

Análise morfométrica do corno anterior da medula espinal de ratos submetidos à isquemia focal e ao treinamento de habilidade do alcance

Janine Beatriz Ramos Anastácio¹
Camila Leite Pereira¹
Régis Gemerasca Mestriner²
Aline de Souza Pagnussat²
Carlos Alexandre Netto²
Márcio Vinícius Fagundes Donadio¹

janine.beatriz@terra.com.br, mdonadio@puccs.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar morfologicamente os motoneurônios do corno anterior da medula espinal de ratos Wistar adultos submetidos à isquemia cerebral focal induzida por endotelina-1 (ET-1) e ao treinamento de habilidade do alcance. Os animais foram distribuídos nos grupos: sham (n=3); isquemia (n=6) e isquemia + tarefa de habilidade do alcance (n=6). A indução isquêmica focal foi realizada pela micro-injeção de ET-1 ou de solução salina para o grupo sham. O período de treinamento foi iniciado 5 dias após a lesão (seis semanas; uma vez/dia). Ao término do tratamento as medulas foram removidas, processadas, coradas (método de Nissl) e examinadas ao microscópio óptico para determinar número e área dos motoneurônios. Os resultados demonstram que o grupo isquemia + tarefa de habilidade do alcance possui maior número de motoneurônios no lado ipsilesional, quando comparado aos grupos sham e isquemia. Em relação à área desses motoneurônios, o grupo sham apresenta maior área quando comparado com os grupos isquemia e isquemia + tarefa de habilidade do alcance. Além disso, verificamos uma correlação negativa entre o número de motoneurônios e a área dos mesmos ipsilateralmente no grupo isquemia + tarefa de habilidade do alcance. Não foram identificadas diferenças no lado contralateral à lesão. Após este estudo, pudemos concluir que um evento isquêmico focal, em nível de córtex sensorio-motor e estriado, induziu uma redução na área dos motoneurônios e o treinamento de habilidade, embora não tenha revertido essa diminuição, resultou em maior número de células no lado ipsilateral à lesão.

Palavras – Chave: Isquemia; Medula Espinal, Neurônios Motores

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate, through morphological analysis, the ventral horn motoneurons of spinal cords of mice submitted to endothelin-1 induced focal cerebral ischemia and reaching skill training. The animals were distributed in groups: sham (n=3); ischemia (n=6); and ischemia with skilled reaching task (n=6). The induction of focal cerebral ischemia was carried with the microinjection of endothelin-1 (ET-1) or saline solution for the sham group. The treatment period started five days after the injury (six weeks; once a day). At the end of the treatment the cords were removed, processed, stained (Nissl method), and examined by optical microscope to determine number and area of the motoneurons. The results show that the ischemia with skilled reaching task group has a greater number of motoneurons ipsilesional, when compared with the sham and ischemia groups. In relation to the area of motoneurons, the sham group presents greater area when compared with the ischemia and ischemia with skilled reaching task groups. Moreover, we verified a negative correlation between the number of motoneurons and their ipsilateral area in the ischemia with skilled reaching task group. Differences in the contralateral side of the injury were not identified. After this study we concluded that a cerebral focal ischemia at the level of sensorimotor and striatum cortex induced a reduction in the area of motoneurons and that skill training, despite not having reversed that reduction, caused an increase in the number of cells on the ipsilateral side of the injury.

Keywords: Ischemia; Spinal Cord; Motor Neurons.

¹ Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia (FAENFI - PUCRS).

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS).

INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é definido, segundo a Organização Mundial de Saúde, como um sinal clínico de rápido desenvolvimento de perturbação focal ou global da função cerebral, supostamente de origem vascular, com sintomas que perduram após 24 horas ou mais, ou que levam à morte sem outra causa aparente a não ser de origem vascular [1]. As doenças cerebrovasculares situam-se entre as principais causas de morte no Brasil [2], sendo que 85% dos AVCs são de etiologia isquêmica e 15% hemorrágica [3]. Além disso, estima-se que 50 a 75% destes indivíduos permaneçam com déficit motor no membro superior afetado [4]. Dentre os diversos modelos experimentais desenvolvidos em roedores para o estudo da isquemia focal, a injeção cortical e estriatal de ET-1 têm se mostrado o mais adequado para a abordagem da recuperação motora e funcional, uma vez que produz déficit sensório-motor de longo prazo com baixa mortalidade [5]. O dano isquêmico provocado por este modelo abrange o córtex frontoparietal e o estriado dorsolateral. Além disso, pode-se observar prejuízo motor dos membros anterior e posterior contralaterais à lesão. Isto acarreta no uso praticamente exclusivo dos segmentos ipsilaterais ao hemisfério lesado se nenhuma intervenção for empregada [6].

De acordo com a literatura, o período crítico para reabilitação dos distúrbios sensório-motores resultantes do AVC é, em geral, de até seis meses após o evento isquêmico [7]. Todavia, mesmo mediante tratamento intensivo durante este período, cerca de 60% dos pacientes permanecem, ao menos parcialmente, dependentes nas atividades de vida diária (AVD's) [5]. Em humanos, a terapia orientada à tarefa baseia-se no re-treinamento de atividades funcionais por meio da utilização e inter-relação de múltiplos sistemas, incluindo o músculo-esquelético, perceptivo e cognitivo. Atualmente na literatura, existem diversos trabalhos em roedores envolvendo o treinamento de habilidade do alcance, modelo animal que pode ser utilizado com o fim de mimetizar os efeitos da terapia orientada à tarefa [8;9]. Este modelo permite que o animal exerça a

habilidade de alcançar, realize apreensão e manipule pequenas esferas comestíveis para posteriormente ingeri-las [10].

Em roedores, sabe-se que o aprendizado e a realização de diversas tarefas motoras como, corrida em esteira [11], ambiente enriquecido [12], natação [13] e tarefas de habilidade [14] são capazes de promover uma maior expressão de substâncias relacionadas com plasticidade em algumas áreas do sistema nervoso, como córtex cerebral [15], estriado [16], núcleo rubro [17], hipocampo [18] e medula espinal [19]. Da mesma maneira, o treino de habilidade do alcance já demonstrou ser capaz de induzir modificações teciduais, tanto em animais intactos [20], como em animais que sofreram isquemia cerebral focal [21]. Entretanto, até o presente momento, os estudos prévios sobre o treinamento de habilidade do alcance têm focado principalmente sobre os possíveis efeitos em áreas supra-espinhais, na presença ou ausência de lesão, inexistindo estudos que avaliem a repercussão deste treinamento sobre a medula espinal [22].

Entretanto, existem achados na literatura que apontam para a possibilidade de que um evento isquêmico cerebral focal seja capaz de induzir alterações morfológicas na substância cinzenta da medula espinal. Essas alterações estariam diretamente relacionadas à degeneração das vias supraespinhais descendentes, envolveriam a resposta inflamatória e a ativação de células microgliciais [23]. Kudo et al. [24], utilizando modelos de isquemia global em ratos, examinaram histologicamente a substância cinzenta da medula espinal e encontraram danos neuronais severos, os quais incluíam morte neuronal por apoptose e necrose com conseqüente déficit motor. Os achados referentes às células gliais na medula espinal de ratos submetidos à isquemia corroboram com os achados neuronais. Sabe-se que a função da microglia ativada, encontrada na medula espinal em casos de isquemia prosencefálica, está diretamente envolvida com o favorecimento da regeneração ou da indução da morte neuronal quando não há mais possibilidade de reparo [23].

Considerando a escassez de estudos que avaliam o papel da medula espinal cervical, em especial o corno

anterior, na plasticidade pós-isquêmica induzida pelo treinamento de habilidade do alcance e as evidências acerca das modificações medulares em animais submetidos à isquemia prosencefálica, o objetivo deste estudo foi avaliar morfológicamente motoneurônios do corno anterior da medula espinal, quanto ao número e área do soma neuronal, de ratos submetidos à isquemia focal induzida por ET-1 e ao treinamento da tarefa de habilidade do alcance, visto que esses aspectos constituem parte da avaliação morfológica básica e podem contribuir para impulsionar a investigação dos possíveis efeitos desse tratamento como uma estratégia de reabilitação.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP/UFRGS, sob nº 2007899) e, logo após, deu-se o início ao experimento.

1.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 15 ratos *Wistar* provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com 60 dias de vida ao início dos experimentos, onde eram mantidos em grupos de 5 em caixas de Plexiglass sob condições padrão (ciclo de 12 h claro/escuro), controle de temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e água e comida *ad libitum*, exceto durante a realização da tarefa que envolvia inserção de alimento novo (glóbulos comestíveis), quando, então, todos os animais permaneciam em restrição parcial de alimento, recebendo 10-15 g de ração padrão ao final de cada dia.

Todos os animais foram submetidos ao treino na tarefa de habilidade do alcance durante 4 semanas (período de treino) sendo, posteriormente, aleatoriamente divididos em 3 grupos: (S) sham (n=3), (I) isquemia (n=6) e (ITH) isquemia + tarefa de habilidade (n=6). O grupo (S) foi submetido à injeção estereotáxica de solução salina. Isso foi realizado para

minimizar a influência do procedimento cirúrgico (anestesia, craniotomia, posicionamento no aparato estereotáxico) sobre as variáveis estudadas. O grupo (I) foi submetido à injeção estereotáxica com injeção de ET-1 para indução da isquemia focal. O grupo (ITH) foi submetido à injeção estereotáxica de ET-1 + tratamento através da tarefa de habilidade do alcance do membro anterior. Essa tarefa motora de habilidade teve início no 5.º dia pós-cirúrgico e as sessões foram realizadas 1 vez por dia, durante 20 minutos, 5 dias por semana. O período total de tratamento teve duração de 6 semanas. Os grupos (S) e (I) permaneceram durante esse período sob o mesmo regime de restrição alimentar do grupo (ITH), receberam a mesma quantidade de glóbulos comestíveis, sendo submetidos apenas aos manuseios habituais necessários na rotina do biotério. Depois de finalizado o período experimental (6 semanas e 5 dias pós-cirúrgicos), os animais pertencentes a todos os grupos foram profundamente anestesiados, perfundidos, e as medulas espinais foram removidas, pós-fixadas e crioprotetidas para posterior análise histológica.

1.2 PROCEDIMENTOS

1.2.1 Protocolo de Tratamento - Tarefa de Habilidade do Alcance

O tratamento foi realizado por meio da tarefa de habilidade – *Single Pellet Reaching*. As caixas para tratamento do alcance e preensão [25] foram confeccionadas em acrílico (40 cm de altura, 25 cm de comprimento e 20 cm de largura) (Figura 1).

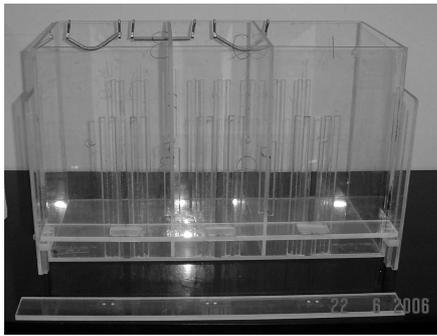


Figura 1. Caixas acrílicas utilizadas na tarefa.

No centro de cada caixa havia uma fenda vertical (1 cm de abertura), a qual se estendia 2,5 cm acima do chão a uma altura de 35 cm. No lado de fora da parede anterior da caixa, em frente da fenda, colocada a 3 cm do chão, havia uma plataforma (2 cm de espessura) com duas endentações, localizadas a 2,3 cm da parte interna da parede anterior. Essas ranhuras, por estarem alinhadas com as margens da fenda, permitiam que os animais alcançassem a comida (Glóbulos Inertes nº 7 - 4,6 mm; 65 mg \pm 10%; Farmacopéia Brasileira Homeopática – Brasil) localizada na parte externa da caixa [26] (Figura 2).



Figura 2. Tarefa do *Single Pellet*

Os animais permaneciam nas caixas e eram estimulados a realizar o alcance durante 20 minutos ou o tempo suficiente para apanharem 20 esferas. O tratamento foi realizado diariamente, 5 dias por semana e teve duração de 6 semanas.

1.2.2 Indução Isquêmica

Para a indução da isquemia focal nos grupos (I) e (ITH) foi utilizado o modelo de isquemia focal induzida por ET-1 (5). Após serem anestesiados com

halotano (Cristália) (4% indução e 1% manutenção) e posicionados ventralmente no aparelho estereotáxico, foi realizada incisão dorsal no crânio e exposição das suturas. Após craniotomia, a isquemia foi induzida por meio da micro-injeção de 2 μ L de ET-1 (800pmol) em duas posições no córtex e uma no estriado, de acordo com as coordenadas estereotáxicas: [Inj1) 0 mm anterior, \pm 2.0 mm lateral e -2.0 mm ventral; Inj2) +2.3 mm anterior, \pm 2.0 mm lateral e -2.0 mm ventral; Inj3) +0.7 mm anterior, \pm 3.8 mm lateral e -6.0 mm ventral] [27]. Cada μ L foi injetado durante 2 min, com pausa de 1 min entre eles e com retardo de 3 min para a retirada da agulha, a fim de minimizar possível refluxo. Nos animais pertencentes ao grupo (S) foi injetado o mesmo volume de diluente (salina). Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram com água e comida *ad libitum* até 24h antes do início do tratamento. Todo o procedimento foi realizado mediante controle de temperatura retal (Letica, Espanha), devendo-se manter os limites de 36.5 a 37.5°C.

Na semana anterior e na semana posterior ao procedimento cirúrgico os animais receberam antibiótico oral diluído em água (Ibatrim, Ibase, Porto Alegre, RS, Brasil) na dose diária de 0.12 mL/Kg de peso corporal. Imediatamente após o procedimento cirúrgico e nas 24h posteriores os animais receberam analgésico oral (Paracetamol, Cimed, Pouso Alegre, MG, Brasil) na dose de 10 mg/Kg ou 0.05 mL/Kg de peso corporal.

1.2.3 Análise Histológica

Depois de finalizado o protocolo experimental, os animais (de todos os grupos) foram anestesiados com hidrato de cloral (30%, 10 mL/Kg, i.p.; Vetec, Brasil), injetados com 1000 UI de heparina no ventrículo cardíaco esquerdo e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica (Control Company, Brasil, fluxo de 20 mL/min) com 200 mL de solução salina seguida por 150 mL de paraformolaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 (TF). As medulas espiniais (segmento da intumescência cervical) foram removidas

e pós-fixadas por 4 horas na mesma solução fixadora e, após, crioprotetidas em sacarose 15% diluída em TF 0.1 M a 4°C até afundarem. Após crioprotetidas, as medulas foram congeladas em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e seccionadas (35 µm) em criostato (Leitz, Alemanha). Para a montagem das lâminas foram selecionados cortes semi-seriados (mantendo-se intervalo de 35 µm entre cada corte coletado), os quais foram, posteriormente, submetidos à coloração de Nissl. Para tal, as lâminas foram mergulhadas em (a) solução 2,5% de violeta de cresila e 10% de ácido acético aquecido a 60°C por 10 min; (b) álcool 96% e ácido acético por 10 seg para diferenciação da coloração; (c) duas séries de 1 min cada em álcool 96% e 100% para desidratação e (d) uma série 1 min em xilol para diafanização dos cortes.

1.2.4 Análise Morfológica

Para a análise morfológica foram digitalizadas 3 imagens do corno anterior da medula espinal cervical (lados ipsilateral e contralateral ao hemisfério lesado, totalizando 6 imagens, em aumento de 20X) (Figura 3) por meio de um microscópio *Nikon Eclipse E-600* acoplado à câmera CCD “*Pró-series High Performance*”.

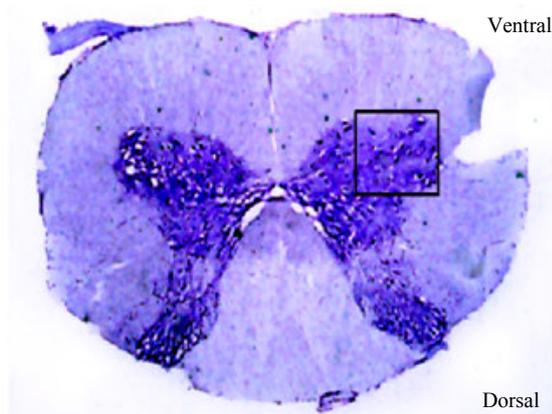


Figura 3. Representação do local selecionado para captura das imagens.

Realizou-se então, a contagem bidimensional de células (motoneurônios) na região selecionada e a mensuração da área dos motoneurônios utilizando o programa Image Pro Plus 6.0. (Figura 4).

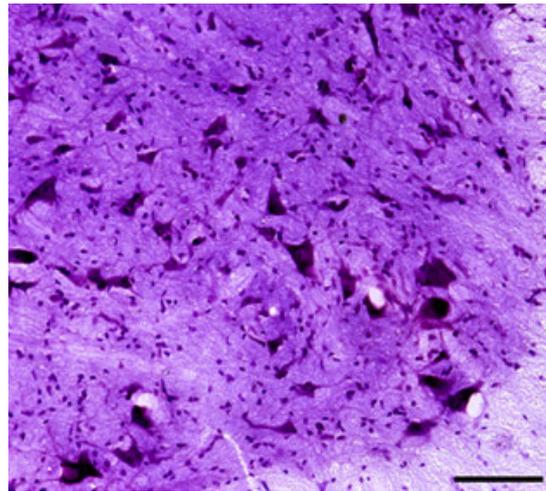


Figura 4. Imagens dos motoneurônios em aumento de 20x. Barra: 10 µm.

Para o cálculo da área dos motoneurônios utilizou-se a técnica de contagem de pontos [28], a qual utiliza “*grids*” com densidade de pontos de 1 ponto por 0,84 µm² e a seguinte equação:

$$\hat{A} = \Sigma p \cdot a/p$$

Onde \hat{A} é a área, Σp é a soma dos pontos e a/p é o valor da área ponto (0,84 µm²).

1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio de uma ANOVA de uma via seguida pelo teste de LSD, quando indicado, e pelo teste de correlação de Pearson. Para processamento dos dados foi utilizado o software SPSS® 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA). A significância foi estabelecida em $p \leq 0.05$ para ambas as análises e os resultados serão representados como médias ± desvio padrão da média (D.P.M).

2 RESULTADOS

A análise morfométrica do corno anterior da medula realizada seis semanas após a indução da isquemia focal evidenciou um número médio de células no lado ipsilateral ao hemisfério lesado de $16,66 \pm 5,50$; $14,94 \pm 3,08$ e $26,83 \pm 11,52$ para os grupos sham,

isquemia e isquemia + tarefa de habilidade, respectivamente; enquanto no lado contralateral foi encontrada média de $17,66 \pm 7,54$; $15,94 \pm 4,27$ e $21,72 \pm 5,92$ células para os grupos sham, isquemia e isquemia + tarefa de habilidade (Figura 5).

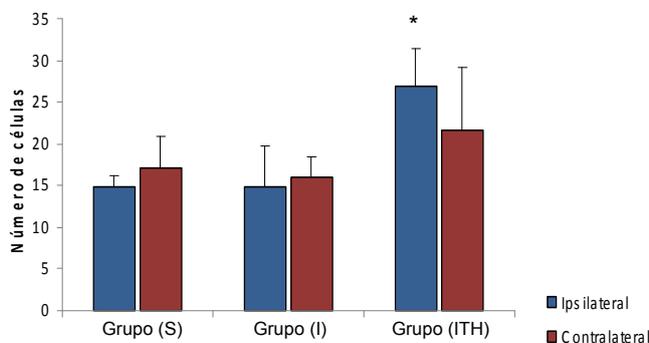


Figura 5. Número de células nos cornos anteriores ipsilateral e contralateral ao hemisfério cerebral lesado. Podemos observar no corno ipsilateral um maior número de células (motoneurônios espinais) no grupo isquemia + tarefa de habilidade (ITH) em relação aos grupos isquemia (I) e sham (S). * $P < 0,05$.

Em relação à área dos motoneurônios, os grupos sham, isquemia e isquemia + tarefa de habilidade apresentaram médias de $630,94 \pm 61,9$; $476,57 \pm 88,63$ e $433,82 \pm 49,39$ no lado ipsilateral e médias de $585,69 \pm 154,44$; $507,70 \pm 30,01$ e $498,23 \pm 53,81$ no lado contralateral ao hemisfério lesado (Figura 6).

A análise de variância de uma via (ANOVA) demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o número de motoneurônios e a área do soma dos mesmos no lado ipsilateral à lesão ($P < 0,05$). Entretanto, não existiram diferenças entre os grupos para as variáveis analisadas no lado contralateral ao insulto isquêmico ($P > 0,05$). Procedeu-se, então, a realização do teste de comparações múltiplas, demonstrando a existência de uma diferença estatisticamente significativa, em relação ao número de células do corno ipsilateral, entre os grupos sham ($P = 0,04$), isquemia e isquemia + tarefa de habilidade ($P = 0,02$). Em relação à área média do soma dos motoneurônios desse mesmo lado, observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sham, isquemia ($P = 0,01$) e isquemia + tarefa de habilidade ($P = 0,005$).

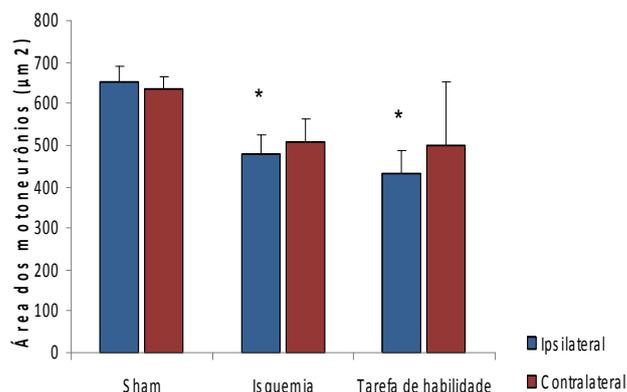


Figura 6. Área média do soma dos motoneurônios do corno anterior ipsilateral e contralateral ao hemisfério cerebral lesado. Podemos observar que no corno ipsilateral os grupos isquemia (I) e isquemia + tarefa de habilidade (ITH) apresentam área média do soma menor em relação ao grupo sham (S). * $P < 0,05$.

Além disso, foi observada uma forte correlação negativa entre o número e a área do soma dos motoneurônios ipsilaterais à lesão do grupo isquemia + tarefa de habilidade, confirmada pelo teste de correlação de Pearson ($R = -0,883$; $P = 0,02$), (Figura 7).

Não foram encontradas correlações significativas entre o número e a área do soma nos demais grupos experimentais (dados não apresentados).

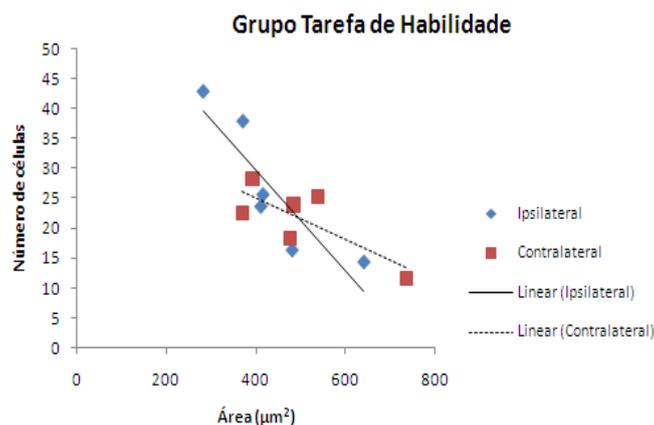


Figura 7. Correlação entre número de células e área do soma dos motoneurônios espinais nos cornos anteriores ipsilateral e contralateral ao hemisfério cerebral lesado no grupo isquemia + tarefa de habilidade (ITH). Podemos observar uma correlação negativa entre o número de células e a área do soma ($r = -0,883$; $P = 0,02$).

3 DISCUSSÃO

Postula-se que a isquemia cerebral focal possa ter repercussões plásticas em locais adjacentes e longínquos

à lesão [29]. O presente estudo demonstra que, após um evento isquêmico central, observa-se no lado ipsilateral à lesão uma diminuição da área do soma dos motoneurônios espinais sem uma alteração no número dos mesmos, o que não era inicialmente esperado. Esse fato pode estar relacionado com a plasticidade morfológica adaptativa ao evento isquêmico, visto que o lado contralateral, hipoteticamente, encontra-se desprovido de aferências superiores essenciais ao controle motor e essa adaptação poderia contribuir para a manutenção da função de neurônios contralaterais. Esse fato pode ser explicado devido à menor distância que um somatório temporal ou espacial de potenciais pós-sinápticos encontra até a chegada do cone de disparo em uma célula que apresenta, possivelmente, menor área de membrana [30]. Entretanto esse achado, que pode ou não estar relacionado ao proposto, ainda não havia sido demonstrado por estudos anteriores. Ressaltamos ainda que o modelo utilizado no presente estudo é um dos mais severos já descritos [5], e talvez se demonstre o mais adequado para observância desses efeitos, o que não ocorreu em trabalhos com modelo de oclusão da artéria cerebral média (ACM). Contudo, estudos adicionais precisam ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo descrito, pois nossos resultados são apenas preliminares, apontando para uma possibilidade e não são suficientemente conclusivos.

Por outro lado, após seis semanas de isquemia cerebral focal, não existem diferenças significativas no corno anterior contralateral da medula espinal à lesão em relação ao número e área dos motoneurônios espinais. Esses achados estão de acordo com o estudo de Gibson et al. [31], que observaram a não existência de adaptações plásticas em animais submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM na vida adulta. Uma das possíveis hipóteses, que pode explicar, pelo menos em parte, a ocorrência desse fenômeno encontra-se nos achados de Moisse et al [23]. Esse estudo demonstrou que após oclusão da ACM existe uma resposta “*priming*” (não-fagocítica) de ativação microglial, o que possivelmente confere um papel protetor aos motoneurônios espinais em uma fase crítica para a

sobrevivência desses neurônios, os quais se tornam vulneráveis devido à perda de aferências motoras superiores importantes. Esse fato pode ter contribuído para a diminuição dos fenômenos apoptóticos, mantendo, assim, o número e da área do soma dessas células.

É bem descrito na literatura que os motoneurônios superiores e inferiores estão envolvidos nos aspectos mais precisos do controle motor voluntário [32]. De modo interessante, quando realizamos treinamento motor de habilidade do alcance em animais previamente submetidos à isquemia cerebral focal, pudemos observar que ocorreu um aumento no número de motoneurônios espinais do corno ipsilateral à lesão e uma diminuição da área do soma dos mesmos neurônios nesse mesmo lado. Verificamos, assim, que o treinamento de habilidade do alcance foi capaz de aumentar o número desses neurônios, embora não tenha sido capaz de evitar a diminuição de área dos mesmos, efeito que provavelmente foi resultado do evento isquêmico. Esse fato é bastante interessante, pois parece que o treinamento de habilidade, apesar de não ter revertido o efeito aparente da isquemia focal sobre a área, aumentou o número de células ipsilaterais à lesão, o que talvez pudesse estar relacionado com uma plasticidade adaptativa produzida pelo treinamento proposto [33]. Entretanto, devido às características técnicas do método utilizado, esse fato não pode ser afirmado conclusivamente, embora se saiba que tanto projeções do trato corticoespinal, como de outras vias envolvidas no controle motor, tais como, rubroespinal e vestibuloespinal [34], podem exercer influência sobre os motoneurônios ipsilaterais ao sítio de lesão. De fato, é muito provável que o tratamento proposto tenha apenas evitado a degeneração e morte celular, o que foi demonstrado pelo maior número de células ipsilaterais à lesão. Nesse sentido, nossos achados não são suficientemente conclusivos. Assim, outros trabalhos que utilizem marcadores sensíveis de morte, gênese e sobrevivência neuronal serão necessários para elucidar esse fenômeno.

Cabe ainda ressaltar que não ocorreram efeitos do treinamento de habilidade sobre os parâmetros

analisados no lado contralateral à lesão. Esse achado inesperado talvez se deva ao efeito de “*priming*”, como citado anteriormente na condição de isquemia, o que pode ter sido fundamental para a manutenção do número e da área dos motoneurônios em questão, o que reduz, pelo menos em parte, a sensibilidade técnica de análise dos parâmetros avaliados. Dessa forma, os efeitos do treinamento de habilidade podem ter ocorrido sob outras variáveis envolvidas no processo de recuperação funcional dificultando a visualização dos possíveis efeitos do mesmo sobre os parâmetros morfométricos avaliados nesse lado. Entretanto, outra possibilidade, é que o treinamento de habilidade não possua efeitos sobre esses neurônios, quanto às variáveis estudadas.

CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que um evento isquêmico focal, em nível de córtex sensório-motor e estriado, induziu uma redução na área dos motoneurônios e o treinamento de habilidade resultou em maior número de células no lado ipsilateral à lesão. A avaliação dos efeitos do treinamento de habilidade sobre a plasticidade neuronal ainda precisa ser melhor elucidada, o que certamente trará grande contribuição para a neuroreabilitação.

REFERÊNCIAS

[1] World Health Organization. Project investigators: The World Health Organization - MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease). *J Clin Epidemiol*. 1988;41:105-14.

[2] World Health Organization [homepage na Internet]. Global burden of disease: cerebrovascular disease. Geneva: World Health Organization; 2000 [acesso em 2008 Set 15]. Disponível em: <http://www.who.int/en/>

[3] Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares. Primeiro consenso brasileiro para trombólise no acidente vascular cerebral isquêmico agudo. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002;60:675-80.

[4] Henderson A, Korner-Bitensky N, Levin M. Virtual reality in stroke rehabilitation: a systematic review of its effectiveness for upper limb motor recovery. *Top Stroke Rehabil*. 2007 Mar-Apr;14(2):52-61.

[5] Windle V, Szymanska A, Granter-Button S, White C, Buist R, Peeling J et al. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol*. 2006 Oct;201(2):324-34.

[6] Castro AJ. Limb preference after lesions of the cerebral hemisphere in adult and neonatal rats. *Physiol Behav*. 1977 Apr;18(4):605-8.

[7] Warlow C. Epidemiology of stroke. *Lancet*. 1998 Oct; 352 Suppl 3:S1- 4.
Schaechter JD. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog Neurobiol*. 2004 May;73(1):61-72.

[8] Schaechter, JD. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog Neurobiol*. 2004;73:61-72.

[9] Whishaw IQ. The impairments in reaching and the movements of compensation in rats with motor cortex lesions: an endpoint, videorecording, and movement notation analysis. *Behav Brain Res*. 1991 Jan; 42(1):77-91.

[10] Iwaniuk AN, Whishaw IQ. On the origin of skilled forelimb movements. *Trends Neurosci*. 2000 Aug;23(8):372-6.

[11] Kim MW, Bang MS, Han TR, Ko YJ, Yoon BW, Kim JH, et al. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res*. 2005 Aug;1052(1):16-21.

[12] Dhanushkodi A, Bindu B, Raju TR, Kutty BM. Exposure to enriched environment improves spatial learning performances and enhances cell density but not choline acetyltransferase activity in the hippocampus of ventral subicular-lesioned rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007 Jun;121(3):491-500.

[13] Yarom O, Maroun M, Richter-Levin, G. Exposure to forced swim stress alters local circuit activity and plasticity in the dentate gyrus of the hippocampus. *Neural Plast*. *In press 2008*.

[14] Maldonado MA, Allred RP, Felthouser EL, Jones TA. Motor skill training, but not voluntary exercise, improves recovery of skilled reaching after unilateral

- ischemic sensorimotor cortex lesions in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. In press 2007 Dec.
- [15] Ploughman M, Attwood Z, White N, Doré JJ, Corbett D. Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia. *Eur J Neurosci*. 2007 Jun;25(11):3453-60.
- [16] Allen, PB. Functional plasticity in the organization of signaling complexes in the striatum. *Parkinsonism Relat Disord*. 2004 Jul;10(5):287-92.
- [17] Lee JK, Kim JE, Sivula M, Strittmatter SM. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci*. 2004 Jul;24(27):6209-17.
- [18] Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):65-75.
- [19] Wolpaw JR. Spinal cord plasticity in acquisition and maintenance of motor skills. *Acta Physiol*. 2007 Feb;189(2):155-69.
- [20] Kleim JA, Barbay S, Nudo RJ. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol*. 1998 Dec;80(6):3321-5.
- [21] Hsu JE, Jones TA. Contralesional neural plasticity and functional changes in the less-affected forelimb after large and small cortical infarcts in rats. *Exp Neurol*. 2006 Oct;201(2):479-94.
- [22] Adkins DL, Boychuck J, Remple MS, Kleim JA. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J Appl Physiol*. 2006 Dec;101(6):1776-82.
- [23] Moisse K, Welch I, Hill T, Volkening K, Strong MJ. Transient middle cerebral artery occlusion induces microglial priming in the lumbar spinal cord: a novel model of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2008 Jul;7:5-29.
- [24] Kudo Y, Ohtaki H, Dohi K, Yin L, Nakamachi T, Endo S, et al. Neuronal damage in rat brain and spinal cord after cardiac arrest and massive hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. 2006 Nov;34(11):2820-6.
- [25] Whishaw IQ, Pellis SM. The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. *Behav Brain Res*. 1990;41(1):49-59.
- [26] Gonzalez CLR, Gharbawie OA, Williams PT, Kleim JA, Kolb B, Whishaw IQ. Evidence for bilateral control of skilled movements: ipsilateral skilled forelimb reaching deficits and functional recovery in rats follow motor cortex and lateral frontal cortex lesions. *Eur J Neurosci*. 2004;20:3442-52.
- [27] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 2004.
- [28] Hermel EE, Ilha J, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci Lett*. 2006 Sep;405(1-2):153-8.
- [29] Block F, Dihné M, Loos M. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog Neurobiol*. 2005 Apr;75(5):342-65.
- [30] Bradshaw RA, Dennis EA. *Handbook of cell signaling*. Vol. 11. San Diego California: Elsevier; 2003.
- [31] Gibson CL, Arnott GA, Clowry GJ. Plasticity in the rat spinal cord seen in response to lesions to the motor cortex during development but not to lesions in maturity. *Exp Neurol*. 2000 Dec;166(2):422-34.
- [32] Ozdinler PH, Macklis JD. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci*. 2006 Nov;9(11):1371-81.
- [33] Jensen JL, Marstrand PC, Nielsen JB. Motor skill training and strength training are associated with different plastic changes in the central nervous system. *J Appl Physiol*. 2005 Oct;99(4):1558-68.
- [34] Tracey, D. Ascending and descending pathways in the spinal cord. In: Paxinos, G. *The rat nervous system*. 3^a ed. San Diego: Elsevier; 2004. p.729-57.