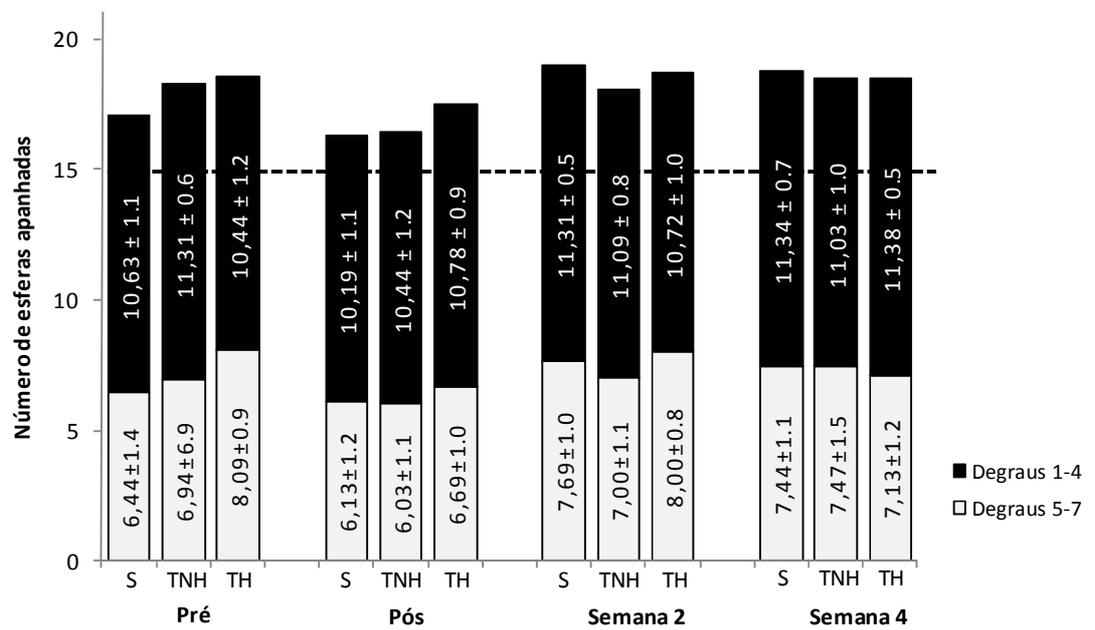
4.1.1 Teste do “Staircase”

A ANOVA de medidas repetidas evidenciou efeito do tempo [$F_{(3,126)}=114.77$, $p<0.01$], grupo [$F_{(1,42)}=8.22$, $p<0.01$] e interação entre tempo e grupo [$F_{(15,126)}=20.78$, $p<0.01$]. Na avaliação pré-operatória não havia diferença entre os grupos quanto ao número de esferas apanhadas ($p>0.05$). Na avaliação pós-operatória, assim como na segunda e quarta semana, todos os grupos submetidos à hemorragia apanharam menos esferas do que os grupos *Sham* ($p<0.01$), porém sem diferença entre seus pares submetidos às tarefas de habilidade e não habilidade ($p>0.05$). O teste de Tukey evidenciou diferença entre o grupo HIC e HIC_TH ($p<0.01$) e entre os grupos HIC_TH e HIC_TNH ($p<0.01$). Não houve diferença entre os grupos HIC e HIC_TNH na última semana de avaliação ($p>0.05$) (Tabela 2).

Quando analisada somente a habilidade em apanhar as esferas localizadas nos degraus 5-7, a ANOVA de medidas repetidas evidenciou efeito do tempo [$F_{(3,126)}=94.27$, $p<0.01$], grupo [$F_{(5,42)}=77.73$, $p<0.01$] e interação entre tempo e grupo

[$F_{(15,126)}=17.38$, $p<0.01$]. Pôde-se observar diferença no número de esferas apanhadas nos degraus 5-7 entre os grupos HIC e *Sham* ($p<0.01$) na avaliação pós-cirúrgica, assim como na segunda e quarta semana de tratamento. Na última avaliação (semana 4) foram evidenciadas diferenças entre os grupos HIC e HIC_TH, assim como entre HIC_TH e HIC_TNH ($p<0.01$); (Figura 10 e Tabela 3).

(a)



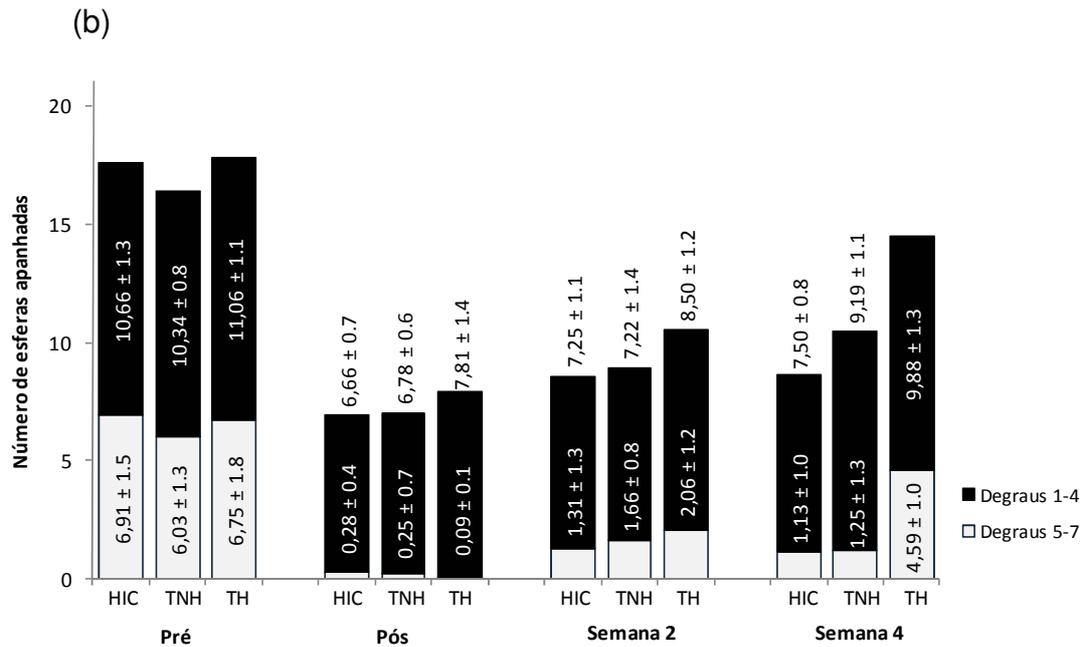


Figura 10. Representação gráfica do número de esferas apanhadas nos primeiros degraus (1-4) e nos últimos degraus (5-7) ao longo do tempo. A) Grupos Sham e tarefas de habilidade e não habilidade; B) Grupos HIC e tarefas de habilidade e não habilidade. A linha pontilhada representa o valor adotado como critério mínimo de preensão para inclusão do animal no estudo. Valores são Média \pm E.P.M (erro padrão da média).

Tabela 1. Valores totais de alcance e preensão no teste *Staircase*, nos diferentes grupos (Sham e HIC) e tarefas ao longo do tempo. “a” todos os grupos Sham tiverem um número maior esferas apanhadas do que os grupos HIC ($p < 0.01$); “b” o grupo HIC_TH teve um número maior de esferas apanhadas do que o grupo HIC ($p < 0.001$) e “c” o grupo HIC_TH teve um número maior de esferas apanhadas do que o grupo HIC_TNH ($p < 0.001$). E.P.M (erro padrão da média).

Grupos	Pré		Pós		Sem 2		Sem 4	
	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M
S	17,06	0,82	16,31	0,65	19,00	0,51	18,78	0,54
S_TNH	18,25	0,74	16,47	0,44	18,09	0,65	18,50	0,46
S_TH	18,53	0,53	17,47	0,24	18,72	0,56	18,50	0,57
HIC	17,56	0,90	6,94 ^a	0,24	8,56 ^a	0,87	8,63 ^a	0,61
HIC_TNH	16,38	0,61	7,03 ^a	0,31	8,88 ^a	0,39	10,44 ^a	0,27
HIC_TH	17,81	0,90	7,90 ^a	0,56	10,56 ^a	0,78	14,47 ^{a,b,c}	0,63

Tabela 2. Valores de alcance e preensão nos degraus 5-7 no teste do *Staircase*, nos diferentes grupos ao longo do tempo. “a” todos os grupos *Sham* tiveram um número maior esferas apanhadas do que os grupos HIC ($p < 0.001$); “b” o grupo HIC_TH teve um número maior de esferas apanhadas do que o grupo HIC ($p < 0.001$) e “c” o grupo HIC_TH teve um número maior de esferas apanhadas do que o grupo HIC_TNH ($p < 0.001$). E.P.M (erro padrão da média).

Grupos	Pré		Pós		Sem 2		Sem 4	
	Média	E.P.M.	Média	E.P.M.	Média	E.P.M.	Média	E.P.M.
S	6,44	0,52	6,13	0,43	7,69	0,37	7,44	0,42
S_TNH	6,94	0,63	6,03	0,42	7,00	0,40	7,47	0,55
S_TH	8,09	0,32	6,69	0,38	8,00	0,30	7,13	0,44
HIC	6,91	0,55	0,28 ^a	0,15	1,31 ^a	0,49	1,13 ^a	0,36
HIC_TNH	6,03	0,48	0,25 ^a	0,25	1,66 ^a	0,30	1,25 ^a	0,47
HIC_TH	6,75	0,64	0,09 ^a	0,07	2,06 ^a	0,45	4,59 ^{a,b,c}	0,36

4.2 Análise Morfométrica

A análise dos dados demonstrou redução significativa quanto à área total do hemisfério ipsilateral à lesão [$F_{(5,29)}=24.27$, $p < 0.01$], área da lesão [$F_{(5,29)} = 19.35$, $p < 0.01$] e espessura cortical ipsilateral à lesão [$F_{(5,29)}=35.18$, $p < 0.01$]. O teste de Tukey evidenciou diferença somente entre os grupos HIC e os grupos *Sham*, sem diferença em relação ao tratamento realizado ($p < 0.01$). Não houve diferença entre as medidas obtidas no hemisfério contralateral à lesão (Tabela3).

Tabela 3. Valores obtidos por meio da análise da área total do hemisfério (ipsilateral e contralateral à lesão), espessura cortical (ipsilateral e contralateral à lesão) e área da lesão. *Diferença entre todos os grupos HIC e os todos os grupos Sham ($p < 0,01$). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

	Área total do Hemisfério		Espessura Cortical		Área da Lesão
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
S	38,05 \pm 1,10	37,08 \pm 0,80	1,65 \pm 0,01	1,64 \pm 0,03	0
S_TNH	36,46 \pm 1,171	37,1 \pm 1,19	1,66 \pm 0,01	1,63 \pm 0,01	0
S_TH	40,59 \pm 0,96	39,63 \pm 1,75	1,74 \pm 0,04	1,70 \pm 0,04	0
HIC	28,29 \pm 0,48 *	30,28 \pm 0,65	1,31 \pm 0,05*	1,64 \pm 0,03	4,18 \pm 0,11*
HIC_TNH	29,09 \pm 1,43*	33,1 \pm 0,54	1,14 \pm 0,04*	1,57 \pm 0,02	4,67 \pm 1,26*
HIC_TH	29,28 \pm 1,15*	33,77 \pm 0,51	1,28 \pm 0,05*	1,45 \pm 0,02	3,76 \pm 0,22*

4.3 Análise da imunorreatividade à MAP-2

A ANOVA evidenciou diferença entre os grupos tanto para análise ipsilateral [$F_{(5, 35)} = 14.25$ ($p < 0.01$)], quanto para a análise do hemisfério contralateral à lesão [$F_{(5, 35)} = 9.70$ ($p < 0.01$)]. No córtex motor primário, o teste de comparações múltiplas de Tukey evidenciou diferença entre os grupos S e STH ($p < 0.001$), S e HIC ($p = 0.02$), S e STNH, HIC_TNH, e HIC_TH ($p < 0.001$), STNH e HIC_TNH ($p = 0.03$), HIC e HIC_TH ($p < 0.01$) na região ipsilateral do hemisfério lesado. Na região contralateral ao hemisfério lesado foram evidenciadas as seguintes diferenças entre os grupos: S e STH, S e HIC, S e HIC_TH ($p < 0.01$), S e HIC_TNH ($p = 0.02$), STNH e HIC_TH ($p < 0.01$), HIC_TH e HIC_TNH ($p = 0.04$) (Figura 14).

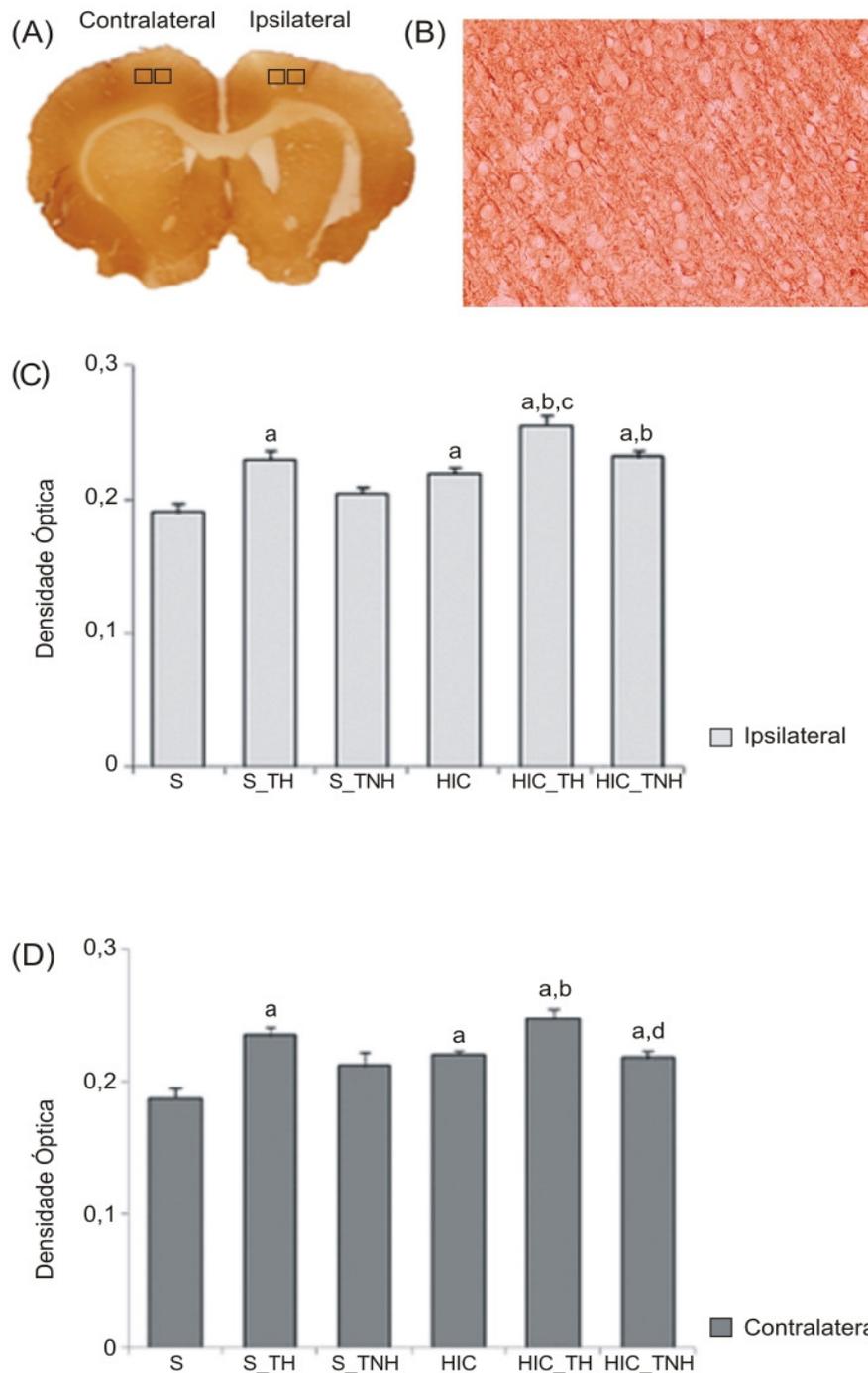


Figura 11. A) Corte encefálico submetido à técnica de imunohistoquímica para MAP2, mostrando as áreas de interesse (AOI) utilizadas para a semi-quantificação da imunorreatividade no córtex motor primário. B) Área representativa mostrando marcação para MAP2 nos dendritos e soma neuronal. C) Densidade óptica relativa no córtex motor primário ipsilateral ao hemisfério lesado; “a” diferença entre S e STH ($p < 0.001$), S e HIC ($p < 0.02$), S e HIC_TH, HIC_TNH ($p < 0.001$); “b” diferença entre STNH e HIC_TH ($p < 0.001$), STNH e HIC_TNH ($p < 0.03$); “c” diferença entre HIC e HIC_TH ($p < 0.01$). D) Densidade óptica relativa no córtex motor primário contralateral ao hemisfério lesado; “a” diferença entre S e STH, HIC, HIC_TH ($p < 0.01$), S e HIC_TNH ($p < 0.02$); “b” diferença entre STNH e HIC_TH ($p < 0.01$); “d” diferença entre HIC_TH e HIC_TNH ($p = 0.04$). E.P.M (erro padrão da média).

5 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho mostram que o treinamento da tarefa de habilidade do membro anterior induz plasticidade, mostrado pelo aumento na imunorreatividade à MAP2 no M1 em ambos os hemisférios cerebrais, em condições de normalidade ou após lesão córtico-estriatal unilateral em ratos adultos. Após a HIC, a realização de tarefa de habilidade resultou em recuperação funcional dos movimentos de alcance e preensão, dados que foram parcialmente correlatos com a mensuração da imunorreatividade à MAP2.

Uma vez que uma das grandes limitações da recuperação após o AVE é a não recuperação da funcionalidade do membro superior (NAKAYAMA *et al.*, 1994; LEVIN, KLEIM & WOLF, 2009) e que a permanência desse déficit impacta diretamente nos índices de independência e qualidade de vida desses pacientes (STOKES, 2004), o foco desse trabalho foi estudar os efeitos de diferentes estratégias de reabilitação motora na recuperação após lesão encefálica causada por hemorragia experimental. Estudos prévios mostraram que o encéfalo de mamíferos é uma estrutura dinâmica, que apresenta capacidade de se adaptar estruturalmente e funcionalmente às demandas comportamentais específicas. Esta plasticidade é particularmente evidente dentro do córtex motor, onde o treino comportamental possui a capacidade de induzir mudanças na expressão gênica (KLEIM *et al.*, 1996), na síntese da MAP2 (PLOUGHMANN *et al.*, 2007), na estrutura e na função neural (KLEIM *et al.*, 2002).

Sabe-se que a tarefa de habilidade de alcance e preensão envolve coordenação multiarticular do membro direcionado as gestos motores funcionais, exigindo integração sensório-motor, capaz de induzir reorganização dos mapas de

representação somatotópica; e que o desempenho motor está relacionado com o tipo, a intensidade e a qualidade da execução dos movimentos (HIKOSAKA *et al.*, 2002; PLOUGHMAN *et al.*, 2007, KLEIM *et al.*, 2002; ADKINS *et al.*, 2006). Neste estudo o aparato utilizado para a realização da tarefa de habilidade (BIERNASKIE & CORBETT, 2001) permite que o animal permaneça, espontaneamente, realizando a tarefa de habilidade do alcance por um tempo mais longo quando comparado a outros modelos criados com a mesma finalidade (WHISHAW & PELLIS, 1990). Além disso, a disposição do animal na caixa de reabilitação, possivelmente, limite os movimentos compensatórios de tronco, os quais podem ser utilizados como parte da estratégia de execução do ato motor quando há limitação sensório-motora do membro anterior (FARR & WHISHAW, 2002; METZ & WHISHAW, 2002). Essas estratégias de movimento compensatórias devem ser evitadas porque restringem a recuperação funcional uma vez que deslocam o centro do movimento das articulações de interesse (MICHAELSEN, DANNENBAUM & LEVIN, 2006). Isso justifica a escolha do protocolo para realização da atividade de habilidade, já que por meio desta caixa de reabilitação (descrita inicialmente por BIERNASKIE & CORBETT, 2001) pode-se proporcionar um treinamento mais eficiente, com reduzida interferência do experimentador.

Por outro lado, a escolha do gesto da marcha, não aeróbica, como tarefa utilizada como treino de não-habilidade, ocorreu em função do seu caráter automatizado, de baixa complexidade e relativa similaridade cinemática com o movimento de habilidade do alcance, mas que está inserido em um contexto comportamental diferente (HERMER-VAZQUEZ *et al.*, 2004). Independente da tarefa treinada, as sessões ocorreram durante 5 dias consecutivos, semanalmente, ao longo de 4 semanas, o que em parte, mimetiza a terapia clínica convencional

para reabilitação de pacientes após o AVE (LINCOLN *et al.*, 1999). A estratégia escolhida para a avaliação da recuperação motora após a HIC foi o estudo comportamental de uma tarefa funcional de alcance e preensão de comida, pelo teste do *Staircase*, (MONTTOYA *et al.*, 1991). Essa escolha justifica-se uma vez que o sucesso na execução desta tarefa evidencia a transposição de recuperação motora em recuperação da funcionalidade do membro anterior. Para que haja recuperação da função é necessário que haja ativação neuromuscular proximal e distal complexa, e que essa ocorra de forma coordenada nas múltiplas articulações apendiculares e na sua inter-relação com os movimentos axiais (DUCAN *et al.*, 1994; DUCAN, 1994; MACKINTOSH & COLMAN, 1995; LUFT & BUITRAGO, 2005; LEVIN, KLEIM & WOLF, 2009). O teste do *Staircase* permite a avaliação precisa da habilidade motora durante os movimentos de alcance e preensão unilateral (MONTTOYA *et al.*, 1991), podendo ser realizado de forma confiável e reprodutível na linhagem de ratos Wistar (PAGNUSSAT *et al.*, 2009).

Por meio da análise quantitativa, nossos dados mostraram que apenas os animais submetidos à tarefa de habilidade após HIC, apresentaram melhora do desempenho motor no final da quarta semana de treino, aumentando a porcentagem total das esferas apanhadas no teste do *Staircase*. Embora o teste do *Staircase* permita mensurar de forma quantitativa a recuperação da extremidade anterior de roedores, pode-se aumentar sua sensibilidade por meio, da utilização de glóbulos com diferentes cores em cada degrau. Dessa forma, é possível inferir sobre o grau de habilidade alcançada, uma vez que a dificuldade no alcance aumenta proporcionalmente à profundidade dos degraus (KLOTH *et al.*, 2006). No presente estudo consideramos também as diferenças no desempenho dos diferentes grupos em alcançar esferas dispostas nos últimos degraus (5º a 7º). Observou-se déficit no

alcance e preensão dos glóbulos localizados nos últimos degraus em todos os grupos submetidos à HIC na avaliação pós-cirurgia e na semana 2. Contudo, ao final do tratamento (semana 4), o grupo HIC_TH apresentou melhores índices de sucesso em apanhar as esferas localizadas nos degraus mais inferiores quando comparado com os grupos HIC e HIC_TNH; ou seja, apenas o grupo HIC_TH apresentou recuperação funcional da tarefa de habilidade e alcance após às 4 semanas de treinamento.

Está bem descrito na literatura que a aprendizagem de tarefa de habilidade envolve a execução de movimentos corporais complexos ou elevado grau de coordenação motora, exigindo integração sensório-motora e cognitiva eficiente para que se obtenha um bom desempenho motor (ANDERSON *et al.*, 2000; COLCOMBE *et al.*, 2004). O reforço na atividade das áreas motoras cerebrais envolvidas, pelo treino repetitivo e específico, favorece a formação e a manutenção de novas sinapses, com conseqüente armazenamento do gesto motor aprendido (NUDO & MILLIKEN, 1996; LUFT & BUITRAGO, 2005), o que pode ocorrer tanto em animais intactos quanto naqueles que sofreram lesão cerebral (KLEIM *et al.*, 2002; MALDONADO *et al.*, 2008).

Nossos dados mostram que a tarefa da habilidade, em condição de lesão, é capaz de induzir maior recuperação do membro anterior quando comparada à tarefa de não-habilidade. Plautz e colaboradores (2000) mostraram que primatas não humanos quando realizam movimento de habilidade de alcance em busca a um determinado alimento, e não meramente movimento simples de repetição, são capazes de desenvolver modificações nas áreas de representação cortical correlatas à mão e dedos. Associa-se a esta capacidade, além da necessidade de maior atenção para a realização da tarefa proposta, o fator motivacional envolvido na

obtenção da recompensa (alimento). De forma similar, Auriat e colaboradores (2006) mostraram que o uso forçado do membro anterior em rodas de corrida não é capaz de melhorar a recuperação sensório-motora após a HIC experimental. Além disso, outros estudos também encontraram que apenas o aumento da movimentação de um segmento não é uma atividade suficientemente complexa a ponto de promover modificações referentes à plasticidade do SNC (KLEIM *et al.*, 1998; REMPLÉ *et al.*, 2001; KLEIM *et al.*, 2004) nas regiões encefálicas responsáveis pelo processamento motor (BLACK *et al.*, 1990; MARKHAM & GREENOUGH, 2004; MALDONADO *et al.*, 2008). Dessa forma, é provável que a complexidade da tarefa utilizada neste estudo como treino de habilidade, por sua associação cognitivo-motora, tenha maior potencial para indução de plasticidade encefálica após lesão, e que essa plasticidade reflita-se em recuperação funcional.

Nossos resultados comportamentais mostram que a realização de tarefa de habilidade após lesão está relacionada não apenas à recuperação do movimento, mas também à melhora do desempenho do gesto motor (LEVIN, KLEIM & WOLF, 2009). É possível que o grau de exigência cognitivo-motora envolvido na realização de determinadas tarefas possa, potencialmente, contribuir para as modificações morfofisiológicas associadas às respostas comportamentais, o que tem sido sugerido tanto em estudos experimentais envolvendo animais (BIERNASKIE & CORBETT, 2001; PLOUGHMAN *et al.*, 2007; MALDONADO *et al.*, 2008) quanto seres humanos (McEWEN *et al.*, 2009).

Em relação à análise morfométrica, os resultados mostraram diferenças somente entre animais lesados e não lesados, com valores significativos de área da lesão, e redução da área total do hemisfério e da espessura cortical no hemisfério ipsilateral à lesão, não havendo diferença em relação aos tratamentos propostos.

Maclellan e colaboradores (2006) mostraram 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 motor, não podendo ser estabelecido como preditor da função sensório-motora. De forma semelhante, estudo realizado recentemente em nosso laboratório (MESTRINER, 2010) não mostrou redução do volume da lesão após HIC e tratamento de reabilitação, embora a recuperação da função tenha sido evidente. No presente estudo objetivamos quantificar o dano tecidual em uma área central de lesão e com representatividade cortical dos grupamentos musculares envolvidos no controle motor do membro anterior de roedores, em nível do Bregma +0,7mm (ADKINS *et al.*, 2006). Nossas análises mostram que a lesão induzida pela injeção de colagenase causou dano significativo do tecido córtico-estriatal no hemisfério lesado, a qual não sofreu modificações ao longo do tratamento, independente da tarefa motora realizada. Isso corrobora com estudos prévios, os quais mostram que a recuperação motora nem sempre está associada com os parâmetros de avaliação morfométrica (RODRIGUES *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2007).

A atividade coordenada entre os córtices motores primários pode ser perdida ou prejudicada após lesão cortical. A utilização de técnicas que induzem o reequilíbrio da excitabilidade no M1 pode ser positiva para a reabilitação terapêutica, ocasionando melhor resultado funcional (STINEAR *et al.*, 2008). A reabilitação após pequena lesão isquêmica promove reorganização do tecido cortical adjacente, podendo estar relacionado com mudanças plásticas dos dendritos e recuperação motora (ZHANG & MURPHY, 2007). Zhuo e colaboradores (2010) mostraram que estimulação elétrica cortical após a isquemia cerebral induz recuperação motora e mudanças na estrutura dendrítica, tal como aumento na imunorreatividade à MAP2

na zona peri-lesional. Além disso, a atividade aeróbica voluntária, associada à tarefa de habilidade, realizadas após a lesão unilateral extensa no córtex sensório-motor e no estriado, provoca aumento da imunorreatividade à MAP2 no córtex contralateral à lesão (PLOUGMANN *et al.*, 2007). Ainda, o crescimento da arborização dendrítica parece estar relacionado com a quantidade de aferências recebidas no córtex motor, induzindo aumento na conectividade sináptica (KOLB & WHISHAW, 1998). A análise dos dados desta pesquisa mostra a ocorrência de adaptações dendríticas, avaliadas por meio do aumento da imunorreatividade à MAP2 no M1 em ambos os hemisférios, após realização de tarefa de habilidade em animais *Sham* e HIC. Porém, essas modificações foram mais pronunciadas nos animais HIC_TH no córtex ipsilateral a lesão do que em animais HIC e no córtex contralateral quando comparado ao grupo HIC_TNH. Estes achados concordam com estudos prévios que referem que a magnitude da plasticidade está relacionada com o grau de exigência da tarefa de habilidade (BLACK *et al.*, 1990; KLEIM *et al.*, 2002; GIBB *et al.*, 2010).

Dados clínicos mostram que o aumento da ativação do hemisfério oposto à lesão está associado com melhora na recuperação motora (KOOP *et al.*, 1999), da mesma forma que a inativação do córtex motor contralesional causa persistência dos déficits motores do membro anterior após o dano encefálico (BIERNASKIE *et al.*, 2005). Adicionalmente, a atividade aumentada no córtex motor contralesional também está associada com realização de tarefa de habilidade em roedores, podendo induzir aumento da expressão da MAP2 no córtex motor (PLOUGHMAN *et al.*, 2007). O presente experimento estende estes resultados, mostrando aumento na densidade dendrítica, avaliado pela imunorreatividade à MAP2, não apenas no córtex ipsilateral, mas também no hemisfério contralateral à lesão, nos animais que realizaram tarefa de habilidade, intactos e lesados. Dessa forma, pode-se inferir que

a reorganização estrutural e funcional do córtex motor é influenciada pelo grau de exigência motora e pela experiência do treino.

Jones e Schallert (1994) observaram mudanças na morfologia dendrítica após reabilitação do membro afetado pelo dano encefálico, contudo, o mesmo efeito não foi reproduzido em animais intactos com treino de um membro superior. A realização de atividade motora parece ser capaz de induzir aumento na arborização dendrítica no córtex motor oposto ao membro treinado, mesmo após transecção do corpo caloso (ADKINS *et al.*, 2002). Além disso, analisando-se o córtex motor de ratos lesados, mas não treinados, e de ratos não lesados, porém treinados, podem ser observadas apenas mudanças sutis nos espinhos dendríticos (ADKINS *et al.*, 2002; BURY & JONES, 2002). Apesar dos desenhos experimentais dos autores supracitados serem diferentes da presente pesquisa, também puderam ser observadas aqui modificações dendríticas de forma mais pronunciada naqueles animais submetidos à HIC e tarefa de habilidade, concomitantemente à maior recuperação motora, quando comparado com os demais grupos HIC e HIC_TNH. Isso sugere que a magnitude e ou o tempo de curso das alterações plásticas neurais resulta da interação entre mudanças SNC induzidas pela lesão e pelas mudanças comportamentais (BURY & JONES, 2002).

Nossos resultados mostram que o grupo HIC, mesmo sem realização de tarefa de reabilitação, apresentou aumento da imunorreatividade à MAP2 em ambos os hemisférios quando comparado com o grupo *Sham*. O grupo HIC_TNH também apresentou aumento da imunorreatividade à MAP2 no M1, porém não associada à melhora do desempenho comportamental. De acordo com Zhang e Murphy (2007), a estrutura dendrítica remanescente pode manter-se estável na zona de penumbra por meio da irrigação proveniente de pequenos vasos sanguíneos nessa área. Após a

lesão do córtex sensório-motor unilateral, o aumento da imunorreatividade à MAP2 nas áreas corticais peri-lesionais poderia ser indicativo da reestruturação dendrítica compensatória dos neurônios remanescentes (BIDMON *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1998). Além disso, Gibb e colaboradores (2010) mostraram que os animais que sofreram lesão bilateral do córtex frontal (não tratados), apresentaram aumento na extensão dos prolongamentos dendríticos, todavia, menos pronunciado do que aqueles animais lesionados e tratados. Em outros estudos, foram encontrados aumento na arborização dendrítica cortical independente da tarefa de reabilitação após dano encefálico (KOLB & GIBB, 1991) e maior imunorreatividade à MAP2 cortical na sexta semana após isquemia cerebral independente do grupo (controle, tratado com BDNF ou uso forçado do membro afetado), sugerindo que a MAP esteja envolvida na estabilização e manutenção dos circuitos neurais no cérebro maduro (SCHÄBITZ *et al.*, 2004). Dessa forma, a atividade dendrítica poder estar presente pelo efeito fisiológico de reestruturação espontânea das redes neurais remanescentes após lesão, e este efeito pode ser intensificado com treino motor específico (GIBB *et al.*, 2010).

Alterações na conectividade funcional corticocortical, tais como: aumento da excitabilidade do hemisfério contralateral à lesão (GERLOFF *et al.*, 2006) e diminuição da ligação bidirecional entre AMS e M1 no hemisfério ipsilateral (GREFKES *et al.*, 2008), estão implicados na reorganização da rede neural após dano encefálico (WANG *et al.*, 2010). O déficit cortical ipsilateral à lesão se traduz em prejuízo motor do membro contralateral, contribuindo para o desuso e a negligência desse segmento, com conseqüente uso compensatório do membro não afetado, retardando a recuperação motora (TAU, USWATTE & ELBERT, 2002; STINEAR *et al.*, 2008). Considerando estes efeitos, da diminuição da atividade do

córtex ipsilateral à lesão e consequente aumento do contralateral após lesão encefálica unilateral, pode-se explicar o fato do grupo HIC não tratado ter apresentado aumento na imunorreatividade à MAP2 no córtex contralateral à lesão (HUS & JONES, 2006; PLOUGHMAN *et al.*, 2007; SCHAECHTER & PERDUE, 2008).

Gibb e colaboradores (2010) mostraram que a estimulação tátil passiva do membro afetado é capaz de induzir aumento dos prolongamentos dendríticos nas regiões corticais adjacentes à lesão. É possível que a atividade motora voluntária e repetitiva utilizada em nosso estudo tenha favorecido o aumento na expressão de MAP2 por meio da estimulação tátil e do aumento das aferências corticais proveniente de receptores musculares e articulares, resultado da descarga de peso do membro afetado. Dessa forma, é possível que a atividade de não habilidade tenha resultado na manutenção das redes neurais remanescentes após dano cerebral, as quais resultaram em aumento da imunorreatividade da MAP2 no grupo HIC_TNH. Ainda, é possível que o aumento da MAP2, observada nesses animais em ambos os hemisférios, possa estar associada à recuperação espontânea ou ao uso motor compensatório do membro não afetado, uma vez que não se traduziu em melhora na avaliação do comportamento funcional (STINEAR *et al.*, 2008; GIBB *et al.*, 2010).

Pelos dados acima expostos, podemos inferir que a recuperação dos movimentos de alcance e preensão está relacionada com mudanças plásticas dos dendritos no córtex motor primário nos dois hemisférios. A estabilidade morfológica e a plasticidade dos processos neurais dependem da integridade do citoesqueleto neural e suas proteínas associadas (KOLB & WHISHAW, 1998). A proteína associada ao microtúbulo-2 é uma das proteínas mais importantes do citoesqueleto,

presente na região somatodendrítica neural no cérebro do mamífero (MANDELKOW & MANDELKOW, 1995), considerado como um marcador confiável da integridade estrutural envolvido na estabilização morfológica dos processos dendríticos e na modulação do crescimento e plasticidade dos neurônios. A diminuição da MAP2 pode estar relacionada com a fase aguda da disfunção neural e essa desestruturação dendrítica pode ser o primeiro sinal de neurodegeneração após isquemia cerebral (LI *et al.*, 1998). Por outro lado, a MAP2 age na resposta neural, na presença de fatores de crescimento, neurotransmissores, atividade sináptica e neurotoxinas (JOHNSON & JOPE, 1992), sendo fundamental para a manutenção da morfologia dendrítica (STEFANO *et al.*, 2006). Adicionalmente, a MAP2 age como um ligante entre os microtúbulos e as organelas (mitocôndrias), vesículas transportadoras e outros elementos do citoesqueleto, os quais são mobilizados de um ponto ao outro do citoplasma (ALBERT, 2010); dessa forma, o aumento na imunorreatividade da MAP2 após dano cerebral pode favorecer a estabilização e/ou crescimento dos dendritos (BALLOUCH *et al.*, 1995;).

Nossos dados mostram que a tarefa de habilidade é capaz de induzir plasticidade dendrítica tanto em animais intactos quanto os que sofreram lesão unilateral córtico-estriatal. Como estratégia de reabilitação, a tarefa de habilidade pode ser considerada adequada, uma vez que é capaz de provocar mudanças estruturais e funcionais do SNC a curto prazo. Estas evidências podem ser importantes para estudos clínicos, uma vez que o platô de recuperação do membro afetado ocorre entre 4 a 6 semanas após AVE (DUNCAN *et al.*, 1994). Embora sejam necessárias investigações pré-clínicas sobre as melhores formas de abordagem terapêutica e mais estudos para a compreensão entre as mudanças comportamentais, sinápticas e dendríticas após hemorragia intracraniana, neste

estudo, a realização da tarefa de habilidade do membro anterior mostrou-se superior á tarefa de não-habilidade, quanto à indução de plasticidade dendrítica e recuperação funcional do membro anterior após a hemorragia intracerebral experimental.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que:

- O treinamento da tarefa de habilidade do alcance e preensão foi capaz de promover melhor recuperação do movimento e do gesto motor em animais submetidos à HIC, avaliados pelos testes do *Staircase*;

- O treinamento da tarefa de habilidade e não-habilidade não alterou a área da lesão, atrofia hemisférica e espessura cortical;

- O treinamento da tarefa de habilidade do alcance e preensão foi capaz de aumentar a imunorreatividade à MAP2, no córtex motor primário em ambos os hemisférios, tanto em animais lesados pela HIC quanto em animais não-lesados (*Sham*), que pode favorecer na densidade dendrítica;

- Os grupos HIC e HIC_TNH também apresentaram aumento na imunorreatividade à MAP2 no córtex motor primário em ambos os hemisférios cerebrais. Essas modificações provavelmente estão envolvidas nos eventos fisiopatológicos da recuperação espontânea e ao uso compensatório do membro anterior.

7 PERSPECTIVAS

- Pesquisar o papel de outras estruturas e vias relacionadas à atividade motora, como o cerebelo, núcleos da base 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 outros elementos neurais;

- 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.
- ADKINS, D.L.; BURY, S.D.; JONES, T.A. Callosal denervation and forelimb behavioral change result in laminar dependent dendritic and spine alterations in the motor cortex of adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 78:35–52, 2002.
- AGO, Y.; TAKAHASHI, K.; NAKAMURA, S. *et al.* Anxiety-like and exploratory behaviors of isolation-reared mice in the staircase test. *J Pharmacol Sci*, 104(2):153–158, 2007.
- ALBERT, B. *et al.* Biologia Molecular da Célula. 5° ed. *Artemed*, 2010.
- ANDERSON, B.J.; RAPP, D.N.; BAEK, D.H. *et al.* Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol Behav*, 70: 425–429, 2000.
- ANDERSON, B.J.; ALCANTARA, A.A.; GREENOUGH, W.T. Motor-Skill Learning: Changes in Synaptic Organization of the Rat Cerebellar Cortex. *Neurobiol Learn Mem*, 66: 221-229, 1996.
- ANDREWS, A.W.; BOHANNON, R.W. Distribution of muscle strength impairments following stroke. *Clin Rehabil*, 14 (1): 79-87, 2000.
- AURIAT, A.M.; WOWK, S.; COLBOURNE, F. Rehabilitation after intracerebral hemorrhage in rats improves recovery with enhanced dendritic complexity but no effect on cell proliferation. *Behav Brain Res*, 214: 42-47, 2010.
- 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.
- BARRETO, S.M.; PINHEIRO, A.R.O.; SICHIERI, R. A *et al.* Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 14(1): 41-68, 2005.
- BALLOUGH, G.P.H.; MARTIN, L.J.; CANN, F.J. *et al.* Microtubule-associated protein 2 (MAP-2): a sensitive marker of seizure-related brain damage. *J Neurosci Meth*, 61:23-32, 1995.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PRARDISO, M.A. Neurociências, desvendando o sistema nervoso. 2. ed. Porto Alegre: *Artemed*, 2002.
- BIDMON, H.J.; JANCSIK, V.; SCHLEICHER, A. *et al.* Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neurosci*, 82(2): 397–420, 1998.

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.

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.

BLACK, J.E.; ISAACS, K.R.; ANDERSON, B.J. *et al.* Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 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.

BOUCHER, M.; BÉLANGER, D; BEAULIEU, C ; LECLERC, N. Tau-mediated process outgrowth is differentially altered by the expression of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 42(4): 257-273, 1999.

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.

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.

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.

CELNIKA, B.; COHENA, L.G. Modulation of motor function and cortical plasticity in health and disease. *Neurol Neurosci*, 22:261–268, 2004.

CHANG, F.L.; GREENOUGH, W.T. Lateralized effects of monocular training on dendritic branching in adult split-brain rats. *Brain Res*, 232: 283–292, 1982.

CHARRIERE-BERTRAND, C.; GARNER, C.; TARDY, M.; NUNEZ, J. Expression of Various Microtubule-Associated Protein 2 Forms in the Developing Mouse Brain and in Cultured Neurons and Astrocytes. *J Neurochem*, 56: 385-391, 1991.

CLARKE, J.; PLOUGHMAN, M.; CORBETT, D. A qualitative and quantitative analysis of skilled forelimb reaching impairment following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res*, 1145(11):204–212, 2007.

CLARKE, P.; BLACK, S.E. Quality of life following stroke: negotiating disability, identity, and resources. *J Appl Gerontol*, 24:319-336, 2005.

COLCOMBE, S.J.; KRAMER, A.F.; ERICKSON, K.I. *et al.* Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3316–3321, 2004.

CRISTOFANILLI, M.; THANOS, S.; BROSIUS, J. *et al.* Neuronal MAP2 mRNA: Species-dependent Differential Dendritic Targeting Competence. *J Mol Biol*, 20(4): 927-934, 2004.

DEBOW, S.B.; DAVIES, M.L.A.; 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.

DELONG, M.R.; WICHMANNT, T. Circuititis an circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol*, 64:20-24, 2007.

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.

DIAMOND, M.C.; LINDNER, B.; RAYMOND, A. Extensive cortical depth measurements and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats. *J Comp Neurol*, 131: 357–364, 1967.

DIAMOND, M.C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M.R. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*: 123:111–120, 1964.

DING, Y.; LI, J.; LUAN, X. *et al.* Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neurosci*, 124: 583–591, 2004.

DUNCAN, P.W.; GOLDSTEIN, L.B.; HORNER, R.D. *et al.* Similar motor recovery of upper and lower extremities after stroke. *Stroke*, 25:1181-1188, 1994.

DUNCAN, P. Stroke Disability. *Physical Therapy*, 74, 30-39, 1994.

- 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.
- FISHER, C.M. Cerebral miliary aneurysms in hypertension. *Am J Pathol*; 66: 313–330,1972.
- FISHER, C.M. Pathological observations in hypertensive cerebral hemorrhage. *J Neuropathol Exp Neurol*, 30: 536–550, 1971.
- GEBEL, J.M.; JAUCH, E.C.; BROTT, T.G. *et al.* Relative edema volume is a predictor of outcome in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 33(11): 2636-2641, 2002.
- GERLOFF, C.; BUSHARA, K.; SAILER, A. *et al.* Multimodal imaging of brain reorganization in motor areas of the contralesional hemisphere of well recovered patients after capsular stroke. *Brain*, 129: 791–808, 2006.
- GIBB, R.L.; GONZALEZ, C.R.L.; WEGENAST, W.; KOLB, B.E. Tactile stimulation promotes motor recovery following cortical injury in adult rats. *Beh Brain Res*, 2010. In Press.
- GLOBUS, A.; ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L.; DIAMOND, M.C. Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol*, 82:175–181, 1973.
- GONZÁLEZ-BILLAULT, C.; ENGELKE, M.; JIMÉNEZ-MATEOS, E.M. *et al.* Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci*, 67(6): 713-719, 2002.
- GRAHAM, D.I.; McINTOSH, T..K.; MAXWELL, W.L.; NICOLL, J.A. Recent dvances in neurotrauma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59: 641–651, 2000.
- GREFKES, C.; NOWAK, D.A.; EICKHOFF, S.B. *et al.* Cortical connectivity after subcortical stroke assessed with functional magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, 63: 236–246, 2008.
- GREENOUGH, W.T.; LARSON, J.R.; WITHERS, G.S. Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat sensory-motor forelimb cortex. *Behav Neural Biol*, 44: 301–314, 1985.
- GUYTON, A.; HALL, J. Tratado de fisiologia médica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- HANDLEY, A.; MEDCALF, P.; HELLIER, K.; DUTTA, D. Movement disorders after stroke. *Age Ageing*, 38: 260-266, 2009.
- HERMER-VAZQUEZ, L.; HERMER-VAZQUEZ, R.; MOXONB, K.A. *et al.* 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.

HIKOSAKA, O.; NAKAMURA, K.; SAKAI, K.; NAKAHARA, H. Central mechanisms of motor skill learning. *Neurobiol*, 12:217–222, 2002.

HOLSCHNEIDER, D.P.; YANG, J.; GUO, Y.; MAARESK, J.M.I. Reorganization of functional brain maps after exercise training: Importance of cerebellar–thalamo–cortical pathway. *Brain Res*, 1184: 96-107, 2007.

HORNE, M.K.; BULTER, E.G. The role of cerebello-thalamo-cortical pathway in skilled movement. *Prog Neurobiol*, 46: 199-213, 1995.

HSU, J.E.; JONES, T.A. Contralesional neural plasticity and functional changes in the less-affected forelimb after large and small cortical infarcts in rats. *Exp Neurol*, 201: 479-494, 2006.

HUMM, 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.

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): 541-548, 2001.

JOHANSSON, B.B. Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke*, 31:223–230, 2000.

JOHNSON, G.V.W.; JOPE, R.S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res*, 33: 505–512, 1992.

JONES, T.A.; CHU, C.J.; GRANDE, L.A.; GREGORY, A.D. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *J Neurosci*, 19(10): 153-163, 1999.

JONES, T.A.; KLINTSOVA, A.Y.; KILMAN, V.L. *et al.* Induction of multiple synapses by experience in the visual cortex of adult rats. *Neurobiol Learn Mem*, 68:13–20, 1997.

JONES, T.A.; SCHALLERT, T. Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci*, 14: 2140 –2152, 1994.

KALCHEVA, N.; ALBALA, J.; O'GUIN, K. *et al.* Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 10894-10898, 1995.

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.
- KIRSCHNER, M.; MITCHISON, T. Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell*, 45(3): 329-342, 1986.
- KLEIM, J.A.; HOGG, T.M.; VANDENBERG, P.M. *et al.* 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.; BARBAY, S.; COOPER, N.R. *et al.* Motor Learning-Dependent Synaptogenesis Is Localized to Functionally Reorganized Motor Cortex. *Neurobiol Learn Mem*, 77: 63–77, 2002.
- 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.; BARBAY, S.; NUDO, R.J. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol*, 80(6):3321–3325, 1998.
- KLEIM, J.A.; SWAIN, R.A.; AMSTRONG, K.A. *et al.* Selective synaptic plasticity within the cerebellar cortex following complex motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem*, 69: 274–289, 1998.
- KLEIM, J.A.; VIJ, K.; BALLARD, D.H.; GREENOUGH, W.T. Learning-dependent synaptic modifications in the cerebellar cortex of the adult rat persist for at least four weeks. *J Neurosci*, 17: 717–721, 1997.
- KLEIM, J.A.; LUSSNIG, E.; SCHWARZ, E.R.; GREENOUGH, W.T. Synaptogenesis and fos expression in the motor cortex of the adult rat following motor skill learning. *J Neurosci*, 16: 4529–4535, 1996.
- KLOTH, V.; KLEIN, A.; LOETTRICH, D.; NIKKHAH, G. Colour-coded pellets increase the sensitivity of the staircase test to differentiate skilled forelimb performances of control and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res Bull*, 70(1): 68–80, 2006.
- KOLB, B.; WHISHAW, I.Q. Brain plasticity and behavior. *Ann Rev Psychol*, 49: 43–64, 1998.
- KOLB, B. Brain plasticity and behavior. Mahwah, NJ: *Lawrence Erlbaum*; 1995. p 194.
- KOLB, B.; GIBB, R. Environmental enrichment and cortical injury: behavioral and anatomical consequences of frontal cortex lesions in rats. *Cereb Cortex*, 1: 189-198, 1991.
- KOPP, B.; KUNKEL, A.; MUHLNICKEL, W. *et al.* Plasticity in the motor system related to therapy-induced improvement of movement after stroke. *Neuroreport*, 10: 807–810, 1999.

KOZLOWSKI, D.A.; JAMES, D.C.; SCHALLERT, T. Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J. Neurosci*, 16: 4776–4786, 1996.

KOWIAŃSKI, P.; KARWACKI, Z.; DZIEWIĄTKOWSKI, J. *et al.* Evolution of microglial and astroglial response during experimental intracerebral haemorrhage in the rat. *Neuropathol*, 41(3): 123–130, 2003.

LENT, R.C. Cem Bilhões de Neurônios, conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: *Atheneu*, 2005.

LEVIN, M.F.; KLEIM, J.A.; WOLF, S.L. What Do Motor “Recovery” and “Compensation” Mean in Patients Following Stroke? *Neurorehabil Neural Repair*, 23: 313-319, 2009.

LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Berne e Levy. Fundamentos de Fisiologia. Rio de Janeiro: *Elsevier*, 2006.

LI, Y.; JIANG, N.; POWERS, C.; CHOPP, M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal ischemia in rats. *Stroke*, 29: 1972–1980, 1998.

LINCOLN, N.B.; PARRY, R.H.; VASS, C.D. Randomized, controlled trial to evaluate increased intensity of physiotherapy treatment of arm function after stroke. *Stroke*, 30: 573–579, 1999.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev*, 79: 1431–1568, 1999.

LUFT, A.R.; BUITRAGO, M.M. Stages of motor skill learning. *Mol Neurobiol*, 32 (3): 205–216, 2005.

LUFT, A.R.; BUITRAGO, M.M.; RINGER, T. *et al.* Motor Skill Learning Depends on Protein Synthesis in Motor Cortex after Training. *J Neurosci*, 24(29):6515– 6520, 2004.

LUSARDI, T.A.; WOLF, J.A.; PUTT, M.E. *et al.* Effect of acute calcium influx after mechanical stretch injury in vitro on the viability of hippocampal neurons. *J Neurotrauma*, 21: 61–72, 2004.

MACKINTOSH, N.J.; COLMAN, A.M. (Eds.). Learning and skills. Londres: *Longman*, 1995.

MACLELLAN, C.L.; SILASI, G.; POON, C.C. *et al.* Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28(3): 516-525, 2008.

MACLELLAN, C.L.; GYAWALI, S.; COLBOURNE, F. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behav Brain Res*, 175: 82–89, 2006.

MACLELLAN, C.L., AURIAT, A.M., MCGIE, S.C. *et al.* Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6(8): 1031-1042, 2006.

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. *Neural Repair*, 22: 250–261, 2008.

MALTA, D.C. ; CEZARIO, A.C. MOURA, L. *et al.* A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 15(3): 47-65, 2006. ISSN 1679-4974.

MANDELKOW, E.; MANDELKOW, E.M. Microtubules and microtubule- associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 72–81, 1995.

MARKHAM, J.A.; GREENOUGH, W.T. Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Biol*. 1 (4): 351-363, 2004.

MATUS, A. Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci*, 17(1): 19-22, 1994.

MAYNE, M.; NI, W.; YAN, H.J. *et al.* Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 32(1): 240-248, 2001.

MAYER, S.A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol*, 4(10): 662-672, 2005.

MESTRINER, R.G. Modificações astrogliais induzidas pela tarefa de habilidade do alcance e preensão contribuem para a recuperação sensório-motora após a hemorragia intracerebral experimental. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do - UFRGS, Porto Alegre, RS, artigo submetido, 2010.

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.

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.

MCCLOSKEY, D.P.; ADAMO, D.S.; ANDERSON, B.J. Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain Res*, 891: 168–175, 2001.

- MICHAELSEN, S.M.; DANNENBAUM, R.; LEVIN, M.F. Task-specific training with trunk restraint on arm recovery in stroke: randomized control trial. *Stroke*, 37(1):186-192, 2006.
- MILMAN, A.; WEIZMAN, R.; RIGAI, T.; RICE, K.C.; PICK, C.G. Behavioral effects of opioid subtypes compared with benzodiazepines in the staircase paradigm. *Behav Brain Res*, 170(1):141–147, 2006.
- 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.
- MONTOYA, C.P.; ASTELL, S.; DUNNETT, S.B. Effects of nigral and striatal grafts on skilled forelimb use in the rat. *Prog Brain Res*, 82:459–466, 1990.
- NAKAYAMA, H.; JORGENSEN, H.S; RAASCHOU, H.O.; OLSEN, T.S. Recovery of upper extremity function in stroke patients: The Copenhagen Stroke Study. *Arch. Phys Med Rehabil*, 75: 394–398, 1994.
- NIMCHINSKY, E.A.; SABATINI, B.L.; SVOBODA, K. Structure Function os Dendritic Spines. *Rev Physiol*, 64: 313-353, 2002.
- NUDO, R.J.; PLAUTZ, E.J.; FROST, S.B. Role Of Adaptive Plasticity In Recovery Of Function After Damage To Motor Cortex. *Muscle Nerve*, 24: 1000–1019, 2001.
- NUDO, R.J. Remodeling of cortical motor representations after stroke: implications for recovery from brain damage. *Mol Psychiatry*, 2:188–191, 1997.
- NUDO, R.J.; MILLIKEN, G. Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J Neurophysiol*, 75:2144-2149, 1996.
- NUDO, R.J.; JENKINS, W.M. Merzenich MM. Repetitive microstimulation alters the cortical representation of movements in adult rats. *Somatosens Mot Res*, 7: 463–483, 1990.
- OLSEN, T.S. Arm and leg paresis as outcome predictors in stroke rehabilitation. *Stroke*, 21: 247-251, 1990.
- PAGNUSSAT, A. Avaliação da Recuperação Motora e Funcional da Pata Anterior de Ratos *Wistar* Adultos Submetidos à Isquemia Focal induzida por Endotelina-1. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 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 Meth*, 177: 115–121, 2009.
- PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: *Academic Press*, 2004.
- PALOMERO-GALLAGHER, N.; ZILLES, K. Isocortex. In: The rat nervous system. 3.ed. *Elsevier*, 729-757, 2004.
- PEREIRA, L.O.; ARTENI, N.S.; PETERSEN, R.C. *et al.* Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 87:101–108, 2007.
- PLAUTZ, E.J.; MILLIKEN, G.W.; NUDO, R. 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. *et al.* Endurance exercise facilitates relarning of forelimb motor skill after focal ischemia. *European J Neurosci*, 25: 3453-3460, 2007.
- PRAAG, H.V.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat neurosci*, 2(3): 266-270, 1999.
- PROSKE, U.; GANDEVIA, S.C. The Kinaesthetic senses. *J Physiol*, 587(17): 4139-4146, 2009.
- QURESHI, A.I.; ALI, Z.; SURI, M.F. *et al.* 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.; SURI, M.F.; OSTROW, P.T. *et al.* Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurg*, 52: 1041–1047, 2003b.
- QURESHI, A.I.; TUHRIM, S.; BRODERICK, J.P. *et al.* Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*, 344: 1450-1460, 2001.
- QURESHI, A.I.; WILSON, D.A.; 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.

RIEDERER, B.; MATUS, A. Differential Expression of Distinct Microtubule-Associated Proteins during Brain Development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(17): 6006-6009, 1985.

REMPLE, M.S.; BRUNEAU, R.M.; VANDENBERG, P.M. *et al.* Sensitivity of cortical movement representations to motor experience: evidence that skill learning but not strength training induces cortical reorganization. *Behav Brain Res*, 23 (2): 133-141, 2001.

RODRIGUES, A.L.; ARTENI, N.S.; ABEL, C. *et al.* Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res*, 1002: 94-99, 2004.

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.

ROPPER, A.H. Lateral displacement of the brain and level of consciousness in patients with an acute hemispherical mass. *N Engl J Med*, 314: 953-958, 1986.

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. *et al.* 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.; PERDUE, K.L. Enhanced Cortical Activation in the Contralesional Hemisphere of Chronic Stroke Patients in Response to Motor Skill Challenge. *Cerebral Cortex March*, 18:638-647, 2008.

SCHAECHTER, J.D. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog Neurobiol*, 73: 61-72, 2004.

SCHÄBITZ, W.R.; BERGER, C.; KOLLMAR, R. *et al.* Functional Motor Recovery After Small Cortical Ischemia Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor Treatment and Forced Arm Use on Functional Motor Recovery After Small Cortical Ischemia. *Stroke*, (35): 992-997, 2004.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S.M.; LEASURE, J.L. *et al.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neurophar*, 39: 777-787, 2000.

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.

STEFANO, G.D.; CASOLI, T.; FATTORETTI, P. *et al.* Level and Distribution of Microtubule-Associated Protein-2 (MAP2) as an Index of Dendritic Structural Dynamics. *Rejuve Res*, 9(1): 94-98, 2006

STINEAR, C.M.; BARBER, P.A.; COXON, J.P. *et al.* Priming the motor system enhances the effects of upper limb therapy in chronic stroke. *Brain*, 131: 1381-1390, 2008.

STOKES, M. *Physical Management in Neurological Rehabilitation*. 2. ed. London: *Elsevier Mosby*, 2004.

SWAIN, R.A.; HARRIS, A.B.; WIENER, E.C. *et al.* Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neurosci*, 117: 1037–1046, 2003.

TAU, B.E.; USWATTE, G.; ELBERT, T. New treatments in neurorehabilitation founded on basic research. *Nat. Rev. Neurosci*, 3: 228–236, 2002.

TOMITA, H.; ITO, U.; OHNO, K.; HIRAKAWA, K. Chronological changes in brain edema induced by experimental intracerebral hematoma in cats. *Acta Neurochir Suppl*, 60: 558–560, 1994.

ULITZUR, N.; HUMBERT, M.; PFEFFER, S.R. Mapmodulin: A possible modulator of the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5084–5089, 1997.

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

VOLKMAR, F.; GREENOUGH, W. Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science*, 176: 1445–1447, 1972.

WANG, J.; ROGOVE, A.D.; TSIRKA, A.E.; TSIRKA, S.E. Protective role of tuftsin fragment 1–3 in an animal model of intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*, 54(5): 655-664, 2003.

WANG, R.Y.; YANG, Y.R.; YU, S.M. Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *Brain Res*, 922: 140–143, 2001.

WANG, L.; YU, C. ; CHEN, H. *et al.* Dynamic functional reorganization of the motor execution network after stroke. *Brain*, 133: 1224–1238, 2010.

WAGNER, K.R. ; XI, G. ; HUA, Y. *et al.* Early metabolic alterations in edematous perihematoma brain regions following experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg*, 88(6): 1058-1065, 1998.

WAGNER, K.R. ; XI, G. ; HUA, Y. *et al.* Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematoma white matter. *Stroke*, 27: 490–97, 1996.

WARD, N.S. Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Med J*; 81: 510–514, 2005.

WÄCHTER, T.; RÖHRICH, S.; FRANK, A. *et al.* Motor skill learning depends on protein synthesis in the dorsal striatum after training. *Exp Brain Res*, 200: 319-323, 2010.

WHISHAW, I.Q.; WOODWARD, N.C.; MIKLYAEVA, E.; PELLIS, S.M. Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. *Behav Brain Res*, 89:167–177, 1997.

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.; 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.

WINDLE, V.; SZYMANSKA, A.; GRANTER-BUTTON, S. *et al.* An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neuro*, 201: 324-334, 2006.

WITHERS, G.S.; GREENOUGH, W.T. Reach training selectively alters dendritic branching in sub-populations of layer II/III pyramids in rat motor-somatosensory forelimb cortex. *Neuropsychol*, 27(1) : 61–69, 1989.

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.

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

XI, G.; HUA, Y.; BHASIN, R.R. *et al.* Mechanisms of Edema Formation After Intracerebral Hemorrhage Effects of Extravasated Red Blood Cells on Blood Flow and Blood-Brain Barrier Integrity. *Stroke*, 32: 2932-2938, 2001.

XI, G.; KEEP, R.F.; HOFF, J.T. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats. *J Neurosurg*, 89: 991–996, 1998.

XUE, M.; DEL BIGIO, M.R. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death. *Neurosci Lett*, 283: 230 -232, 2000.

YANG, Y.R.; WANG, R.Y.; WANG, P.S. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 339: 91–94, 2003.

YANG, G.Y.; BETZ, A.L.; CHENEVERT, T.L. *et al.* Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats. *J Neurosurg*, 81: 93–102, 1994.

YEN, C.L.; WANG, R.Y.; LIAO, K.K. *et al.* Gait training induced change in corticomotor excitability in patients with chronic stroke. *Neurorehabil Neural Repair*, 22: 22-30, 2008.

ZAZULIA, A.R.; DIRINGER, M.N.; VIDEEN, T.O. *et al.* Hypoperfusion without ischemia surrounding acute intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21: 804–810, 2001.

ZAZULIA, A.R.; DIRINGER, M.N.; DERDEYN, C.P.; POWERS, W.J. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 30: 1167–1173, 1999.

ZHANG, S.; MURPHY, T.H. Imaging the Impact of Cortical Microcirculation on Synaptic Structure and Sensory-Evoked Hemodynamic Responses In Vivo. *PLoS Biology*, 5: 1152-1167, 2007.

ZHOU, Q.; ZHANG, Q.; ZHAO, X. *et al.* Cortical electrical stimulation alone enhances functional recovery and dendritic structures after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 1311: 148-157, 2010.