

LAILA CRISTINA MOREIRA DAMÁZIO

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CEREBRAL E DO DESEMPENHO  
MOTOR DE RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS SUBMETIDOS À  
ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Damázio, Laila Cristina Moreira, 1981-

D155a  
2013

Avaliação da morfologia cerebral e do desempenho motor de ratos sedentários e exercitados submetidos à isquemia cerebral transitória / Laila Cristina Moreira Damázio. – Viçosa, MG, 2013.

v, 51 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Isquemia cerebral. 2. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos. 3. Rato como animal de laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.81

LAILA CRISTINA MOREIRA DAMÁZIO

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CEREBRAL E DO DESEMPENHO  
MOTOR DE RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS SUBMETIDOS À  
ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de novembro de 2013.

---

André Ricardo Massensini

---

Juliana S. Rocha

---

Ita de Oliveira e Silva

---

Reggiani V. Gonçalves

---

Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminho e permitir que eu realizasse o meu sonho.

À professora e orientadora Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, pelo apoio e colaboração na construção deste trabalho.

Aos professores e co-orientadores Ricardo Junqueira Del Carlo e Antônio José Natali pela receptividade, suporte e revisão deste trabalho.

Ao colega da pós-graduação, Raphael Teixeira Rocha Melo, pois sem ele esse trabalho não teria acontecido.

À Professora Maira de Castro Lima, pela amizade, disponibilidade e valiosos ensinamentos.

Às pessoas que auxiliaram nos experimentos deste trabalho, pós-graduandos, Pablo, Luís Eugênio, Vanessa e Marli; às graduadas, Natália e Bárbara e aos Professores Betânia e Rômulo.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular da UFSJ, Rosy Ribeiro e Hélio dos Santos, por gentilmente disponibilizar seu laboratório para a realização deste trabalho, bem como por todo apoio.

Aos meus pais, Fátima Damasceno e David José Damázio pelo apoio e consolo nas horas mais difíceis.

Às minhas tias, Ida, Dilene e Márcia, pelo apoio incondicional e incentivo.

Aos meus irmãos, Danilo e Rafael, por sempre estarem ao meu lado, vivenciando todos os momentos da minha vida.

Às minhas amigas, Viviane e Luciléia, pelo carinho e amizade.

Ao meu amor e companheiro, Ney, pelo apoio, paciência, compreensão, incentivo e dedicação. Obrigada por sempre estar ao meu lado!

## RESUMO

DAMAZIO, Laila Cristina Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Avaliação da morfologia cerebral e do desempenho motor de ratos sedentários e exercitados submetidos à isquemia cerebral transitória.** Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

O exercício físico tem sido utilizado na prevenção e principalmente na reabilitação de pacientes acometidos pela isquemia cerebral, porém, o mecanismo pelo qual a prática do exercício físico promove neuroproteção e plasticidade neural ainda não é totalmente conhecido. Este trabalho teve como objetivo analisar o desempenho motor, o volume de infarto cerebral, a densidade de astrócitos e de neurônios no *striatum*, no ápice do giro denteado do hipocampo e córtex motor de ratos que exercitaram antes e/ou após a isquemia cerebral. Foram utilizados 48 ratos Wistar, (Peso médio ~ 138g; idade: 30 dias) separados aleatoriamente em dois grupos: um submetido à oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM) e outro ao acesso cirúrgico com ausência da isquemia. Ambos os grupos foram subdivididos em: animais que realizaram exercício físico prévio à OACM e a cirurgia (AI e AC, n=12); animais que realizaram exercício físico prévio e após a OACM e a cirurgia (ADI e ADC, n=12); animais que realizaram exercício físico após a OACM e a cirurgia (DI e DC, n=12); e animais que não realizaram exercício físico (SI e SC, n=12). O treinamento físico foi realizado em esteira motorizada, a velocidade de 15 ou 12 m/min., 5 dias/semana, 30 min./dia, por 6 semanas. A avaliação do desempenho motor foi feita através dos testes funcionais, passo em falso e barras paralelas. Para determinação do volume de infarto cerebral, foram analisados cortes de cérebro corados com solução a 2% de 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio, a 37°C, por 30 minutos. Cortes de cérebro corados pelo método de Nissl foram utilizados para quantificação de neurônios, enquanto para quantificação de astrócitos, foram utilizados cortes de cérebro submetidos à imunohistoquímica para proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os resultados demonstraram que os animais exercitados antes e após a isquemia cerebral apresentaram melhor desempenho motor nos testes funcionais e menor volume de infarto cerebral em comparação com os não exercitados. Os animais que exercitaram antes da isquemia cerebral apresentaram menor volume de infarto cerebral e maior densidade de neurônios no *striatum*, no ápice do giro denteado do hipocampo e no córtex motor contralateral à lesão, além de apresentarem mais astrócitos reativos no córtex motor dos dois

hemisférios cerebrais em comparação com os não exercitados. A densidade de neurônios das regiões do cérebro analisadas se manteve inalterada nos animais exercitados a partir do quarto dia após a isquemia cerebral. Estes resultados indicam que o exercício físico é uma intervenção que promove benefícios no desempenho motor e na neuroplasticidade do cérebro de ratos submetidos à isquemia cerebral.

## ABSTRACT

DAMAZIO, Laila Cristina Moreira Damázio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2013. **Assessment of brain morphology and motor performance in sedentary and exercised rats subject to transient cerebral ischemia.** Advisor: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

Physical exercise has been used in the prevention and rehabilitation of patients affected by cerebral ischemia, however, the mechanism by which exercise promotes neuroprotection and neuronal plasticity is not yet fully known. This study aims to analyze the motor performance, the volume of cerebral infarction, the density of astrocytes and neurons in the striatum, in the apex of the dentate gyrus of the hippocampus and in the motor cortex of rats that performed exercise before and/or after cerebral ischemia. Forty-eight Wistar male rats (Body weight: 138g; Age: 30 days) were randomly divided into two groups: transient occlusion of the middle cerebral artery (MCAO); sham surgery with no ischemia. Then, both groups were subdivided into: rats submitted to exercise training prior to sham surgery and MCAO (AI and AC, n = 12); rats submitted to exercise training prior and after sham surgery and MCAO (ADI and ADC, n = 12); rats submitted to exercise training after sham surgery and MCAO (DI and DC, n = 12); and rats not submitted to exercise (SI and SC, n = 12). Exercise training was performed on a motor driven treadmill at the speed of 15 or 12 m/min., 5 days/wk, 30 min/day for 6 weeks. Motor performance was assessed by motor function tests, foot fault and parallel bars. The volume of brain infarction was analyzed in brain sections stained with 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride solution (2%), at 37°C, for 30 min. Brain slices stained with Nissl method was used to quantify neurons, while astrocytes were quantified in brain sections by using immunohistochemistry to glial fibrillary acidic protein (GFAP). The results showed that animals exercised before and after cerebral ischemia exhibited better motor performance in functional tests and lower volume of cerebral infarction as compared to those not exercised. Animals exercised before cerebral ischemia had lower cerebral infarct volume and greater density of neurons in the striatum, in the apex of the dentate gyrus of the hippocampus and in the motor cortex contralateral to the lesion, and showed more reactive astrocytes in the motor cortex of both hemispheres than animals not exercised. The density of neurons of the brain regions analyzed remained unchanged in animals exercised after cerebral ischemia. These results indicate that exercise training promotes benefits to motor performance and neuroplasticity in the brain of rats subjected to cerebral ischemia.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. ATIVIDADE FÍSICA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL EM RATOS COM ISQUEMIA CEREBRAL.....</b>	<b>12</b>
3.1. Introdução.....	13
3.2. Material e Métodos.....	14
3.2.1. Animais.....	14
3.2.2. Treinamento Físico.....	15
3.2.3. Oclusão da artéria cerebral média.....	16
3.2.4. Escala de avaliação neurológica.....	17
3.2.5. Avaliação Funcional.....	18
3.2.6. Coloração e mensuração do volume de infarto.....	18
3.2.7. Análise estatística.....	19
3.3. Resultados.....	19
3.3.1. Análise do peso corporal.....	19
3.3.2. Testes funcionais.....	20
3.3.3. Medida do volume de infarto cerebral.....	22
3.4. Discussão.....	23
3.5. Conclusão.....	25
3.6. Referências.....	25
<b>4. EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO OU APÓS A ISQUEMIA CEREBRAL INDUZ ALTERAÇÕES NA DENSIDADE DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS NO CÉREBRO DE RATOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Introdução.....	31
4.2. Material e Métodos.....	32
4.2.1. Animais.....	32
4.2.2. Treinamento físico.....	33
4.2.3. Oclusão da artéria cerebral média.....	35
4.2.4. Escala de avaliação neurológica.....	36
4.2.5. Histoquímica pelo método de Nissl.....	36
4.2.6. Imunohistoquímica.....	36
4.2.7. Morfometria.....	37
4.2.8. Análise estatística.....	38
4.3. Resultados.....	38
4.4. Discussão.....	43
4.5. Conclusão.....	46
4.6. Referências.....	46
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O encéfalo é um órgão de extrema importância para o organismo e necessita de suprimento sanguíneo adequado para realizar suas funções (Machado, 2006; Lent, 2008). Se o fluxo de sangue é obstruído (isquemia) ou ocorre o rompimento de algum vaso (hemorragia), temos o acidente vascular encefálico (AVE), determinando o sofrimento ou morte da região afetada e, conseqüentemente, perda ou diminuição das suas respectivas funções (Rowland, 2011).

O AVE acarreta uma disfunção com desenvolvimento rápido, focal ou global e, devido suas causas, pode ser dividido em dois subtipos patológicos: o isquêmico e o hemorrágico (Lessa e Silva, 1993; Lessa, 1999).

No AVE hemorrágico, ocorre rompimento de um vaso sanguíneo com conseqüente acúmulo de sangue no parênquima encefálico, o que por sua vez provocará destruição tecidual direta e compressão dos tecidos adjacentes. Além disso, poderá levar à um aumento da pressão intracraniana, prejudicando a circulação sanguínea tecidual (Cherubini *et al.*, 2005).

O AVE isquêmico ou isquemia encefálica é a maior causa de morte no mundo e de incapacidade permanente em adultos (Sturm *et al.*, 2004; Strong *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2010). Geralmente ocorre obstrução de um vaso que determinará a falta de suprimento sanguíneo adequado, falta de oxigênio e de glicose, além de aumento dos níveis de gás carbônico. Este evento é prejudicial ao tecido nervoso, o qual é altamente sensível à falta de suprimento energético, ocorrendo morte celular, mesmo após a irrigação sanguínea ser restabelecida (Danbolt, 2001). Na isquemia cerebral a área afetada está restrita ao cérebro sendo constituída por uma zona central e outra periférica. Na primeira, há ausência completa de fluxo sanguíneo e suas células sofrem despolarização anóxica permanente, ocorrendo morte neuronal após poucos minutos. Na zona periférica ou área de penumbra, a irrigação sanguínea é parcial e as células sofrem contínuos processos de despolarização e repolarização, tornando-se funcionalmente prejudicadas,

porém, ainda viáveis, permitindo a atuação de mecanismos neuroprotetores (Lessa e Silva, 1993; Strong *et al.*, 2007).

O mecanismo fisiopatológico que desencadeia a morte neuronal na isquemia cerebral inicia-se com a falência energética, ocorrendo a diminuição de adenosina trifosfato (ATP) intracelular e consequente inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, prejudicando a repolarização do axônio e da membrana sináptica após a despolarização. Com isso, grande quantidade de glutamato é liberada na fenda sináptica, estimulando os receptores de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), como N-metil-D-aspartato (NMDA), que permitirão a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ , sódio ( $\text{Na}^+$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e de água para o meio intracelular, determinando edema celular e lise da membrana. A degeneração de neurônios mediada por ativação excessiva de receptores de glutamato foi denominada como excitotoxicidade (Olney, 1969; Nishizawa, 2001). Outro evento que acontece na fase aguda da isquemia cerebral é a inibição do metabolismo oxidativo mitocondrial pela abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  e consequente aumento de radicais livres e morte neuronal (Lessa, 1999; Ding *et al.*, 2004b).

Estudos têm utilizado a oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM) como mecanismo de promoção da isquemia cerebral em ratos (Hossmann, 1998; Ding *et al.*, 2004a,b; Ding *et al.*, 2006), já que a artéria cerebral média (ACM) irriga o córtex motor primário e sensorial, o *striatum* e o hipocampo (Paxinos, 1995). Além disso, o procedimento permite a sobrevivência do animal por longos períodos (Riek-Burchardt *et al.*, 2004) e não utiliza craniotomia que, além de invasiva, altera a pressão intracraniana (Longa *et al.*, 1989).

Em ratos adultos, para que ocorra infarto cortical significativo, a OACM deve ser realizada por mais de 60 minutos (Klintsova *et al.*, 2004), sendo que a região de infarto cortical é proporcional ao tempo de oclusão (Hossmann, 1998). As regiões do cérebro mais comprometidas pela isquemia cerebral são o *striatum*, o hipocampo e o córtex motor, sendo que o *striatum* é a mais vulnerável às lesões isquêmicas, uma vez que é irrigado pelo ramo lenticuloestriado que se origina na base da ACM (Razzaboni, *et al.* 1992; Machado, 2006; Lent, 2008). Essas áreas cerebrais também são importantes no planejamento e execução do movimento, sendo muito

estudadas nas lesões isquêmicas do cérebro. O *striatum* está relacionado com o planejamento motor, o hipocampo com a aprendizagem motora e o córtex motor com a execução do movimento. Todas elas possuem conexões importantes para o controle motor (Machado, 2006; Lent, 2008).

A isquemia cerebral compromete de forma significativa a função motora e sensorial do animal (Ding *et al.*, 2002). Após o evento isquêmico ocorre diminuição do peso muscular, com atrofia significativa tanto dos músculos do lado afetado quanto do lado não afetado (An *et al.*, 2000). Associado às alterações musculares, existem comprometimentos nas áreas de planejamento motor no cérebro do rato que contribuem para o déficit na coordenação motora e equilíbrio do animal (Ding *et al.*, 2004a). Baseado nisto, existem testes funcionais que foram desenvolvidos com o intuito de avaliar o equilíbrio, coordenação e desempenho motor dos animais experimentais. O teste passo em falso é muito utilizado na avaliação da habilidade e resposta motora dos membros torácicos dos ratos (Hernandez e Schallert, 1988; Jones *et al.*, 1999). Já o teste das barras paralelas é mais complexo e exige mais equilíbrio e coordenação dos membros pélvicos do animal (Senna *et al.*, 2011).

Atualmente existem algumas terapias que objetivam a reabilitação dos animais com isquemia cerebral, dentre elas, destaca-se a prática de exercícios físicos que tem sido utilizado como mecanismo de neuroproteção. Os protocolos utilizados para a reabilitação dos animais com isquemia cerebral são variados e levam em consideração o tipo de exercício, ser voluntário ou forçado, assim como a duração e a intensidade do exercício (Gomez, *et al.*, 1998; Ploughman *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2013; Curlik II, *et al.*, 2013). Existem evidências experimentais de que a atividade física realizada antes ou depois do insulto isquêmico promove neuroproteção, dentre elas, diminuição da área de infarto cerebral (Ploughman *et al.*, 2007), sobrevivência neuronal (Klintsova *et al.*, 2004; Ploughman *et al.*, 2005), liberação de fatores neurotróficos (Lindvall *et al.*, 1994; Neeper *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 1998), aumento da angiogênese (Paxinos, 1995) e liberação de proteínas protetoras de estresse (Zhang *et al.*, 2012). No entanto, não existem trabalhos que analisam a histologia cerebral em animais com isquemia cerebral, que realizaram exercício físico antes e depois ao mesmo

tempo, o que torna de extrema relevância o presente estudo para a neurociência.

A neuroplasticidade é definida como a capacidade de adaptação da estrutura e função do sistema nervoso em decorrência dos padrões de experiência (Lent, 2002; Kandel *et al.*, 2003). Durante muitos anos acreditava-se que, a partir de certa idade, o número de neurônios não se renovava, porém nos últimos anos, houve duas grandes contribuições científicas sobre a capacidade de recuperação constante do cérebro, sendo que a primeira vem do conceito de neuroplasticidade, em que o cérebro altera suas conexões conforme o tipo de estímulo, e a segunda vem da descoberta de que novos neurônios (neurogênese) surgem em locais estratégicos (Altman e Das, 1965; Lent, 2002). O treinamento físico estimula a neuroplasticidade cerebral e a recuperação das áreas de tecido nervoso com lesão (Neeper *et al.*, 1996; Vaynman *et al.*, 2004). A neuroplasticidade é influenciada pela intensidade e tipo de exercício executado pelo animal (Curlik e Shors, 2011). Exercícios mais complexos estimulam a maior liberação de fatores de crescimento neuronal propiciando a recuperação de áreas de penumbra do córtex (Gould *et al.*, 1999; Curlik e Shors, 2011), pois estes exercícios envolvem a integração do *striatum*, hipocampo, medula espinhal e córtex motor, intensificando o processo de neuroplasticidade (Ding *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2004b; Maldonado *et al.*, 2008).

Dentre os fatores neurotróficos que estimulam as terminações nervosas e permitem uma remodelação do tecido nervoso (Stroemer *et al.*, 1998; Kleim *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 2003), cita-se o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), da família das neurotrofinas, que interfere na célula neuronal através do receptor tropomiosina quinase B (TrkB) (Lindvall *et al.*, 1994). O BDNF é fosforilado pelo receptor TrkB e ativa a proteína vesicular pré-sináptica, denominada sinapsina-I, que regula a remodelação das terminações nervosas e leva ao desenvolvimento neural (Vaynman *et al.*, 2004; Ploughman *et al.*, 2005). Existem outros fatores que interferem na neuroplasticidade e recuperação de uma lesão neuronal tais como, a sinaptofisina (Nudo *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2010), o fator de crescimento neuronal (NGF) (Lindvall *et al.*, 1994; Neeper *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 1998) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Bergami *et al.*, 2008).

O GDNF é sintetizado pelos astrócitos, que são células da glia que interferem positivamente na neuroplasticidade, após uma injúria cerebral. Essas células também sintetizam a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que favorece a sobrevivência neuronal e atua como transportador do glutamato, diminuindo a toxicidade neuronal (Henderson *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1993; Bergami *et al.*, 2008). Os astrócitos perineuronais absorvem o pro-BDNF (precursor do BDNF) do meio extracelular e o secreta quando ocorre estímulo neuronal, interferindo na regulação desse fator neurotrófico no córtex cerebral (Fayard *et al.*, 2005; Bergami *et al.*, 2008). Outra função importante dos astrócitos é a regulação da interface entre os capilares sanguíneos e o tecido nervoso (Eddleston e Mucke, 1993). Os astrócitos ajudam a manter a barreira hematoencefálica que existe entre as células endoteliais dos capilares e os neurônios, controlando a permeabilidade das membranas (Arthur *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1996). Análises imunohistoquímicas da GFAP no córtex cerebral e *striatum* dos cérebros de ratos exercitados demonstraram aumento da proliferação de astrócitos e da angiogênese em decorrência da maior demanda de oxigênio e glicose pelo tecido neural (Li *et al.*, 2005).

Estudos têm utilizado o cálculo do volume de infarto cerebral como forma de medir a área de lesão cerebral permitindo identificar o tamanho e a evolução do dano cerebral após isquemia focal induzida (Swanson *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004). Existem técnicas de coloração do tecido nervoso que possibilitam a marcação do volume de infarto cerebral (Yang *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004; Regan *et al.*, 2007). O método que utiliza o corante 2,3,5-cloreto trifeniltetrazólio (TTC) permite a marcação da área de infarto (Altman, 1976; Bederson *et al.*, 1986), é simples, econômico e oferece preparações de alto contraste (Yang *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004). O TTC reage com os citocromos da membrana da mitocôndria, reduzindo o tetrazólio em formação e promovendo a coloração do tecido neuronal normal em vermelho (Altman, 1976; Goldlust *et al.*, 1996).

Outra forma de corar o tecido nervoso permitindo o cálculo do volume de infarto cerebral é o método de Nissl, que utiliza de um corante básico, o cresil violeta, para corar os corpúsculos de Nissl (compostos citoplasmáticos de RNA) presentes no citoplasma dos neurônios. Essa coloração indica

viabilidade neuronal, pois na lesão esses corpúsculos desaparecem, num fenômeno denominado de cromatólise (Alvarez-Buylla *et al.*, 1990; Scorza *et al.* 2005).

Na literatura são escassos os trabalhos que descrevem o desempenho motor e análise histopatológica do cérebro de ratos exercitados, principalmente em animais submetidos ao exercício prévio e após a isquemia cerebral, no mesmo estudo. Assim, este estudo teve por objetivo analisar o desempenho motor, o volume de infarto cerebral, a densidade de astrócitos e de neurônios no *striatum*, no ápice do giro denteado do hipocampo e córtex motor de ratos que exercitaram antes e/ou após a isquemia cerebral.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, F.P. Tetrazolium salts and formazans. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v.9, p.1-56, 1976.

ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **Journal of Comparative Neurology**, p. 319-335, 1965.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; LING, C.; KIRN, J.R. Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. **Journal Neuroscience Methods**, v.33, p. 129-33, 1990.

AN, G.Y.; LEE, Y.K.; IM, J.H.; CHOI, S.; CHOI, M.A. Effect of exercise during acute stage on hindlimb muscles of stroke induced rat. **Journal of Korean Biological Nursing Science**, v.2, p. 9-16, 2000.

ARTHUR, F.E.; SHIVERS, R.R.; BOWMAN, P.D. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. **Brain Research**, v.433, p. 155-159, 1987.

BEDERSON, J.B.; PITTS, L.H.; GERMANO, S.M.; NISHIMURA, M.C.; DAVIS, R.L.; BARTKOWSKI, H.M. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, v.17, p.1304-1308, 1986.

BERGAMI, M.; SANTI, S.; FORMAGGIO, E.; CAGNOLI, C.; VERDERIO, C.; BLUM, R.; BERNINGER, B.; MATTEOLI, M.; CANOSSA, M. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. **Journal of Cell Biology**, v.183, n.2, p. 213-221, 2008.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M.C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radic Biological Medical**, v.39, n.7, p.841-852, 2005.

CHUNG, J.Y.; KIM, M.W.; BANG, M.S.; KIM, M. The effect of exercise on trkA in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. **Brain Research**, v.1353, p.187-193, 2010.

CURLIK II, D.M.; MAENG, L.Y.; AGARWAL, P.R.; SHORS, T.J. Physical skill training increases the number of surviving new cells in the adult hippocampus. **Plos One**, v.8, p. 1-9, 2013.

CURLIK, D.M.; SHORS, T.J. Learning increases the survival of newborn neurons provided that learning is difficult to achieve and successful. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v.23, p.2159-2170, 2011.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in neurobiology**, v.65, p.1-105, 2001.

DING, Y.; LI, J.; CLARK, J.; DIAZ, F.G.; RAFOLS, J.A. Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion. **Neurology Research**, v.25, p.189-94, 2003.

DING, Y.; LI, J.; LAI, Q.; RAFOLS, J.A.; LUAN, X.; CLARK, J.; DIAZ, F.G. Motor balance and coordination functional outcome in rat with cerebral artery occlusion training enhances transient middle. **Neuroscience**, v.123, p. 667-674, 2004a.

DING, Y.; LI, J.; LUAN, X.; DING, Y.H.; LAI, Q.; RAFOLS, J.A.; PHILLIS, J.W.; CLARK, J.C.; DIAZ, F.G. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. **Neuroscience**, v.124, p. 583-591, 2004b.

DING, Y.C.; ZHOU, Y.D.; LAI, Q.; LI, J.; PARK, H.; DIAZ, F.G. Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion. **Behavioural Brain Research**, v.132, p. 29-36, 2002.

DING, Y.H.; DING, Y.C.; LI, J.; BESSERT, D.A.; RAFOLS, J.A. Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. **Neurology Research**, v.28, p. 184-189, 2006.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v.54, p.15-36, 1993.

FAYARD, B.; LOEFFLER, S.; WEISS, J.; VOGELIN, E.; KRUTTGEN, A. The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor proBDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. **Journal Neuroscience Research**, v.80, p.18-28, 2005.

GOLDLUST, E.J.; PACZYNSKI, R.P.; HE, Y.Y.; HSU, C.Y.; GOLDBERG, M.P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke**, v.27, p. 1657-62, 1996.

GOMEZ, P.; DAO, L.; SO, V. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. **Brain Research**, v.764, p.1-8, 1998.

GOULD, E.; BEYLIN, A.; TANAPAT, P.; REEVES, A.; SHORS, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience**, v.2, p. 260-265, 2011.

HENDERSON, C.E.; PHILLIPS, H.S.; POLLOCK, R.A.; DAVIES, A.M.; LEMEULLE, C.; ARMANINI, M.; SIMPSON, L.C.; MOFFET, B.; VANDLEN, R.A.; KOLIATSOS, V.E.; ROSENTHAL, A. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. **Science**, v. 266, p. 1062-1064, 1994.

HERNANDEZ, T.D.; SCHALLERT, T. Seizures and recovery from experimental brain damage. **Experimental Neurology**, v. 102, p. 318-24, 1988.

HOSSMANN, K.A., Experimental models for the investigation of brain ischemia. **Cardiovascular Research**, v.39, n.1, p. 106-120, 1998.

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. **Journal Neuroscience**, v.19, n.10, p. 153-163, 1999.

JOSHI, C.N.; JAIN, S.K.; MURTHY, P.S.R. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. **Brain Research Protocols**, v.13, p. 11-17, 2004.

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

KLEIM, J.A; LUSSNI, E.; SCHWARZ, E.R.; COMERY, T.A.; GREENOUGH, W.T. Synaptogenesis and fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. **Journal Neuroscience**, v.16, p. 4529-35, 1996.

KLINTSOVA, A.Y.; DICKSON, E.; YOSHIDA, R.; GREENOUGH, W.T. Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. **Brain Research**, v.1028, p. 92-104, 2004.

KONDO, T.; KINOCHI, H.; KAWASE, M.; YOSHIMOTO, T. Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia/reoxygenation. **Neuroscience Letters**, v.208, p. 101-104, 1996.

LEE, M.C.; INOUE, K.; OKAMOTO, M.; LIU, Y.F.; MATSUI, T.; YOOK, J.S.; SOYA, H. Voluntary resistance running induces increased hippocampal neurogenesis in rats comparable to load-free running. **Neuroscience Letters**, v.537, p.6-10, 2013.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. São Paulo: Atheneu; 2002

LENT, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento – Lent**. 1ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LESSA, I.; SILVA, M.R. Cerebrovascular diseases as multiple cause of death in Salvador: magnitude and space differences of mortality omitted in official statistics. **Arquivo Neuropsiquiatria**, v.51, 1993, p. 319-24, 1993.

LESSA, I. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 4, p. 509-18, 1999.

LI, J.; DING, Y.H.; RAFOLS, J.A.; LAI, Q.; MCALLISTER II, A.P.; DING, Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. **Neuroscience Letters**, v. 386, p. 160-164, 2005.

LIN, L.F.H.; DOHERTY, D.H.; LILE, J.D.; BEKTESH, S.; COLLINS, F. A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**, v.260, p. 1130-1132, 1993.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z.; BENGZON, J.; ELMER, E.; KOKAIA, M. Neurotrophins and brain insults. **Trends Neuroscience**, v.17, p. 490-6, 1994.

LONGA, E.Z.; WEINSTEIN, P.R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. Reversible Middle Cerebral-Artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke**, v.20, n.1, p.84-91, 1989.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2ª Ed., São Paulo: Atheneu, 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. **Neurorehabilitation Neural Repair**, v.22, p. 250-61, 2008.

NEEPER, S.A.; GOMEZ, P.; CHOI, J.; COTMAN, C.W. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Research**, v.726, p. 49-56, 1996.

NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. **Life Sciences**, v.69, p. 369-381, 2001.

NUDO, R.J.; PLAUTZ, E.J.; FRONST, S.B. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. **Muscle Nerve**, v. 24, p. 000-19, 2001.

OLNEY, J.W. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice Electron microscopy of the acutely evolving lesion, **Journal Neuropathology Experimental Neurology**, v. 28, p. 455-474, 1969.

PAXINOS, G. **Cerebral Vascular System - In The Rat Nervous System**. Second ed., Edited by Academic Press, San Diego, 1995.

PLOUGHMAN, M.; GRANTER-BUTTON, S.; CHERNENKO, G.; TUCKER, B.A.; MEAROW, K.M.; CORBETT, D. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. **Neuroscience**, v.136, p. 991-1001, 2005.

PLOUGHMAN, M.; BUTTON, S.G.; CHERNENKO, G.; ATTWOOD, Z.; TUCHER, B.A.; MEAROW, K.M.; CORBETT, D. Exercise intensity influences the temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia. **Brain Research**, v.1150, p. 207-216, 2007.

RAZZABONI, B.L.; PAPASTOITSIS, G.; KOO, E.H.; ABRAHAM, C.R. A calcium stimulated serine protease from monkey brain degrades the  $\beta$ -amyloid precursor protein. **Brain Research**, v. 589, p. 207-216, 1992.

REGAN, H.K.; DETWILER, T.J.; HUAN, J.C.; LYNCH, J.J.; REGAN, C.P. An improved automated method to quantitate infarct volume in triphenyltetrazolium stained rat brain sections. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 56, p. 339-343, 2007.

RIEK-BURCHARDT, M.; HENRICH-NOACK, P.; METZ, G.A.; REYMANN, K.G. Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia. **Journal of Neuroscience Methods**, v.137, n.2, p. 227-233, 2004.

ROWLAND, L P. **Merritt: Tratado de Neurologia**. 12<sup>a</sup> Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011

SCORZA, F.A.; ARIDA, R.M.; CYSNEIROS, R.M.; SCORZA, C.A.; ALBUQUERQUE, M.; CAVALHEIRO, E.A. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arquivo Neuropsiquiatria**. v.63, n.2A, p. 283-288, 2005.

SENNA, P.N.; ILHA, J.; BAPTISTA, P.P.A.; NASCIMENTO, P.S.; LEITE, M.C.; PAIM, M.F.; GONÇALVES, C.A.; ACHAVAL, M.; XAVIER, L.L. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 26, n. 4, p. 269-279, 2011.

SEO, H.G.; KIM, D.Y.; PARK, H.W.; LEE, S.U.; PARK, S.H. Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain. **Neuroscience**, v.25, p. 1638-1645, 2010.

STROEMER, R.P.; KENT, T.A.; HULSEBOSCH, C.E. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. **Stroke**, v. 29, p. 2381-93, 1998.

STRONG, K.; MATHERS, C.; BONITA, R. Preventing stroke: saving lives around the world. **Lancet Neurology**, v.6, p. 182-187, 2007.

STURM, J.; DONNAN, G.; DEWEY, H.; MACDONELL, R.; GILLIGAN, A.; THRIFT, A. Determinants of handicap after stroke: the North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). **Stroke**, v.35, p. 715-20, 2004.

SWANSON, R.A.; MORTON, M.T.; TSAO-WU, G.; SAVALOS, R.A.; DAVIDSON, C.; SHARP, F.R. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. **Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v.10, p. 290-293, 1999.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **European Journal of Neuroscience**, v.20, p. 2580-2590, 2004.

YANG, Y.; SHUAIB, A.; LI, Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. **Journal Neuroscience Methods**, v. 84, p. 9-16, 1998.

ZHANG, Q.; WU, Y.; SHA, H.; ZHANG, P.; JIA, J.; HU, Y.; ZHU, J. Early exercise affects mitochondrial transcription factors expression after cerebral ischemia in rats. **International Journal Molecular Sciences**, v. 13, p. 1670-9, 2012.

### 3. ATIVIDADE FÍSICA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL EM RATOS COM ISQUEMIA CEREBRAL\*

Laila Cristina Moreira Damázio<sup>1</sup>, Raphael Teixeira Rocha Melo<sup>1</sup>, Maira de Castro Lima<sup>2</sup>, Vanessa Guedes Pereira<sup>4</sup>, Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro<sup>2</sup>, Natália Ribeiro Alves<sup>2</sup>, Betânia Souza Monteiro<sup>4</sup>, Antônio José Natali<sup>3</sup>, Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>4</sup>, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>2</sup> Grupo de Atuação Docente de Morfologia, Universidade Federal de São João Del Rei –CCO, 35501-296, Divinópolis, MG, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

**Resumo:** A atividade física tem sido utilizada como estratégia importante na recuperação das disfunções motoras ocasionadas pela isquemia cerebral. O presente estudo investigou o desempenho motor e o volume de infarto cerebral em ratos sedentários ou que praticaram exercício físico antes e após a isquemia cerebral, promovida por oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM). Quarenta e oito ratos Wistar, foram randomizados em dois grupos, um submetido à OACM e o outro apresentando ausência da isquemia. Ambos os grupos foram subdivididos em AI (n=6): animais que realizaram exercício físico prévio a OACM; DI (n=6): animais que realizaram exercício físico após a OACM; ADI (n=6): animais que realizaram exercício físico antes e após a OACM e SI (n=6): animais que não realizaram exercício. O treinamento físico na esteira foi realizado por 6 semanas (30 min./dia), 5 dias na semana. Os resultados demonstraram perda de peso significativa nos animais SI após o procedimento de OACM (81 dias) e no final do experimento no grupo ADI ( $p < 0.0001$ ). Os animais dos grupos AI e ADI apresentaram menor frequência de erros no teste passo em falso e barras paralelas aos 76 dias. Ao final do experimento o grupo ADI apresentou melhor desempenho motor nos testes funcionais e menor volume de infarto cerebral.

**Palavras Chave:** exercício físico, isquemia cerebral, desempenho motor, volume de infarto cerebral.

---

\*O artigo foi submetido à ISRN Neurology, no dia 05 de dezembro de 2013 – n° do manuscrito: 982483.

### 3.1. Introdução

A isquemia cerebral é importante causa de mortalidade e morbidade [1,2,3]. Na lesão estão caracterizadas duas áreas, uma central, com morte neuronal, e outra denominada de penumbra, com irrigação parcial e células ainda viáveis [4]. Geralmente após a isquemia cerebral em ratos ocorre disfunção motora, sensorial e cognitiva [5,6] e, conseqüentemente, a reabilitação física parece ser uma estratégia clínica para recuperação dos portadores [7].

Existem algumas terapias que objetivam a reabilitação dos animais com isquemia cerebral, dentre elas, destaca-se a prática de exercícios físicos que tem sido utilizado como mecanismo de neuroproteção [8,9,10] pois, promove a integração de vários impulsos neuronais cerebrais, permitindo mudanças plásticas que beneficiam as estruturas cerebrais comprometidas [11,12,13,14,15].

O programa de exercício físico interfere de diferentes formas no cérebro dos ratos portadores de isquemia cerebral [3], e quanto mais cedo é iniciada a reabilitação, maior será a neuroproteção [9,16]. Tem sido demonstrado que o exercício físico de intensidade moderada diminui a apoptose celular, aumenta a presença de fatores neurotróficos [17,18], promove a biogênese mitocondrial [19] e a angiogênese [20].

O exercício físico realizado previamente à isquemia cerebral também promove neuroproteção do cérebro do rato [10,21] e, dentre os mecanismos neuroprotetores estão a diminuição da reação inflamatória e do edema cerebral [9], além de promover aumento da síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de crescimento neuronal (NGF) [22,23,24]. A expressão desses fatores neurotróficos é importante no processo de proliferação, maturação e sobrevivência das células neuronais [25,26].

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do exercício físico em diferentes momentos sobre o desempenho motor e o volume de infarto cerebral em animais submetidos à isquemia cerebral por meio da oclusão transitória da artéria cerebral média.

## 3.2. Material e Métodos

*3.2.1. Animais.* Quarenta e oito ratos Wistar, machos, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Viçosa, com peso médio de  $(138.7 \pm 2.18)$  g, 30 dias, que foram mantidos em gaiolas, com acesso livre a água e ração, em fotoperíodo de 12 horas, temperatura ambiente entre 21 e 22°C e umidade relativa do ar de 60-70%. Os animais foram pesados no início do experimento (30 dias), imediatamente antes (76 dias) e após (81 dias) o procedimento cirúrgico e ao final do experimento (126 dias). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 32/2011).

Vinte e quatro animais foram submetidos à isquemia por oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM) e distribuídos (tabela 1) nos seguintes subgrupos: AI (n=6): realizaram exercício na esteira (Insight Instrumentos® – Ribeirão Preto, SP) previamente à realização da isquemia; DI (n=6): realizaram exercício na esteira após a isquemia; ADI (n=6): realizaram exercício antes e após a isquemia e SI (n=6): não realizaram exercício. Outros vinte e quatro animais (controle) foram submetidos ao acesso cirúrgico, mas não à OACM, e foram distribuídos (tabela 1) nos seguintes subgrupos: AC (n=6): treinados antes da cirurgia; DC (n=6): treinados após a cirurgia; ADC (n=6): treinados antes e após a cirurgia e SC (n=6): não treinados na esteira.

**Tabela 1.** Distribuição dos quarenta e oito ratos segundo os grupos experimentais

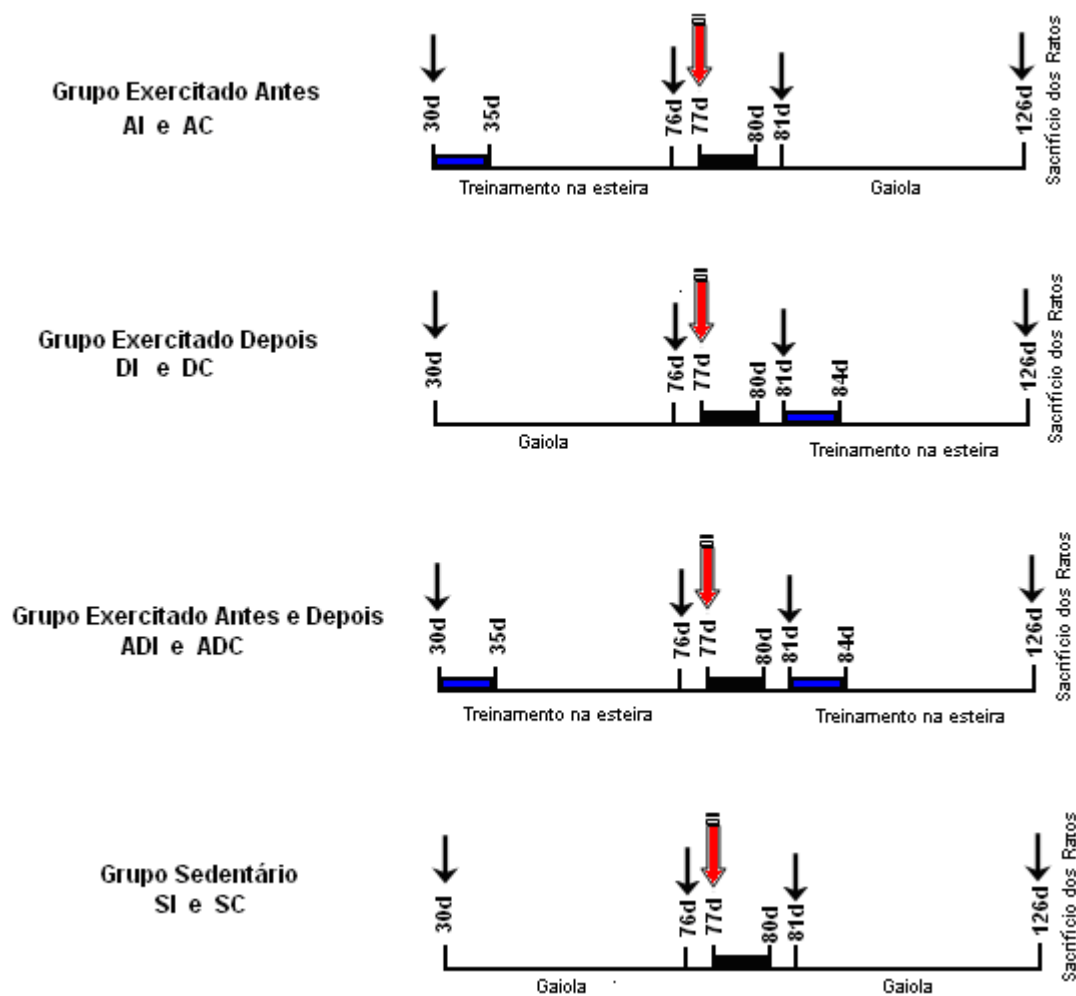
<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Exercício Prévio</b>	<b>Exercício Posterior</b>	<b>Exercício prévio e posterior</b>	<b>Sedentário</b>
<b>Animais submetidos à isquemia cerebral</b>	AI (n=6)	DI (n=6)	ADI (n=6)	SI (n=6)
<b>Animais operados, mas sem isquemia cerebral</b>	AC (n=6)	DC (n=6)	ADC (n=6)	SC (n=6)

*3.2.2. Treinamento Físico.* Os animais exercitados antes do procedimento cirúrgico foram adaptados ao exercício em esteira, por cinco dias, na velocidade de 10-12 m/min., durante 12 min./dia antes dos procedimentos cirúrgicos.

Após o período de adaptação, os ratos pertencentes aos grupos exercitados previamente à cirurgia (AI, AC, ADI, ADC) foram submetidos ao exercício na esteira, sem inclinação, por seis semanas, cinco dias por semana, durante 30 min./dia [27,28], na velocidade de 15 m/min. [8,10]. A velocidade do exercício foi gradualmente aumentada, sendo que no primeiro dia correram com 10m/min., no segundo 12m/min. e do terceiro dia em diante correram com velocidade de 15 m/min. [8,10].

Os ratos alocados nos grupos que exercitaram após a cirurgia (DI, DC, ADI, ADC), iniciaram os exercícios sete dias após o procedimento cirúrgico e o período de adaptação na esteira. O exercício físico após a OACM (DI e ADI) e os animais do grupo controle (DC e ADC) durou seis semanas e os ratos correram por 30 min./dia, na esteira sem inclinação, durante cinco dias por semana [27,28], com velocidade entre 8 a 12 m/min. [9,14]. A velocidade do exercício foi gradualmente aumentada, sendo que no primeiro dia os ratos correram com 8 m/min., no segundo 10 m/min. e do terceiro dia em diante correram 12 m/min. [9,14,19]. Os ratos que conseguiram exercitar por 2 minutos na velocidade de 8, 11 e 12 m/min. nos três primeiros dias de treinamento, foram incluídos no estudo e prosseguiram na pesquisa.

A metodologia de exercícios e a cronologia dos exames realizados no experimento estão resumidamente descritas na figura 1.



**Figura 1.** Representação dos procedimentos realizados nos grupos: exercitado antes (AI e AC), exercitado depois (DI e DC), exercitado antes e depois (ADI e ADC) e grupo sedentário (SI e SC). Dia da OACM (AI, DI, ADI e SI) ou do procedimento cirúrgico no grupo controle (AC, DC, ADC e SC): (→). Dias das avaliações funcionais utilizando o teste passo em falso e barras paralelas: (→). Período de avaliação neurológica e observação dos animais para confirmação da isquemia cerebral no grupo OACM e acompanhamento do grupo controle: (■). Os grupos (AI, AC, DI, DC, ADI e ADC) submetidos ao treinamento físico na esteira passaram por um período de adaptação: (■).

**3.2.3. Oclusão da artéria cerebral média.** Os animais receberam analgesia pré-empitiva com fentanil (0,3 mg/Kg/IM), foram sedados com Diazepan (2,5 mg/Kg resp., i.p.) e anestesiados com Isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100 %. Foi realizada antimicrobianoprofilaxia com enrofloxacina (10 mg/Kg) por via intramuscular.

Após a anestesia, foi administrada por via intraperitoneal atropina diluída em solução salina a 2 % (0,1 mL por animal) para a prevenção de

arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à estimulação mecânica do nervo vago durante a operação.

O procedimento cirúrgico utilizado para a realização da oclusão transitória da artéria cerebral média (ACM) foi o descrito por Longa et al. [29]. Após tricotomia e antisepsia da região cervical ventral, foi realizada incisão sagital mediana de aproximadamente 3 cm de comprimento. Os tecidos foram divulsionados até a exposição da bifurcação da artéria carótida comum (ACC) esquerda. O ramo pterigopalatino da artéria carótida interna (ACI) foi clampeado em sua origem. A artéria carótida externa (ACE) foi ligada com fio Vicryl n.0 em sua porção distal da bifurcação da ACC. Após a ACC e a ACI terem sido clampeadas, a ACE foi seccionada para passagem do fio de oclusão (monofilamento para oclusão de silicone, 5-0 de diâmetro e 0.12 mm de comprimento, Docol®). O fio foi introduzido através da ACE esquerda no interior da ACI até a origem da ACM, aproximadamente 20-21 mm de distância em relação à bifurcação da ACC. Para permitir a passagem do fio de oclusão, o clipe da ACI foi removido. Para determinar o comprimento, os fios foram previamente marcados em 18, 20 e 22 mm no seu comprimento. A introdução de 20 mm do fio de oclusão associado à discreta resistência à passagem do fio indicou o local da origem da ACM. A incisão cirúrgica foi fechada, mantendo o fio de oclusão e o clipe da ACC.

O fio e o clipe permaneceram por 60 minutos [9,30,31], quando o animal foi novamente anestesiado, o fio foi retirado e a porção da ACE proximal à bifurcação da ACC (por onde foi introduzido o fio de oclusão) foi ligada. Foi realizada aproximação dos tecidos e dermorrafia com náilon 3-0.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em recuperação por duas horas sob luz quente para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38°C, com água e comida. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente por até 12 horas e em seguida os animais foram transferidos para caixas forradas com maravalha. Para reposição de líquido corporal foi injetado diariamente 10 mL de solução salina intraperitoneal durante os três primeiros dias de observação [32].

*3.2.4. Escala de avaliação neurológica.* Foi utilizada a escala para o modelo de OACM em ratos proposta por Menzies [33], que possui escores

de 0 a 4, sendo que quanto maior o escore, pior é o déficit neurológico. No primeiro dia após a cirurgia, os animais que apresentaram escore quatro foram incluídos no experimento e utilizados nos subgrupos AI (exercício antes da OACM); DI (exercício após OACM); ADI (exercício antes e depois da OACM) e SI (sedentário e OACM).

*3.2.5. Avaliação funcional.* Os animais foram avaliados com dois diferentes testes motores (teste passo em falso e teste das barras paralelas), aplicados aos 30, 76, 81 e 126 dias. Três avaliadores foram treinados antes da aplicação dos testes, que foi realizada de forma cega. A média dos erros cometidos pelos ratos, nos dois testes funcionais neurológicos, foi calculada posteriormente.

Para realização do teste passo em falso, foi utilizada uma placa (estrutura) gradeada de 100 x 50 cm, com intervalo de grade de 3 x 3 cm (9 cm<sup>2</sup>). A duração do teste foi de três minutos, sendo o erro considerado quando a pata do animal passava por entre a grade [34,35,36].

Para realização do teste da barras paralelas foram utilizadas duas plataformas de madeira unidas por barras paralelas de metal (115 cm), com um estímulo aversivo (choque de baixa intensidade) nas extremidades das barras, forçando o animal a caminhar sobre as barras. O teste teve a duração de cinco minutos e foi considerado erro quando o animal colocou as duas patas na mesma barra ou quando a pata passou entre as duas barras ou por fora [34,35].

*3.2.6. Coloração e mensuração do volume de infarto.* Depois de 126 dias, todos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina 1% (30 mg/Kg) e xilazina (4 mg/Kg) [36]. Na seqüência, foram perfundidos transcárdiacamente com solução salina heparinizada (0,9 % de NaCl contendo 5000UI de heparina/L) por 5 minutos, seguidos da perfusão com solução a 4 % de paraformaldeído, por mais 5 minutos. Em seguida, os cérebros foram removidos e fatiados em secções de 1 mm no plano coronal. As secções foram coradas com solução de 2% de trifeniltetrazólio de cloreto-2,3,5 (TTC; Vetec; Brazil), a 37°C, por 30 minutos, para determinar a viabilidade do tecido cerebral [37,38,39,40,41]. O volume de infarto foi

calculado em imagens de todas as secções dos cérebros, digitalizadas por um scanner de mesa (HP scanjet M1120MFP resolução de 300dpi) e, as áreas de infarto foram calculadas utilizando o programa Image J software (Image-Pro Plus, versão 4.5, Windows 98). O volume de infarto foi calculado pela soma de todas as áreas de infarto cerebral nas secções de cada animal. Para diminuir o erro introduzido pelo edema do tecido cerebral, foi utilizado o método indireto para cálculo do volume de infarto, que foi considerado igual à área do hemisfério contralateral, subtraindo a área não infartada do hemisfério ipsilateral. A porcentagem foi obtida pela divisão do volume de infarto pela área do hemisfério contralateral multiplicado por 100 % [42,43].

*3.2.7. Análise estatística.* As análises das médias entre os diferentes grupos foram realizadas pelo teste One-Way ANOVA, seguido do *Post-hoc de Tukey*, considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As variáveis analisadas foram o peso corporal, desempenho funcional e volume de infarto cerebral.

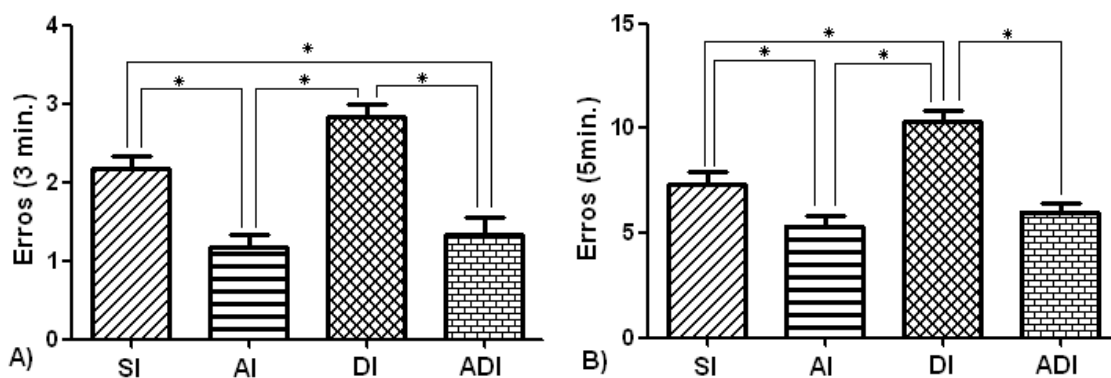
### **3.3. Resultados**

*3.3.1. Análise do peso corporal.* Os animais ganharam peso corporal durante o período experimental, verificando-se diferença significativa entre as médias de peso corporal obtidas no início e ao final do experimento ( $p < 0.0001$ ). Antes do procedimento cirúrgico e da OACM, aos 76 dias, não foi observada diferença significativa entre os pesos dos animais. Depois do procedimento cirúrgico e da OACM (81 dias), os animais do grupo SI apresentaram diminuição do peso corporal ( $p < 0.0001$ ). No final do experimento (126 dias), os animais do grupo ADI apresentaram diminuição do peso corporal ( $p < 0.0001$ ), como demonstrado na tabela 1.

**Tabela I:** Peso Corporal dos animais no início do experimento (30 dias), antes da cirurgia (76 dias), após a cirurgia (81 dias) e no final do experimento (126 dias).

<b>PESO CORPORAL DOS ANIMAIS</b>				
<b>GRUPOS</b>	<b>INÍCIO</b>	<b>ANTES</b>	<b>DEPOIS</b>	<b>FINAL</b>
<b>SC</b>	140.3±1.20	266.1±11.01	266.3±9.40	399.7±18.27
<b>AC</b>	142.4±2.08	286.5±5.26	289.4±5.06	387.8±9.03
<b>DC</b>	140.1±1.98	285.2±5.10	284.5±5.13	396.9±8.41
<b>ADC</b>	139.7±2.37	280.3±6.02	276.1±8.60	389.6±16.57
<b>SI</b>	140.4±2.97	254.6±12.90	230.6±14.29	348.8±16.90
<b>AI</b>	138.7±1.06	292.3±14.69	274.0±13.22	385.9±3.75
<b>DI</b>	138.7±2.18	278.8±8.82	240.7±23.58	373.6±20.46
<b>ADI</b>	141.0±0.487	289.8±6.78	277.9±9.06	344.2±8.74

*3.3.2. Testes funcionais.* Os dados dos testes funcionais realizados com 30 dias, não identificou diferenças entre os grupos em relação aos testes passo em falso e barras paralelas. Os animais com 76 dias, exercitados antes da isquemia cerebral, demonstraram frequência de erros menor no teste passo em falso ( $p < 0.0001$ ) e nas barras paralelas ( $p < 0.0001$ ) em comparação com os ratos sedentários, como demonstrado na figura 2. Os animais do grupo controle, que exercitaram antes da cirurgia também apresentaram frequência de erros menor nos testes funcionais em comparação com os animais do grupo sedentário.

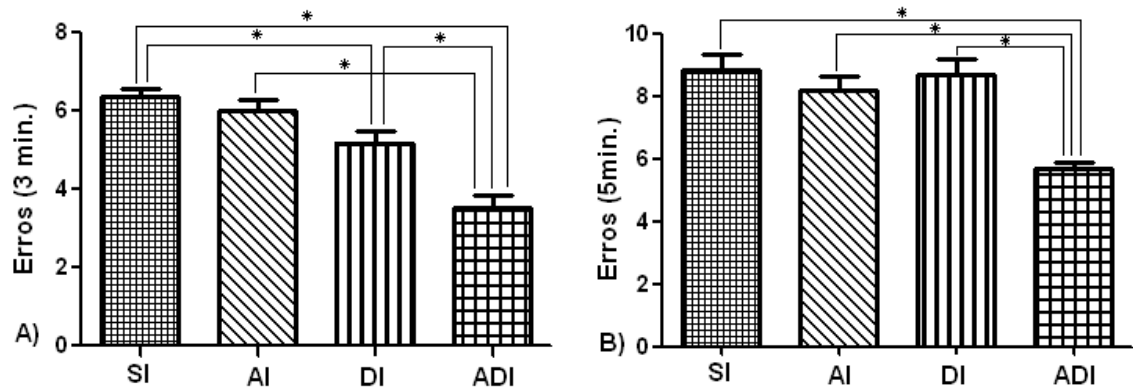


**Figura 2.** Frequência de erros cometidos nos testes funcionais pelos animais com 76 dias. O grupo SI - sedentário com isquemia cerebral, AI – Exercitou antes da isquemia cerebral, DI – Exercitou após a isquemia cerebral e ADI – Exercitou antes e após a isquemia cerebral. No teste passo em falso (A) durante três minutos e no teste das barras paralelas (B) durante cinco minutos de observação. Os animais dos grupos AI (n=6) e ADI (n=6) demonstraram menor frequência de erros no teste passo em falso ( $p < 0.0001$ ;  $F = 18.768$ ) e nas barras paralelas ( $p < 0.0001$ ;  $F = 19.667$ ) em comparação com os animais do grupo sedentário. Médias  $\pm$  Erro padrão \* $p < 0.0001$  (teste one-way ANOVA, seguido do post-hoc de Tukey).

Com 81 dias os testes funcionais demonstraram diferenças significativas entre as médias dos grupos com isquemia cerebral e controle, sendo que os grupos com isquemia apresentaram maior frequência de erros em relação aos grupos controle tanto no teste passo em falso quanto no das barras paralelas. Os ratos exercitados antes da isquemia cerebral demonstraram redução na frequência de erros cometidos no teste passo em falso ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo sedentário. No teste das barras paralelas, os ratos do grupo ADI demonstraram menor frequência de erros quando comparados aos outros grupos com isquemia cerebral ( $p < 0.0001$ ). Os animais do grupo controle que exercitaram antes do procedimento cirúrgico, apresentaram melhor desempenho no teste passo em falso ( $p = 0.0014$ ) e nas barras paralelas ( $p = 0.0011$ ) em comparação com os outros animais do grupo controle.

No final do experimento, também foram identificadas diferenças entre os grupos quanto à frequência de erros nos testes funcionais ( $p < 0,0001$ ). O grupo SI apresentou mais erros no teste passo em falso ( $p < 0.0001$ ) e nas barras paralelas ( $p < 0.0001$ ) quando comparado aos animais dos outros grupos com isquemia cerebral. Os animais do grupo ADI apresentaram melhor desempenho nos dois testes funcionais, como demonstrado na figura 3. Os animais do grupo controle exercitados antes do procedimento

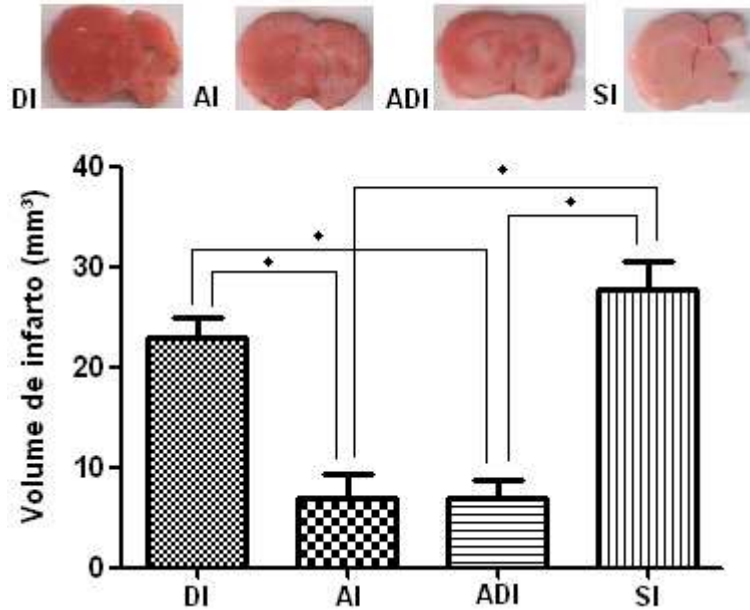
cirúrgico, também apresentaram menor freqüência de erros no teste passo em falso ( $p < 0.0001$ ). Os animais do grupo exercitados apenas depois do procedimento cirúrgico cometeram mais erros nos dois testes funcionais ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 3.** Freqüência de erros cometidos nos testes funcionais pelos animais com 126 dias. O grupo SI - sedentário com isquemia cerebral, AI – Exercitou antes da isquemia cerebral, DI – Exercitou após a isquemia cerebral e ADI – Exercitou antes e após a isquemia cerebral. No teste passo em falso (A) durante três minutos e no teste das barras paralelas (B) durante cinco minutos de observação. Os animais do grupo ADI ( $n=6$ ) cometeram menor frequência de erros no teste passo em falso ( $p < 0.0001$ ;  $F=19.885$ ) e nas barras paralelas ( $p < 0.0001$ ;  $F=11.642$ ) quando comparado aos animais dos grupos com isquemia cerebral ( $p < 0.0001$ ). Médias  $\pm$  Erro padrão \* $p < 0.0001$  (teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc* de Tukey).

**3.3.3. Medida do Volume de Infarto Cerebral.** As análises das fatias dos cérebros dos ratos dos grupos controle não demonstraram área de infarto no hemisfério cerebral esquerdo. As imagens das fatias coronais dos cérebros dos ratos com isquemia cerebral demonstraram uma diminuição das áreas dos hemisférios cerebrais esquerdos correspondentes à região de infarto.

Os grupos AI e ADI demonstraram menores áreas corticais de infarto no hemisfério cerebral esquerdo quando comparado aos grupos SI e DI ( $p < 0.0001$ ). Ao comparar o volume de infarto cerebral entre os grupos SI e DI e o grupo AI com o ADI, não foi possível identificar diferenças significativas entre eles (Figura 4).



**Figura 4.** Imagens representativas de secções do hemisfério cerebral direito e esquerdo, 2.20 mm do Paxinos e Watson [44], coradas por TTC, de ratos dos grupos DI, AI, ADI e SI. Barra = 1 mm. Representação gráfica do volume de infarto cerebral dos grupos submetidos à OACM. Média ± Erro padrão \* $p < 0.0001$ ;  $F=49.515$  (teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc de Tukey*).

### 3.4. Discussão

A isquemia cerebral causa comprometimento motor que prejudica o desempenho funcional dos ratos, e isso foi observado nos animais submetidos ao procedimento de OACM do presente estudo. Esses animais apresentaram diminuição significativa do peso corporal, o qual não ultrapassou 30 % do seu peso antes do procedimento cirúrgico e, que pode estar relacionada à dificuldade de movimentação e de apreensão do alimento.

O presente estudo demonstrou que um programa de atividade física realizado antes e depois de um evento isquêmico pode promover melhor desempenho motor e diminuição do volume de infarto cerebral nos ratos com lesão cerebral. O exercício físico regular tem sido utilizado na reabilitação de ratos com isquemia cerebral demonstrando benefícios funcionais e estruturais no cérebro de animais treinados [7,44].

Os dados do presente estudo demonstraram que os animais do grupo que exercitou apenas depois do evento isquêmico não apresentaram melhor

desempenho motor no final do experimento e não foram beneficiados com uma região menor de infarto cerebral. Isso pode estar relacionado com o início tardio dos exercícios físicos (no quarto dia pós-operatório), pois estudos que iniciaram os exercícios 24 horas após a isquemia cerebral demonstraram menor volume de infarto cerebral quando comparado ao grupo sedentário [9,14,19,45]. Após 24 horas da isquemia cerebral a área de infarto aproxima de um estado de maturação onde a capacidade de alteração histopatológica permanece diminuída e a recuperação da área de penumbra permanece reduzida [46]. Outro fator que deve ser considerado como limitante na recuperação da área de penumbra, após a isquemia cerebral, é a realização de atividades motoras simples, como a corrida na esteira, que não necessita do recrutamento de um circuito neuronal mais complexo, o que otimizaria a plasticidade cerebral [11,16,47,48,49]. A velocidade do exercício físico empregada nesse estudo aumentou progressivamente até atingir uma velocidade moderada de 12m/min. na tentativa de minimizar o impacto do exercício físico na lesão cerebral. A velocidade excessiva após o evento isquêmico promove aumento da excitotoxicidade na área de penumbra determinando aumento do volume de infarto cerebral [46,50].

Os resultados demonstraram que os animais do grupo controle, exercitados antes da cirurgia, foram beneficiados com o programa de exercício físico, pois demonstraram melhor desempenho nos testes funcionais durante todo o experimento. No grupo com isquemia cerebral, a prática de exercício físico antes da isquemia cerebral promoveu efeitos neuroprotetores no cérebro dos animais treinados e isso foi evidenciado pela diminuição significativa do volume de infarto cerebral nos animais treinados nesta circunstância. A prática de exercício físico após o evento isquêmico, no grupo que exercitou antes e depois, também beneficiou o tecido neuronal permitindo que ocorra o reaprendizado motor e conseqüentemente o melhor desempenho motor desses animais nos testes funcionais do presente estudo. O exercício físico estimula a reorganização cortical [23] das áreas de planejamento motor que foram lesadas [51,52,53], com o estímulo da sinaptogênese, neurogênese, regeneração axonal e conseqüente recuperação da área de penumbra na lesão isquêmica [7,13,14,15,54,55].

Os animais com isquemia cerebral que não praticaram exercício físico apresentaram região de infarto cerebral maior quando comparado aos animais treinados apenas antes e antes e depois. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos [8,9,10,35] onde foi demonstrado que o exercício físico promove reabilitação física e recuperação das áreas cerebrais acometidas na isquemia cerebral [9,14]. A realização de atividade física previamente à indução da isquemia cerebral promove redução do infarto cerebral por desenvolver neurotolerância endógena à lesão isquêmica [8]. Diversos mecanismos são descritos como fatores de neuroproteção no cérebro de ratos com isquemia cerebral, como: aumento de densidade microvascular [10], diminuição de proteínas indutoras de apoptose [21], aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro [25] e do fator de crescimento neuronal [23,24].

Com isso, demonstra-se a importância da prática de exercício físico antes e após o evento isquêmico, enfatizada pelos dados do presente estudo, quando foi observado melhor desempenho funcional e menor volume de infarto cerebral, nos animais que exercitaram antes e depois da isquemia cerebral. A rede treinada antes da isquemia cerebral precisa ser constantemente ativada após a isquemia para que se tenha manutenção do benefício do treinamento.

### **3.5. Conclusão**

O estudo demonstrou que a realização de um programa de atividade física antes do evento isquêmico diminui o volume de infarto cerebral beneficiando o processo de reaprendizado motor que foi intensificado pelo programa de exercício físico após a isquemia cerebral. Os animais que exercitaram antes e depois da isquemia cerebral apresentaram melhor desempenho motor nos testes funcionais.

### **3.6. Referências**

1. B. Boden-Albala and R.L. Sacco, "The stroke prone individual". *Rev.Soc.Cardiol.*, vol.4, pp.501-8, 1999.

2. J. Turm, G. Donnan, H. Dewey, R. Macdonell, A. Gilligan, and A. Thrift, "Determinants of handicap after stroke: the North East Melbourne stroke incidence study (NEMESIS)", *Stroke*, vol.35, pp.715-20, 2004.
3. J.Y. Chung, M.W. Kim, M.S. Bang, and M. Kim, "The effect of exercise on trkA in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain", *Brain Res.*, vol. 1353, pp.187-193, 2010.
4. K. Strong, C. Mathers, and R. Bonita, "Preventing stroke: saving lives around the world", *Lancet Neurology*, vol.6, pp.182-187, 2007.
5. M.W. Kim, M.S. Bang, T.R. Han, Y.J. Ko, B.W. Yoon et. al., "Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain", *Brain Res.*, vol.1052, pp.16-21, 2005.
6. H.C. Chang, Y.R. Yang, S.G. Wang, and R.Y. Wang, "Effects of treadmill training on motor performance and extracellular glutamate level in striatum in rats with or without transient middle cerebral artery occlusion", *Behav. Brain Res.*, vol.250, pp.450-455, 2009.
7. Z. Pengyue, Z. Oi, P. Hongjian, W. Yi, B. Yulong, S. V. Peter, C. Jun et al., "Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury", *Front Biosci.*, vol.4, pp.2476-89, 2012.
8. Y. Ding, J. Li, X. Luan, Y.H. Ding, Q. Lai, J. A. Rafols et al., "Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin", *Neuroscience*, vol.124, pp.583-591, 2004.
9. P. Zhang, Q. Zhang, H. Pu, Y. Wu, Y. Bai, P.S. Vosler et al., "Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury", *Front. Biosci.*, vol.4, pp.2476-89, 2012.
10. Y. H. Ding, Y.C. Ding, J. Li, D.A. Bessert, and J.A. Rafols, "Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model", *Neurol. Res* ,vol.28, pp.184-189, 2006.
11. Y. Ding, J. Li, J. Clark, F.G. Diaz, and J.A. Rafols, "Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion", *Neurol. Res.*, vol. 25, pp.189-94, 2003.
12. M.A. Maldonado, R.P. Allred, E.L. Felthouser, and T.A. Jones, "Motor skill training but not voluntary exercise, improves skilled reaching after unilateral ischemic lesions of the sensorimotor cortex in rats", *Neurorehabil Neural Repair*, vol. 22, pp.250-61, 2008.
13. R. J. Nudo, "Post infarct cortical plasticity and behavioral recovery", *Stroke*, vol. 38, pp.840-845, 2007.

14. Q. Zhang, Y. Wu, H. Sha, P. Zhang, J. Jia, Y. Hu, J. Zhu, "Early exercise affects mitochondrial transcription factors expression after cerebral ischemia in rats", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, pp.1670-9, 2012.
15. Y.R. Yang, H.C. Chang, P.S. Wang, and R.Y. Wang, "Motor performance improved by exercises in cerebral ischemic rats", *J. Mot. Behav.*, vol. 44, pp.97-103, 2012.
16. H.G. Seo, D.Y. Kim, H.W. Park, S.U. Lee, and S.H. Park, "Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain", *Neuroscience*, vol. 25, pp.1638-1645, 2010.
17. C. H. Chae and H.T. Kim, "Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats", *Neurochemistry International*, vol.55, pp.208-213, 2009.
18. M. Bergami, S. Santi, E. Formaggio, C. Cagnoli, C. Verderio, R. Blum et al., "Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes", *J. Cell. Biol.*, vol.183, no.2, pp.213-221, 2008.
19. Q. Zhang, Y. Wu, P. Zhang, H. Sha, J. Jia, Y. Hu, and J. Zhu, "Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats", *Neuroscience*, vol. 205, pp.10-17, 2012.
20. J.Y. Chung, M.W. Kim, M.S. Bang, and M. Kim, "Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise", *Plos One*, vol.8, no.3, pp.524-61, 2013.
21. B. Liebelt, P. Papapetrou, A. Ali, M. Guo, X. Ji, C. Peng, et al., "Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-Kinase 1/2", *Neuroscience*, vol.166, pp.1091-1100, 2010.
22. O. Lindvall, Z. Kokaia, J. Bengzon, E. Elmer, and M. Kokaia, "Neurotrophins and brain insults", *Trends Neurosci.*, vol.17, pp.490-6, 1994.
23. S.A. Neeper, P. Gomez, J. Choi, and C.W. Cotman, "Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain", *Brain Res.*, vol.726, pp.49-56, 1996.
24. P. Gomez, L. Dao, and V. So, "Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus", *Brain Res.*, vol.764, pp.1-8, 1998.
25. M. Ploughman, S. Granter-Button, G. Chernenko, B.A. Tucker, K.M. Mearow, and D. Corbett, "Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia", *Neuroscience*, vol.136, pp. 991-1001, 2005.

26. A. Y. Klintsova, E. Dickson, R. Yoshida, and W.T. Greenough, "Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise", *Brain Res.*, vol.1028, pp.92-104, 2004.
27. F. Zhang, J. Jia, Y. Wu, Y. Hu, and Y. Wang, "The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia", *Int. J. Mol. Sci.*, vol.11, pp. 2658-2669, 2010.
28. Y. R. Yang et al., "Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats", *Neurosci Letters*, vol.339, pp.91-94, 2003.
29. E. Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, and R. Cummins, "Reversible middle cerebral-artery occlusion without craniectomy in rats", *Stroke*, vol.20, pp. 84-91, 1989.
30. S. G. Duarte, A.D. Campos, and B.O. Colli, "Functional evaluation of temporary focal cerebral ischemia", *Arq. Neuropsiquiatr.*, vol.67, pp.751-756, 2003.
31. J. Ma, L. Zhao, and J.R. NOWAK, "Selective, reversible occlusion of the middle cerebral artery in rats by an intraluminal approach optimized filament design and methodology", *J. Neurosci. Methods.*, vol.156, pp.76-83, 2006.
32. M. Modo, R.P. Stroemer, E. Tang, T. Veizovic, P. Sowniski, and H. Hodges, "Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion", *J. Neuro Sci. Methods*, vol. 194, pp.99-109, 2000.
33. S.A. Menzies, R.R. Smith, J.T. Hoff, and A.L. Betz, "Middle cerebral-artery occlusion in rats - A neurological and pathological evaluation of a reproducible model", *Neurosurgery*, vol.31, pp.100-107, 2002.
34. Y.C. Ding, Y.D. Zhou, Q. Lai, J. Li, H. Park, and F.G. Diaz, "Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion", *Behavioural Brain Research*, vol.132, pp.29-36, 2002.
35. Y. Ding, J. Li, Q. Lai, et al., "Motor balance and coordination functional outcome in rat with cerebral artery occlusion training enhances transient middle", *Neurosci.*, vol.123, pp.667-674, 2004.
36. S. H. Lim, J. LEE, S. LEE et al., "The quantitative assessment of functional impairment and its correlation to infarct volume in rats with transient middle cerebral artery occlusion", *Brain Research*, vol.1230, pp.303-309, 2008.
37. Y. Yang, A. Shuaib and Q. LI, "Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method", *J. Neurosci. Methods*, vol.84, pp.9-16, 1998.

38. K. Isayama, L.H. Pitts and M.C. Nishimura, "Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarct", *Stroke*, vol.22, pp.1394-1398, 1991.
39. K. Tureyen, R. Vemuganti, K.A. Sailor and R.J. Dempsey, "Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques", *J. Neurosci. Methods*, vol.139, pp.203-207, 2004.
40. F.P. Altman, "Tetrazolium salts and formazans", *Prog. Histochem. Cytochem.*, vol.9, pp.1-56, 1976.
41. J.B. Bederson, L.H. Pitts, S.M. Germano, M.C. Nishimura, R.L. Davis and H.M. Bartkowski, "Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain form detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats", *Stroke*, vol.17, pp.1304-1308, 1986.
42. R.A. Swanson, M.T. Morton, G. Tsao-wo, R.A. Savalos, C. Davidson and F.R. Sharp, "A semiautomated method for measuring brain infarct volume", *J. Cereb.l Blood Flow Metab.*, vol.10, pp.290-293, 1990.
43. C.N. Joshi, S.K. Jain and P.S.R. Murthy, "An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts", *Brain Research Protocols*, vol.13, pp. 11-17, 2004.
44. R. Marin, A. Williams, S. Hale, B. Burge, M. Mense, R. Bauman and F. Tortella, "The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat", *Physiology & Behavior* , vol. 80, pp. 167-175, 2003.
45. N. Liu, H. Huang, F. Lin, A. Chen, Y. Zhang, R. Chen and H. Du, "Effects of treadmill exercise on the expression of netrin-1 and its receptors in rat brain after cerebral ischemia", *Neuroscience*, vol. 37, pp.45-55, 2011.
46. J.L. Humm *et al.*, "Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period." *Brain Res*, vol.783, pp.286-92, 1998.
47. D. M. CURLIK II, L.Y. MAENG, P.R. AGARWAL and T.J. SHORS, "Physical skill training increases the number of surviving new cells in the adult hippocampus", *Plos One*, vol.8, pp.1-9, 2013.
48. E. Gould, A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves and T.J. Shors, "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation", *Nature Neuroscience*, no. 2, pp. 260-265, 1999.
49. D.M., Curlik and T.J. Shors, "Learning increases the survival of newborn neurons provided that learning is difficult to achieve and successful", *Journal of Cognitive Neuroscience*, no. 23, pp. 2159-2170, 2011.

50. R.J. Nudo, "Mechanisms for recovery of motor function following cortical damage", *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 16, pp. 638-644, 2006.
51. G. Paxinos, "*Cerebral Vascular System. In The Rat Nervous System*", 2 ed. Academic Press. San Diego, 1995.
52. M. Jueptner, K. Stephan, C. Frith, D. Brooks, R. Frackowiak and R. Passingham, "Anatomy of motor learning - Frontal cortex and attention to action", *J. Neurophysiol.*, vol.77, pp.1313-24, 1997.
53. E. Guise, M. Pesce, N. Foschi, A. Quattrini, I. Papo and M. Lassonde, "Colossal and cortical contribution to procedural learning", *Brain.*, vol. 122, pp. 1049-62, 1999.
54. J. Li, Y.H. Ding, J.A. Rafols, Q. Lai, A.P. Mcallister II and Y. DING, "Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise". *Neuroscience Letters*, vol. 386, pp. 160-164, 2005.
55. R. P. Stroemer, T.A. Kent and C.E. Hulsebosch, "Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats", *Stroke*, vol.29, pp. 2381-93, 1998.

## 4. EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO OU APÓS A ISQUEMIA CEREBRAL INDUZ ALTERAÇÕES NA DENSIDADE DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS NO CÉREBRO DE RATOS

Laila Cristina Moreira Damázio<sup>1</sup>, Raphael Teixeira Rocha Melo<sup>1</sup>, Maira de Castro Lima<sup>2</sup>, Betânia Souza Monteiro<sup>4</sup>, Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro<sup>2</sup>, Hélio Batista dos Santos<sup>2</sup>, Natália Ribeiro Alves<sup>2</sup>, Antônio José Natali<sup>3</sup>, Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>4</sup>, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>2</sup> Grupo de Atuação Docente de Morfologia, Universidade Federal de São João Del Rei –CCO, 35501-296, Divinópolis, MG, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Educação Física, UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Veterinária, UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi analisar a densidade de astrócitos e de neurônios nas áreas do córtex motor, *striatum* e hipocampo de ratos que praticaram exercício físico, antes ou após a isquemia cerebral. Foram avaliados trinta e seis ratos Wistar, separados em dois grupos, um submetido à oclusão da artéria cerebral média (OACM) e outro ao acesso cirúrgico com ausência da isquemia. Ambos os grupos foram subdivididos em: animais que realizaram exercício físico prévio à OACM e à cirurgia (AI e AC, n=12); animais que realizaram exercício físico após a OACM e a cirurgia (DI e DC, n=12) e animais que não realizaram exercício (SI e SC, n=12). Os cérebros dos ratos foram seccionados e corados pelo método de Nissl para coloração dos neurônios, e os astrócitos foram marcados por imunohistoquímica com a proteína ácida fibrilar glial (GFAP). O treinamento físico na esteira foi realizado por seis semanas (30 min./dia), cinco dias na semana. Os animais que exercitaram antes da isquemia cerebral apresentaram maior densidade de neurônios no *striatum*, no ápice do giro denteado do hipocampo e no córtex motor contralateral à lesão, além de mais astrócitos no córtex motor dos hemisférios cerebrais, em comparação com o grupo sedentário (p<0.05). A densidade de neurônios das regiões do cérebro analisadas se manteve inalterada nos animais exercitados a partir do quarto dia após a isquemia cerebral quando comparado ao grupo sedentário.

**Palavras-Chave:** isquemia cerebral, imunohistoquímica por GFAP, astrócitos, neurônios.

### 4.1. Introdução

Os astrócitos estão envolvidos com a neuroplasticidade por meio da absorção e liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), pela

síntese da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), e pelo transporte do glutamato e da sintetase glutamina [1,2]. Um mecanismo de regulação da excitotoxicidade na isquemia cerebral é a conversão do glutamato em glutamina pela enzima sintetase glutamina, presente nos astrócitos [3,4].

As células da glia mais abundantes no sistema nervoso central (SNC) [5,6] são os astrócitos, que cobrem 90% da superfície cerebrovascular [7], e que participam da regulação de neurotransmissores livres, resposta imune, reparação da matriz extracelular, controle da barreira cerebrovascular e suporte trófico [3]. A GFAP é uma proteína que compõe os filamentos intermediários do citoesqueleto dos astrócitos [2] e sua imunomarcagem permite evidenciar os astrócitos reativos em lesões do SNC [8].

A maior densidade de astrócitos constitui um mecanismo relacionado com a recuperação da área ao redor da isquemia cerebral em ratos treinados após a lesão [9], já que essas células também participam da regulação da barreira hematoencefálica, sendo importantes na manutenção da permeabilidade cerebral [10,11,12].

O exercício físico reduz a injúria cerebral pela diminuição do edema local e pela manutenção da integridade microvascular [9,13]. Também promove remodelação das sinapses no hipocampo [14] e os astrócitos desempenham papel importante nesse processo [15,16] por meio da síntese do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), que é responsável pelo aumento da sobrevivência dos neurônios motores dopaminérgicos, além de favorecer a neuroplasticidade [17,18,19].

Como são escassos os estudos que descrevem a densidade de astrócitos e de neurônios em ratos com isquemia cerebral submetidos ao exercício físico, este estudo teve por objetivo analisar a densidade de astrócitos e de neurônios no cérebro de ratos que praticaram exercício físico antes ou após isquemia cerebral.

## **4.2. Material e Métodos**

*4.2.1. Animais.* Trinta e seis ratos Wistar, machos, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Viçosa, com peso médio de

(138.7±2.18) g, 30 dias, que foram mantidos em gaiolas, com acesso livre a água e ração, fotoperíodo de 12 horas, temperatura ambiente entre 21 e 22°C e umidade relativa do ar de 60-70 %. Os animais foram pesados no início do experimento (30 dias), imediatamente antes (76 dias) e após (81 dias) o procedimento cirúrgico e ao final do experimento (126 dias). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 32/2011).

Dezoito animais foram submetidos à isquemia por oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM) e distribuídos (tabela 1) nos seguintes subgrupos: AI (n=6): realizaram exercício na esteira (Insight Instrumentos® – Ribeirão Preto, SP) previamente à realização da isquemia; DI (n=6): realizaram exercício na esteira após a isquemia e SI (n=6): não realizaram exercício.

Outros dezoito animais (controle) foram submetidos ao acesso cirúrgico, mas não à OACM, e foram distribuídos (tabela 1) nos seguintes subgrupos: AC (n=6): treinados antes da cirurgia; DC (n=6): treinados após a cirurgia e SC (n=6): não treinados na esteira.

**Tabela 1.** Distribuição dos 36 ratos segundo os grupos experimentais.

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Exercício Prévio</b>	<b>Exercício Posterior</b>	<b>Sedentário</b>
<b>Animais submetidos á isquemia cerebral</b>	AI (n=6)	DI (n=6)	SI (n=6)
<b>Animais operados, mas sem isquemia cerebral</b>	AC (n=6)	DC (n=6)	SC (n=6)

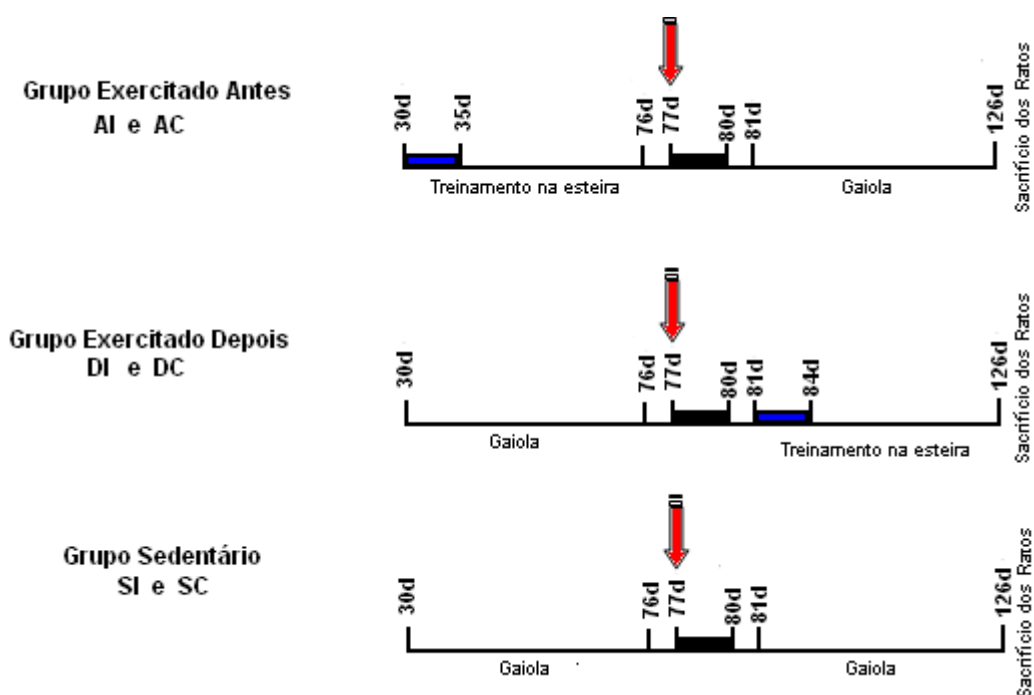
*4.2.2. Treinamento Físico.* Os animais exercitados antes do procedimento cirúrgico foram adaptados à esteira por cinco dias, na velocidade de 10-12 m/min., durante 12 min./dia.

Após o período de adaptação, os ratos pertencentes aos grupos treinados previamente à cirurgia (AI e AC) foram submetidos ao exercício, na esteira sem inclinação, por seis semanas, cinco dias por semana, durante 30

min./dia, na velocidade de 15 m/min.. A velocidade do exercício foi gradualmente aumentada, sendo que no primeiro dia eles correram 10 m/min., no segundo 12m/min. e do terceiro dia em diante correram com velocidade de 15m/min. [13,20].

Os ratos alocados nos grupos exercitados após a cirurgia (DI e DC) iniciaram os exercícios sete dias após o procedimento cirúrgico e do período de adaptação na esteira. Os exercícios após a OACM (DI), e dos animais do grupo controle (DC), duraram seis semanas e os ratos correram por 30 min./dia, na esteira sem inclinação, durante cinco dias por semana, com velocidade de 12 m/min. [14,21,22]. A velocidade do exercício foi gradualmente aumentada, sendo que no primeiro dia os ratos correram 8 m/min., no segundo 10 m/min. e do terceiro dia em diante 12 m/min. [14,21,22]. Os ratos que conseguiram se exercitar por 2 minutos nas velocidades de 8, 11 e 12 m/min., nos três primeiros dias de treinamento, prosseguiram na pesquisa.

A metodologia de exercícios e a cronologia dos exames realizados no experimento estão apresentadas na figura 1.



**Figura 1.** Representação dos procedimentos realizados nos grupos: exercitado antes (AI e AC), exercitado depois (DI e DC) e grupo sedentário (SI e SC). Dia da OACM (AI, DI e SI) ou do procedimento cirúrgico no grupo controle (AC, DC e SC): ( ). Período de avaliação neurológica e observação dos animais para confirmação da isquemia cerebral no grupo OACM e acompanhamento do grupo controle: ( ). Os grupos (AI, AC, DI e DC)

submetidos ao treinamento físico na esteira passaram por um período de adaptação: (■).

**4.2.3. Oclusão da artéria cerebral média.** Os animais receberam analgesia pré-empitiva com fentanil (0,3 mg/Kg/IM), foram sedados com Diazepan (2,5 mg/Kg/IP) e anestesiados com Isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100%. Foi realizada antimicrobianoprofilaxia com enrofloxacina (10 mg/Kg) por via intramuscular.

Após a anestesia, foi administrada por via intraperitoneal atropina diluída em salina a 2% (0,1mL por animal) para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à estimulação mecânica do nervo vago durante a operação.

O procedimento cirúrgico utilizado para a realização da oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM) foi o descrito por Longa *et al.* [23]. Após tricotomia e anti-sepsia da região cervical ventral, foi realizada incisão sagital mediana de aproximadamente 3 cm de comprimento. Os tecidos foram divulsionados até a exposição da bifurcação da artéria carótida comum (ACC) esquerda. O ramo pterigopalatino da artéria carótida interna (ACI) foi clampeado em sua origem. A artéria carótida externa (ACE) foi ligada com fio vicryl 0, na porção distal da bifurcação da ACC. Após a ACC e a ACI terem sido clampeadas, a ACE foi seccionada para passagem do fio de oclusão (monofilamento para oclusão de silicone, 5-0 de diâmetro e 0,12 mm comprimento, Docol®). O fio foi introduzido através da ACE esquerda no interior da ACI até a origem da ACM, aproximadamente 20-21 mm de distância em relação à bifurcação da ACC. Para permitir a passagem do fio de oclusão, o clipe da ACI foi removido. Para determinar o comprimento, os fios foram previamente marcados em 18, 20 e 22 mm no seu comprimento. A introdução de 20 mm do fio de oclusão associado à discreta resistência à passagem do fio indicou o local da origem da ACM. A incisão cirúrgica foi fechada, mantendo o fio de oclusão e o clipe na ACC.

O fio e o clipe permaneceram por 60 minutos [24,25], quando o animal foi novamente anestesiado, o fio foi retirado e a porção da ACE proximal à bifurcação da ACC (por onde foi introduzido o fio de oclusão) foi ligada. Foi realizada aproximação dos tecidos e dermorrafia com náilon 3-0.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em recuperação, por duas horas, com a temperatura corporal entre 36-38°C, com água e ração à vontade. Para reposição volêmica foi injetado, diariamente, 10 mL de solução salina intraperitoneal, durante as primeiras 72 horas [26].

*4.2.4. Escala de avaliação neurológica.* Foi utilizada a escala para o modelo de OACM em ratos proposta por Menzies [27], que possui escores de 0 a 4, sendo que quanto maior o escore pior é o déficit neurológico. No primeiro dia após a cirurgia, os animais que apresentaram escore quatro foram incluídos no experimento e utilizados nos subgrupos DI (exercício após OACM); SI (sedentário e OACM) e AI (exercício antes da OACM).

*4.2.5. Histoquímica pelo método de Nissl.* Depois de 126 dias, todos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina 1 % (30mg/Kg) e xilazina (4mg/Kg) [28]. Na seqüência, foram perfundidos transcardiacamente com solução salina heparinizada (0,9 % de NaCl contendo 5000UI de heparina/L) por 5 minutos, seguidos da perfusão com solução de 4 % de paraformaldeído, por mais 5 minutos. Em seguida, os cérebros foram removidos e fatiados em secções de 1 mm no plano coronal. As fatias foram parafinizadas e as secções, 3,20 mm, 0,20 mm e -2,80 mm [29], em relação ao bregma, foram selecionadas para coloração pelo método de Nissl. Essas secções foram novamente seccionadas (micrótomo rotativo Leica®, modelo RM2255), obtendo-se secções transversais de 10 µm de espessura. Após a desparafinização e hidratação numa série alcoólica decrescente, as secções foram coradas com uma solução de cresil violeta (Sigma-Aldrich) a 0,5 %, por 30 minutos, para marcação dos corpúsculos de Nissl presentes no citoplasma dos neurônios. Em seguida procedeu-se a montagem e análise das lâminas [29,30].

*4.2.6. Imunohistoquímica.* Secções de 3 µm, dos intervalos de 3,20 mm, 0,20 mm e -2,80 mm, em relação ao bregma, foram desparafinizadas em xilol, sob aquecimento na estufa, à 60°C, durante 30 minutos. O anticorpo primário utilizado foi para a proteína ácida fibrilar glial (1:200; anti-GFAP, Sigma-Aldrich). Para recuperação antigênica, foi utilizado um pré-

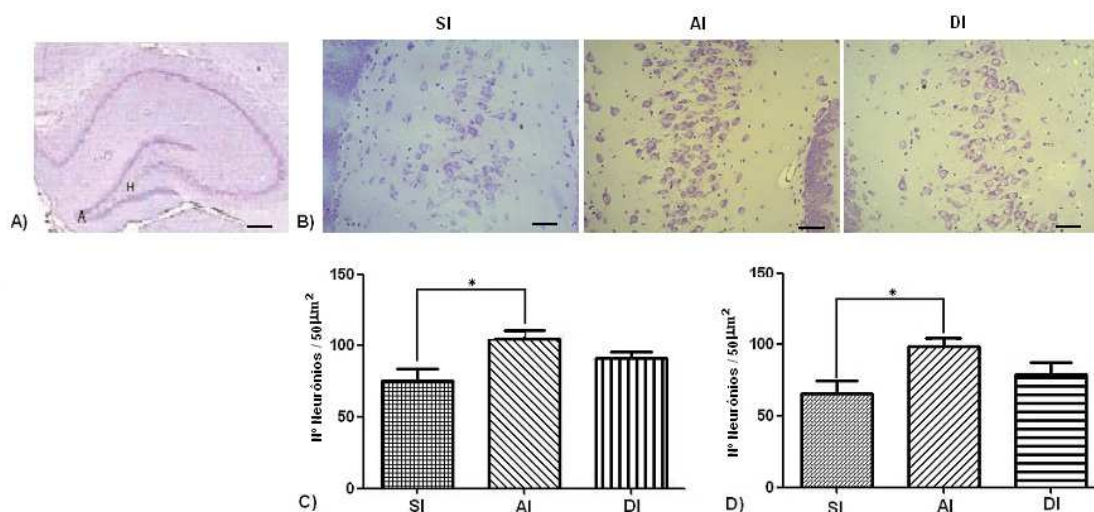
tratamento com tampão de citrato (pH 6,0) a 95°C, durante 30 minutos no microondas. Após lavagem com PBS, um tampão com 2% BSA + TritonX-100 + Tween 20 foi utilizado para bloquear as reações não específicas e deixar o tecido mais permeável. Logo, foram imersas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3 %, para o bloqueio da peroxidase endógena. As secções foram incubadas com o anticorpo primário durante a noite numa câmara umidificada a 4°C. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado (LSAB 2 Sistema de HRP, DakoCytomation) durante 2 horas e depois com estreptavidina conjugada com peroxidase, durante 45 minutos. Para a imunocoloração os cortes foram revelados com solução de cromógeno de tetracloreto de 3-3'diaminobenzidina (1:2; DAB, Sigma-Aldrich) e contrastadas com hematoxilina. Para o controle negativo, um dos cortes histológicos não recebeu o anticorpo primário.

*4.2.7. Morfometria.* Para análise quantitativa das células, foram capturadas três imagens de cada corte histológico, totalizando 9 imagens de cada animal e 54 imagens de cada grupo. Utilizando-se na captura das imagens o programa Axio Vision (versão 4.8) e câmera digital (AxionCam ERC5S) acoplada no microscópio (Zeiss Axio Lab A1), com aumento de 200 X, com área de análise das imagens de 50x10<sup>6</sup> µm<sup>2</sup>. Em seguida, as células das imagens selecionadas foram quantificadas com auxílio do programa *Image J* software (Image-Pro Plus, versão 4.5, Windows 98), obtendo-se a média de células de cada corte histológico. A quantificação foi realizada nos dois hemisférios cerebrais, em regiões específicas de cada secção, em relação ao bregma: na secção 3,20 mm, foram consideradas duas regiões: a borda da região do córtex motor com isquemia e a área de penumbra; na secção 0,20 mm foi considerada a transição entre o *striatum* e o córtex motor e, na secção -2,80 mm foi quantificada a região do ápice do giro denteado (hipocampo). Na quantificação dos neurônios, foram consideradas as maiores células com os limites do núcleo e nucléolo bem definidos, além da marcação dos corpúsculos de Nissl no citoplasma dos neurônios [29]. Para quantificação dos astrócitos imunoreativos ao GFAP, foram consideradas as células cujo citoplasma apresentou coloração marrom.

4.2.8. *Estatística.* As análises das médias referentes à densidade de neurônios e astrócitos, entre os grupos, foram realizadas pelo teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc de Tukey*, considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

### 4.3. Resultados

Na análise da densidade de neurônios no ápice do giro denteado do hipocampo, dos animais com isquemia cerebral, foi evidenciada diferença entre os hemisférios cerebrais direito ( $p < 0,05$ ; Figura 2B e 2C) e esquerdo ( $p < 0,05$ ; Figura 2D) dos animais que exercitaram antes da OACM e do grupo sedentário (Figura 2B). No grupo controle não foi observada diferença entre os hemisférios cerebrais ( $p < 0,05$ ).

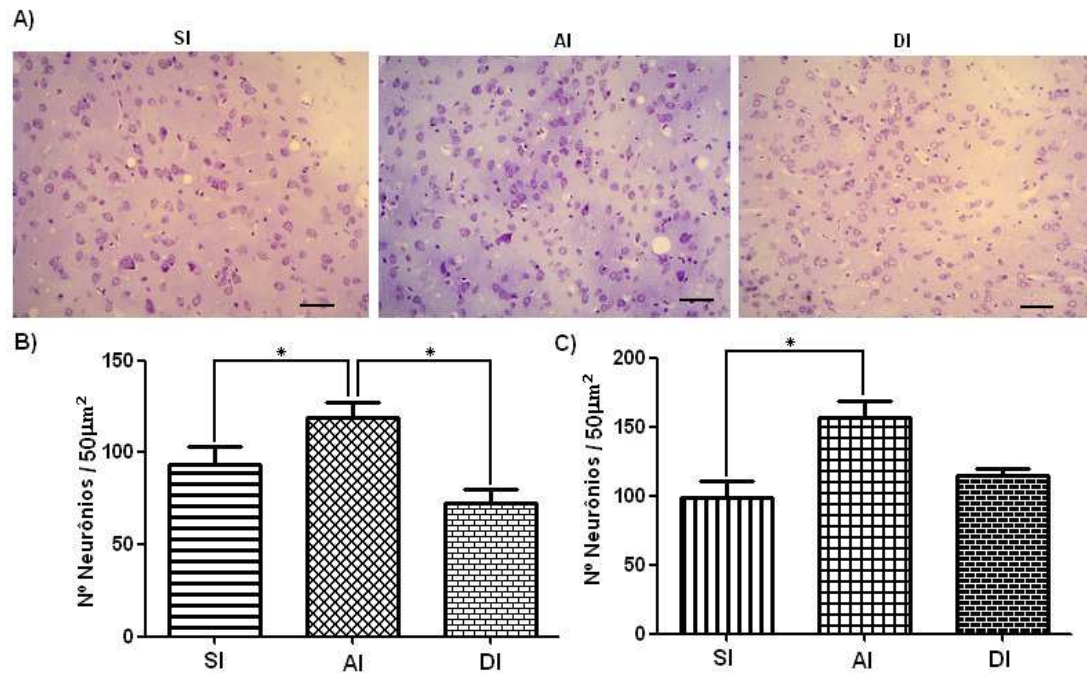


**Figura 2.** Quantificação de neurônios do ápice do giro denteado pela marcação do método de Nissl. Grupo sedentário (SI), animais que exercitaram antes da OACM (AI) e que exercitaram após a OACM (DI). Em (A): hipocampo, onde H representa o hilus e A o ápice do giro denteado. Barra = 40  $\mu$ m. Em (B): células do ápice do giro denteado. Barra = 50  $\mu$ m. Em (C): representação dos dados no hemisfério cerebral direito. (D): representação dos dados no hemisfério cerebral esquerdo. Média  $\pm$  SEM (n= 6/grupo), \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo sedentário, pelo teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc de Tukey*.

O estudo identificou maior densidade de neurônios no *striatum* do hemisfério cerebral direito ( $p < 0,05$ ) entre o grupo que exercitou antes e o grupo sedentário e o que exercitou após a OACM (Figura 3B). No hemisfério cerebral esquerdo também foi identificada maior densidade de neurônios no

grupo que exercitou antes da OACM em comparação com o grupo sedentário ( $p < 0.05$ ; Figura 3A e 3C).

No grupo controle, foi observada maior densidade de neurônios no *striatum* do hemisfério cerebral esquerdo dos animais que exercitaram antes da cirurgia em comparação com os animais sedentários e que exercitaram após a cirurgia ( $p < 0.05$ ). No hemisfério cerebral direito não foi observada diferença entre os grupos ( $p < 0.05$ ).

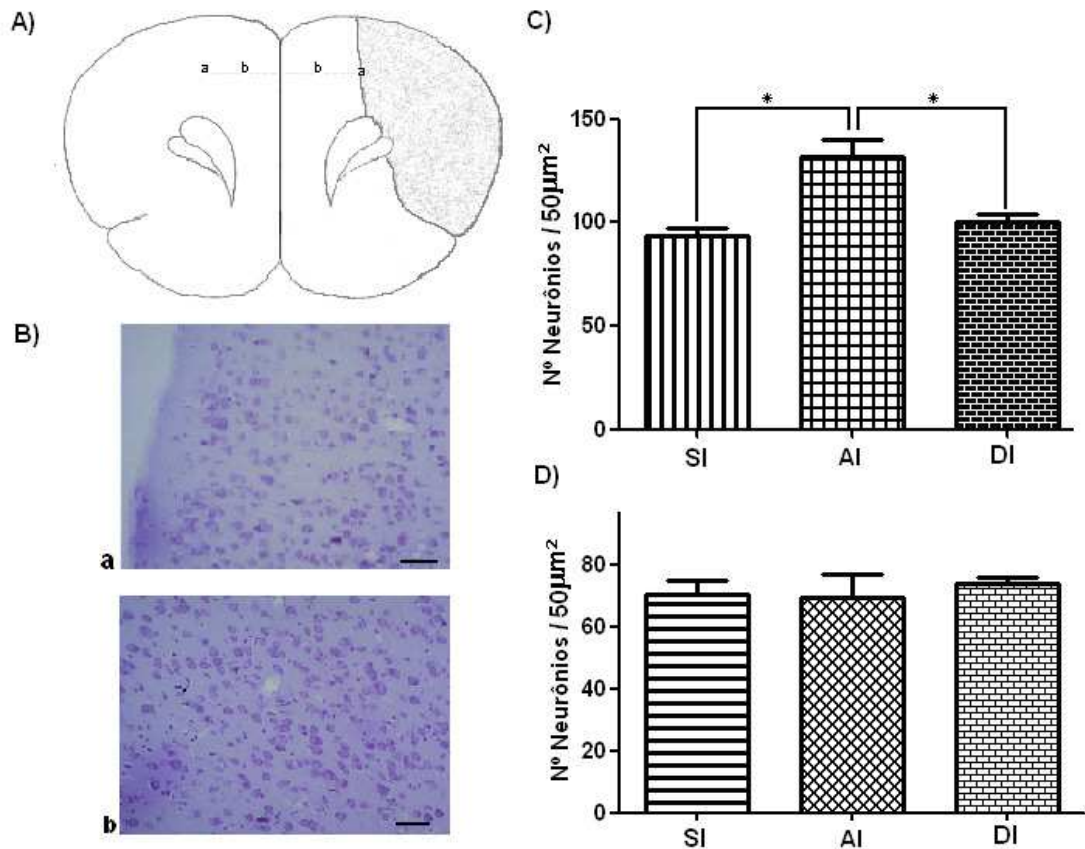


**Figura 3.** Quantificação de neurônios no *striatum* do hemisfério cerebral esquerdo e direito pelo método de Nissl. (A): células do *striatum* do hemisfério cerebral esquerdo dos animais do grupo sedentário (SI), dos animais que exercitaram antes da OACM (AI) e que exercitaram após a OACM (DI). Barra: 50 µm. (B): dados da quantificação de neurônios do *striatum* do hemisfério cerebral direito. (C): dados da quantificação de neurônios do *striatum* do hemisfério cerebral esquerdo. Média ± SEM (n= 6/grupo), \*  $p < 0.05$ , pelo teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc de Tukey*.

A análise da densidade de neurônios da área de penumbra do hemisfério cerebral direito foi identificada diferença ( $p < 0.05$ ) na densidade de neurônios do grupo cujos animais foram exercitados antes da OACM em comparação com o grupo sedentário e o que foi exercitado depois da isquemia cerebral (Figura 4C). No hemisfério cerebral esquerdo não foi observada diferença entre os grupos (Figura 4D).

Após análise da densidade de neurônios na borda do infarto cerebral em ambos os hemisférios cerebrais, não foi observado diferença entre os grupos. Já os resultados das áreas correspondentes no córtex motor dos

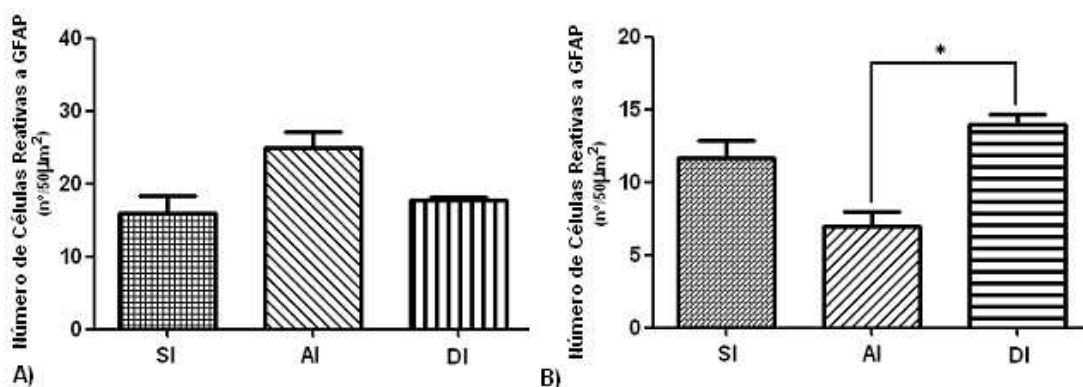
hemisférios cerebrais do grupo controle, houve menor densidade celular no grupo de animais que foi exercitado após a cirurgia em comparação com o grupo sedentário ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.** Quantificação de neurônios do córtex motor dos hemisférios cerebrais direito e esquerdo pelo método de Nissl. (A): esquema da fatia do córtex motor, sendo **a** representação da borda da área de infarto e **b** a área de penumbra do córtex motor. (B): Neurônios da borda (**a**) e da área de penumbra do hemisfério cerebral esquerdo (**b**) de um animal do grupo AI. Barra: 50μm. (C): dados da quantificação de neurônios na região de penumbra dos hemisférios cerebrais direito. (D) dados da quantificação de neurônios na região de penumbra do hemisfério cerebral esquerdo. Média ± SEM (n= 6/grupo), \*  $p < 0.05$ , pelo teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc de Tukey*.

Os dados da quantificação de astrócitos no ápice do giro denteado do hipocampo de ambos os hemisférios cerebrais, não demonstraram diferença significativa na imunoreatividade do GFAP nos astrócitos entre os grupos com isquemia cerebral. A quantificação dos astrócitos no *striatum* do hemisfério cerebral direito não demonstrou diferença significativa (Figura 5A). No hemisfério cerebral esquerdo, foi evidenciada diferença no número de células reativas ao GFAP nos animais treinados após a isquemia cerebral

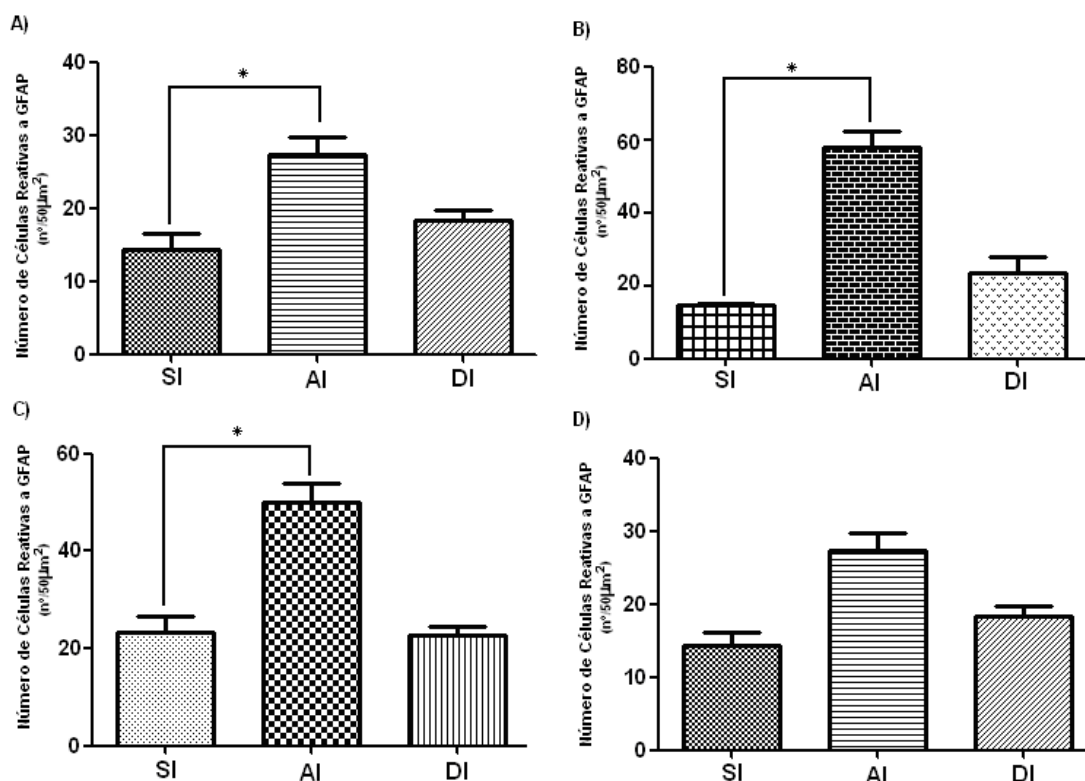
em comparação com a quantificação de astrócitos nos animais treinados antes da isquemia (Figura 5B).



**Figura 5.** Quantificação de astrócitos no *striatum* dos ratos com isquemia cerebral. Em (A): dados da quantificação de células reativas ao GFAP de uma área de  $50 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  do hemisfério cerebral direito. (B): dados de quantificação de células reativas ao GFAP de uma área de  $50 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  do *striatum* do hemisfério cerebral esquerdo. Média  $\pm$  SEM ( $n=6/\text{grupo}$ ), \*  $p < 0.05$ , pelo teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc de Tukey*.

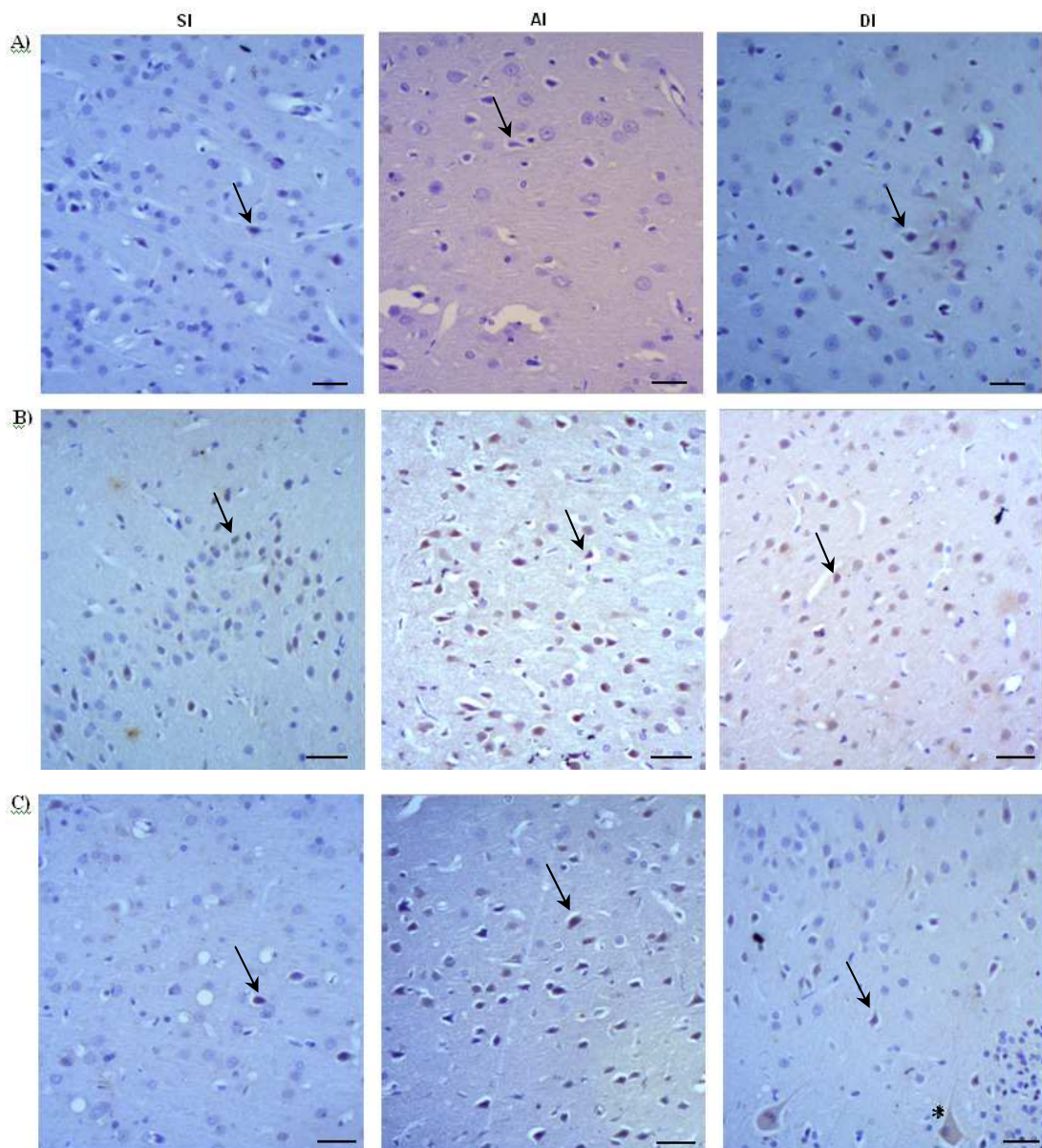
Foi observado maior número de astrócitos na borda do córtex motor, do hemisfério cerebral direito e esquerdo, dos animais que exercitaram antes da isquemia em comparação com o grupo sedentário (Figura 6A e 6B). Na área de penumbra do córtex motor do hemisfério cerebral direito foi evidenciado maior quantidade de astrócitos nos animais exercitados antes da isquemia cerebral em comparação com o grupo sedentário (Figura 6C). Na área de penumbra do hemisfério cerebral esquerdo não foi observada diferença no número de astrócitos na área de penumbra entre os grupos com isquemia (Figura 6D).

No grupo controle foi observado aumento significativo no número de astrócitos no *striatum* e no córtex motor do hemisfério cerebral esquerdo e direito dos animais que exercitaram antes da cirurgia em comparação com os sedentários e que exercitaram após a cirurgia.



**Figura 6.** Quantificação de astrócitos na borda e área de penumbra do córtex motor dos ratos com isquemia cerebral. Em (A): quantificação de astrócitos da borda do córtex motor do hemisfério cerebral direito. (B): quantificação de astrócitos da borda do córtex motor do hemisfério cerebral esquerdo. (C): quantificação de astrócitos da área de penumbra do córtex motor do hemisfério cerebral direito. (D): quantificação da área de penumbra do córtex motor do hemisfério cerebral esquerdo. Média  $\pm$  SEM (n=6/grupo), \*  $p < 0,05$ , pelo teste one-way ANOVA, seguido do *post-hoc de Tukey*.

Nas fotomicrografias da imunohistoquímica para GFAP é possível observar o maior número de astrócitos marcados no *striatum* e no córtex motor dos ratos com isquemia cerebral do grupo AI em comparação com o grupo SI, do hemisfério cerebral esquerdo (Figura 7A e 7B). Na figura 7C, observa-se maior número de astrócitos reativos à GFAP na área de penumbra do hemisfério cerebral direito dos animais do grupo AI em comparação com o grupo SI. Também é possível observar nessas fotomicrografias a presença de astrócitos gemistocíticos (astrócitos com citoplasmas grandes) na área de penumbra do grupo DI, no hemisfério cerebral direito.



**Figura 7.** Imunohistoquímica para GFAP dos astrócitos do *striatum* e do córtex motor de ratos com isquemia cerebral. Em (A) imagens do *striatum* do hemisfério cerebral esquerdo. (B): imagens da borda do córtex motor do hemisfério cerebral esquerdo. (C): imagens da área de penumbra do córtex motor do hemisfério cerebral direito. Barra: 20  $\mu$ m; astrócitos reativos ao GFAP (seta); astrócito gemistocítico (asterisco).

#### 4.4. Discussão

Este estudo teve como objetivo analisar a densidade de astrócitos e de neurônios no cérebro de ratos que praticaram exercício físico antes ou após a isquemia e os resultados indicaram que a prática de exercício físico, antes da isquemia cerebral, beneficiou a morfologia do tecido cerebral, pois

ocorreu aumento da densidade de neurônios em regiões importantes do planejamento motor, como o hipocampo, *striatum* e córtex motor.

O presente estudo demonstrou que a prática de exercício físico previamente à lesão promove diminuição da morte neuronal e conseqüente recuperação da área de lesão. No estudo de Wang *et al* [31] o pré-condicionamento físico, ocasionou aumento da angiogênese pelo aumento na demanda metabólica em regiões corticais e subcorticais do cérebro do rato. Endres *et al.* [32] identificou o aumento da expressão de óxido nítrico endotelial como fator neuroprotetor da atividade física no cérebro de ratos com isquemia cerebral.

No grupo controle, que exercitou antes da cirurgia, também foi evidenciado aumento de neurônios e de astrócitos no *striatum* e córtex motor dos hemisférios cerebrais, o que confirma os benefícios de um programa de exercícios físicos como forma de prevenção de patologias cerebrais e neuroplasticidade. Existem vários fatores neurotróficos que são liberados em conseqüência do treinamento físico, permitindo o aumento da neuroplasticidade cerebral [33].

O presente estudo identificou uma maior densidade de neurônios no hemisfério cerebral contralateral à lesão nos animais exercitados antes da isquemia cerebral em comparação com os animais sedentários. Isso pode ser justificado pelas mudanças neuroplásticas que ocorrem na região de lesão [33,34], pois, após a injúria cerebral ocorre crescimento de axônios no córtex contralateral que se projetam para o córtex motor e corpo estriado da região lesionada, como forma de recuperação da parte prejudicada [35,36]. Esse processo acontece através da emissão de estímulos neuronais da região da lesão para os neurônios do córtex motor contralateral permitindo a reorganização cortical [36,37]. Também estão envolvidos neste processo, o aumento da síntese de fatores neurotróficos como, BDNF e fator de crescimento neuronal (NGF) no córtex motor contralateral à lesão [33,34, 38,39].

Os dados do programa de exercício físico empregado após a isquemia cerebral, não demonstrou aumento no número de neurônios nas áreas cerebrais analisadas, mas permitiu o aumento de astrócitos no *striatum* do hemisfério com lesão. Estes resultados são importantes, pois os

astrócitos desempenham diversas funções no cérebro, sendo que a reparação da área lesionada é realizada pela liberação de fatores de crescimento que estimulam os fibroblastos a depositarem proteínas na matriz extracelular para remodelação do tecido da região da lesão [3]. Mesmo assim, a prática de exercícios físicos deve ser considerada benéfica, uma vez que favorece o fortalecimento muscular, o desempenho motor, a coordenação e o equilíbrio dos animais [22,40].

A velocidade máxima empregada nesse estudo foi obtida de forma progressiva para minimizar o impacto sobre a região da lesão cerebral. No entanto, admite-se que o início do programa de exercício pode ter sido tardio (quarto dia pós-operatório). Alguns estudos que iniciaram o programa de exercícios um dia após a isquemia cerebral demonstraram recuperação da região de isquemia cerebral [14,21,22].

A análise dos astrócitos reativos ao GFAP no hipocampo dos ratos do presente estudo demonstrou que existe menor densidade dessas células no ápice do giro denteado em comparação com o *striatum* e o córtex motor, confirmada em outros trabalhos onde foram apresentadas algumas particularidades da morfologia hipocampal [3,8]. Apesar dos dados do presente estudo demonstrarem uma menor densidade de astrócitos no hipocampo, a quantificação dos neurônios demonstrou que os ratos treinados antes da isquemia cerebral apresentaram maior densidade de neurônios em comparação com o grupo sedentário. Estes resultados podem ser sustentados por alguns trabalhos que demonstram os benefícios do exercício físico no resgate da morte neuronal e recuperação da área de lesão [41,42,43,44]

A maior densidade de astrócitos evidenciada no córtex motor dos ratos treinados antes da isquemia, e no *striatum* dos ratos treinados após a isquemia cerebral demonstra a interferência do exercício físico no número dessas células, e conseqüentemente a sua participação na reparação da região de lesão cerebral do presente estudo. Os astrócitos são importantes na modulação da neuroplasticidade, sendo que a complexidade e versatilidade dessas células na reparação do tecido nervoso dependem da diversidade do repertório de marcadores, receptores, fatores de expressão, bem como da localização e da extensão da lesão [8].

Os resultados demonstraram que os animais treinados antes da isquemia cerebral também foram beneficiados com maior número de astrócitos no córtex motor dos hemisférios cerebrais, o que pode ter contribuído para a sobrevivência neuronal. Os astrócitos atuam na regeneração do tecido cerebral e na integridade microvascular, interferindo na lâmina basal e diminuindo o edema cerebral na isquemia [13,20]. Os fatores neurotróficos sintetizados pelos astrócitos também protegem o SNC, pois participam da homeostasia do cálcio neuronal e da diminuição da toxicidade no local da lesão [3].

Os resultados do presente estudo mostram que existem mecanismos neuroprotetores importantes na regeneração de áreas de lesão isquêmica dos ratos previamente treinados, mas os mecanismos exatos envolvidos nesse processo precisam ser mais estudados. Além disso, protocolos diferentes de treinamento físico podem interferir de forma adversa na morfologia cerebral dos ratos.

#### **4.5. Conclusão**

Os animais que exercitaram antes da isquemia cerebral apresentam maior densidade de neurônios no *striatum*, no ápice do giro denteado do hipocampo e no córtex motor contralateral à lesão, além de mais astrócitos reativos no córtex motor dos hemisférios cerebrais.

Os animais exercitados a partir do quarto dia após a isquemia cerebral não demonstram maior densidade de neurônios no ápice do giro denteado, *striatum* e córtex motor dos cérebros analisados.

#### **4.6. Referências**

[1] Bergami M, Santi S, Formaggio E, Cagnoli C, Verderio C, Blum R, Berninger B, Matteoli M, Canossa M. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *Journal of Cell Biology*. 2008; 2(183):213-221.

- [2] Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years. *Neurochemical Research*. 2000; 25(9):1439-1451.
- [3] Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes; implications for their role in neurologic diseases. *Neuroscience*. 1993; 54:15-36.
- [4] Cammer W, Tansey FA, Brosnan CF. Reactive gliosis in the brains of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis. *Journal Neuroimmunological*. 1990;27:111-120.
- [5] Abbott N.J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal Anatomical*. 2002;200:629-638.
- [6] Goudstein GW, Betz AL. The blood brain barrier. *Science*.1986;255:70-79.
- [7] Willis CL, Nolan CC, Reith SN, Lister T, Prior MJW, Guerin J, Mavroudis G, Ray DE. Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia*. 2004; 45:325-337.
- [8] Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Tins*. 1997; 20:570-577.
- [9] Li J, Ding YH, Rafols JA, Lai Q, Mcallister II AP, Ding Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience Letters*. 2005;386:160-164.
- [10] Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Research*.1987; 433:155-159.
- [11] Tao, C.J. Nagy, Z. and Brightman, M.W. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *Journal Neuroscience*.1987; 7:3293-3299.
- [12] Kondo T, Kinouchi H, Kawase M, Yoshimoto T. Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia/reoxygenation. *Neuroscience Letters*. 1996; 208:101-104.
- [13] Ding YH, Ding YC, Li J, Bessert DA, Rafols JA. Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. *Neurological Research*.2006;28: 184-189.
- [14] Liu N, Huang H, Lin F, Chen A, Zhang Y, Chen R, Du H. Effects of treadmill exercise on the expression of netrin-1 and its receptors in rat brain after cerebral ischemia. *Neuroscience*.2011;37:45-55.

- [15] Humm JL, Kozlowski Da, James DC, Gotts JE, Schallert T. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Research*.1998;783:286– 92.
- [16] Taskapiliogly MO, Alkan T, Goren B, Tureyen K, Sahin S, Taskapilioglu O, Korfali E. Neuronal protective effects of focal ischemic pre-and/or postconditioning on the model of transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Clinical Neuroscience*.2009;16:693-697.
- [17] Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simpson LC, Moffet B, Vandlen RA, Koliatsos VE, Rosenthal A. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*.1994; 266:1062-1064.
- [18] Lin FH, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.*Science*.1993;260:1130-1132.
- [19] Senna PN, Ilha J, Baptista PPA, Nascimento OS, Leite MC, Paim MF, Gonçalves CA, Achaval M, Xavier LL. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metabolic Brain Disease*. 2011;4:269-279.
- [20] Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, Phillis JW, Clark JC, Diaz FG. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience*.2004;124:583-591.
- [21] Zhang Q, Wu Y, Zhang P, Sha H, Jia J, Hu Y, Zhu J. Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats. *Neuroscience*. 2012: 205,10-17.
- [22] Zhang P, Zhang Q, Pu H, Wu Y, Bai Y, Vosler PS, Chen J, Shi H, Gao Y, Hu Y. Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury. *Front Bioscience*.2012;4:2476-89.
- [23] Longa EZ, Weinstein, PR, Carlson S, Cummins R. Reversible Middle Cerebral-Artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*.1989;20(1)84-91.
- [24] Ma J, Zhao L, Nowak JR. Selective, reversible occlusion of the middle cerebral artery in rats by an intraluminal approach optimized filament design and methodology. *Journal Neuroscience Methods*.2006;156:76-83.
- [25] Duarte SG, Campos AD, Colli BO. Functional evaluation of temporary focal cerebral ischemia. *Arquivo de Neuropsiquiatria*.2003; 61:751-756.
- [26] Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with

transient middle cerebral artery occlusion. *Journal Neuroscience Methods*.2000;194:99-109.

[27] Menzies SA, Smith RR, Hoff JT, Betz AL. Middle Cerebral-Artery Occlusion in Rats - A Neurological and Pathological Evaluation of Reproducible Model. *Neurosurgery*.1992; 31:100-107.

[28] Lim SH, Lee J, Lee JI, Lee JI, Im S, Ko YJ, Kim HW. The quantitative assessment of functional impairment and its correlation to infarct volume in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*. 2008;1230:303-309.

[29] Scorza FA, Arida RM, Cysneiros RM, Scorza CA, Albuquerque M, Cavalheiro EA. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 2005; 63:283-288.

[30] Alvarez-Buylla A, Ling C, Kirn JR. Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *Journal Neuroscience Methods*.1990;33:129-33.

[31] Wang RY, Yang YR, Yu SM. Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *Brain Research*. 2001; 922:140-143

[32] Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schrock H, Nickening G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U. Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Annals of Neurology*. 2003; 54:582-590.

[33] Kim MW, Bang MS, Han TR, Ko YJ, Yoon BW, Kim JH, Kang LM, Lee KM, Kim MH. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Research*.2005;1052:16-21.

[34] Chung JY, Kim MW, Bang MS, Kim M. The effect of exercise on trkA in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Research*.2010;1353:187-193.

[35] Jones TA, Allred RP, Adkins DL, Hsu JE, O'Bryant A, Maldonado MA. Remodeling the brain with behavioral experience after stroke. *Stroke*. 2009;40:135-138

[36] Carmichael ST, Chesselet MF. Synchronous Neuronal Activity Is a Signal for Axonal Sprouting after Cortical Lesions in the Adult. *The Journal of Neuroscience*. 2002; 22: 6062-6070.

[37] Carmichael ST. Plasticity of cortical projections after stroke. *The neuroscientist*. 2003;9:64-75.

[38] Chung JY, Kim MW, Bang MS, Kim M. Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise. *Plos One*. 2013;8(3):524-61.

- [39] Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*. 2004;20:2580-2590.
- [40] Ding Y, Li J, Lai Q, Rafols JA, Luan X, Clark J, Diaz FG. Motor balance and coordination functional outcome in rat with cerebral artery occlusion training enhances transient middle. *Neuroscience*. 2004;123:667-674.
- [41] Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*. 1965; 319-335.
- [42] Curlik DM, Shors TJ. Learning increases the survival of newborn neurons provided that learning is difficult to achieve and successful. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 2011; 23:2159-2170.
- [43] Curlik II DM, Maeng LY, Agarwal PR, Shors TJ. Physical skill training increases the number of surviving new cells in the adult hippocampus. *Plos One*. 2013;8:1-9.
- [44] Ploughman M, Button SG, Chernenko G, Attwood Z, Tucher BA, Mearow KM, Corbett D. Exercise intensity influences the temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia. *Brain Research*. 2007;1150: 2017-2016.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- O programa de atividade física antes do evento isquêmico diminuiu o volume de infarto cerebral, beneficiando o processo de reaprendizado motor, o qual foi intensificado pelo programa de exercício físico após a isquemia cerebral;
- Os animais que exercitaram antes e depois da isquemia cerebral apresentaram menor volume de infarto cerebral e melhor desempenho motor nos testes funcionais;
- Os animais que exercitaram antes da isquemia cerebral também apresentaram menor volume de infarto cerebral e maior densidade de neurônios no *striatum*, no ápice do giro denteado do hipocampo e no córtex motor contralateral à lesão, além de apresentarem mais astrócitos reativos no córtex motor de ambos os hemisférios cerebrais.
- Os animais exercitados a partir do quarto dia após a isquemia cerebral não demonstraram maior densidade de neurônios nas regiões do cérebro analisadas.