

**RAPHAEL TEIXEIRA ROCHA MELO**

**EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA, ANTES E APÓS A INDUÇÃO DE ISQUEMIA  
CEREBRAL TRANSITÓRIA, SOBRE O DESEMPENHO MOTOR E A  
HISTOMORFOMETRIA DE MÚSCULOS DOS MEMBROS  
TORÁCICO E PÉLVICO DE RATOS**

**Dissertação 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  
*Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

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

T

M528e  
2012

Melo, Raphael Teixeira Rocha, 1986-

Efeitos da atividade física, antes e após a indução de isquemia cerebral transitória, sobre o desempenho motor e a histomorfometria de músculos dos membros torácico e pélvico de ratos / Raphael Teixeira Rocha Melo. – Viçosa, MG, 2012.

87f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 79-87.

1. Isquemia cerebral. 2. Atrofia muscular. 3. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos. 4. Músculos esqueléticos - Histoquímica. 5. Histoquímica. 6. Histologia. 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

**RAPHAEL TEIXEIRA ROCHA MELO**

**EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA, ANTES E APÓS A INDUÇÃO DE ISQUEMIA  
CEREBRAL TRANSITÓRIA, SOBRE O DESEMPENHO MOTOR E A  
HISTOMORFOMETRIA DE MÚSCULOS DOS MEMBROS  
TORÁCICO E PÉLVICO DE RATOS**

**Dissertação 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  
*Magister Scientiae*.**

**APROVADA: 08 de outubro de 2012**

---

Ricardo Junqueira Del Carlo

---

Sérgio Luís Pinto da Matta

---

Profa. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar e guiar meus passos nessa caminhada, me dando força e fé para continuar sempre e por permitir que esse sonho pudesse ser realizado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pela oportunidade de realização deste curso.

À professora e orientadora Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, pelos grandes ensinamentos, pelo incentivo, pela paciência e pelo suporte.

Aos professores e co-orientadores Sérgio Luís Pinto da Matta e Ricardo Junqueira Del Carlo pela receptividade, pelos valiosos ensinamentos e por terem aceitado esse convite.

À Laila Cristina Moreira Damázio, pois sem ela este trabalho não teria acontecido.

À equipe do Bloco Cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário.

Às pessoas que auxiliaram em boa parte das etapas da realização deste trabalho, em especial à Maira, ao Pablo, ao Joel, ao Rômulo, à Bárbara, ao Luís, à Vanessa, ao Eduardo, à Marli e à Carmem. Muito obrigado!

Ao professor Antônio José Natali, por gentilmente disponibilizar seu laboratório para a realização deste trabalho, bem como por todo apoio.

Ao laboratório de Biologia Estrutural, em especial ao Mateus e ao Kenner pelo companheirismo e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos meus pais Isaias e Maria do Carmo, e ao meu irmão Júnior pelo amor incondicional e por me fazerem lembrar sempre das minhas origens.

À Taynara por todo seu amor, respeito, por sempre me apoiar, me incentivar a ir além, por toda paciência, compreensão, companheirismo e ensinamentos de vida! Sempre serei grato por tudo!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para a realização deste sonho... Muito Obrigado!

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Planejamento do experimento I, destacando-se os principais procedimentos realizados.....   | 23 |
| <b>Figura 2</b> – Planejamento do experimento II, destacando-se os principais procedimentos realizados.....  | 23 |
| <b>Figura 3</b> – Representação esquemática do processo de oclusão transitória da ACM.....   | 25 |
| <b>Figura 4</b> – Fio de oclusão, utilizado na indução da isquemia cerebral, feito de nylon 5-0, com diâmetro de 0,12mm, comprimento de 30 mm e recoberto por silicone em sua extremidade..... | 25 |
| <b>Figura 5</b> – Rato durante realização do teste passo em falso.....   | 26 |
| <b>Figura 6</b> – Rato durante realização do teste das barras paralelas.....   | 27 |
| <b>Figura 7</b> – Secção histológica da região superficial do bíceps braquial de um rato do grupo controle sedentário (CS) após reação com a SDH.....  | 31 |
| <b>Figura 8</b> – Imagem da gradícula gerada no programa <i>Image Pro Plus</i> e aplicada sobre imagem microscópica do músculo tibial anterior, em corte transversal.....                      | 32 |
| <b>Figura 9</b> – Gráficos mostrando o peso dos animais.....   | 33 |
| <b>Figura 10</b> – Erros (valores médios) cometidos pelos animais antes (a,b) e após (c,d) os procedimentos cirúrgicos e antes da eutanásia (e,f).....   | 34 |
| <b>Figura 11</b> - Fibras musculares de animais controle sedentários (a,c,e) e animais isquemiados sedentários (b,d,f), em corte transversal, após reação da SDH.....                          | 38 |
| <b>Figura 12</b> – Frequência de fibras tipo I e tipo II no bíceps braquial.....   | 39 |
| <b>Figura 13</b> – Frequência de fibras tipo I e tipo II no sóleo.....   | 40 |
| <b>Figura 14</b> – Frequência de fibras tipo I e tipo II no tibial anterior.....   | 41 |
| <b>Figura 15</b> – Área de secção transversal de fibras na região superficial do bíceps braquial.....  | 43 |
| <b>Figura 16</b> – Área de secção transversal de fibras na região profunda do bíceps braquial.....   | 43 |
| <b>Figura 17</b> – Área de secção transversal de fibras no sóleo.....  | 44 |
| <b>Figura 18</b> – Área de secção transversal de fibras na região superficial do tibial anterior.....  | 45 |
| <b>Figura 19</b> – Área de secção transversal de fibras na região profunda do tibial anterior.....   | 46 |
| <b>Figura 20</b> – Fibras musculares, em corte transversal, de animais controle (a,b,c) e isquemiados (d,e,f) sedentários. a,d – bíceps braquial; b,e – sóleo; c,f – tibial anterior.....      | 48 |
| <b>Figura 21</b> – Frequência dos componentes do músculo bíceps braquial.....  | 49 |
| <b>Figura 22</b> – Frequência dos componentes do músculo sóleo.....  | 51 |
| <b>Figura 23</b> – Frequência dos componentes do músculo tibial anterior.....  | 53 |
| <b>Figura 24</b> – Músculo sóleo de animais isquemiados sedentários.....   | 55 |
| <b>Figura 25</b> – Músculo sóleo de um animal do grupo isquemiado sedentário (SI) com uma fibra muscular alterada no centro.....   | 56 |
| <b>Figura 26</b> - Músculo sóleo de animais isquemiados sedentários.....   | 57 |
| <b>Figura 27</b> – Peso dos animais.....   | 59 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 28</b> – Número de erros cometidos pelos animais depois dos procedimentos cirúrgicos e ao final do experimento.....  | 60 |
| <b>Figura 29</b> – Frequência de fibras tipo I e tipo II no bíceps braquial.....   | 62 |
| <b>Figura 30</b> – Frequência de fibras tipo I e tipo II no sóleo.....   | 63 |
| <b>Figura 31</b> – Frequência de fibras tipo I e tipo II no tibial anterior.....   | 64 |
| <b>Figura 32</b> – Área de secção transversal de fibras na região superficial do bíceps braquial.....                          | 65 |
| <b>Figura 33</b> – Área de secção transversal de fibras na região profunda do bíceps braquial.....                             | 65 |
| <b>Figura 34</b> – Área de secção transversal de fibras no sóleo.....  | 66 |
| <b>Figura 35</b> – Área de secção transversal de fibras na região superficial do tibial anterior.....                          | 68 |
| <b>Figura 36</b> – Área de secção transversal de fibras na região profunda do tibial anterior.....                             | 68 |
| <b>Figura 37</b> - Fibras musculares, em corte transversal, de animais controle (a,b,c) e isquemiados (d,e,f) sedentários..... | 70 |
| <b>Figura 38</b> - Frequência dos componentes do bíceps braquial.....  | 71 |
| <b>Figura 39</b> - Frequência dos componentes do sóleo.....  | 73 |
| <b>Figura 40</b> - Frequência dos componentes do tibial anterior.....  | 75 |

## RESUMO

MELO, Raphael Teixeira Rocha, M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2012. **Efeitos da atividade física, antes e após a indução de isquemia cerebral transitória, sobre o desempenho motor e a histomorfometria de músculos dos membros torácico e pélvico de ratos.** Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Antonio José Natali.

A isquemia cerebral é a redução do fluxo sanguíneo no cérebro, que provoca hipóxia e consequente lesão neuronal. É a causa do tipo mais frequente de acidente vascular encefálico, distúrbio que pode levar à morte, ou então determinar várias sequelas, principalmente prejuízo motor dos membros, torácico e pélvico, contralaterais ao hemisfério cerebral lesionado. Embora, a atividade física seja uma alternativa preventiva e terapêutica para diversas enfermidades cerebrovasculares, ainda existem poucas informações com relação aos efeitos do exercício sobre músculos esqueléticos e o desempenho motor de animais com isquemia cerebral. Neste trabalho, foram realizados testes de avaliação motora (passo em falso e barras paralelas), além da histomorfometria dos músculos bíceps braquial, sóleo e tibial anterior de ratos submetidos ao exercício físico em esteira, antes e após a indução da isquemia cerebral pela oclusão da artéria cerebral média (OACM). Foram utilizados 36 ratos Wistar distribuídos em seis grupos: **CS**: animais controle sedentários (n=6) que foram submetidos à falsa cirurgia (operação na qual não ocorreu a OACM); **CEA**: animais controle exercitados antes da falsa cirurgia (n=6); **CED**: animais controle exercitados após a falsa cirurgia (n=6); **IS**: animais isquemiados sedentários (n=6), **IEA**: animais exercitados antes da indução da isquemia (n=6) e **IED**: animais isquemiados exercitados após a indução da isquemia (n=6). O exercício físico consistiu no treinamento em esteira durante seis semanas, 30 minutos/dia (cinco dias/semana) a uma velocidade de 14 m/min para os grupos CEA e IEA, e de 8m/min para os grupos CED e IED. Realizou-se a histomorfometria dos músculos esqueléticos, determinando-se a frequência e a área de fibras musculares do tipo I e II, bem como a densidade de fibras musculares com alterações citológicas e de componentes do interstício muscular. Os animais isquemiados sedentários apresentaram pior desempenho nos testes funcionais. Ratos submetidos ao exercício, após a isquemia, apresentaram recuperação significativa do desempenho motor. Houve aumento na frequência de fibras I no músculo sóleo, tanto nos animais isquemiados sedentários, quanto nos animais exercitados antes e após a cirurgia de OACM. Ocorreu atrofia de fibras I no bíceps braquial e no tibial anterior, e do tipo I e II no sóleo dos animais isquemiados sedentários, sendo que nos animais treinados após a isquemia, o exercício atenuou a atrofia muscular. O exercício físico, além de promover melhoria no desempenho motor de animais isquemiados, atenua a atrofia muscular causada pela isquemia cerebral e pode estimular a angiogênese no músculo esquelético.

## ABSTRACT

MELO, Raphael Teixeira Rocha, M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, october of 2012. **Effects of physical activity, before and after induction of transient cerebral ischemia, on motor performance and histomorphometry of thoracic and pelvic muscle of rats.** Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-Advisers: Clóvis Andrade Neves and Antonio José Natali.

Cerebral ischemia is a reduction of blood flow in the brain, which causes hypoxia and consequent neuronal damage. It is the cause of the most common type of stroke, a disorder that can lead to death, or determine several sequels, mainly motor impairment of thoracic and pelvic members, in the contralateral hemisphere to the injured. Although physical activity is an preventive alternative and treatment for various cerebrovascular diseases, there is little information regarding the effects of exercise on skeletal muscle and motor performance of animals with cerebral ischemia. In this study, tests were performed for motor evaluation (foot fault test and parallel bars test), besides the histomorphometry of the biceps brachii, soleus and anterior tibial muscles of rats subjected to physical exercise on a treadmill before and after induction of cerebral ischemia by middle cerebral artery occlusion (MCAO). 36 Wistar rats were divided into six groups: **CS**: sedentary control animals (n = 6) who underwent a fake surgery (there were no MCAO); **CEA**: control animals exercised before the fake surgery (n = 6) ; **CED**: control animals trained after the fake surgery (n = 6); **IS**: sedentary ischemic animals (n = 6), **IEA**: exercised animals before induction of ischemia (n = 6) and **IED**: ischemic animals trained after induction of ischemia (n = 6). The exercise treadmill training consisted of six weeks, 30 minutes/day (five days/week) at a speed of 14 m/min for CEA and IEA groups, and 8m/min for CED and IED groups. Histomorphometry of skeletal muscles was performed, determining the frequency and area of muscle fibers type I and II as well as the density of muscle fibers with cytological alterations and component of interstitial of muscles. The sedentary-ischemic animals showed poorer performance on functional tests. Rats submitted to exercise after ischemia, showed significant recovery of motor performance. There was an increase in the frequency of type I fibers in the soleus muscle, both in sedentary-ischemic animals, as in the exercised animals before and after MCAO surgery. Type I fiber atrophy occurred in the biceps and anterior tibial muscles, and type I and II in the soleus of sedentary-ischemic animals, whereas in animals trained after ischemia, exercise attenuated muscle atrophy. Exercise promotes improvement in motor performance of ischemic animals, attenuates muscle atrophy caused by cerebral ischemia and can stimulate angiogenesis in skeletal muscle.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1) INTRODUÇÃO.....  | 09 |
| 1.1) Modelo de oclusão da artéria cerebral média.....                       | 12 |
| 1.2) Testes funcionais para avaliação do desempenho motor.....              | 14 |
| 1.3) Efeitos da isquemia cerebral sobre o músculo estriado esquelético..... | 15 |
| 1.4) Efeitos da atividade física em indivíduos isquêmicos.....              | 17 |
| 2) OBJETIVOS.....   | 20 |
| 2.1) Objetivo geral.....  | 20 |
| 2.2) Objetivos específicos.....   | 20 |
| 3) MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 22 |
| 3.1) Animais e grupos experimentais.....                                    | 22 |
| 3.2) Indução cirúrgica da isquemia cerebral.....                            | 24 |
| 3.3) Critérios de inclusão quanto ao desempenho motor.....                  | 26 |
| 3.4) Aplicação dos testes funcionais.....                                   | 26 |
| 3.5) Treinamento na esteira rolante.....                                    | 27 |
| 3.6) Eutanásia e coleta do material.....                                    | 28 |
| 3.7) Microscopia de luz.....  | 29 |
| 3.8) Histoquímica para enzima Succino-Desidrogenase (SDH).....              | 29 |
| 3.9) Captura de imagens e análise morfométrica.....                         | 30 |
| 3.10) Análise estatística.....  | 32 |
| 4) RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO I.....                              | 33 |
| 4.1) Peso corporal dos animais.....   | 33 |
| 4.2) Testes funcionais.....   | 34 |
| 4.3) Frequência de fibras musculares tipo I e II.....                       | 37 |
| 4.3.1) Bíceps braquial.....   | 38 |
| 4.3.2) Sóleo.....   | 40 |
| 4.3.3) Tibial anterior.....   | 41 |
| 4.4) Área das fibras.....   | 42 |
| 4.4.1) Bíceps braquial.....   | 42 |
| 4.4.2) Sóleo.....   | 44 |
| 4.4.3) Tibial anterior.....   | 45 |
| 4.5) Proporção volumétrica.....   | 47 |
| 5) CONCLUSÕES.....  | 58 |
| 6) RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO II.....                             | 59 |
| 6.1) Peso corporal dos animais.....   | 59 |
| 6.2) Testes funcionais.....   | 59 |
| 6.3) Frequência de fibras tipo I e tipo II.....                             | 61 |
| 6.3.1) Bíceps braquial.....   | 62 |
| 6.3.2) Sóleo.....   | 63 |
| 6.3.3) Tibial anterior.....   | 64 |
| 6.4) Área das fibras.....   | 64 |
| 6.4.1) Bíceps braquial.....   | 65 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 6.4.2) Sóleo.....                  | 66 |
| 6.4.3) Tibial anterior.....        | 67 |
| 6.5) Proporção volumétrica.....    | 69 |
| 7) CONCLUSÕES.....                 | 78 |
| 8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 79 |

## 1) INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) ou cerebral (AVC) é um distúrbio neurológico pertencente ao grupo de doenças cerebrovasculares. Atualmente, o AVC é a principal causa de incapacidade em adultos, e a segunda causa de mortalidade no mundo (Nudo & Nelson, 2003; Garber, 2007; Zheng *et. al.*, 2011). No Brasil, são registrados 90 mil casos por ano (Leite *et. al.*, 2009; Otero *et. al.*, 2009), com perspectiva de que a incidência de AVC se torne ainda maior na próxima década. A prevalência de doenças cerebrovasculares, principalmente nos países do mundo ocidental, está relacionada a vários fatores de risco, destacando-se, a hipertensão arterial, fibrilação atrial, os distúrbios metabólicos (diabetes, dislipidemias), a inatividade física e a obesidade (Oliveira, 2001).

Dependendo do fator desencadeante, isquemia ou hemorragia, os acidentes vasculares cerebrais (AVCs) são classificados respectivamente em isquêmicos e hemorrágicos. Os isquêmicos correspondem a mais de 80% dos AVCs e ocorrem por obstrução das principais artérias que levam sangue ao cérebro. Esta obstrução pode ser decorrente da formação de um trombo ou então de um êmbolo. Considerando-se que o cérebro é um órgão com elevada taxa metabólica e dependente de contínuo fornecimento de oxigênio e glicose através do sangue, a redução severa ou completa do fluxo sanguíneo (isquemia) acaba por promover deficiências funcionais e bioquímicas instantâneas nos neurônios (Hossmann, 1998). Os AVCs hemorrágicos ocorrem por ruptura de uma artéria, causando sangramento intracraniano, e daí, a designação popular “derrame cerebral”, utilizada genericamente para denominar qualquer tipo de AVC (Oliveira, 2001). No AVC hemorrágico, a hemorragia pode ser intracerebral, quando ocorre dentro do cérebro, ou subaracnóidea, quando a hemorragia acontece entre a meninge aracnóide e o encéfalo. O AVC hemorrágico pode ser clinicamente devastador quando afeta grandes porções do cérebro e se estende ao sistema ventricular (Kumar *et. al.*, 2008).

Os sintomas e os sinais apresentados pelo paciente com AVC dependem, basicamente, se o mesmo é do tipo isquêmico ou hemorrágico e da artéria comprometida. Geralmente, no AVC isquêmico, o vaso sanguíneo comprometido é a artéria cerebral média (Winstein *et al.*, 1999) ou um de seus ramos (Astrup *et. al.*,

1981; Brown, 2002; Garber, 2007). A artéria cerebral média (ACM) irriga primariamente a região lateral posterior do córtex frontal e a região lateral anterior dos córtices parietal, motor e sensorial primários. A ACM origina ramos profundos que irrigam estruturas subcorticais, tais como núcleos da base e cápsula interna (Paxinos, 1995, Winstein *et. al.*, 1999). Os núcleos da base se conectam reciprocamente com o sistema motor cortical, enquanto a cápsula interna é uma área de substância branca que contém a maioria das fibras que entram ou saem do córtex cerebral. As fibras que se dirigem ao córtex vêm do tálamo, e as fibras originadas no córtex, bem como no tronco encefálico, formam os tratos ou vias descendentes (dentre eles, o trato corticoespinhal), que têm como objetivo comum a modulação da atividade dos neurônios na medula espinhal, através das seguintes funções: controle descendente das aferências sensoriais; excitação direta e indireta de motoneurônios; inibição de motoneurônios; controle autonômico; plasticidade de longa duração de circuitos espinhais e funções tróficas ao longo do desenvolvimento (Lemon & Griffiths, 2005).

No encéfalo, o tecido nervoso submetido à isquemia passa por uma série de eventos complexos e intrincados, os quais conjuntamente podem ser denominados de “cascata isquêmica”. Minutos após a oclusão vascular, ocorre despolarização neuronal, excessiva liberação seguida de falha na recaptação do neurotransmissor glutamato, aumento do nível intracelular de cálcio, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, depleção dos níveis de enzimas antioxidantes, produção de ácido araquidônico e mediadores inflamatórios, além da ativação de segundos-mensageiros envolvidos na sinalização da morte neuronal. O infarto cerebral designa exatamente a área de morte neuronal desencadeada pela isquemia. Os neurônios lesionados no centro da área de infarto não se regeneram e produzem déficits neurológicos muitas vezes graves e permanentes (White *et. al.*, 2000; Danbolt, 2001; Rahme *et. al.*, 2011).

Os sinais clínicos após um AVC isquêmico podem incluir deficiências do sistema motor, do sistema sensorial, dificuldades cognitivas, alterações emocionais e dificuldades perceptuais. Dentre os prejuízos motores decorrentes estão: fraqueza muscular; atrofia muscular; hemiparesia, que consiste na paralisia dos músculos no lado do corpo contralateral a área da lesão cerebral; falta de coordenação motora e hipertonia espástica do membro superior e inferior contralaterais à lesão. Estes

prejuízos motores são resultantes da degeneração de fibras nervosas do trato corticospinal (Brandstater, 2002), em função de lesões que podem ter ocorrido no córtex cerebral, cápsula interna, e tronco cerebral.

McComas *et al.* (1973) propuseram a hipótese da degeneração trans-sináptica, na qual a lesão das fibras do trato corticospinal, após infarto cerebral, causariam mudanças trans-sinápticas que influenciariam o funcionamento dos motoneurônios. Essa hipótese tem sido reforçada por estudos que demonstraram a redução do número de unidades motoras funcionais, além de indícios de rearranjo dessas unidades nos músculos de membros paréticos de humanos, após isquemia cerebral (Dietz *et al.*, 1986; Datolla *et al.*, 1993; Arasaki *et al.*, 2006).

Contudo, estudos histopatológicos da medula espinhal de pacientes, após isquemia cerebral, não têm revelado diferença significativa no número de neurônios localizados nos cornos anteriores, mas a área destes neurônios é menor no lado comprometido. Segundo Arasaki *et al.* (2006), os motoneurônios, apesar de funcionalmente inibidos, sobrevivem após AVE isquêmico. Esta é uma das constatações que reforça a utilização de estratégias de reabilitação, dentre elas, a atividade física, no tratamento de pacientes após isquemia cerebral.

Considera-se que a força muscular está na dependência do número de unidades motoras ativadas e na frequência de disparo dessas unidades. Cada unidade é formada por um motoneurônio alfa e fibras musculares que são inervadas por ele. As fibras musculares, numa única unidade motora, apresentam o mesmo padrão histoquímico e funcional. Assim, as unidades motoras podem ser classificadas de acordo com a resistência à fadiga e a velocidade de contração. As unidades de contração rápida são compostas de fibras musculares do tipo II, relativamente pouco resistentes à fadiga, enquanto as unidades de contração lenta são formadas por fibras musculares do tipo I (fadigo-resistentes). Músculos ligados ao reflexo de fuga, corridas de alta velocidade em distâncias curtas (por exemplo: gastrocnêmio, bíceps braquial) são compostos predominantes por unidades motoras de contração rápida, ou seja, formadas por fibras musculares do tipo II. Por outro lado, músculos que possuem unidades de contração lenta, com fibras musculares do tipo I, são aqueles referidos como antigravitacionais (posturais), como é o caso do sóleo (Bear *et al.*, 2008)

## 1.1) Modelo de oclusão da artéria cerebral média

Desde a década de 70, modelos animais para estudo da isquemia cerebral foram desenvolvidos com o objetivo de identificar os mecanismos que causam danos nos tecidos e proporcionar a base para o desenvolvimento, em nível pré-clínico, de novas terapias para o AVE. Atualmente, modelos confiáveis de animais para o estudos da isquemia cerebral estão disponíveis em uma variedade de espécies, incluindo primatas, porcos, ovelhas, cães, gatos, coelhos, ratos e camundongos. Em estudos de isquemia cerebral, os ratos têm sido os animais mais comumente utilizados devido ao seu tamanho, o que permite fácil monitoramento das variáveis fisiológicas e manipulação de estruturas vasculares (Bacigallupi *et. al.*, 2010B; Howells *et. al.*, 2010; Liu & McCullough, 2010).

Existem dois tipos de isquemia cerebral: isquemia focal e isquemia global. A isquemia focal é caracterizada por uma redução do fluxo sanguíneo em uma determinada região do cérebro e a isquemia global por uma redução do fluxo sanguíneo que afeta todo o cérebro. Na isquemia cerebral focal, uma artéria ou veia é ocluída mecanicamente ou por tromboembolismo cerebral (Bacigallupi & Hermann, 2008).

As isquemias oriundas da oclusão de um vaso cerebral podem ser produzidas por meio das seguintes técnicas: processos mecânicos de oclusão da artéria cerebral média (ACM) ou oclusão trombótica (injeção de coágulos sanguíneos ou trombina na ACM ou por foto-trombose). A oclusão mecânica da ACM é mais utilizada por reproduzir melhor a forma mais prevalente de AVE, correspondendo a aproximadamente 80% das isquemias em humanos (Donnan *et. al.*, 2008). Os sinais clínicos comumente observados após oclusão da ACM são: prejuízos na função motora e sensorial no lado contralateral ao hemisfério envolvido, déficits visuais, afasia de expressão e de compreensão e apraxia (Winstein *et. al.*, 1999; Biernaskie & Corbett, 2001; Ding *et. al.*, 2002). Injúrias cerebrais que envolvem a área da ACM e atingem o córtex pré-motor induzem grave perda de mobilidade em humanos (Miyai *et. al.*, 1999).

Modelos de oclusão da ACM, além de serem os mais utilizados em estudos de lesão isquêmica (Papadopoulos *et. al.*, 2009) e para testes da eficácia de drogas neuroprotetoras (Reglodi *et. al.*, 2003), são também os mais relevantes clinicamente

(Hossmann, 1998). Nesse modelo faz-se a oclusão mecânica direta da ACM, na maioria das vezes utilizando-se um fio de nylon revestido com silicone em sua extremidade (Howells *et. al.*, 2010). A inserção deste fio geralmente ocorre no lúmen da artéria carótida interna (ACI), avançando pelo polígono de Willis para ocluir a ACM em sua origem. A gravidade da lesão isquêmica pode ser modulada através do tempo de permanência do fio de oclusão no lúmen da ACM. Para os modelos de oclusão transitória da ACM, o fio de oclusão permanece por um período de 30-120 minutos na ACM até ser retirado para permitir a reperfusão do tecido (Bacigallupi *et. al.*, 2010B). O tempo de isquemia tolerado pelo cérebro depende, dentre outros fatores, do tipo de oclusão da artéria (parcial ou completa), do *status* energético do cérebro, da velocidade de consumo de energia, da temperatura, do grau de atividade funcional e da ausência ou presença de anestésicos e outras drogas (Hossmann, 1998). Em ratos anestesiados, a oclusão da ACM por 60 minutos foi suficiente para que 100% dos animais apresentassem infarto cortical enquanto que o tamanho do infarto aumentou progressivamente com o aumento do tempo de oclusão (Memezawa *et. al.*, 1992). No caso da oclusão permanente da ACM o fio de oclusão não é removido e não ocorre a reperfusão do tecido (Hermann *et. al.*, 2001; Bacigallupi *et. al.*, 2010B).

Como permite a sobrevivência do animal por longos períodos, esse modelo de oclusão transitória da ACM é utilizado em vários tipos de estudos, inclusive para investigar a eficácia de determinados testes em detectar melhoras funcionais (Riek-Burchardt *et. al.*, 2004), o efeito do treinamento na recuperação de funções motoras (Bland *et. al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004A), aprendizado motor após lesão (Winstein *et. al.*, 1999; Ding *et. al.*, 2002), efeito neuroprotetor e de reabilitação motora do exercício antes e após isquemia (Lee *et. al.*, 2003; Ding *et. al.*, 2004B).

Este modelo oferece ainda uma abordagem cirúrgica relativamente simples, com bom índice de sucesso e menos traumática em relação aos modelos de craniotomia (modelos de Tamura). A cirurgia sem craniotomia não altera a pressão intracraniana, sendo considerada uma técnica simples e pouco invasiva (Longa *et. al.*, 1989; Memezawa *et. al.*, 1992). Além disso, é capaz de produzir a oclusão focal de uma artéria cerebral grande tal qual ocorre nos AVEs em humanos. A principal desvantagem do modelo é que, apesar do controle do tempo de oclusão, o tamanho da lesão isquêmica não pode ser rigorosamente controlado (Hata *et. al.*, 2000;

Carmichael, 2005), uma vez que está diretamente ligada à experiência e habilidade manual do cirurgião e também às características anatômicas de cada animal. Diferenças anatômicas interespecíficas e intraespecíficas devem ser levadas em consideração para se evitar variações, e obter-se o resultado esperado (Howells *et. al.*, 2010).

A oclusão da ACM leva ao comprometimento do lado esquerdo do encéfalo que acometerá o lado direito do corpo, pois o trato cortico-espinhal cruza na decussação das pirâmides e sendo responsável pela motricidade voluntária, causando a hemiparesia ou hemiplegia. Os sinais e sintomas dependerão da área do cérebro atingida, levando à paresia ou paralisia em membros torácicos, pélvicos, tronco e cabeça. Ocorrerá a hipo ou hipertonia, hipo ou hiperreflexia, alterações da marcha, perda ou diminuição da função com alteração dos movimentos involuntários e voluntários, e diminuição do equilíbrio (Salmela *et. al.*, 2000, Iwabe *et. al.*, 2008).

## **1.2) Testes funcionais para avaliação do desempenho motor**

Muitos estudos experimentais têm identificado potenciais tratamentos para o AVE isquêmico, porém até agora poucos têm sido, de fato, traduzidos em um tratamento clínico eficaz (Lakhan *et. al.*, 2009, Encarnacion *et. al.*, 2011). O baixo aproveitamento destas descobertas deve-se, em parte, à falta de avaliações de rotina que possam prever o comportamento patológico em longo prazo.

São inúmeros os testes funcionais para avaliação de déficits motores e sensoriais em ratos submetidos à oclusão transitória e permanente da ACM. Esses testes avaliam o desempenho do animal em vários aspectos, tais como: alterações posturais, distúrbios de marcha, atividade exploratória espontânea, disfunções sensoriais e motoras (Zhang *et. al.*, 2000; Hunter *et. al.*, 2000; Zausinger *et. al.*, 2000; Modo *et. al.*, 2000; Encarnacion *et. al.*, 2011). Para avaliar a atividade exploratória espontânea, o teste de campo aberto é muito utilizado e bem descrito na literatura (Lyden *et. al.*, 1997; Farrell *et. al.*, 2001). Para avaliação do desempenho motor do animal, os testes do passo em falso e das barras paralelas são muito utilizados. Enquanto o teste do passo em falso avalia a coordenação motora das patas anteriores, o teste das barras paralelas mensura a habilidade das patas posteriores. Esses dois testes são bem descritos com parâmetros bem

definidos para a classificação do comprometimento motor do animal e apresentam grande reprodutividade de resultados entre os avaliadores (Modo *et. al.*, 2000; Ding *et. al.*, 2002; Ding *et. al.*, 2004a; Encarnacion *et. al.*, 2011).

### **1.3) Efeitos da isquemia cerebral sobre o músculo estriado esquelético**

Nos mamíferos, os músculos estriados esqueléticos são formados de células multinucleadas, denominadas miofibras ou fibras musculares estriadas. Durante o desenvolvimento, principalmente no período embrionário, as miofibras são formadas a partir da fusão de células musculares progenitoras mononucleadas, algumas das quais permanecem associadas às miofibras adultas como células satélites, um tipo específico de célula tronco. Miofibras diferenciadas representam um tipo celular com elevada plasticidade, que pode sofrer alterações no tamanho (atrofia / hipertrofia) ou no padrão bioquímico. As fibras musculares também podem reparar os danos locais por meio de estruturas intracelulares específicas. Por exemplo, disrupções focais na membrana plasmática induzidas pelas contrações musculares, podem ser reparadas pela fusão de vesículas subsarcolemais à membrana plasmática. Núcleos das miofibras podem desaparecer devido a apoptose focal, fenômeno ocasionalmente vista nos músculos atrofícos. Pode ocorrer também aumento no número de núcleos por incorporação de células satélites ativadas.

No entanto, nas lesões traumáticas e miopatias, pode ocorrer necrose de miofibras inteiras ou de alguns de seus segmentos. Nestes casos, ocorre uma resposta inflamatória, seguida de ativação de células satélites, que sofrem proliferação, diferenciação e fusão ao segmento danificado da fibra (Charge & Rudnicki, 2004).

Nos mamíferos, o músculo esquelético é um mosaico de diferentes tipos de fibras musculares com diversas propriedades estruturais e capacidades funcionais. As fibras musculares têm sido tradicionalmente classificadas por reações histoquímicas miofibrilares, imunoblot, e/ou análises de imunofluorescência das isoformas da cadeia pesada de miosina (MHC). Com base nestes parâmetros, os roedores apresentam fibras tipo I, IIa, IIb/x, e IIb, enquanto que seres humanos apresentam três tipos de fibra (I, IIa, e IIb/x) (Yan *et. al.*, 2011). De forma geral,

vários estudos têm adotado apenas a classificação proposta por Brooke & Kaiser (1970), envolvendo fibras do Tipo I e II.

As fibras Tipo I (também chamadas de vermelhas) apresentam menor atividade da mATPase, menor velocidade de degradação de ATP e são utilizadas em exercícios que exijam contração lenta. São resistentes à fadiga e importantes na realização de atividades de longa duração, como maratonas e ciclismo. Essas fibras possuem maiores concentrações de oxigênio e mioglobina, elevado número de mitocôndrias e enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, além de baixa velocidade de condução de estímulo nervoso, devido ao reduzido número de placas mioneurais (Rossi & Tirapegui, 1999).

As fibras tipo II (também chamadas de brancas) apresentam maior atividade da enzima mATPase do que as do tipo I e maior velocidade de degradação de ATP. São mais utilizadas durante o metabolismo anaeróbico, funcionalmente em atividades de saída rápida (explosão), parada brusca e em exercícios intensos até a exaustão. São menos resistentes à fadiga e apresentam reduzidas concentrações de mioglobina e mitocôndrias, porém apresentam numerosas placas mioneurais e alta velocidade de condução de estímulo quando comparadas às fibras tipo I (Green, 2000).

Embora a maioria dos músculos contenha uma combinação igual de fibras lentas e rápidas, alguns músculos são compostos predominantemente por determinados tipos de fibras em detrimento dos demais. Em ratos, por exemplo, no bíceps braquial, em sua região profunda, há predomínio de fibras tipo I, enquanto na sua região superficial há predomínio de fibras tipo II (Fuente *et. al.*, 1998). No sóleo ocorre predomínio de fibras tipo I (Laughlin, 1984). No tibial anterior, em sua região profunda, há um predomínio de fibras tipo I e na sua região superficial um predomínio de fibras tipo II (Pullen, 1977).

Após AVE, a atrofia de músculos esqueléticos é associada a uma reduzida capacidade funcional nos pacientes acometidos (Sharp & Brouwer, 1997; Li *et. al.*, 2011). Scelci *et. al.* (1984) ressaltaram que a atrofia muscular parética, associada à lesão cerebral aguda, é caracterizada pela variabilidade no diâmetro das fibras musculares, internalização de núcleos e presença de infiltrado inflamatório perivascular. De acordo com Hamill *et. al.* (1998), o músculo atrofiado é incapaz de gerar muita tensão contrátil. A fraqueza muscular reflete a incapacidade de gerar

força pela diminuição da ativação das unidades motoras ou das mudanças fisiológicas do músculo parético. Potempa *et. al.* (1996) ressaltam que a isquemia cerebral e a hemiparesia produzem alterações fisiológicas nas fibras musculares que são semelhantes às aquelas que ocorrem devido ao desuso prolongado.

A atrofia muscular é caracterizada pela diminuição na massa muscular, na área de secção transversal da fibra e também no conteúdo proteico miofibrilar (McKinnell & Rudnicki, 2004). Os estudos em animais fornecem evidências de redução do peso muscular tanto no lado afetado (contralateral à lesão cerebral) quanto no lado não afetado durante o período de 7 dias após a lesão isquêmica (An *et. al.*, 2000; Choe *et. al.*, 2004). Hafer-Macko *et. al.* (2005) demonstraram que a expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) é aumentada no músculo esquelético de indivíduos isquemiados, contribuindo para a atrofia muscular através da inibição da síntese proteica e da regulação transcricional da expressão de genes das miofibrilas, pela intensificação da degradação proteica por proteinases ubiquitinadas e, também, pela morte celular por apoptose.

Macko *et. al.* (1997) observaram que músculos paréticos ativam fibras glicolíticas tipo II para que a contração se inicie, enquanto os músculos não paréticos recrutam principalmente as fibras tipo I. Eventualmente essa mudança nos padrões de recrutamento resulta em uma proporção reduzida de fibras tipo I, menor capacidade em termos de metabolismo oxidativo e diminuição da *endurance* dos exercícios. Análises histoquímicas de fibras musculares de pacientes com isquemia cerebral indicaram tanto atrofia de fibras musculares tipo II (Dietz *et. al.*, 1986) quanto das fibras tipo I e tipo II (Hachisuka *et. al.*, 1997) dos membros hemiparéticos. Ryan *et. al.* (2002) encontraram, além da atrofia muscular nos membros hemiparéticos, grande acúmulo de gordura no interstício muscular, outro fator que pode estar relacionado à deficiência funcional do músculo.

#### **1.4) Efeitos da atividade física em indivíduos isquêmicos**

Desde a antiguidade, o exercício regular tem sido conhecido como benéfico por incluir melhoras no desempenho e longevidade. Mais recentemente, tem sido demonstrado que o exercício exerce efeitos significativos sobre um número crescente de afecções em humanos, incluindo doenças cardiovasculares,

cerebrovasculares, obesidade e diabetes. Uma vez que estas doenças crônicas, ou são causas diretas ou riscos importantes para a mortalidade, o exercício regular deve tornar-se uma estratégia fundamental no combate a estas doenças. Embora o exercício físico inevitavelmente afete todos os órgãos no corpo, os principais impactos são vistos principalmente nas adaptações do músculo esquelético (Yan *et. al.*, 2011). Portanto, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares e estruturais relacionados à adaptação do músculo esquelético induzida pela atividade física fornecerá informações valiosas para a utilização de exercícios e planejamento de intervenções terapêuticas para muitas doenças que afetam pessoas.

Indivíduos hemiparéticos têm se beneficiado com um programa de fortalecimento muscular melhorando seu desempenho (Zheng *et. al.*, 2011). Estudos que analisaram os grupos musculares mais potentes da marcha evidenciaram benefícios principalmente na fase de impulsão da marcha (Teixeira-Salmela *et. al.*, 2005). O aumento da força por meio de programa de fortalecimento nos membros pélvicos paréticos está associado com a melhora da velocidade e cadência, execução de tarefas funcionais como caminhar, sentar, levantar, subir e descer escadas, além do aumento do equilíbrio durante a fase de apoio sem, no entanto, haver aumento da espasticidade (Brown e Kautz, 1998). Potempa *et. al.* (1996) relataram que em pacientes com AVE, o treinamento físico aeróbico pode melhorar o recrutamento de unidades motoras, reduzindo a atrofia por desuso. Engardt *et. al.* (1995) demonstraram que o exercício físico está associado à redução da atrofia muscular, e melhora significativa nas funções motoras tais como movimentos de extensão e flexão do joelho e de toda a musculatura afetada.

Choe & Shin (1999) demonstraram que o exercício de baixa intensidade em esteira atenua a redução da massa muscular e, também, do conteúdo proteico miofibrilar dos músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio de ratos. An *et. al.* (2000) realizaram a oclusão da artéria cerebral média em ratos e observaram que o exercício físico, após o 6<sup>o</sup> dia pós-operatório, tem efeito benéfico e preventivo à perda de massa muscular, tanto na musculatura afetada quanto na não afetada. Choe *et. al.* (2006) observaram que o exercício físico de baixa intensidade durante 8 dias após a indução da isquemia por oclusão da artéria cerebral média confere um caráter preventivo à atrofia muscular, sendo que o peso muscular, a área das fibras

do tipo I e tipo II em corte transversal e o conteúdo proteico miofibrilar dos músculos sóleo, gastrocnêmio e plantar aumentaram.

Além dos efeitos na musculatura, diversos estudos têm demonstrado o efeito benéfico do exercício físico como um mecanismo de neuroproteção. A atividade física contribui ainda para a diminuição de fatores de risco de AVEs, tais como peso corporal, pressão sanguínea e níveis de colesterol (Zhang *et. al.*, 2010).

Neste trabalho foram avaliados os efeitos do exercício físico em ratos, realizado antes e após a indução de isquemia cerebral, sobre desempenho motor e estrutura dos seguintes músculos esqueléticos: o bíceps braquial, rico em fibras musculares do tipo II e com ação flexora no membro torácico; tibial anterior e sóleo, músculos do membro pélvico ricos em fibras do tipo II e I, respectivamente. Deve-se acrescentar que os músculos tibial anterior, e sóleo representam um par agonista/antagonista especialmente importante no déficit motor do “pé caído” (Snow *et. al.*, 2012), frequentemente observado em humanos, após AVE isquêmico.

Apesar do número razoável de trabalhos experimentais sobre isquemia cerebral, os estudos relacionando exercício, isquemia cerebral e histologia do tecido muscular esquelético, ainda são escassos. Este trabalho é o primeiro a abordar a trilogia exercício, isquemia e estrutura muscular, para o músculo bíceps braquial de ratos e também os efeitos da atividade física prévia à lesão isquêmica.

## **2) OBJETIVOS**

### **2.1) Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho motor e a histomorfometria dos músculos bíceps braquial, sóleo e tibial anterior de ratos submetidos a um programa de treinamento em esteira rolante, antes (experimento I) e depois (experimento II) da cirurgia de indução da isquemia cerebral pela oclusão transitória da artéria cerebral média.

### **2.2) Objetivos específicos – Experimento I**

- Aplicar os testes passo em falso e barras paralelas antes e após a oclusão da ACM e ao final do experimento, para avaliação do desempenho motor dos animais
- Determinar nos músculos bíceps braquial, tibial anterior e sóleo, a frequência e área das fibras musculares I e II, em corte transversal
- Quantificar nos músculos bíceps braquial, tibial anterior e sóleo, fibras musculares íntegras e alteradas, além de componentes do interstício muscular.
- Demonstrar que o programa de treinamento físico na esteira pode ser utilizado como estratégia de proteção em ratos com isquemia cerebral induzida.

### **2.3) Objetivos específicos – Experimento II**

- Aplicar os testes passo em falso e barras paralelas após a oclusão da ACM e ao final do experimento, para avaliação do desempenho motor dos animais
- Determinar nos músculos bíceps braquial, tibial anterior e sóleo, a frequência e área das fibras musculares I e II, em corte transversal
- Quantificar nos músculos bíceps braquial, tibial anterior e sóleo, fibras musculares íntegras e alteradas, além de componentes do interstício muscular.

- Demonstrar que o programa de treinamento físico na esteira pode ser utilizado como estratégia de reabilitação motora em ratos com isquemia cerebral induzida.

### 3) MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1) Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, com 30 dias de idade e peso médio de 140g, obtidos no Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, CCB/UFV. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola) no BioEx (Laboratório de Biologia do Exercício) do Departamento de Educação Física, CCB/UFV, sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo (25<sup>o</sup>C e 12hs claro/12 hs escuro), com água e ração *ad libitum*. O trabalho teve início com a liberação dos animais pelo Biotério do CCB, quando os mesmos atingiram 30 dias de idade, sendo então transferidos para o BioEx. Foram realizados dois experimentos:

- Experimento I (Fig. 1)
- Experimento II (Fig. 2)

O experimento I (Fig. 1) foi realizado para avaliar os efeitos do exercício em esteira antes da indução da isquemia cerebral. O exercício teve a duração de seis semanas e a cirurgia de indução da isquemia foi realizada quando os animais estavam com 72 dias de idade. Após as cirurgias os animais não realizaram exercício em esteira. Para o experimento I foram estabelecidos os seguintes grupos:

- GRUPO CS (n=6): animais **controle** que foram submetidos à falsa cirurgia (operação sem a indução da isquemia cerebral) e que não praticaram exercício físico (**sedentários**)
  - GRUPO CEA (n=6): animais **controle exercitados** em esteira **antes** da falsa cirurgia;
  - GRUPO IS (n=6): animais **isquemiados sedentários**;
  - GRUPO IEA (n=6): animais **exercitados** em esteira **antes** da indução da **isquemia cerebral**.

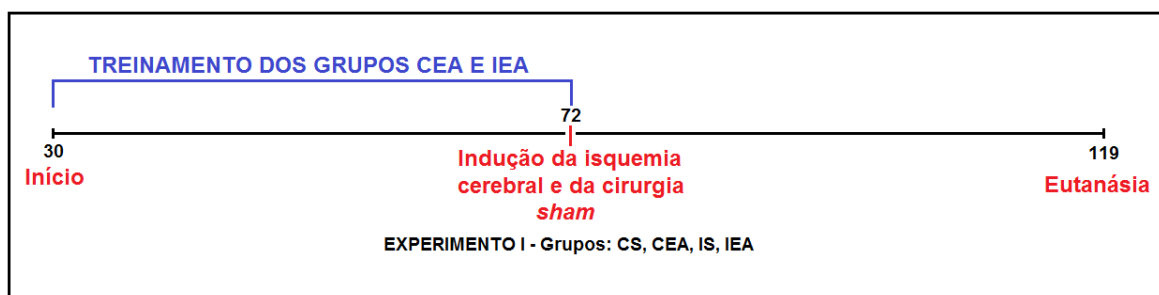


Figura 1 – Planejamento do experimento I, destacando-se os principais procedimentos realizados.

Já o experimento II (Fig. 2) consistiu na avaliação dos efeitos do exercício em esteira realizado a partir do quinto dia após a cirurgia de indução de isquemia cerebral (que ocorreu também aos 42 dias de idade). O exercício praticado após as cirurgias teve a duração de seis semanas. Antes das cirurgias os animais não foram exercitados. Para o experimento II, foram designados os seguintes grupos:

- GRUPO CS (n=6): animais **controle** que foram submetidos à falsa cirurgia (operação sem a indução da isquemia cerebral) e que não praticaram exercício físico (**sedentários**)
- GRUPO CED (n=6): animais **controle exercitados** em esteira **depois** da falsa cirurgia;
- GRUPO IS (n=6): animais **isquemiados sedentários**
- GRUPO IED (n=6): animais **exercitados** em esteira **depois** da indução da **isquemia** cerebral.

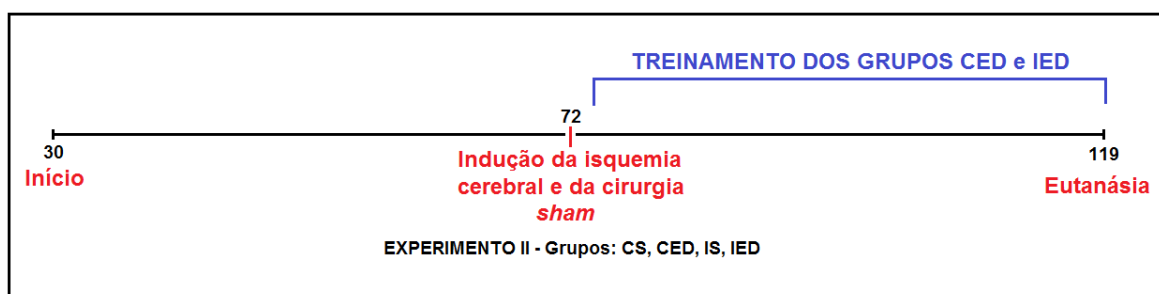


Figura 2 – Planejamento do experimento II, destacando-se os principais procedimentos realizados.

OBS: Na análise dos resultados do experimento II, os animais sedentários (grupos CS e IS) correspondem aos mesmos animais do experimento I.

A eutanásia dos animais de **todos os grupos dos dois experimentos** ocorreu quarenta e sete dias após a indução da isquemia cerebral (dia 119).

Os animais foram pesados no início do experimento e antes da eutanásia, utilizando-se balança digital de precisão com duas casas decimais.

Todos os procedimentos adotados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 32/2011).

### **3.2) Indução cirúrgica da isquemia cerebral**

A indução da isquemia cerebral foi realizada através da oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM), segundo método de Longa *et. al.* (1989).

A indução anestésica foi feita com isoflurano (Isoflurano<sup>®</sup> - Laboratório Abbott), por via inalatória a 4%, e para a manutenção anestésica, isoflurano, na concentração de 2,5% e oxigênio (1,5%). Administrou-se por via intraperitoneal, uma dose de atropina (5 mcg/100 g de peso do animal) para prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à estimulação mecânica do nervo vago durante o procedimento cirúrgico. Para cobertura antibiótica profilática foi administrado Pentabiótico Veterinário- Pequeno Porte<sup>®</sup> (Benzilpenicilina benzatina + Benzilpenicilina procaína + Benzilpenicilina potássica + Diidroestreptomicina + Estreptomicina), por via intramuscular (0,1 mL/rato).

Após tricotomia da região ventral cervical e subsequente assepsia com álcool iodado, realizou-se incisão sagital mediana, afastando-se os tecidos até que a bifurcação da artéria carótida comum (ACC) esquerda pudesse ser visualizada (Fig. 3A e 3B). Logo após, foi feito o clampeamento do ramo da artéria carótida interna (ACI) e da ACC. A artéria carótida externa (ACE) foi ligada com fio de algodão em sua porção distal e seccionada com auxílio de tesoura microftálmica. O fio de oclusão (Fig. 4) foi introduzido na ACE esquerda, sendo direcionado para o interior da ACI, (Fig. 3C). Para os animais submetidos à falsa cirurgia (controle), o fio de oclusão foi retirado da ACI e o fluxo sanguíneo liberado para o SNC. Para os animais isquemiados, o fio continuou a ser introduzido. Foram utilizados dois critérios para determinar se o fio de oclusão estava na origem da ACM: a inserção do fio a uma distância de 20-22 mm da bifurcação da ACC e/ou se houve uma discreta resistência à passagem do fio nessa determinada distância. O fio obstrutor foi mantido durante 60 minutos e durante este tempo, foram monitorados quaisquer

efeitos adversos, tais como parada cardíaca e respiratória, hipersecreção brônquica ou hipotermia.

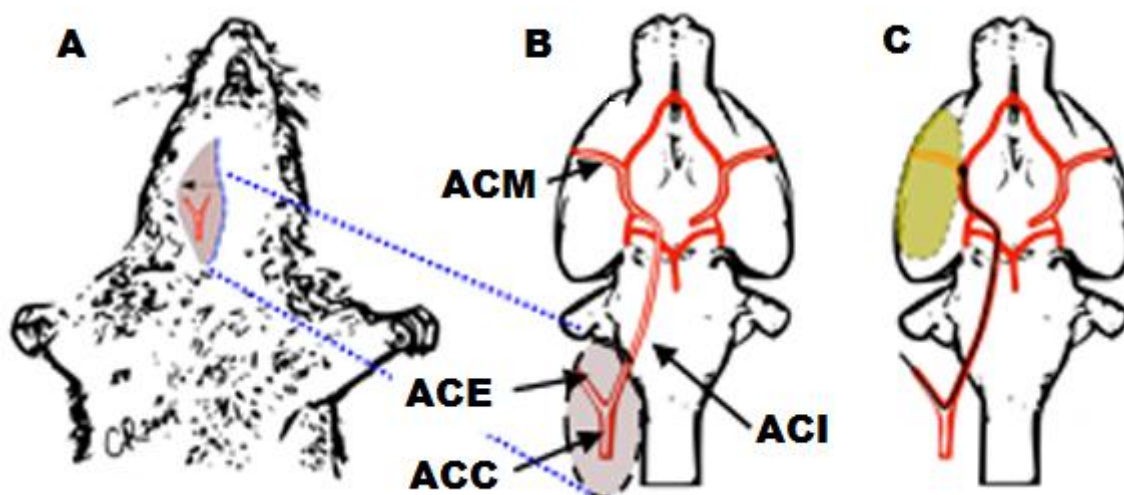


Figura 3 – Representação esquemática do processo de oclusão transitória da ACM. A – Visão geral demonstrando a bifurcação da ACC. B – Detalhe mostrando a ACE, ACI e ACM. C – Detalhe mostrando o fio de oclusão introduzido pela ACE, passando pela ACI e chegando à origem da ACM. ACM (artéria cerebral média); ACC (artéria carótida comum); ACE (artéria carótida externa); ACI (artéria carótida interna). Fonte: Adaptação de Khanna *et. al.* (2005).



Figura 4 – Fio de oclusão, utilizado na indução da isquemia cerebral, feito de nylon 5-0, com diâmetro de 0,12mm, comprimento de 30 mm e recoberto por silicone em sua extremidade. A parte recoberta pelo silicone (à esquerda na figura) apresenta 0,33 mm de diâmetro e aproximadamente 5 mm de comprimento. Fonte: *Docol Corporation*

Após a retirada do fio de oclusão, a porção da ACE proximal à bifurcação da ACC foi ligada com fio de algodão, e a incisão cirúrgica foi suturada com fio de Nylon 3-0. Durante o procedimento cirúrgico, a temperatura corporal foi mantida entre 36 a 38°C, com o animal sobre colchão térmico.

Os animais foram mantidos durante as primeiras duas horas após a cirurgia, sob luz quente para a manutenção da normotermia. Apenas, no primeiro dia pós-cirúrgico, o fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente ao invés de serragem. Até o quarto dia pós-operatório, cada rato recebeu, por via intraperitoneal, uma dose diária de 3mL de soro fisiológico para reposição iônica.

### 3.3) Critérios de inclusão quanto ao desempenho motor

Entre 24 e 48 horas após a indução da isquemia cerebral, os animais foram classificados quanto ao desempenho motor de acordo com índice de gravidade de **zero** a **quatro** (Menzies *et. al.*, 1992). O valor **zero** significou ausência de déficit aparente; **um**: flexão da pata anterior direita; **dois**: diminuição da preensão da pata direita quando suspenso pela cauda; **três**: movimentação espontânea para todas as direções, mas movimento circular para a esquerda, quando suspenso pela cauda e **quatro**: movimento circular espontâneo para a esquerda. Os animais isquemiados que apresentaram índices **três** e **quatro** foram incluídos no experimento.

Após a recuperação, os animais permaneceram em observação durante 1 semana e logo depois foi iniciado o programa de treinamento na esteira rolante.

### 3.4) Aplicação dos testes funcionais

Para a avaliação do desempenho motor dos animais foram adotados os seguintes testes: passo em falso e barras paralelas. O primeiro teste (passo em falso) foi utilizado para mensurar a coordenação motora das patas anteriores. Os animais foram colocados sobre uma grade de 100 cm x 50 cm e subdivisões de 3 x 3 cm suspensa a 50 cm de altura (Fig. 5). A correta colocação das patas foi analisada por 3 minutos. Considerou-se erro toda vez que o animal falhou em pegar a grade e a pata anterior direita passou por entre o espaço vazio de 9 cm<sup>2</sup>.



Figura 5 – Rato durante realização do teste passo em falso.

O teste nas barras paralelas foi utilizado com o intuito de mensurar a coordenação motora das patas posteriores. O artefato para aplicação desse teste

(Fig. 6) consiste em duas plataformas de madeira (30 cm x 20 cm e 40 cm de altura) unidas por duas barras de metal paralelas com comprimento de 115 cm e com uma distância de 2,5 cm entre as duas barras. O teste foi realizado durante 5 minutos, sendo aplicado estímulo aversivo (choque) na plataforma para forçar o animal a se deslocar. Considerou-se erro nas seguintes situações: quando o animal colocava as duas patas na mesma barra, e quando a pata passava entre as duas barras ou por fora.



Figura 6 – Rato durante realização do teste das barras paralelas.

Os dois testes foram aplicados no início do experimento para confirmar que os animais não apresentavam comprometimento motor. No experimento I os animais foram avaliados antes das cirurgias (falsa cirurgia e de indução da isquemia), quatro dias após as cirurgias e antes da eutanásia. No experimento II, os animais foram avaliados quatro dias após as cirurgias e após a última sessão de treinamento. Os testes funcionais foram realizados sempre a partir das 17h30min. Os animais foram levados para sala de avaliação uma hora antes da aplicação dos testes, que foram realizados sempre na seguinte ordem: passo em falso e barras paralelas.

### **3.5) Treinamento na esteira rolante**

O programa de treinamento em esteira rolante (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP) foi realizado durante seis semanas, sendo que a primeira semana foi destinada à adaptação dos animais ao exercício e consistiu na seguinte programação:

- Dia 1: velocidade - 10m/min; tempo - 10 min; inclinação - 0°
- Dia 2: velocidade - 10m/min; tempo - 10 min; inclinação - 3°
- Dia 3: velocidade - 11m/min; tempo - 11 min; inclinação - 3°
- Dia 4: velocidade - 11m/min; tempo - 11 min; inclinação - 5°
- Dia 5: velocidade - 12m/min; tempo - 12 min; inclinação - 5°

No experimento I, após a primeira semana de adaptação, os animais realizaram o treinamento durante cinco semanas a uma velocidade de 14m/min (adaptado de Zhang *et. al.* 2010), 5 dias por semana.

No experimento II, o protocolo de treinamento após as cirurgias (falsa cirurgia e de indução da isquemia) teve início no 5° dia pós-operatório. O treinamento durou seis semanas, no qual os ratos correram por 30 minutos/dia na esteira rolante sem inclinação, durante cinco dias por semana, com velocidade controlada de 8m/min.

Os animais sedentários exercitaram na esteira uma vez por semana e durante 5 minutos, a uma velocidade de 5m/min, para simular as mesmas condições de estresse dos animais exercitados.

### **3.6) Eutanásia e coleta do material**

Foi injetado no animal, por via intramuscular, 0,2mL de cloridrato de xilazina e 0,3mL de cloridrato de quetamina. Em seguida, o animal foi transferido para uma câmara fechada contendo algodão embebido em éter etílico. Após este processo, o animal foi acomodado em decúbito ventral para dissecação e coleta dos músculos bíceps braquial, sóleo e tibial anterior do lado direito (lado parético nos animais isquemiados). Cada músculo foi seccionado em vários fragmentos de maneira a obter amostras que foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2-7.4, e amostras que foram rapidamente congeladas em N-Hexana, a -70°C, previamente resfriada em nitrogênio líquido. Este tratamento com N-Hexana promove o congelamento rápido do material, evitando a formação de cristais de gelo no tecido.

Os fragmentos fixados em paraformaldeído foram submetidos ao processamento para inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin®), enquanto os fragmentos congelados em n-Hexana foram armazenados em *ultra-freezer*, a -80°C,

para posterior obtenção de cortes em criostato que foram submetidos à reação histoquímica da Succino-Desidrogenase (SDH).

### **3.7) Microscopia de luz**

Após fixação, durante 24 horas, em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2-7.4, os fragmentos musculares foram armazenados em solução de álcool etílico a 70%. Posteriormente, estes fragmentos foram desidratados em soluções de concentração crescente de etanol: 70°, 80°, 90°, 95° e 100° GL para impregnação e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin<sup>®</sup> Leica)

A microtomia foi realizada em micrótomo rotativo Leica<sup>®</sup>, modelo RM2255, obtendo-se secções transversais de 4 µm de espessura, semi-seriados, com intervalo mínimo entre cortes de 40 µm. As secções foram coradas com solução de Azul de Toluidina + Borato de Sódio.

### **3.8) Histoquímica para enzima Succino-Desidrogenase (SDH)**

De cada fragmento muscular, previamente congelado em n-Hexana, foram obtidas secções transversais seriadas de 12 µm de espessura no criostato LEICA<sup>®</sup>, modelo CM1850, a -20°C. As secções foram colhidas em lâminas histológicas para a reação da enzima succino-desidrogenase (SDH), de acordo com o método descrito por Sheehan & Hrapchak (1987). A enzima SDH é uma flavoproteína mitocondrial que catalisa a oxidação do ácido succínico em ácido fumárico. A demonstração histoquímica da atividade da SDH é feita em presença do succinato (substrato) e um indicador redox (tetrazólio). Durante a reação, o tetrazólio é convertido em formazana (composto insolúvel de coloração azul marinho, que se precipita dentro das mitocôndrias). As fibras do tipo I têm mais mitocôndrias e, por conseguinte, apresentam intensa positividade à reação da SDH em comparação às fibras do tipo II (Fig. 6).

Durante a reação para SDH, as lâminas contendo os cortes foram mantidas em ambiente úmido, numa placa de Petri contendo um disco de papel filtro umedecido com água destilada. Os cortes foram cobertos com o meio de incubação constituído de tampão fosfato 0,2M + succinato de sódio + *nitro blue tetrazolio*

(NBT), a 37°C por 60 minutos. Em seguida os cortes foram tratados com soluções de acetona a 90, 60 e 30% e efetuada a montagem das preparações com meio hidrofílico (Xarope de Apathy).

### **3.9) Captura de imagens e análise morfométrica**

Após microscopia preliminar das preparações histológicas e histoquímicas (SDH), foi realizada a captura de imagens, utilizando-se o programa QC CAPTURE (versão 3.1 para Windows) e o sistema composto de câmera digital Olympus QColor-3<sup>®</sup> (Tóquio-Japão) acoplada ao microscópio Olympus<sup>®</sup>, modelo BX-60.

Nos cortes submetidos à reação histoquímica para SDH dos músculos bíceps braquial e tibial anterior, foram capturadas três imagens microscópicas da região superficial (rica em fibras do tipo II) e três imagens da região profunda (rica em fibras do tipo I) de cada músculo/animal. Para o músculo sóleo, rico em fibras do tipo I e que não apresenta regionalização de fibras I e II, foram capturadas três imagens não coincidentes/animal. Já, nos cortes corados com Azul de Toluidina+Borato de Sódio, foram capturadas cinco imagens não coincidentes por músculo/animal.

A análise histomorfométrica das imagens capturadas foi realizada com o auxílio do programa de análise de imagem (*Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows 98) e consistiu na determinação da frequência e da área das fibras musculares I e II nos cortes submetidos à reação para SDH (Fig. 7). A frequência das fibras foi expressa em porcentagem. Para determinação da área das fibras, foram mensuradas 50 células, aleatoriamente, em corte transversal, por tipo (I,II)/músculo/animal. Os valores de área foram expressos em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ).

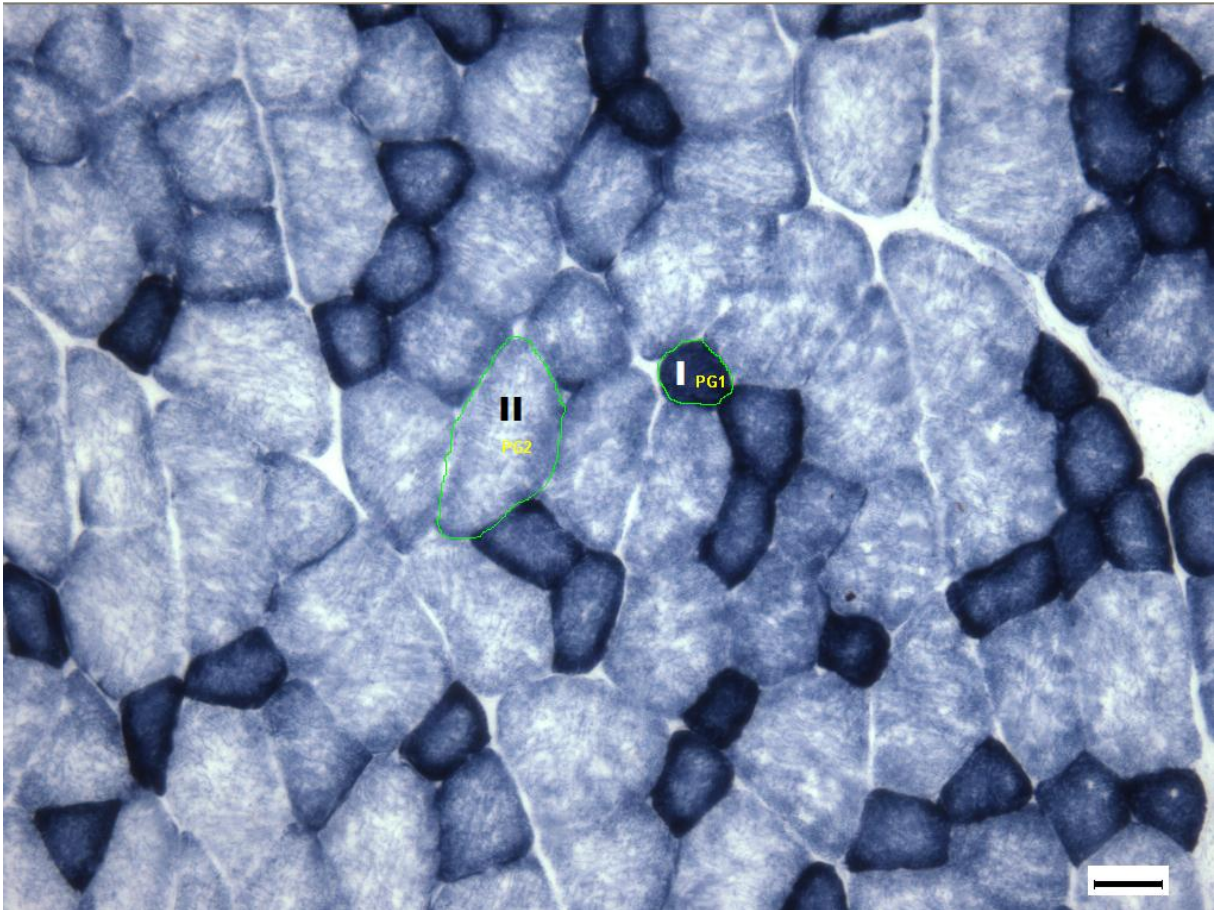


Figura 7 – Secção histológica da região superficial do bíceps braquial de um rato do grupo controle sedentário (CS) após reação com a SDH. Imagem obtida do programa *Image Pro Plus* mostrando a identificação dos tipos de fibras e a mensuração da área destas fibras. I: Fibra tipo I; II: Fibra tipo II; PG1: área da fibra do tipo I; PG2: área da fibra do tipo II. Barra: 40  $\mu\text{m}$ .

Nos cortes corados com Azul de Toluidina+Borato de Sódio, a histomorfometria envolveu a quantificação dos seguintes constituintes: fibras musculares íntegras; fibras musculares com alterações citológicas (fibras anguladas, núcleos deslocados para o centro, fibras com vacuolização citoplasmática); núcleos de fibras musculares em posição subsarcolemal e deslocados para o centro; interstício muscular e outros elementos (vasos sanguíneos, mastócitos e leucócitos). Para esse fim, foi aplicado um sistema teste com 225 pontos (gradícula com 225 intersecções) sobre cada uma das cinco imagens capturadas, totalizando 1125 pontos/músculo/animal (Fig. 8). A área analisada por imagem corresponde a 94000  $\mu\text{m}^2$ . Portanto a área total analisada por músculo por animal correspondeu a 470000  $\mu\text{m}^2$ . Os valores encontrados nesta análise histomorfométrica foram expressos em porcentagem.

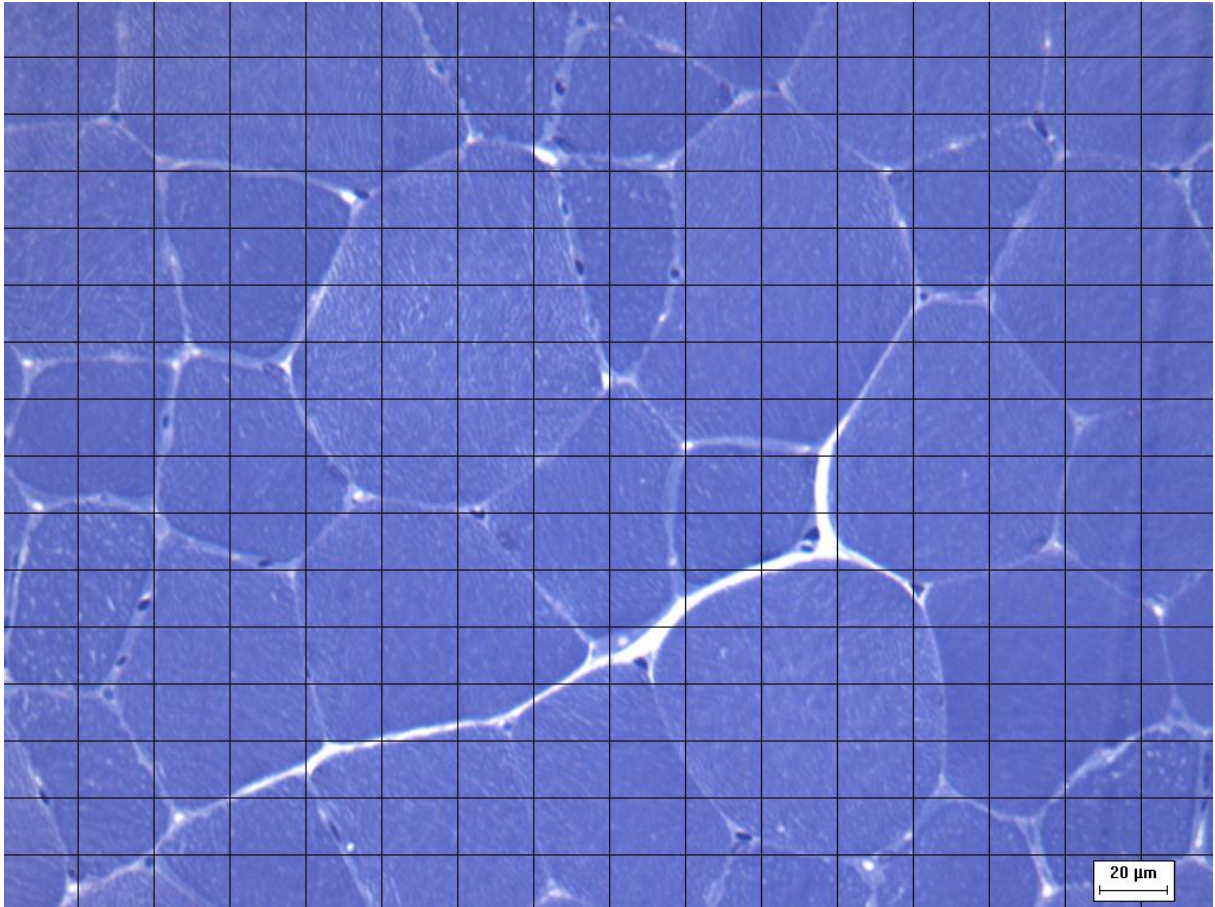


Figura 8 – Imagem da gradícula gerada no programa *Image Pro Plus* e aplicada sobre imagem microscópica do músculo tibial anterior, em corte transversal. A quantificação gerada a partir dessa disposição consistiu na contagem de intersecções coincidentes com cada um dos constituintes (fibras musculares íntegras e alteradas, elementos do interstício muscular, entre outros). Coloração: Azul de Toluidina + Borato de sódio. Barra: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.10) Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de significância, através do software STATISTICA em ambiente Windows 98. Os valores obtidos foram representados através de suas médias  $\pm$  desvio-padrão.

## 4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EXPERIMENTO I

#### 4.1) Peso corporal dos animais

Os valores médios referentes ao peso corporal inicial e final dos animais estão representados na Fig. 9.

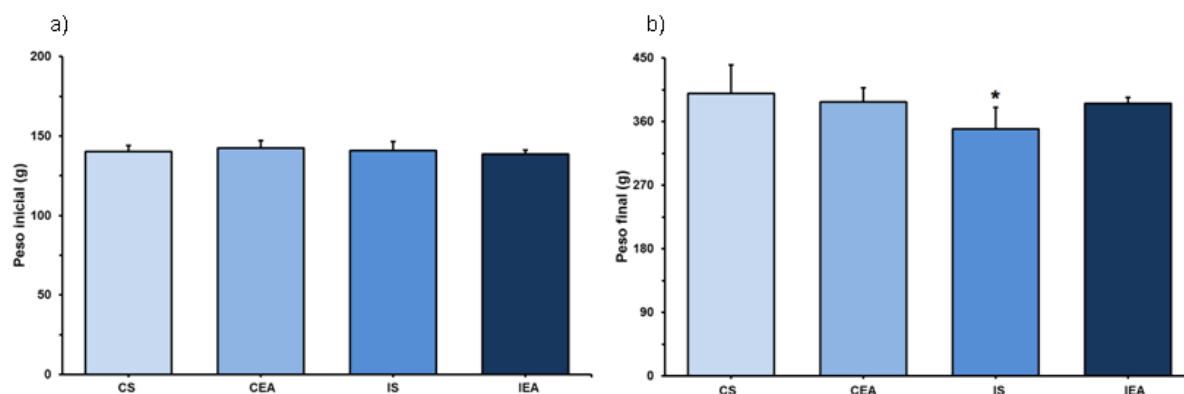


Figura 9 – Gráficos mostrando o peso dos animais. a) Peso no início do experimento; b) Peso no final do experimento, \*  $P < 0,05$  vs grupo CS. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Não foi observada diferença significativa, entre os grupos com relação ao peso dos animais no início do experimento (Fig. 9a) (CS:  $140,29 \pm 3,62$ ; CEA:  $142,40 \pm 4,66$ ; IS:  $140,95 \pm 5,56$ ; IEA:  $138,70 \pm 2,37$ ). Ao final do experimento (Fig. 9b) foi observado menor peso dos animais isquemiados sedentários (IS:  $349,38 \pm 30,89$ ) em relação aos animais controle sedentários (CS:  $399,69 \pm 40,85$ ). Entre os demais grupos não houve diferença no peso final (CEA:  $387,76 \pm 20,19$ ; IEA:  $385,86 \pm 8,37$ ).

Modo *et. al.* (2000) e Choe *et. al.* (2004) relataram que animais isquemiados apresentam menor taxa de ingestão diária de ração após a cirurgia de OACM quando comparados aos animais controle. Conseqüentemente observaram que os animais isquemiados, na primeira semana após OACM, apresentaram peso corporal significativamente menor em relação ao grupo controle. Neste trabalho, ao final do período experimental (45 dias após as cirurgias), os animais do grupo IEA recuperaram o peso, indicando um possível efeito estimulador da atividade física sobre o consumo alimentar destes animais. Choe *et. al.* (2006) também constataram

aumento do peso de ratos com isquemia cerebral e submetidos ao exercício físico 48 horas após a indução da isquemia

## 4.2) Testes funcionais

Os valores médios dos erros cometidos pelos animais no teste passo em falso e nas barras paralelas estão representados na Fig. 10.

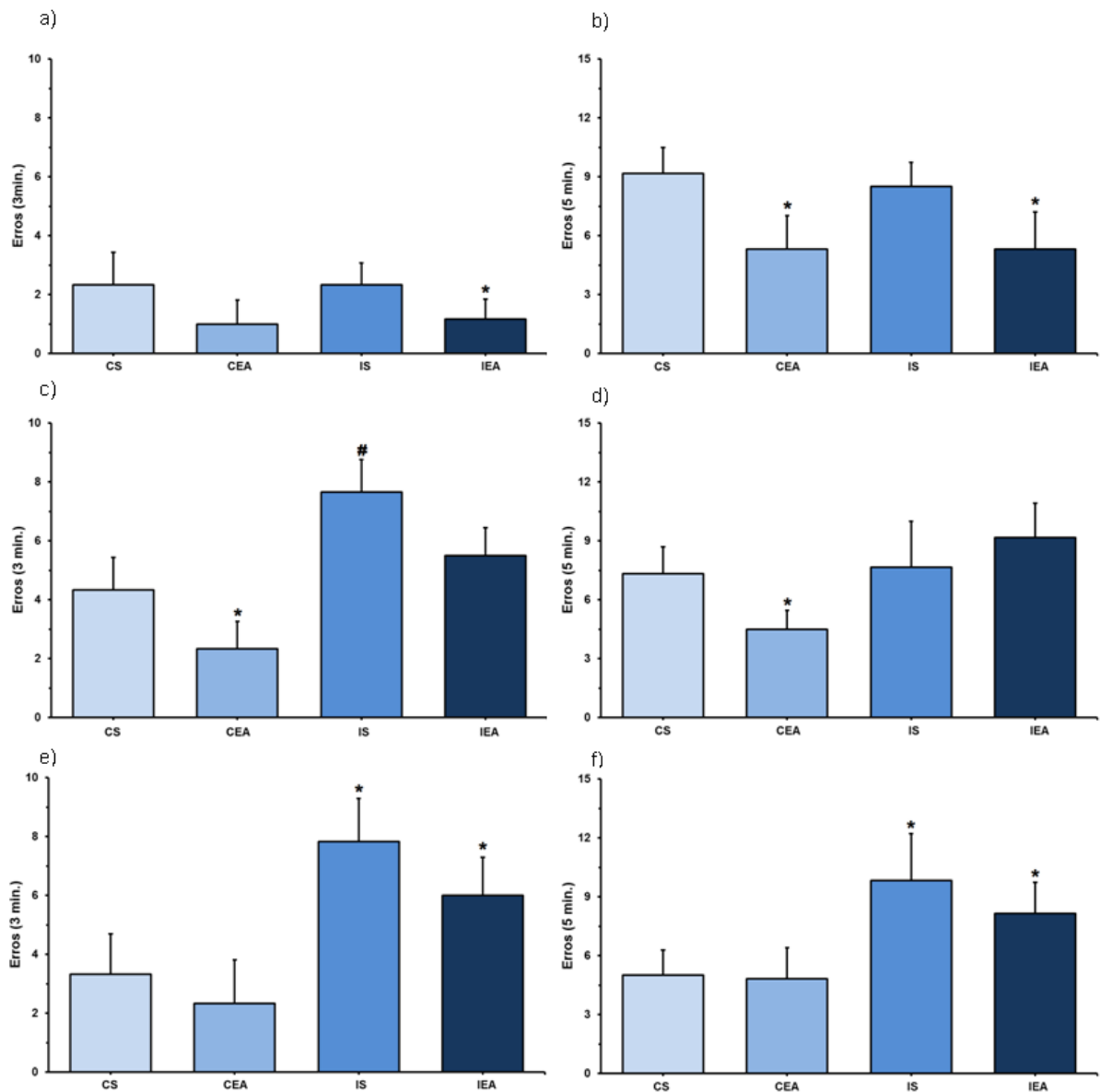


Figura 10 - Erros (valores médios) cometidos pelos animais antes (a,b) e após (c,d) os procedimentos cirúrgicos e antes da eutanásia (e,f). a) Teste passo em falso. \*P<0,05 vs grupo CS; b) Barras paralelas. \* P<0,05 vs grupos CS e IS. c) Teste passo em falso. \*P<0,05 vs demais grupos. #P<0,05 vs grupos CS e IEA; d) Barras paralelas. \* P<0,05 vs demais grupos; e) Teste passo em falso. \*P<0,05 vs grupos controle; f) Barras paralelas. \*P<0,05 vs grupos controle. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Antes dos procedimentos cirúrgicos, para o teste passo em falso (Fig. 10a) foi observado menor número de erros cometidos pelos animais do grupo IEA ( $1,16 \pm 0,68$ ) em relação ao grupo CS ( $2,33 \pm 1,10$ ). Em relação aos demais grupos não houve diferença significativa (CEA:  $1,00 \pm 0,81$  e IS:  $2,33 \pm 0,74$ ). Nas barras paralelas (Fig. 10b) os animais que foram treinados (CEA:  $5,33 \pm 1,69$  e IEA:  $5,33 \pm 1,88$ ) apresentaram menor número de erros quando comparados aos animais sedentários (CS:  $9,16 \pm 1,34$  e IS:  $8,50 \pm 1,25$ ).

Yang *et. al.* (2012) afirmaram que a atividade física, além de neuroprotetora, está relacionada à angiogênese no núcleo estriado (área comprometida pela OACM), determinando melhora significativa na função motora de ratos. A redução no número de erros observadas nos grupos ESH e EI do presente estudo corroboram os dados de Yang *et. al.* (2012).

Os valores médios dos erros cometidos pelos animais no teste passo e nas barras paralelas após a cirurgia estão representados na Fig. 10c e 10d. Para o teste passo em falso (Fig. 10c) observou-se menor número de erros cometidos pelos animais controle exercitados (CEA:  $2,33 \pm 0,94$ ) em relação aos demais grupos (CS:  $4,33 \pm 1,10$ ; IS:  $7,66 \pm 1,10$  e IEA:  $5,50 \pm 0,95$ ), bem como maior número de erros no grupo isquemiado sedentário (IS) em relação ao grupo controle sedentário (CS) e ao grupo isquemiado exercitado (IEA). O melhor desempenho do grupo CEA deve-se, além dos efeitos da atividade física, aos efeitos do comprometimento motor dos animais com isquemia cerebral. Se comparados apenas os animais controle, o grupo CEA teve redução significativa em relação ao grupo CS, confirmando que realmente a atividade física promove melhoria no desempenho motor dos animais. Em relação aos animais que tiveram a oclusão da ACM, o grupo IEA apresentou redução significativa no número de erros cometidos em relação aos animais sedentários do grupo IS, confirmando o efeito neuroprotetor do exercício físico. Quando comparados os grupos CEA e IEA percebe-se maior número de erros cometidos pelos animais isquemiados durante a realização do teste, devido aos efeitos da isquemia sobre o desempenho motor dos animais.

Para o teste das barras paralelas (Fig. 10d), nota-se que os animais controle exercitados (CEA:  $4,50 \pm 0,95$ ) apresentaram menor número de erros cometidos em relação aos demais grupos (CS:  $7,33 \pm 1,37$ ; IS:  $7,66 \pm 2,35$  e IEA:  $9,16 \pm 1,77$ ). Em relação ao grupo isquemiado sedentário (IS), era esperada um melhor desempenho

dos animais isquemiados exercitados (IEA). Os dados indicam que o treinamento promoveu benefícios no desempenho dos animais controle exercitados ao atravessarem as barras e que, a cirurgia de oclusão da ACM gerou déficits motores nas patas posteriores dos animais isquemiados, sendo que o exercício praticado pelo grupo IEA não foi capaz de garantir um melhor desempenho em relação ao grupo IS.

Ding *et. al.* (2002) mostraram que os efeitos da oclusão da ACM estão presentes desde o 5<sup>o</sup> até o 28<sup>o</sup> dia após a reperfusão. Tanto para o teste do passo em falso, quanto para as barras paralelas. Estes autores demonstraram que o comprometimento motor dos membros anterior e posterior foi significativamente maior nos animais isquemiados. Modo *et. al.* (2000) e Encarnacion *et. al.* (2011) também encontraram resultados semelhantes para o teste passo em falso na primeira semana após a reperfusão, sendo que os animais com oclusão da ACM apresentaram mais erros em relação aos animais controle. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados pelos referidos autores, sendo que os animais isquemiados apresentaram maior número de erros em ambos os testes (Fig. 10c e 10d), porém, com maior grau de comprometimento da pata anterior com consequente aumento no número de erros no teste passo em falso (Fig. 10c).

Marin *et. al.* (2003) relatam que o exercício físico, além de reduzir a área de infarto cerebral nos animais que sofreram oclusão da ACM, produziu efeitos significativos no desempenho motor e coordenação dos animais que se exercitaram. Houve, como em nosso trabalho, uma redução significativa no número de erros cometidos no teste passo em falso pelos animais que foram treinados (Fig. 10c). Acreditamos que o exercício esteja relacionado a uma recuperação mais acelerada, devido à influência da atividade física sobre a recuperação de lesões cerebrais secundárias (área de penumbra), fato confirmado pela análise da área de infarto do encéfalo dos animais deste trabalho, onde encontramos uma redução significativa na área da lesão cerebral nos animais treinados em esteira (DAMÁZIO *at. al.*, 2012).

Os valores médios dos erros cometidos pelos animais no teste passo em falso e nas barras paralelas antes da eutanásia estão representados na Figs. 10e e 10f. No teste passo em falso (Fig. 10e), houve maior número de erros cometidos pelos animais isquemiados (IS: 7,83±1,46 e IEA: 6,00±1,29) em relação aos animais controle (CS: 3,33±1,37 e CEA: 2,33±1,49), assim como nas barras paralelas (Fig.

10f), onde os animais isquemiados apresentaram pior rendimento (IS:  $9,83 \pm 2,40$  e IEA:  $8,16 \pm 1,57$  vs CS:  $5,00 \pm 1,29$  e CEA:  $4,83 \pm 1,57$ ). O programa de treinamento antes das cirurgias não foi suficiente para garantir melhor desempenho dos animais treinados ao fim do experimento, uma vez que o menor número de erros visto nos animais treinados (CEA e IEA) em relação aos animais sedentários (CS e IS) não foi significativo.

Mesmo seis semanas após a cirurgia de OACM, os animais isquemiados apresentaram comprometimento motor das patas anteriores e posteriores, mostrando que não houve recuperação. Nossos dados permanecem de acordo com o encontrado por Ding *et. al.* (2002), onde, até o 28<sup>o</sup> dia após a reperfusão, eles notaram que não houve melhora espontânea dos animais isquemiados, e que estes cometeram mais erros nos testes passo em falso e barras paralelas.

#### **4.3) Frequência de fibras musculares tipo I e II**

A frequência das fibras musculares foi determinada com a finalidade de detectar possíveis alterações provocadas pela isquemia cerebral no padrão de distribuição destas fibras (Fig. 11). Inúmeros trabalhos vêm utilizando esta metodologia, mas, este trabalho foi inédito por contemplar os efeitos do exercício prévio sobre os músculos bíceps braquial, sóleo e tibial anterior. Para o caso do bíceps braquial, um músculo afetado pela isquemia cerebral, até o momento não existem na literatura trabalhos que analisem os efeitos da lesão isquêmica neste músculo, tampouco os efeitos do exercício físico sobre o mesmo.

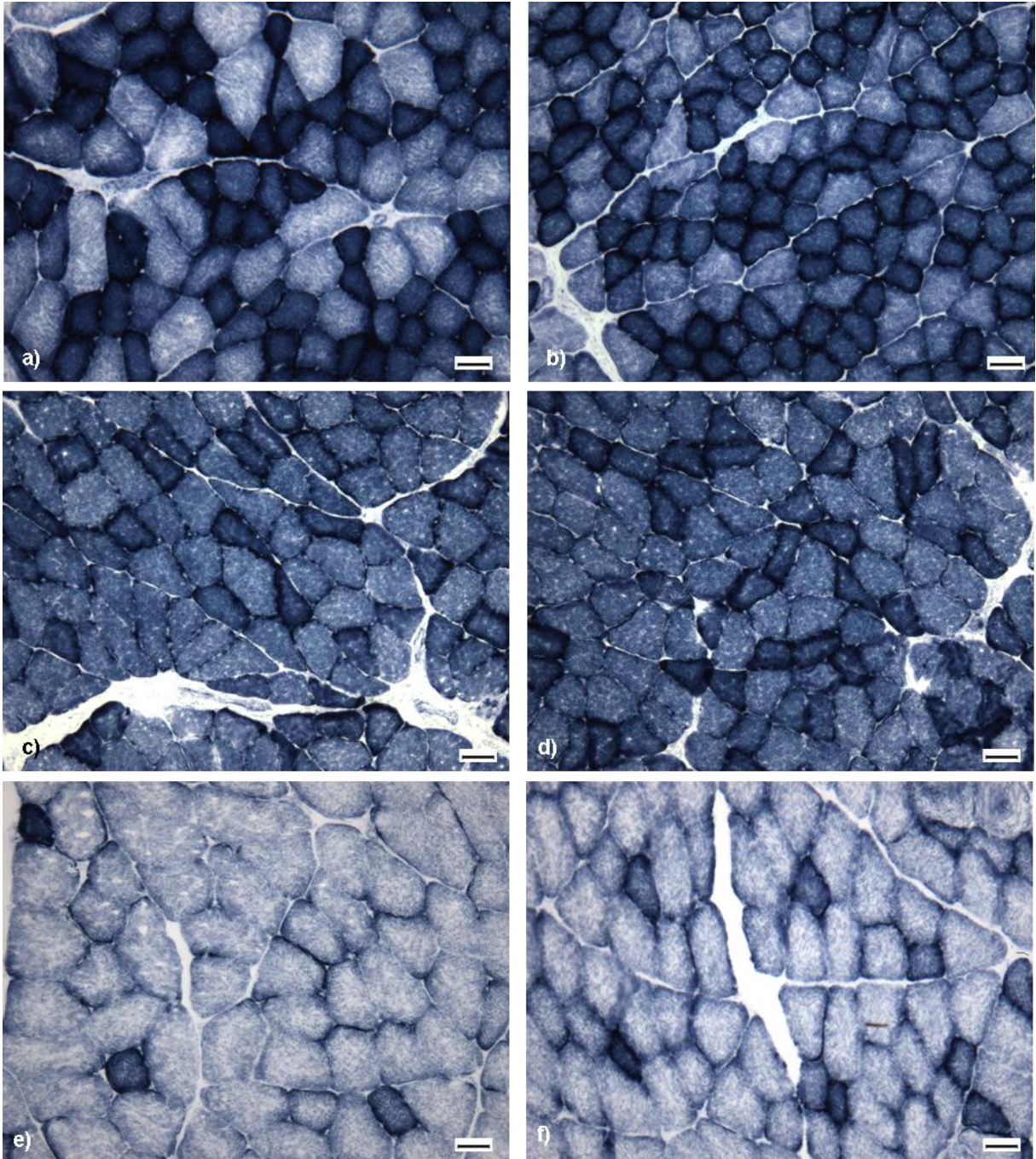


Figura 11 - Fibras musculares de animais controle sedentários (a,c,e) e animais isquemiados sedentários (b,d,f), em corte transversal, após reação da SDH. a) e b) Região profunda do bíceps braquial; c) e d) Regiões não coincidentes do sóleo; e) e f) Região superficial do tibial anterior. Notar o aumento na frequência das fibras tipo I nos animais isquemiados e a visível redução na área das fibras tipo I e tipo II nos animais isquemiados em relação aos animais controle. Barra: 40  $\mu$ m.

#### 4.3.1) Bíceps braquial

O bíceps braquial de ratos é um músculo que apresenta duas regiões morfológicamente distintas: a região superficial e a região profunda. Na região

superficial há um predomínio de fibras tipo II e na região profunda prevalecem as fibras tipo I. Os valores médios referentes à frequência das fibras tipo I e tipo II nas regiões do bíceps braquial estão apresentados na Fig. 12.

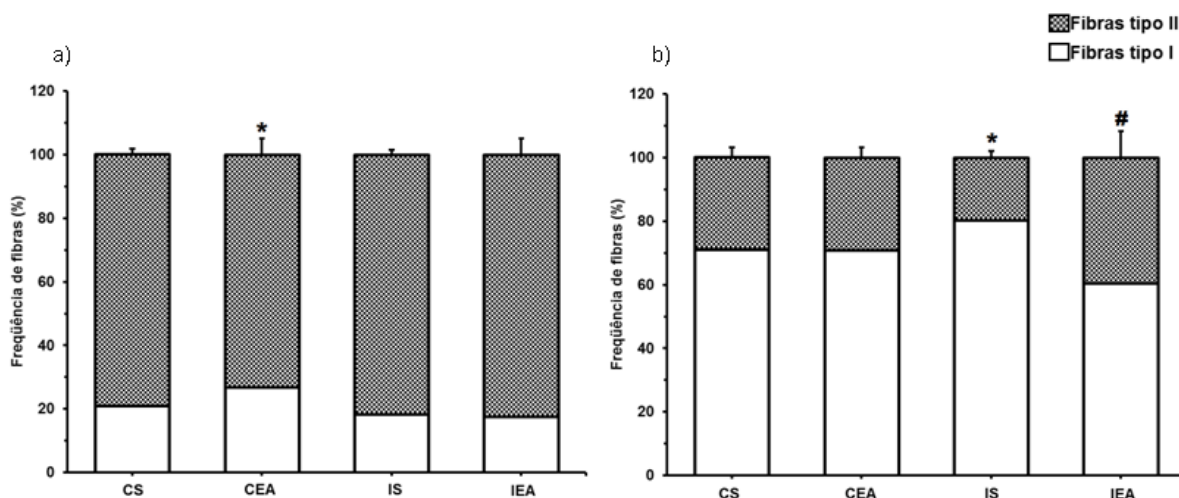


Figura 12 - Frequência de fibras tipo I e tipo II no bíceps braquial. a) Região superficial. \*P<0,05 vs demais grupos; b) Região profunda. \*P<0,05 vs demais grupos, # P<0,05 vs demais grupos. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Na região superficial do bíceps braquial (Fig. 12a), houve maior frequência de fibras tipo I (com conseqüente redução na frequência de fibras tipo II) no grupo controle exercitado (CEA: 26,79±5,20) em relação aos demais grupos (CS: 20,88±1,99; IS: 18,34±1,59 e IEA: 17,48±5,22).

Na região profunda do bíceps braquial (Fig. 12b), observou-se maior frequência das fibras tipo I nos animais isquemiados sedentários (IS: 80,28±2,12) em relação aos demais grupos (CS: 71,12±3,27; CEA: 70,88±3,22 e IEA: 60,43±8,34), bem como menor frequência das fibras tipo I (com conseqüente aumento na frequência de fibras tipo II) no grupo IEA em relação aos grupos controle (CS e CEA).

Scherbakov & Doehner (2011) afirmaram que o músculo esquelético apresenta elevado potencial adaptativo, ainda que os mecanismos de atrofia e mudança de fenótipo após a isquemia cerebral não sejam totalmente conhecidos. Relatam ainda que em pacientes que sofreram isquemia cerebral pode haver aumento na isoforma da MHC tipo II e decréscimo na isoforma MHC tipo I. Porém, esses resultados são bastante controversos, pois diversos trabalhos não têm apresentado uma diferença significativa na proporção entre fibras tipo I e tipo II (Choe *et. al.*, 2006). Na região superficial do bíceps braquial não houve diferença na

frequência de fibras entre animais controle e isquemiados. Houve diferença apenas entre animais treinados e animais sedentários. Na região profunda do bíceps braquial observamos maior frequência das fibras tipo II apenas no grupo isquêmico treinado (IEA).

#### 4.3.2) Sóleo

Os valores médios referentes à frequência das fibras tipo I e tipo II no sóleo estão apresentados nas Fig. 13.

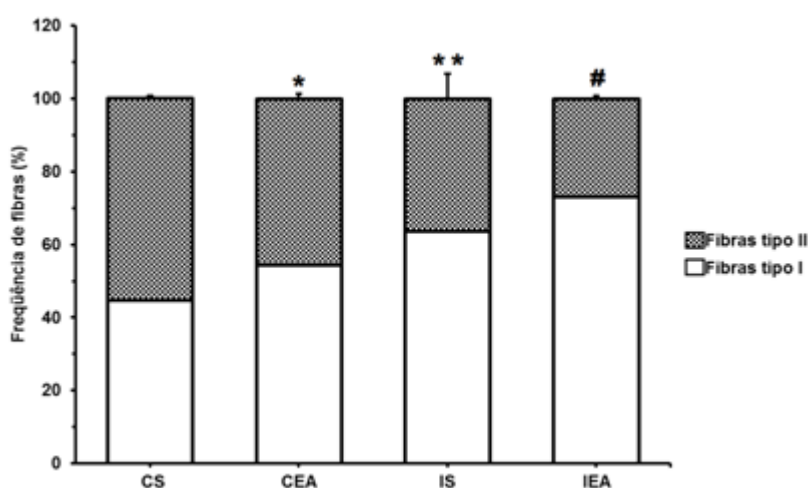


Figura 13 - Frequência de fibras tipo I e tipo II no sóleo. \*P<0,05 vs grupo CS. \*\* P<0,05 vs grupos controle. # P<0,05 vs demais grupos. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Observou-se maior frequência de fibras tipo I nos animais que foram submetidos ao treinamento físico, bem como nos animais que tiveram a oclusão da ACM. Os grupos isquemiados (IS: 63,67±6,86 e IEA: 73,08±0,79) apresentaram maior proporção de fibras tipo I em relação aos grupos controle (CS: 44,68±0,87 e CEA: 54,49±1,30), assim como os animais treinados (CEA: 54,49±1,30 e IEA: 73,08±0,79) em relação aos animais sedentários (CS: 44,68±0,87 e IS: 63,67±6,86).

Embora ainda não seja consenso, alguns estudos têm demonstrado que pode haver decréscimo na proporção de fibras tipo II (com conseqüente aumento nas fibras tipo I) no sóleo de animais isquemiados. Lee *et. al.* (2012) demonstraram aumento na frequência de fibras tipo I nos animais que sofreram a indução cirúrgica da isquemia cerebral por meio da oclusão mecânica da ACM. Chang *et. al.*(2010) relataram decréscimo na frequência de fibras tipo II nos animais isquemiados em

relação aos animais controle. Nossos dados estão de acordo com o relatado por Lee *et. al.* (2012) e Chang *et. al.*(2010), uma vez que houve aumento na proporção de fibras tipo I (e conseqüente redução de fibras tipo II) nos animais isquemiados em relação aos animais controle.

Yan *et. al.* (2011), Simoneau *et. al.*(1985) e Green *et. al.*(1979) relatam que o exercício físico pode determinar aumento na proporção de fibras tipo I no músculo esquelético, porém, apenas nos casos em que o exercício é praticado por grandes períodos de tempo, como no caso de atletas que realizam exercício extremamente intenso por anos. Em nosso experimento foi utilizado um protocolo de exercício de intensidade moderada, por período de tempo relativamente longo, onde, o exercício pode ter ocasionado o aumento na proporção de fibras tipo I dos grupos treinados.

### 4.3.3) Tibial anterior

O tibial anterior de ratos, assim como o bíceps braquial, é um músculo que apresenta duas regiões morfologicamente distintas: a região superficial com predomínio de fibras tipo II e a região profunda com predomínio de fibras tipo I. Os valores médios referentes à frequência das fibras tipo I e tipo II nas diferentes regiões do tibial anterior estão apresentados na Fig. 14.

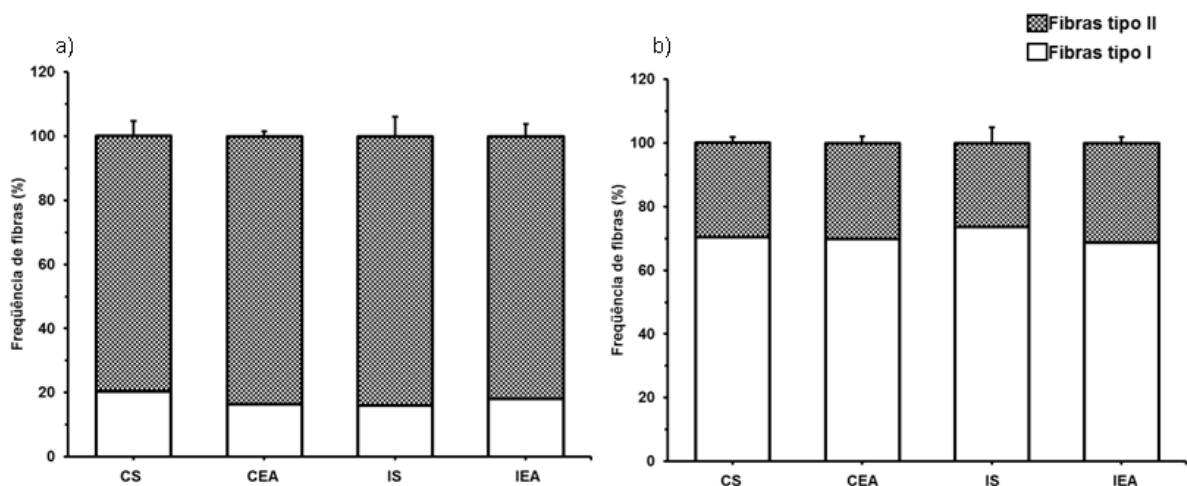


Figura 14 - Frequência de fibras tipo I e tipo II no tibial anterior. a) Região superficial; b) Região profunda. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Tanto na região superficial (Fig. 14a) – fibras tipo I – CS: 20,38±4,67; CEA: 16,34±1,49; IS: 15,93±6,11 e IEA: 18,17±3,81 – quanto na região profunda (14b) –

fibras tipo I - CS:  $70,42 \pm 2,01$ ; CEA:  $69,86 \pm 2,05$ ; IS:  $73,66 \pm 4,86$  e IEA:  $68,79 \pm 1,96$  – não foi observada diferença significativa no padrão das fibras musculares.

Snow *et. al.* (2012) em modelos de indução de isquemia cerebral por hemorragia no estriato, também não encontraram diferença significativa na distribuição de fibras tipo I e tipo II nas regiões profunda e superficial do tibial anterior de ratos exercitados. Chang *et. al.* (2010), relatam, entretanto, que ratos submetidos à oclusão da ACM apresentaram redução significativa na porcentagem de fibras tipo II no tibial anterior, assim como Scelci *et. al.* (1984), que, em biópsias do músculo tibial anterior de pacientes com isquemia cerebral, verificaram redução significativa nas fibras do tipo II e aumento na frequência de fibras tipo I.

Portanto, a oclusão da ACM e o treinamento prévio em esteira por 6 semanas não foram capazes de alterar o padrão de fibras musculares do tibial anterior de ratos.

#### **4.4) Área das fibras**

A atrofia muscular é observada nos experimentos que envolvem o modelo de oclusão da ACM, onde nota-se redução na área de secção transversal das fibras musculares.

##### **4.4.1) Bíceps braquial**

Os dados obtidos na mensuração da área das fibras tipo I e tipo II estão apresentados nas Figs. 15 e 16.

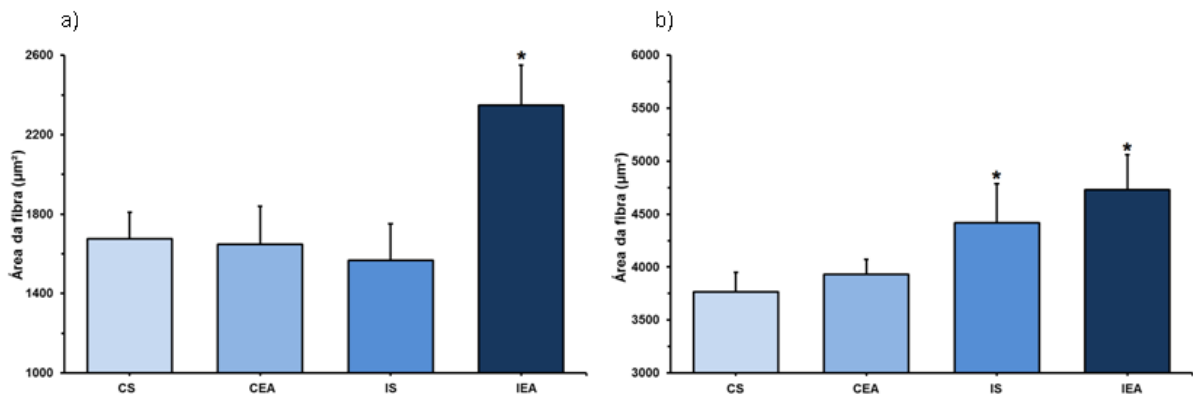


Figura 15 - Área de secção transversal de fibras na região superficial do bíceps braquial. a) Fibras tipo I. \*P<0,05 vs demais grupos; b) Fibras tipo II. \*P<0,05 vs grupos controle. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

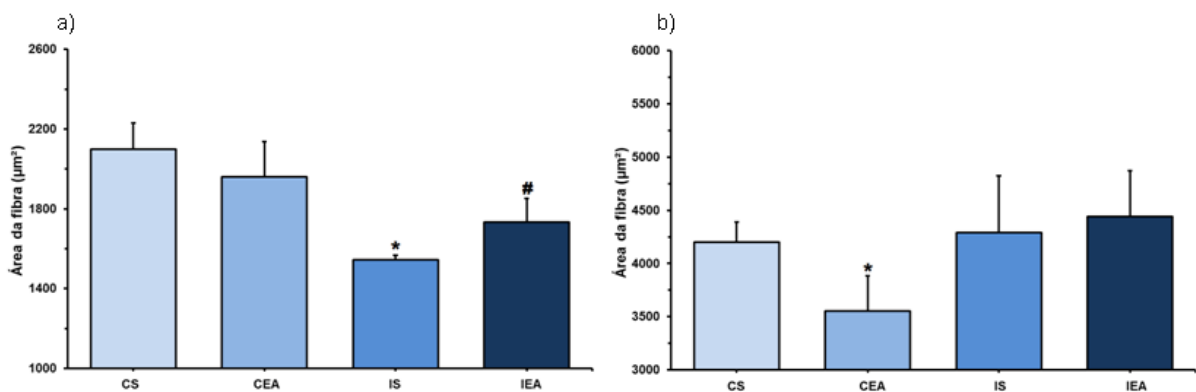


Figura 16 - Área de secção transversal de fibras na região profunda do bíceps braquial. a) Fibras tipo I. \*P<0,05 vs grupos controle. #P<0,05 vs grupo IS; b) Fibras tipo II. \*P<0,05 vs demais grupos. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Na região superficial do bíceps (Fig. 15) observou-se hipertrofia de fibras tipo I e tipo II nos animais isquemiados. Nas fibras tipo I (Fig. 15a) observou-se maior área das fibras no grupo isquemiado exercitado (IEA: 2347,96±202,77) em relação aos demais grupos (CS: 1676,46±132,21; CEA: 1647,63±191,09 e IS: 1566,93±185,09). Nas fibras tipo II (Fig. 15b), observou-se maior área nos animais isquemiados (IS: 4418,89±367,82 e IEA: 4731,28±328,56) em relação aos animais controle (CS: 3767,54±182,08 e CEA: 3929,46±143,61).

Na região profunda (Fig. 16) do bíceps foi observada atrofia de fibras tipo I (Fig. 16a) nos animais isquemiados sedentários (IS: 1543,54±23,56) em relação aos grupos controle (CS: 2100,16±129,29 e CEA: 1961,28±176,54). Os animais isquemiados exercitados (IEA: 1733,77±119,01) apresentaram área das fibras tipo I significativamente maior que os animais isquemiados sedentários (IS: 1543,54±23,56). Para as fibras tipo II (Fig. 16b) observou-se menor área das fibras

no grupo CEA (3555,17±331,23) em relação aos demais grupos (CS: 4198,66±190,33; IS: 4290,31±533,68 e IEA: 4441,9±428,27).

Voos & Ribeiro (2008) relataram que a isquemia cerebral afeta toda a musculatura flexora do membro torácico hemiparético, determinando atrofia por diminuição do uso destes músculos. Neste experimento foi observado comprometimento motor na pata anterior direita dos animais isquemiados (Fig. 10e), comprovado pelo pior desempenho destes animais na realização do teste passo em falso ao final do experimento.

A hipertrofia de fibras musculares em modelos de isquemia cerebral ainda não é um mecanismo bem compreendido, porém alguns trabalhos vêm detectando tal alteração em alguns músculos (Snow *et. al.* 2012).

O exercício praticado antes da isquemia cerebral (grupo IEA) foi eficiente na prevenção da atrofia muscular das fibras tipo I da região profunda do bíceps braquial, uma vez que estes animais apresentaram maior área destas fibras quando comparados em relação aos animais isquemiados sedentários (grupo IS).

#### 4.4.2) Sóleo

Os valores médios obtidos na mensuração da área das fibras tipo I e tipo II no sóleo estão apresentados na Fig. 17.

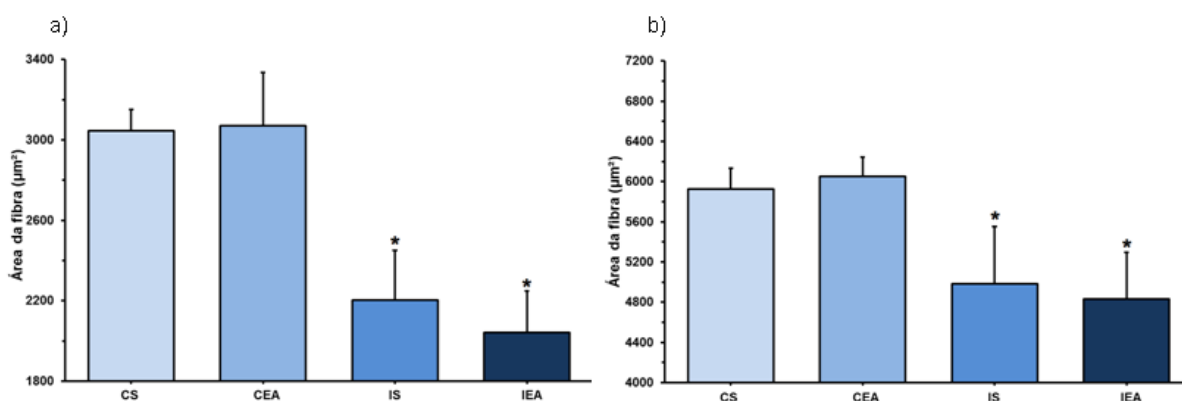


Figura 17 - Área de secção transversal de fibras no sóleo. a) Fibras tipo I. \*P<0,05 vs grupos controle. b) Fibras tipo II. \*P<0,05 vs grupos controle. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Foi detectada atrofia em todo o sóleo dos animais isquemiados (IS e IEA). Para as fibras tipo I (Fig. 17a) observou-se menor área das fibras nos grupos IS

(2202,69±248,16) e IEA (2042,58±207,20) em relação aos animais controle (CS: 3044,49±106,17 e CEA: 3071,57±265,02), assim como para as fibras tipo II (Fig. 17b), onde observou-se menor área destas fibras nos animais dos grupos IS (4982,38±570,91) e IEA (4834,09±462,82) em relação aos animais controle (CS: 5927,98±205,72 e CEA: 6050,15±192,98).

Diversos estudos têm demonstrado que o sóleo é altamente afetado pela isquemia cerebral, sendo, que a atrofia muscular sempre é observada neste músculo. Choe *et. al.* (2004) encontraram atrofia do sóleo de animais com oclusão da ACM, sendo que as mudanças mais evidentes foram observadas nas fibras tipo I, que apresentaram uma menor área de secção transversal. Depois de um período de sete dias após a indução da isquemia cerebral An (2004) encontrou uma redução na área das fibras tipo I do sóleo em relação aos animais controle. Lee *et. al.* (2006) observaram redução na área das fibras tipo I e tipo II do sóleo nos estágios iniciais da isquemia cerebral. Nossos dados estão de acordo com os estudos anteriores, uma vez que houve uma redução significativa na área das fibras tipo I e tipo II dos animais isquemiados (grupos SI e EI) em relação aos animais controle (grupos SSH e ESH).

O exercício físico antes da cirurgia de oclusão da ACM não foi suficiente para reduzir a atrofia das fibras musculares no sóleo dos animais isquemiados.

#### 4.4.3) Tibial anterior

Os dados obtidos na mensuração da área das fibras tipo I e tipo II nas regiões superficial e profunda do tibial anterior estão apresentados nas Figs. 18 e 19.

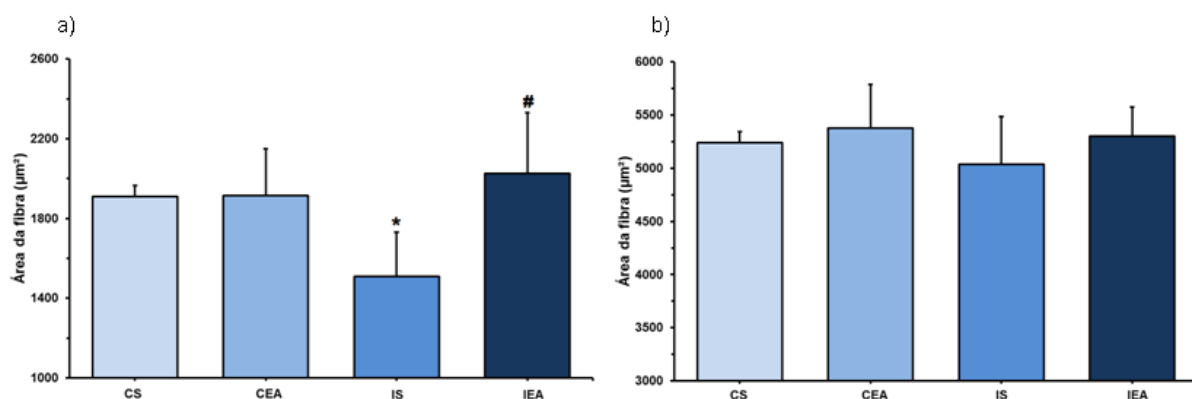


Figura 18 - Área de secção transversal de fibras na região superficial do tibial anterior. a) Fibras tipo I. \*P<0,05 vs grupos controle. #P<0,05 vs grupo IS; b) Fibras tipo II. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

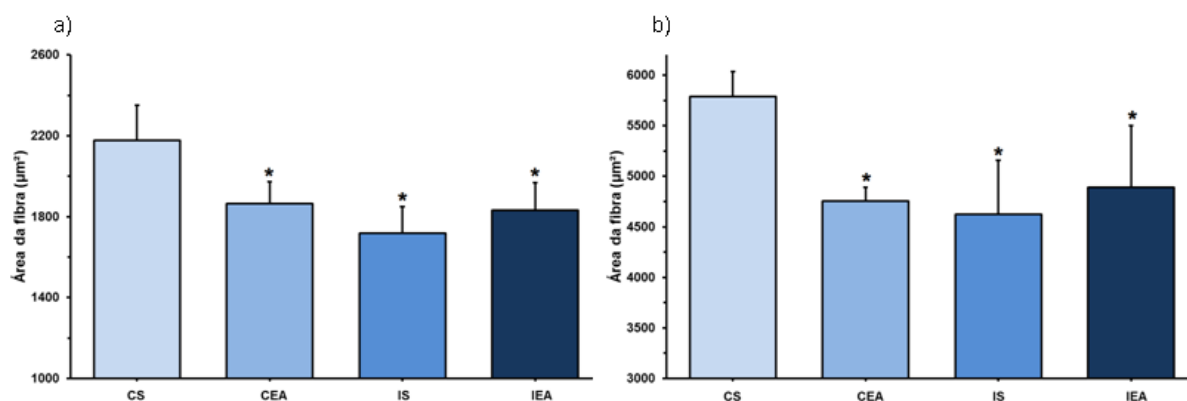


Figura 19 - Área de secção transversal de fibras na região profunda do tibial anterior. a) Fibras tipo I. \* $P < 0,05$  vs grupo CS; b) Fibras tipo II. \* $P < 0,05$  vs grupo CS. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Na região superficial do tibial anterior (Fig. 18) foram detectadas alterações apenas na área das fibras tipo I (Fig. 18a), onde observou-se menor área destas fibras nos animais isquemiados sedentários (IS:  $1508,23 \pm 222,26$ ) em relação aos animais controle (CS:  $1909,13 \pm 57,72$  e CEA:  $1915,30 \pm 234,13$ ). Houve ainda maior área das fibras tipo I no grupo isquemiado exercitado (IEA:  $2025,79 \pm 306,14$ ) em relação ao grupo isquemiado sedentário (IS).

Na região profunda do tibial anterior (Fig. 19), para as fibras tipo I (Fig. 19a), os grupos CEA ( $1864,29 \pm 107,85$ ), IS ( $1719,6 \pm 130,55$ ) e IEA ( $1831,19 \pm 137,94$ ) apresentaram menor área de secção transversal das fibras em relação ao grupo CS ( $2177,49 \pm 174,01$ ). Para as fibras tipo II (Fig. 19b) também observou-se menor área das fibras nos grupos CEA ( $4754,50 \pm 137,10$ ) IS ( $4625,53 \pm 532,61$ ) e IEA ( $4888,94 \pm 613,03$ ) quando comparados ao grupo controle sedentário (CS:  $5786,93 \pm 248,07$ ).

Scelci *et. al.* (1984) relataram redução de diâmetro das fibras tipo I e II do músculo tibial anterior de membros paréticos de indivíduos com isquemia cerebral. Ramsay *et. al.* (2011) relataram, porém, que não houve diferença significativa no volume do tibial anterior de membros paréticos em relação aos membros não paréticos de indivíduos isquêmicos. Em modelos animais também há relatos de atrofia do tibial anterior; Chang *et. al.* (2010) relataram redução significativa na massa do tibial anterior de ratos isquêmicos em comparação a ratos controle.

Em nosso trabalho, na região superficial do tibial anterior, os dados indicam atrofia seletiva das fibras tipo I do tibial anterior dos animais isquêmicos sedentários (IS). O exercício físico antes da cirurgia de oclusão da ACM levou ao aumento da

área das fibras e foi capaz de prevenir a atrofia muscular dos animais do grupo IEA. Na região profunda, encontramos redução na área das fibras tipo I e tipo II nos grupos isquemiados em relação aos animais controle sedentários. Portanto, nossos dados, assim como os estudos prévios, apontaram atrofia de fibras tipo I (região superficial) e de fibras tipo I e tipo II (região profunda) do tibial anterior de ratos isquemiados.

#### **4.5) Proporção volumétrica**

A avaliação histológica dos músculos bíceps braquial, sóleo e tibial anterior, dos diferentes grupos, mostrou predominância de fibras musculares com morfologia preservada, em aspecto poligonal em corte transversal, individualmente envolvidas pelo endomísio e organizadas em fascículos pelo perimísio (Fig. 20).

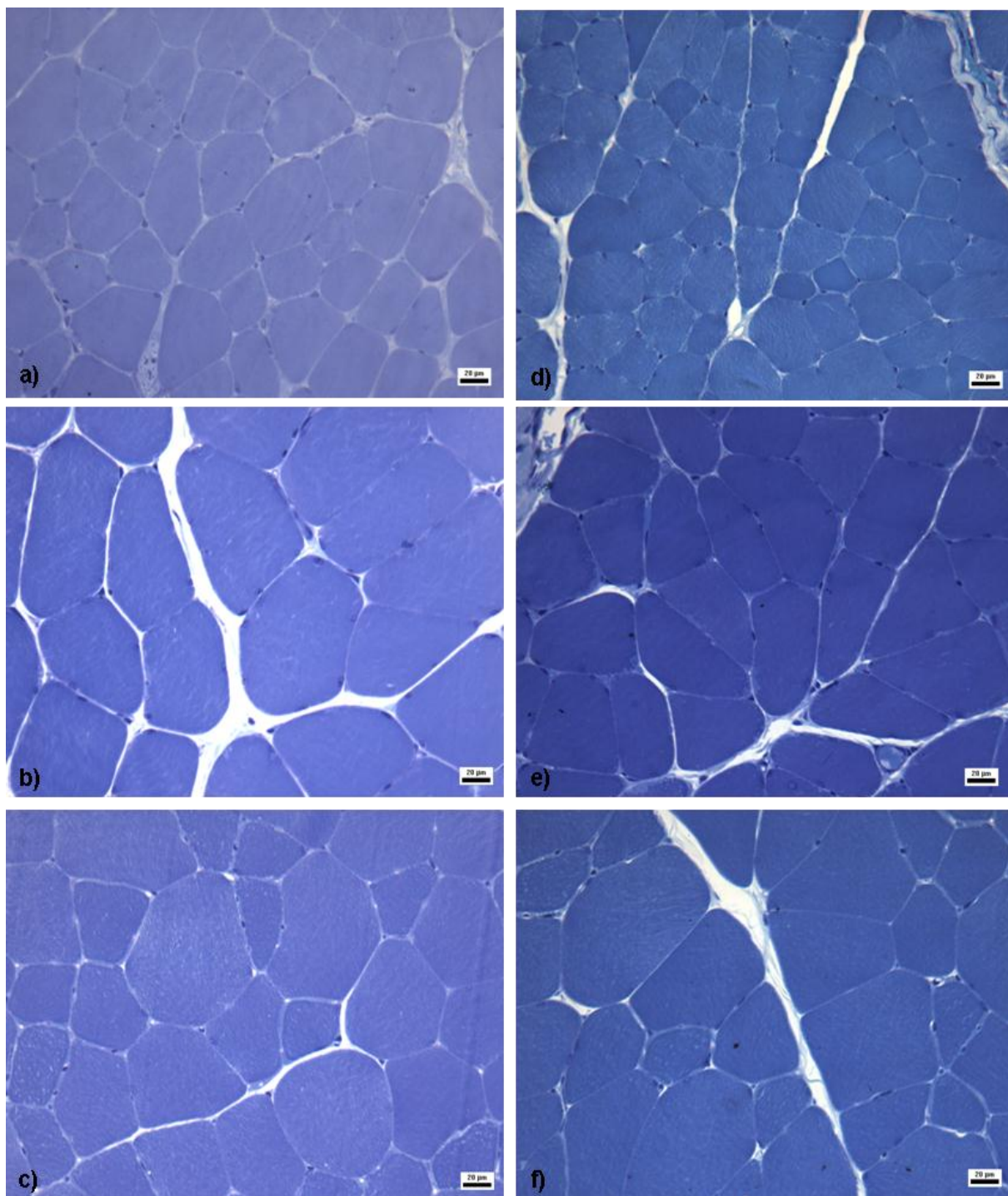


Figura 20 - Fibras musculares, em corte transversal, de animais controle (a,b,c) e isquemiados (d,e,f) sedentários. a,d – bíceps braquial; b,e – sóleo; c,f – tibial anterior. Coloração: Azul de Toluidina + Borato de sódio. Notar a redução significativa na área das fibras dos animais isquemiados em relação aos animais controle. Barra: 20 µm.

Os valores médios encontrados para a proporção volumétrica dos componentes musculares (citoplasma de fibras musculares normais, núcleo da fibra, interstício, elementos vasculares, mastócitos, leucócitos, fibras musculares alteradas

e núcleos de fibras deslocados) dos diversos grupos estão apresentados nas Figs. 21, 22 e 23.

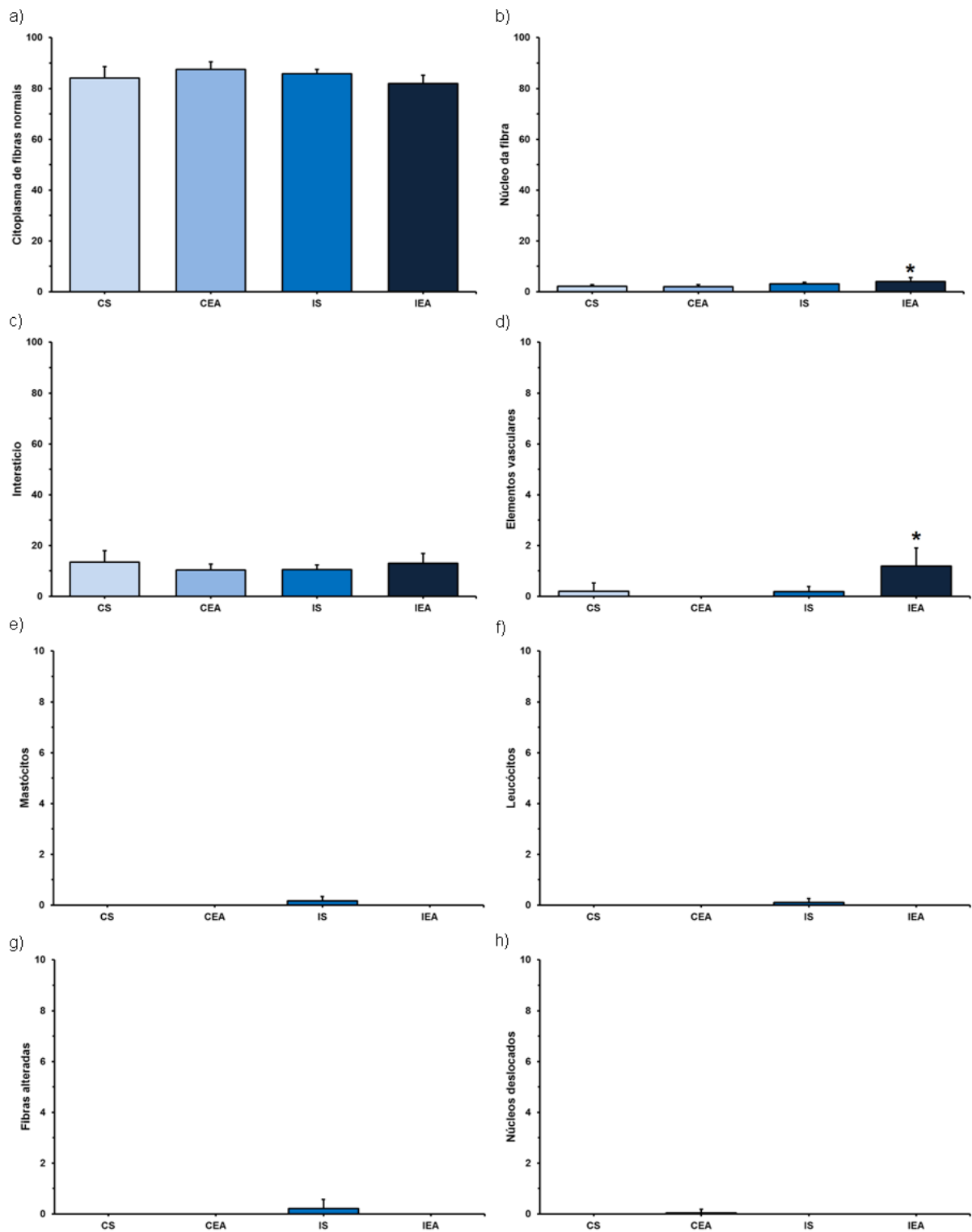


Figura 21 – Frequência dos componentes do músculo bíceps braquial. a) Citoplasma de fibras musculares normais; b) Núcleo das fibras. \* $P < 0,05$  vs grupos controle; c) Interstício; d) Elementos vasculares. \* $P < 0,05$  vs demais grupos; e) Mastócitos; f) Leucócitos; g) Fibras alteradas; h) Núcleos de fibras deslocados. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Para a proporção volumétrica dos constituintes do bíceps braquial (Fig. 21), nota-se que não houve diferença significativa no número de pontos contados sobre o citoplasma de fibras musculares normais (Fig. 21a) das fibras dos diferentes grupos (CS:  $84,07 \pm 4,55$ ; CEA:  $87,52 \pm 2,99$ ; IS:  $85,77 \pm 1,78$  e IEA:  $81,87 \pm 3,29$ ). A densidade de núcleos das fibras musculares (Fig. 21b) foi significativamente maior no grupo isquemiado exercitado (IEA:  $3,95 \pm 1,64$ ) quando comparada aos demais grupos (CS:  $2,16 \pm 0,58$ ; CEA:  $1,99 \pm 0,78$  e IS:  $3,02 \pm 0,64$ ). A proporção de interstício (endomísio, perimísio e epimísio) (Fig. 21c) não apresentou alterações significativas entre os diferentes grupos (CS:  $13,55 \pm 4,45$ ; CEA:  $10,41 \pm 2,34$ ; IS:  $10,48 \pm 1,94$ ; IEA:  $12,94 \pm 4,00$ ). Quanto aos elementos vasculares (Fig. 21d), percebe-se uma maior frequência na vascularização do bíceps braquial no grupo isquemiado exercitado (IEA:  $1,19 \pm 0,71$ ) em relação aos demais grupos (CS:  $0,20 \pm 0,33$ ; CEA:  $0 \pm 0$  e IS:  $0,19 \pm 0,19$ ). Mastócitos (Fig. 21e), Leucócitos (Fig. 21f) e fibras alteradas (Fig. 21g) foram identificados apenas no grupo isquemiado sedentário (IS). Núcleos deslocados para o interior da fibra muscular (Fig. 21h) foram visualizados apenas no grupo controle exercitado (CEA).

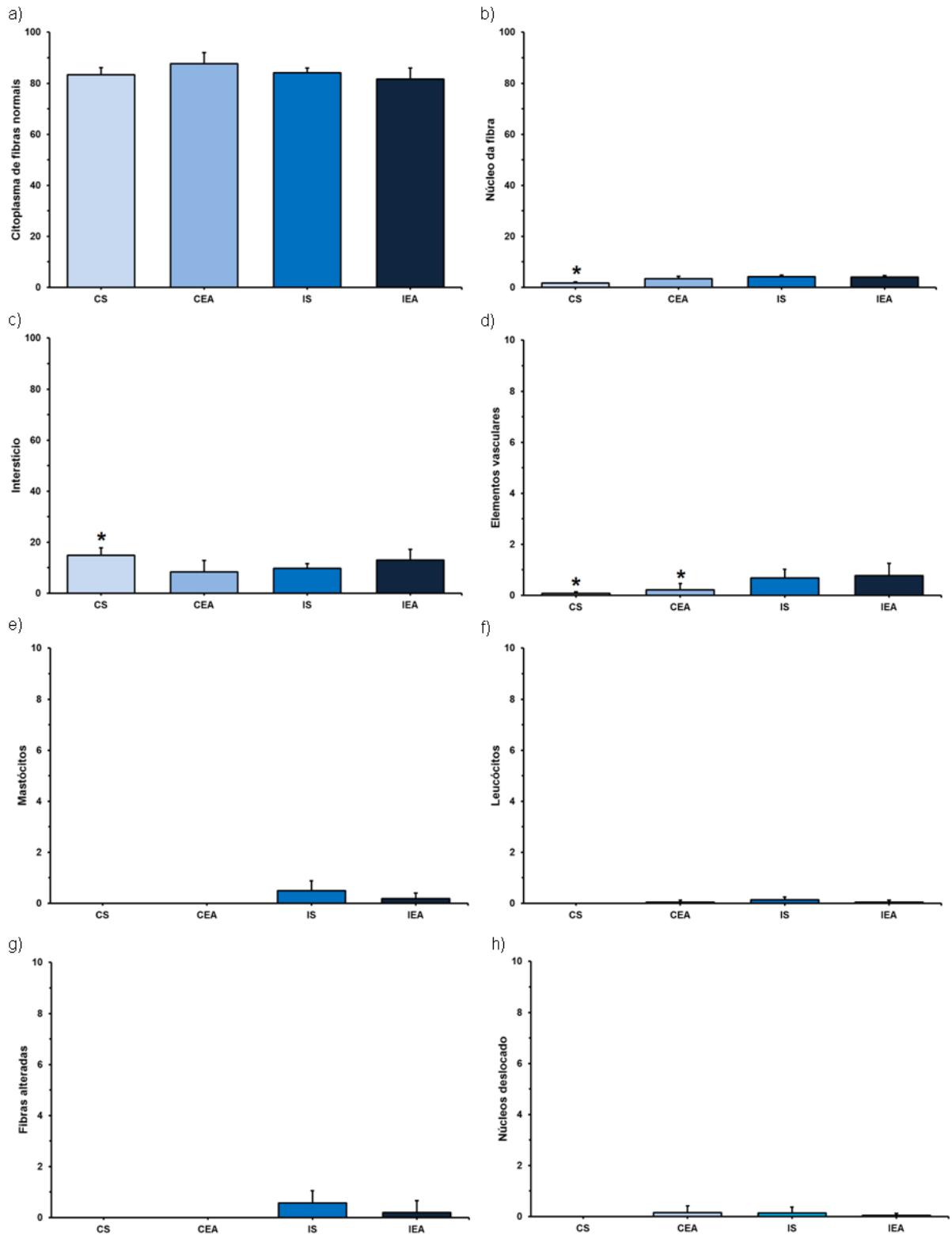


Figura 22 – Frequência dos componentes do músculo sóleo. a) Citoplasma de fibras musculares normais; b) Núcleo das fibras. \*P<0,05 vs demais grupos; c) Interstício. \*P<0,05 vs grupo CEA; d) Elementos vasculares. \*P<0,05 vs grupos isquemiados; e) Mastócitos; f) Leucócitos; g) Fibras alteradas. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Para a proporção volumétrica dos constituintes do sóleo (Fig. 22), não foi observada diferença significativa no número de pontos sobre o citoplasma das fibras musculares normais (Fig. 22a) dos diferentes grupos (CS:  $83,27 \pm 2,80$ ; CEA:  $87,65 \pm 4,41$ ; IS:  $84,13 \pm 1,86$  e IEA:  $81,65 \pm 4,27$ ). Quanto à proporção de núcleos das fibras (Fig. 22b), percebe-se maior frequência nos animais isquemiados (IS:  $4,11 \pm 0,67$  e IEA:  $4,10 \pm 0,56$ ) e no grupo controle exercitado (CEA:  $3,50 \pm 0,87$ ) em relação aos animais controle sedentários (CS:  $1,70 \pm 0,42$ ). A frequência de interstício (Fig. 22c) apresentou-se reduzida no grupo controle exercitado (CEA:  $8,42 \pm 0,24$ ) em relação ao grupo controle sedentário (CS:  $14,93 \pm 2,85$ ). Em relação à vascularização do sóleo (Fig. 22d) houve maior proporção dos elementos vasculares nos animais isquemiados em relação aos animais controle (IS:  $0,67 \pm 0,34$  e IEA:  $0,78 \pm 0,48$  vs CS:  $0,08 \pm 0,06$  e CEA:  $0,22 \pm 0,24$ ). Mastócitos (Fig. 22e) foram encontrados apenas nos grupos isquemiados (IS e IEA), assim como fibras alteradas (Fig. 22g). Leucócitos (Fig. 22f) e núcleos deslocados (Fig. 22h) foram visualizados nos grupos CEA, IS e IEA.

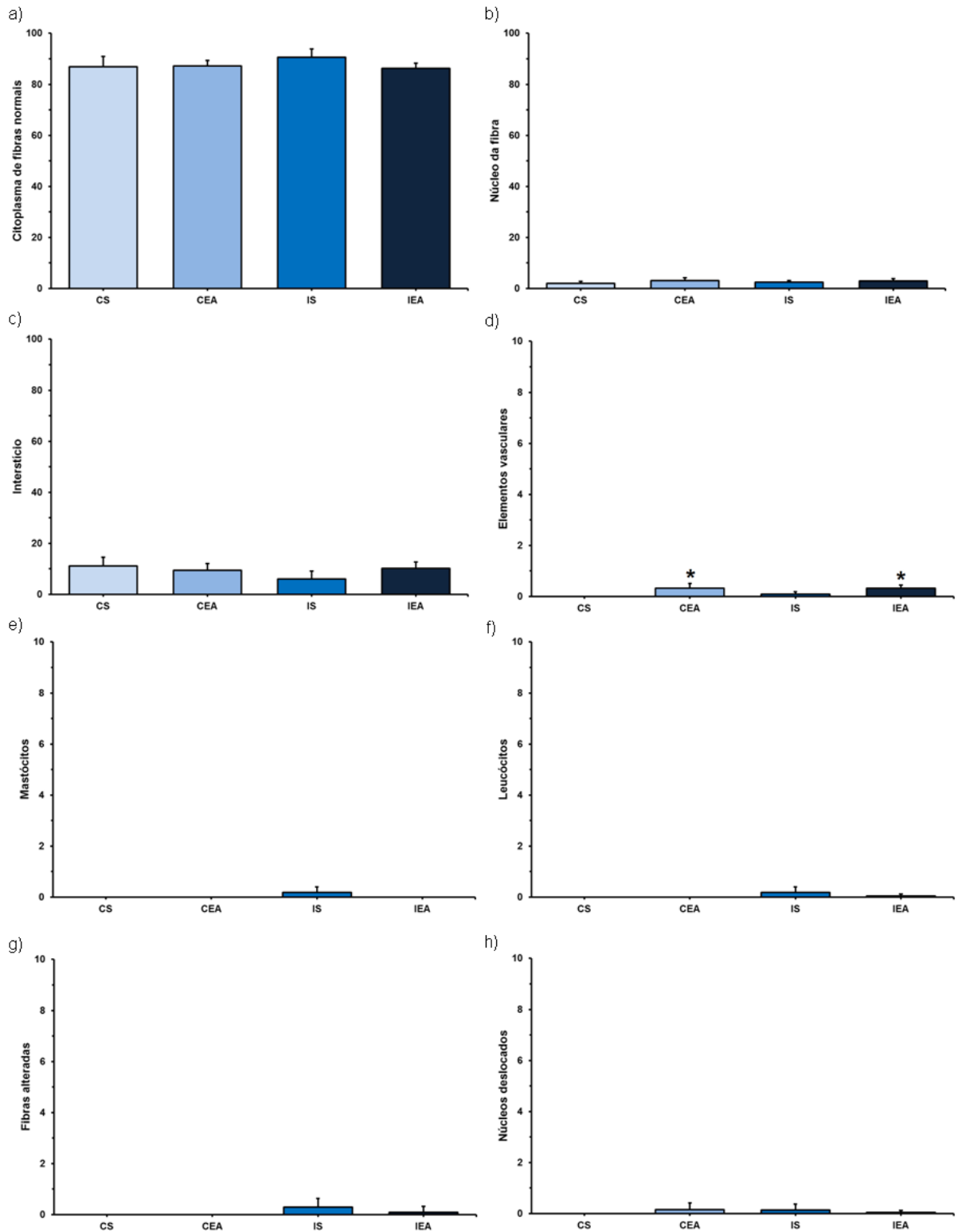


Figura 23 – Frequência dos componentes do músculo tibial anterior. a) Citoplasma de fibras musculares normais; b) Núcleo das fibras; c) Interstício; d) Elementos vasculares. \* $P < 0,05$  vs grupos CS e IS; e) Mastócitos; f) Leucócitos; g) Fibras alteradas; h) Núcleos de fibras deslocados. CS = Grupo controle sedentário; CEA = Grupo controle exercitado antes da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IEA = Grupo isquemiado exercitado antes da cirurgia de OACM.

Quanto à frequência dos constituintes do tibial anterior (Fig. 23), não foram observadas alterações significativas na proporção de citoplasma de fibras normais (Fig. 23a) – CS:  $86,84 \pm 4,04$ ; CEA:  $87,07 \pm 2,15$ ; IS:  $90,52 \pm 3,27$ ; IEA:  $86,23 \pm 1,96$  –, núcleos das fibras (fig. 23b) – CS:  $2,02 \pm 0,84$ ; CEA:  $3,03 \pm 1,12$ ; IS:  $2,52 \pm 0,58$ ; IEA:  $2,94 \pm 0,89$  – e interstício (Fig. 23c) – CS:  $11,12 \pm 3,47$ ; CEA:  $9,39 \pm 2,64$ ; IS:  $6,01 \pm 3,15$ ; IEA:  $10,26 \pm 2,38$  – entre os diferentes grupos. Quanto à vascularização do tibial anterior (Fig. 23d) percebe-se maior frequência nos grupos exercitados (CEA:  $0,32 \pm 0,19$  e IEA:  $0,32 \pm 0,13$ ) em relação aos grupos sedentários (CS:  $0 \pm 0$  e IS:  $0,04 \pm 0,19$ ). Mastócitos (Fig. 23e) foram encontrados apenas no grupo isquemiado sedentário (IS). Leucócitos (Fig. 23f) e fibras alteradas (Fig. 23g) foram identificados apenas nos animais isquemiados (IS e IEA), com presença mais acentuada no grupo IS. Núcleos de fibras deslocados (Fig. 23h) estiveram presentes nos grupos CEA, IS e IEA.

Apesar da redução significativa na área das fibras observada no sóleo e em determinadas regiões do bíceps braquial e do tibial anterior dos animais isquemiados, a frequência de citoplasma, fibras musculares normais e de interstício destes músculos não mostrou alterações significativas em relação aos animais dos grupos controle.

Já em relação à densidade de núcleos das fibras musculares, observou-se aumento nos animais isquemiados em relação aos animais controle, principalmente no sóleo, mas também no bíceps braquial, e com maior proeminência no grupo isquemiado exercitado (IEA). Ciciliot & Schiaffino (2010) relataram que as células satélites podem contribuir para o aumento no número de mionúcleos durante a regeneração muscular. Ocorre uma proliferação das células satélites, seguida de uma diferenciação e incorporação destas células pelas fibras musculares danificadas. Acreditamos que foi o que houve em nosso trabalho, onde a OACM, determinando atrofia muscular e, com o passar do tempo, houve regeneração destes músculos afetados nos animais isquemiados.

Elementos vasculares foram mais frequentes nos animais isquemiados quando comparados aos animais controle. Entre os animais isquemiados, aqueles que foram submetidos ao treinamento em esteira (IEA), apresentaram maior proporção de elementos vasculares em relação aos animais sedentários (IS). Zheng e colaboradores (2011), trabalhando com o modelo de OACM em ratos,

demonstraram que ratos treinados por 2 semanas (12 m/min e 30 min/dia) apresentaram uma expressão elevada de Ang-1 e Tie-2, importantes fatores envolvidos em processos de neo-angiogênese, no cérebro. A expressão elevada destes fatores colaborou para uma recuperação de função motora, assim como no presente trabalho, nos animais isquemiados, sendo importante no processo de reabilitação. Além de promover angiogênese no cérebro, inúmeros estudos têm evidenciado o efeito do exercício na angiogênese no músculo esquelético (Yan *et. al.*, 2011). O aumento na proporção de elementos vasculares nos músculos dos animais isquemiados treinados pode ser um indicativo de angiogênese não só nos músculos, mas também no cérebro, dada a melhora significativa no desempenho funcional dos animais ao final do experimento.

Mastócitos e leucócitos (Fig. 24) foram visualizados principalmente nos animais isquemiados sedentários e treinados. Esperávamos encontrar um número maior de células do sistema imune no interstício muscular dos animais isquemiados, porém, estes dados podem ser explicados pela baixa frequência de fibras alteradas e também pelo tempo relativamente longo do experimento. Ciciliot & Schiaffino (2010) afirmam que, nos estágios iniciais da regeneração do músculo, há um recrutamento quimiotático inicial de leucócitos, principalmente neutrófilos, seguida pela invasão de macrófagos. Assim, pode ser que nas primeiras semanas após a indução da isquemia cerebral esta situação tenha ocorrido, porém, com o passar do tempo e também com o avanço da regeneração muscular, esse quadro não pôde ser visualizado.

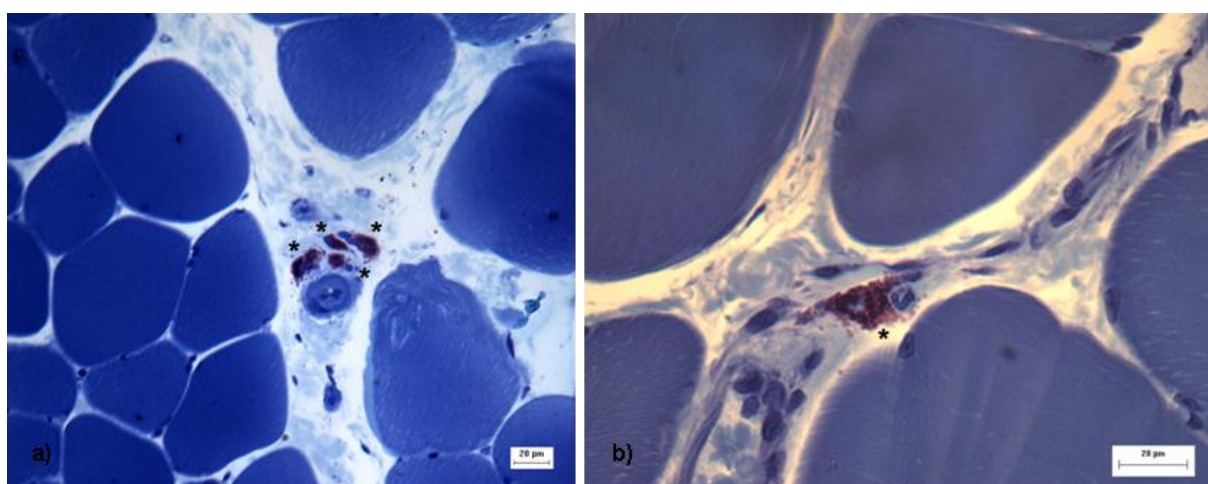


Figura 24 – Músculo sóleo de animais isquemiados sedentários. a) mastócitos (asteriscos) localizados no interstício; b) mastócito (asterisco). Coloração: Azul de Toluidina + Borato de sódio. Barra: 20 µm.

A ocorrência de fibras alteradas (Fig.25) foi relativamente baixa e coincide com a presença de mastócitos e/ou leucócitos, confirmando que estas células possam estar, de fato, envolvidas no processo de regeneração destas fibras afetadas pela lesão isquêmica.

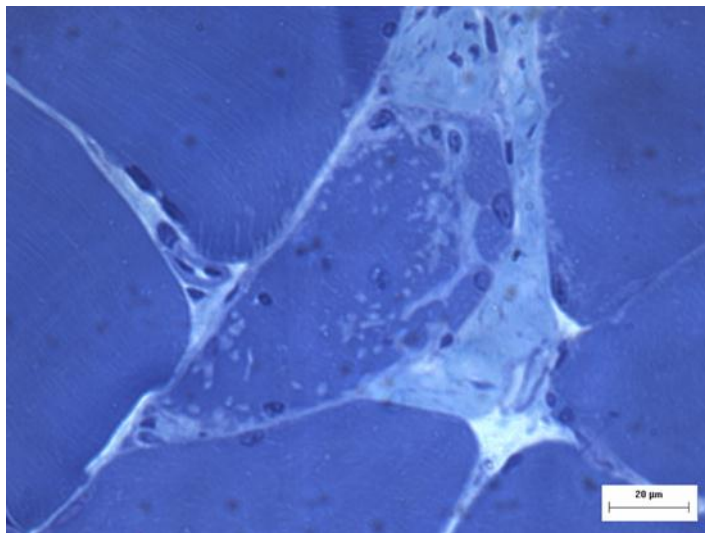


Figura 25 – Músculo sóleo de um animal do grupo isquemiado sedentário (SI) com uma fibra muscular alterada no centro. Notar a internalização de alguns núcleos, vacuolização citoplasmática e os contornos irregulares da fibra. Coloração: Azul de Toluidina + Borato de sódio. Barra: 20  $\mu$ m.

Os núcleos deslocados para o centro da fibra (Fig. 26), evidentes principalmente no sóleo e no tibial anterior, também podem ser indicativos de regeneração muscular. Estes núcleos em posição central estão presentes apenas nos grupos onde se observou a presença de fibras alteradas e/ou mastócitos e leucócitos. Segundo Duarte (1993) e Ciciliot & Schiaffino (2010), fibras regeneradas podem ser reconhecidas pela presença destes núcleos centrais, principalmente em roedores. Segundo Duarte *et. al.* (2001), núcleos em posição central, podem ser um sinal de áreas em regeneração ou de novas fibras em crescimento. Estes núcleos provêm da estimulação e da consequente diferenciação das células satélites em mioblastos que se fundem à fibra muscular adjacente. A ocorrência destes núcleos em posição central constitui, por isso, um possível indicador da existência prévia de injúria muscular.

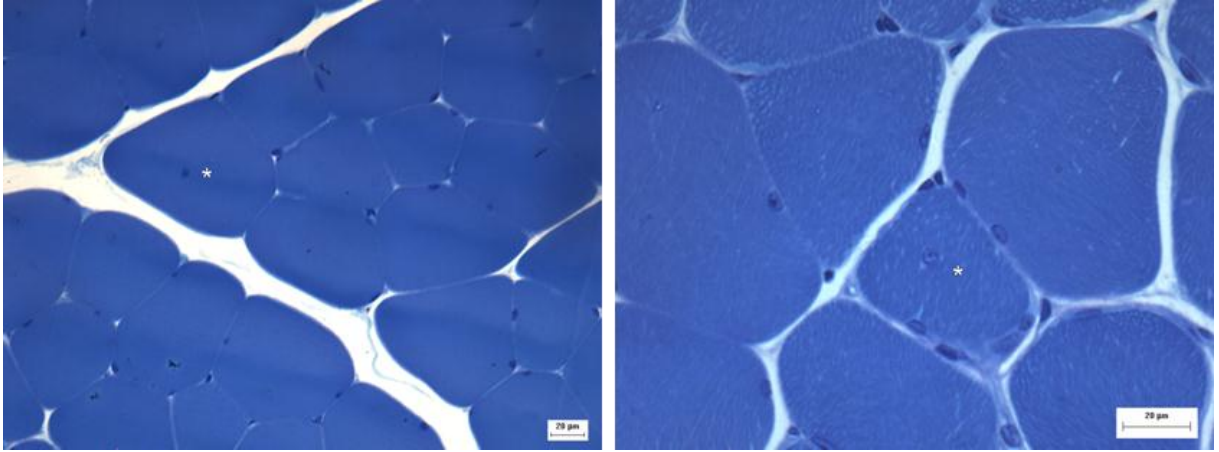


Figura 26 - Músculo sóleo de animais isquemiados sedentários. Fibras musculares, em corte transversal. \* núcleos deslocados para o interior da fibra muscular. Coloração: Azul de Toluidina + Borato de sódio. Barra: 20 µm.

Portanto, as principais alterações ocorridas no bíceps braquial, sóleo e tibial anterior, possivelmente são decorrentes de processos normais de regeneração muscular decorrente do prejuízo no controle nervoso. Efeitos significativos do exercício foram vistos na proporção de elementos vasculares, onde, acreditamos ter havido angiogênese nos músculos esqueléticos avaliados.

## **5) CONCLUSÕES**

O exercício físico, praticado antes da indução da isquemia cerebral, além de promover melhora na coordenação e desempenho motor, atenua a atrofia muscular de fibras tipo I e influencia nos processo de recuperação muscular por meio da estimulação da angiogênese.

## 6) RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EXPERIMENTO II

#### 6.1) Peso corporal dos animais

Os valores médios referentes ao peso corporal inicial e final dos animais do experimento II estão representados na Fig. 27.

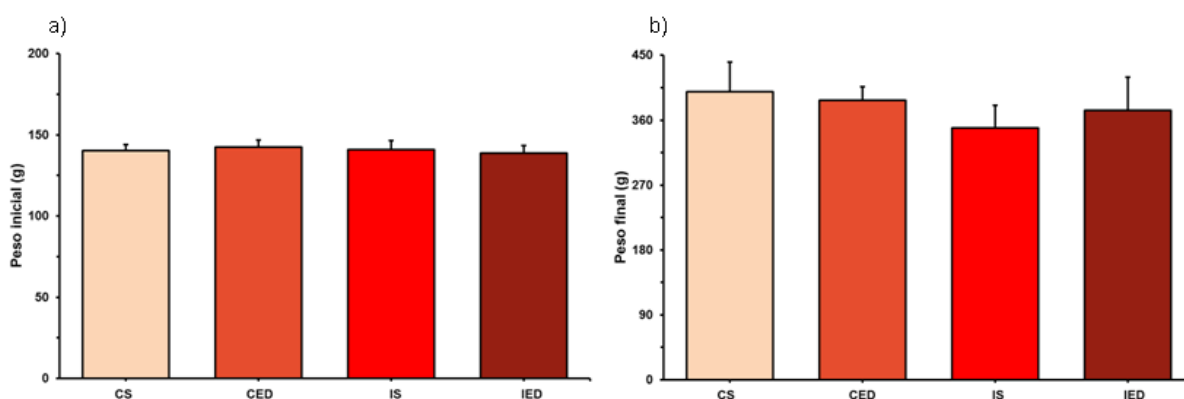


Figura 27 – Peso dos animais. a) Início do experimento; b) Final do experimento. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

No início do experimento, não foi observada diferença significativa no peso dos animais dos diferentes grupos (Fig. 27a) (CS: 140,29±3,62; CED: 142,40±4,42; IS: 140,95±5,56; IED: 138,66±4,87). No final do experimento (Fig. 27b), assim como no experimento I, observou-se menor peso dos animais isquemiados sedentários, porém esta relação não foi significativa (CS: 399,69±40,85; CED: 387,76±18,80; IS: 349,38±30,89; IED: 376,63±45,74).

#### 6.2) Testes funcionais

Os valores médios dos erros cometidos pelos animais no teste passo em falso e nas barras paralelas após a cirurgia e antes da eutanásia estão apresentados na Fig. 28.

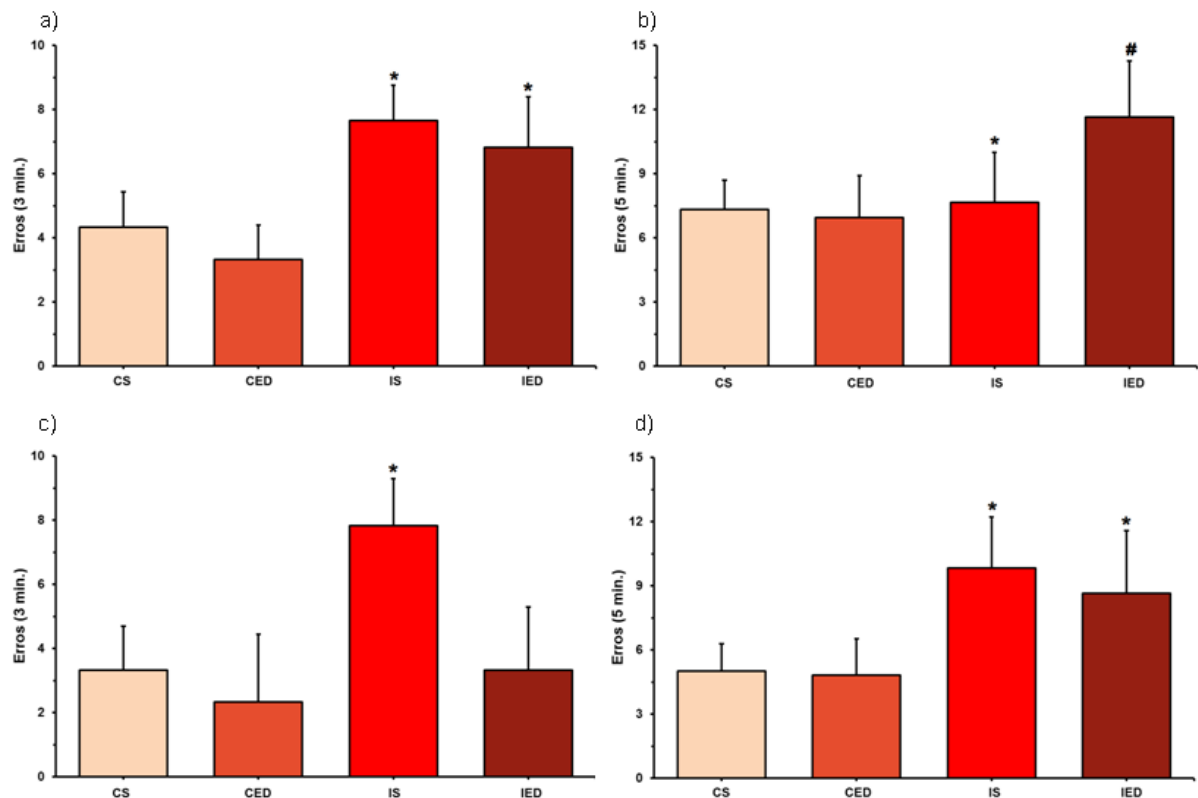


Figura 28 – Número de erros cometidos pelos animais depois dos procedimentos cirúrgicos e ao final do experimento. a) Teste passo em falso. \* $P < 0,05$  vs grupos controle; b) Barras paralelas. \*  $P < 0,05$  vs grupo CED. # $P < 0,05$  vs demais grupos. c) Teste passo em falso. \* $P < 0,05$  vs demais grupos; d) Barras paralelas. \*  $P < 0,05$  vs grupos controle. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Depois das cirurgias (falsa cirurgia e de OACM), no teste passo em falso (Fig. 28a), os animais isquemiados (IS:  $7,66 \pm 1,10$  e IED:  $6,83 \pm 1,57$ ) apresentaram um maior número de erros em relação aos animais controle (CS:  $4,33 \pm 1,10$  e CED:  $3,33 \pm 1,06$ ), comprovando que a oclusão da ACM levou ao comprometimento da pata anterior. Nas barras paralelas (Fig. 28b) observou-se maior número de erros cometidos pelo grupo IED ( $11,66 \pm 2,62$ ) em relação aos demais grupos (CS:  $7,33 \pm 1,37$ ; CED:  $6,94 \pm 1,97$  e IS:  $7,66 \pm 2,35$ ), bem como um maior número de erros cometidos pelo grupo IS em relação ao grupo CED, confirmando que também houve comprometimento da pata posterior pela isquemia cerebral. Portanto, assim como no experimento I, os animais isquemiados apresentaram pior desempenho nos testes funcionais após a cirurgia devido ao comprometimento motor causado pela indução da isquemia cerebral.

Antes da eutanásia, no teste passo em falso (Fig. 28c) observou-se maior número de erros cometidos pelo grupo isquemiado sedentário (IS:  $7,83 \pm 1,46$ ) em

relação aos demais grupos (CS:  $3,33\pm 1,37$ ; CED:  $2,33\pm 2,11$  e IED:  $3,33\pm 1,97$ ). Esses dados mostram que o exercício físico praticado após a oclusão da ACM pelo grupo isquemiado (IED) foi eficiente na melhora da coordenação e desempenho motor das patas anteriores.

No teste das barras paralelas (Fig. 28d) os animais pertencentes aos grupos que sofreram a isquemia cerebral (IS:  $9,83\pm 2,40$  e IED:  $8,66\pm 2,92$ ) apresentaram menor rendimento na realização do teste quando comparados aos animais controle (CS:  $5,00\pm 1,29$ ; CED:  $4,83\pm 1,69$ ). Tanto para animais controle, quanto para animais isquemiados o treinamento não foi suficiente para produzir melhora no desempenho motor durante a realização do teste.

O melhor desempenho alcançado pelos animais isquemiados (IED) neste trabalho, no teste passo em falso, deve-se ao programa de treinamento em esteira, e não a uma recuperação espontânea dos animais, visto que os animais sedentários (IS) apresentaram maior número de erros na realização dos testes. Modo *et. al.* (2000) relataram que para o teste passo em falso foi observada recuperação espontânea da função motora dos animais, porém, somente com 9-10 semanas após a reperfusão. O mecanismo de recuperação espontânea ao longo do tempo ainda não é completamente conhecido.

Chang e colaboradores (2009) observaram que ratos isquemiados, após um período de 48 horas pós-reperfusão, apresentaram maior número de erros em relação aos animais controle. Demonstraram ainda que os animais controle e isquemiados que se submeteram ao treinamento físico por 14 dias em esteira apresentaram uma menor taxa de erros tanto no teste passo em falso quanto nas barras paralelas quando comparados aos animais sedentários. Nossos dados estão de acordo, uma vez que em ambos os testes os animais isquemiados apresentaram, no geral, maior número de erros em relação aos animais controle. Porém, quanto aos efeitos do exercício físico, apenas para o teste passo em falso houve diferença significativa no número de erros, sendo que o exercício depois da oclusão da ACM (grupo IED) determinou redução significativa no número de erros cometidos durante o teste em relação aos animais isquemiados sedentários (IS).

### **6.3) Frequência de fibras tipo I e tipo II**

Assim como no experimento I, a frequência das fibras musculares foi determinada para detectar possíveis alterações provocadas pela isquemia cerebral no padrão de distribuição destas fibras (Fig. 11).

### 6.3.1) Bíceps braquial

Os valores médios referentes à frequência das fibras tipo I e tipo II nas regiões superficial e profunda do bíceps braquial estão apresentados na Fig. 39.

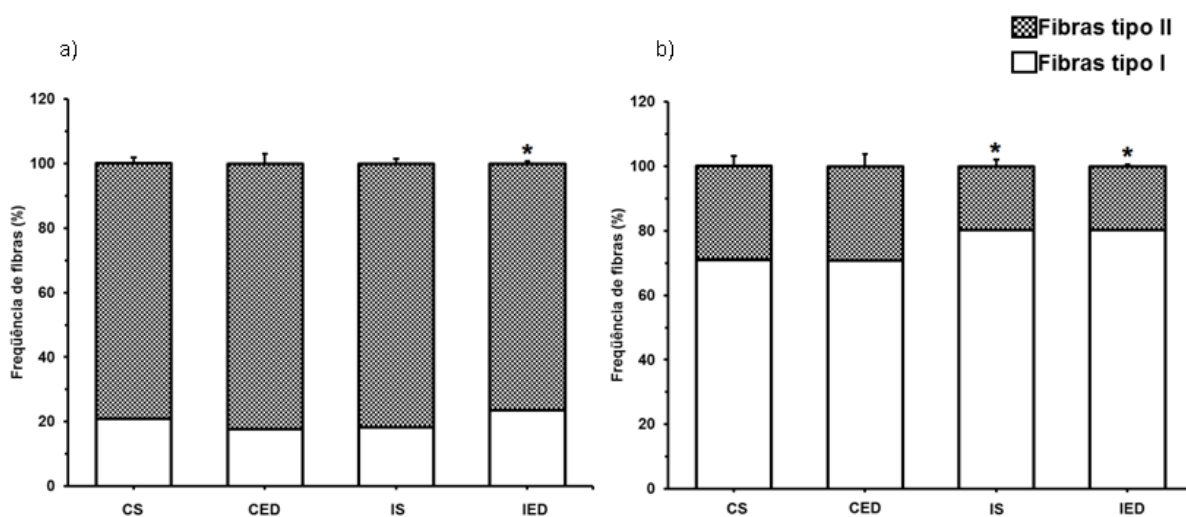


Figura 29 – Frequência de fibras tipo I e tipo II no bíceps braquial. a) Região superficial. \*P<0,05 vs grupos CED e IS; b) Região profunda. \*P<0,05 vs grupos controle. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Observou-se maior frequência das fibras tipo I (com consequente redução nas fibras tipo II) da região superficial do bíceps braquial (Fig. 29a) no grupo isquemiado exercitado (IED: 23,56±0,84) em relação aos grupos CED (17,77±3,01) e IS (18,34±1,59), não havendo diferença significativa quando comparado ao grupo CS (20,88±1,99).

Na região profunda do bíceps braquial (Fig. 29b), observou-se maior frequência de fibras tipo I nos animais isquemiados (IS: 80,28±2,12 e IED: 80,25±0,64) em relação aos animais controle (CS: 71,12±3,27 e CED: 70,78±3,76).

Nossos dados indicam aumento na proporção de fibras tipo I tanto em animais sedentários quanto em animais exercitados, porém apenas quando houve a oclusão da ACM. Portanto, pode-se afirmar que a oclusão da ACM aliada a um

programa de treinamento em esteira após a isquemia cerebral pode determinar aumento na frequência de fibras tipo I com consequente redução na frequência das fibras tipo II do bíceps braquial.

### 6.3.2) Sóleo

Os valores médios referentes à frequência das fibras tipo I e tipo II no sóleo estão apresentados na Fig. 30.

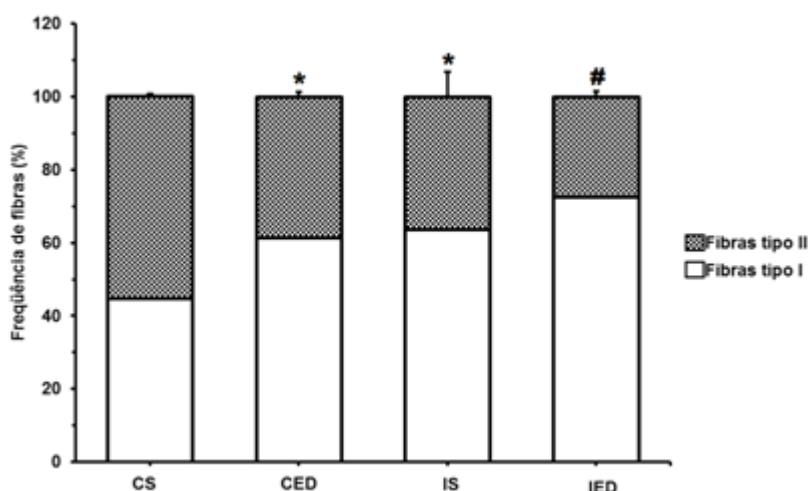


Figura 30 - Frequência de fibras tipo I e tipo II no sóleo. \*P<0,05 vs grupo CS. #P<0,05 vs demais grupos. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Foi observado, no músculo sóleo, maior frequência de fibras tipo I nos animais treinados e nos animais isquemiados. Os grupos CED (61,39±1,32), IS (63,67±6,86) e IED (72,49±1,59) apresentaram maior frequência de fibras tipo I em relação ao grupo CS (44,68±0,87), assim como no grupo IED em relação aos grupos CED e IS.

À semelhança do experimento I (Fig. 13), os animais isquemiados e os animais que receberam o treinamento físico apresentaram menor proporção de fibras tipo II (ou aumento na proporção de fibras tipo I). Neste experimento foi utilizado um protocolo de exercício de baixa intensidade e que, mesmo assim foi capaz de provocar alterações no padrão de distribuição das fibras tipo I e tipo II.

Os dados encontrados em ambos os experimentos confrontam os resultados obtidos por Choe *et. al.* (2006), onde não foi encontrada diferença significativa na distribuição de fibras musculares (I e II) do sóleo de ratos com oclusão da ACM e que foram treinados em esteira por um período de 6 dias (10 m/min, 20 min/dia)

após a indução da isquemia cerebral. A ausência de alterações na frequência de fibras musculares demonstrada pelos referidos autores talvez seja explicada pelo período experimental relativamente curto, diferente do nosso trabalho, onde os períodos de treinamento de 6 semanas antes (experimento I) e após (experimento II) a indução da isquemia cerebral, foram suficientes para provocar a alterações na proporção das fibras musculares do sóleo.

### 6.3.3) Tibial anterior

Os valores médios referentes à frequência das fibras tipo I e tipo II no tibial anterior estão apresentados na Fig. 31.

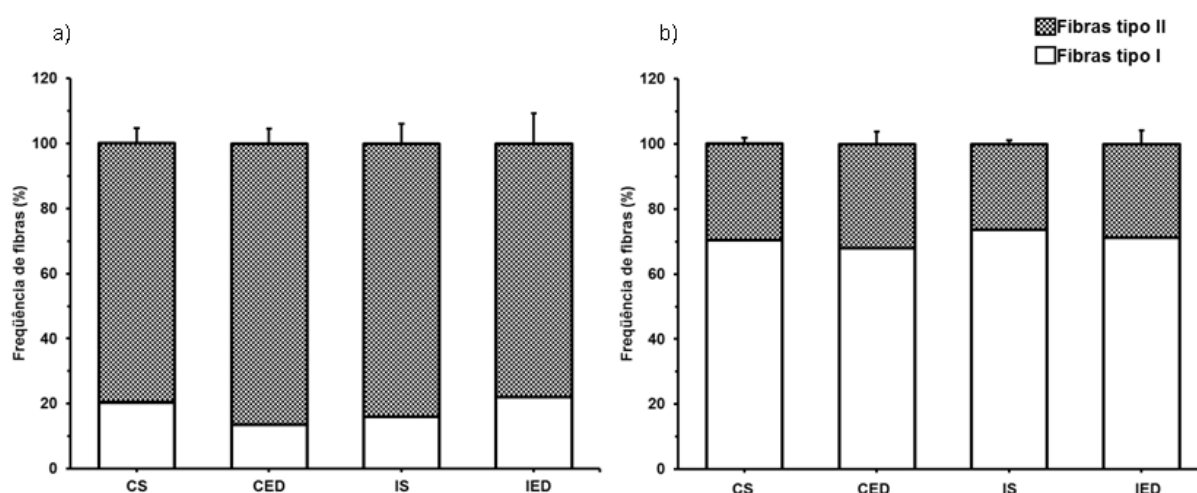


Figura 31 - Frequência de fibras tipo I e tipo II no tibial anterior. a) Região superficial. b) Região profunda. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Assim como no experimento I, não houve diferença significativa na frequência de fibras tipo I e tipo II entre os diferentes grupos, tanto na região superficial (CS: 20,38±4,67; CED: 13,64±4,61; IS: 15,93±6,11 e IED: 22,01±9,36), quanto na região profunda (CS: 70,42±2,01; CED: 68,02±3,72; IS: 73,66±1,13 e IED: 71,28±4,27). Nossos dados permanecem de acordo com o encontrado por Snow *et. al.* (2012), onde a isquemia cerebral e a atividade física praticada após a lesão cerebral não alteraram o padrão de fibras musculares do tibial anterior de ratos.

### 6.4) Área das fibras

### 6.4.1) Bíceps braquial

Os valores obtidos na mensuração da área das fibras musculares nas regiões superficial e profunda do bíceps braquial estão apresentados nas Figs. 32 e 33.

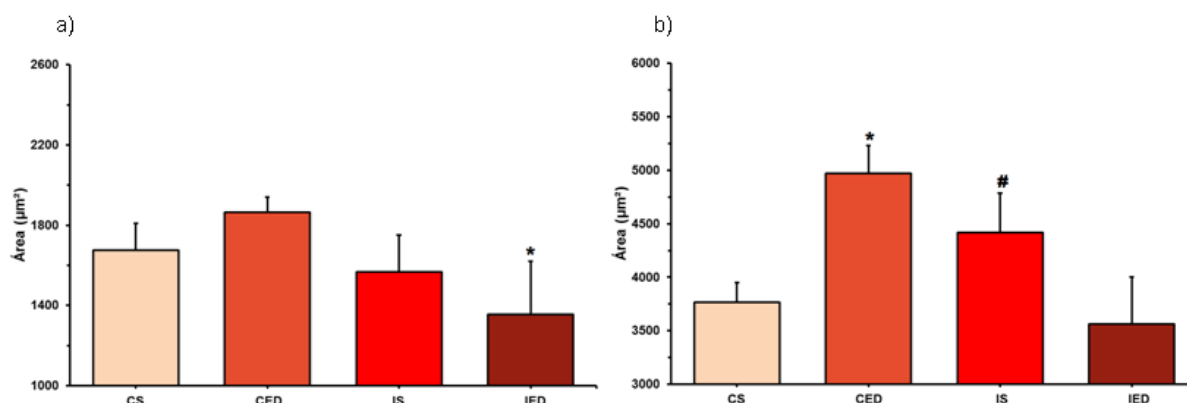


Figura 32 - Área de seção transversal de fibras na região superficial do bíceps braquial. a) Fibras tipo I. \*P<0,05 vs grupo CED; b) Fibras tipo II. \*P<0,05 vs demais grupos. #P<0,05 vs demais grupos. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

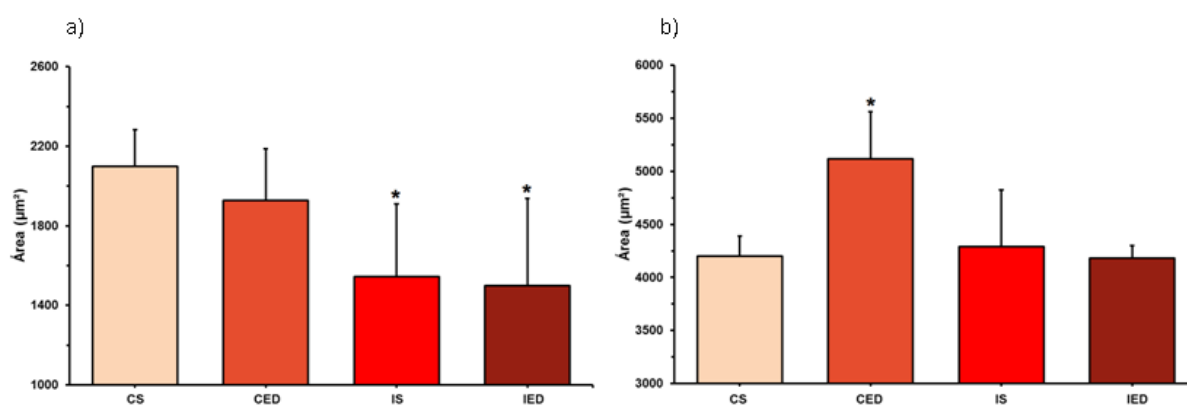


Figura 33 - Área de seção transversal de fibras na região profunda do bíceps braquial. a) Fibras tipo I. \*P<0,05 vs grupos controle; b) Fibras tipo II. \*P<0,05 vs demais grupos. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Na região superficial do bíceps (Fig. 32) o grupo isquemiado exercitado (IED:  $1354,41 \pm 266,32$ ) apresentou menor área das fibras tipo I (Fig. 32a) em relação ao grupo controle exercitado (CED:  $1865,17 \pm 75,83$ ). Para as fibras tipo II (Fig. 32b) foi observada uma maior área das fibras no grupo controle exercitado (CED  $4973,04 \pm 259,00$ ) em relação aos demais grupos (CS:  $3757,54 \pm 182,08$ ; IS:  $4418,89 \pm 367,82$  e IED:  $3564,06 \pm 439,12$ ), bem como aumento na área das fibras no grupo isquemiado sedentário (IS) em relação aos grupos CS e IED.

Na região profunda do bíceps (Fig. 33) observou-se atrofia das fibras tipo I (Fig. 33a) nos animais isquemiados (IS:  $1543,54 \pm 367,82$  e IED:  $1498,69 \pm 439,12$ ) em

relação aos animais controle (CS: 2100,16±182,08 e CED: 1927,57±259,00). Quanto às fibras tipo II (Fig. 33b) o grupo controle exercitado (CED: 5115,55±446,51) apresentou área significativamente maior das fibras em relação aos demais grupos (CS: 4198,66±190,33; IS: 4290,31±533,68 e IED: 4181,61±119,10).

Neste experimento, os animais do grupo isquemiado sedentário apresentaram comprometimento das patas anteriores, comprovado pelo pior desempenho no teste do passo em falso (Fig. 28c). Assim como no experimento I, para tal grupo foi detectada atrofia apenas das fibras tipo I da região profunda, sendo que, diferentemente do primeiro experimento, o exercício praticado pelo grupo IED não foi suficiente para a prevenção da atrofia destas fibras.

A redução na área das fibras tipo I do grupo isquemiado exercitado (IED), na região superficial do bíceps braquial, comprovam que a isquemia cerebral determina atrofia das fibras musculares, uma vez que os animais controle exercitados apresentaram uma área significativamente maior destas fibras.

Foi observada hipertrofia apenas das fibras tipo II da região superficial do bíceps braquial em animais isquemiados sedentários (IS). No experimento I também foi observada hipertrofia destas fibras em animais isquemiados.

#### 6.4.2) Sóleo

Os valores obtidos na mensuração da área das fibras musculares no sóleo estão apresentados na Fig. 34.

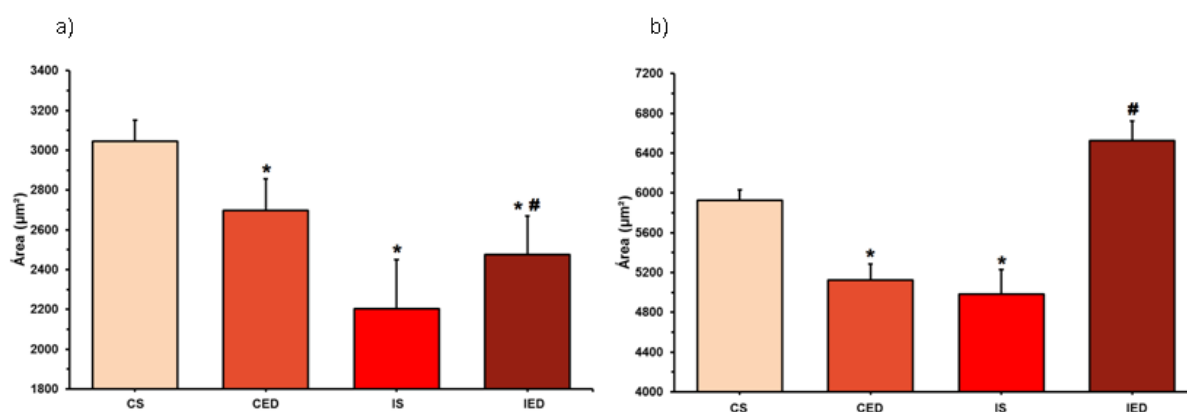


Figura 34 - Área de secção transversal de fibras no sóleo. a) Fibras tipo I. \*P<0,05 vs grupo CS. #P<0,05 vs grupo IS; b) Fibras tipo II. \*P<0,05 vs grupo CS. #P<0,05 vs grupos CED e IS. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Foi observada menor área das fibras tipo I (Fig. 34a) nos grupos CED (2697,19±158,83), IS (2202,69±248,16) e IED (2475,24±195,08) em relação ao grupo controle sedentário (CS: 3044,49±106,17). O grupo isquemiado exercitado (IED) apresentou área das fibras tipo I significativamente maior que os animais isquemiados sedentários (IS).

Em relação às fibras tipo II (Fig. 34b) foi observada atrofia nos grupos CED (5125,63±158,83) e IS (4982,38±248,16) quando comparados aos grupos CS (5927,98±106,17) e IED (6526,73±195,08).

Assim como no experimento I foi detectada atrofia das fibras musculares no sóleo dos animais isquemiados sedentários (SI), porém o programa de treinamento em esteira após a indução da isquemia cerebral (grupo IE) foi eficiente na prevenção da atrofia destas fibras.

Choe *et. al.* (2006) avaliaram os efeitos do exercício físico em esteira sobre o sóleo de ratos isquêmicos, e observaram que o exercício físico colaborou na redução da atrofia muscular, uma vez que os animais que se submeteram ao treinamento apresentaram uma área de fibras tipo I significativamente maior em relação aos animais sedentários. Assim como Choe *et. al.* (2006), vimos que o exercício físico de baixa intensidade, após a indução da isquemia cerebral produziu efeitos benéficos em relação à atrofia das fibras musculares dos animais isquemiados treinados (grupo IED). Acredita-se que a atrofia muscular após a isquemia cerebral deve-se à inatividade e à perda dos estímulos neurais, sendo que o estímulo gerado pelo exercício físico é capaz de restabelecer parte destes estímulos perdidos.

#### **6.4.3)Tibial anterior**

Os valores obtidos na mensuração da área das fibras musculares nas regiões superficial e profunda do tibial anterior estão apresentados nas Figs. 35 e 36.

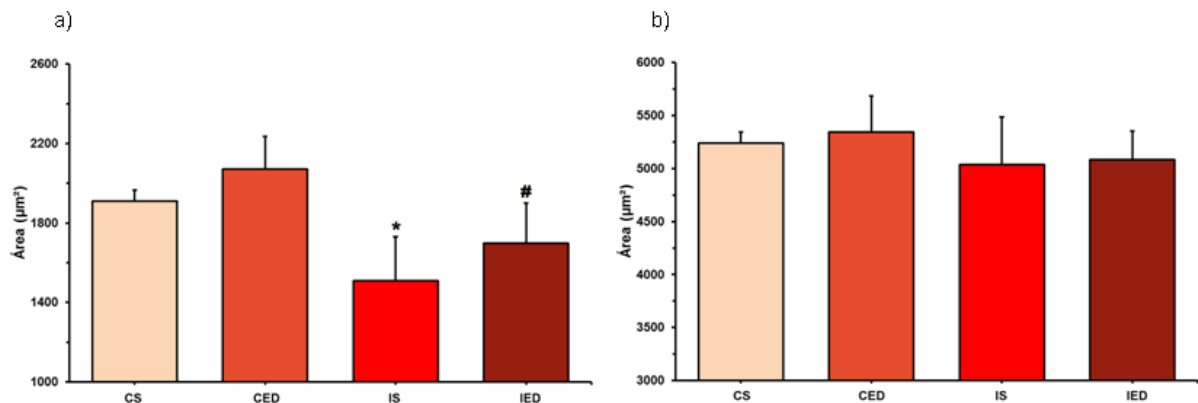


Figura 35 - Área de secção transversal de fibras na região superficial do tibial anterior. a) Fibras tipo I. \* $P < 0,05$  vs grupos controle. # $P < 0,05$  vs grupo IS; b) Fibras tipo II. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

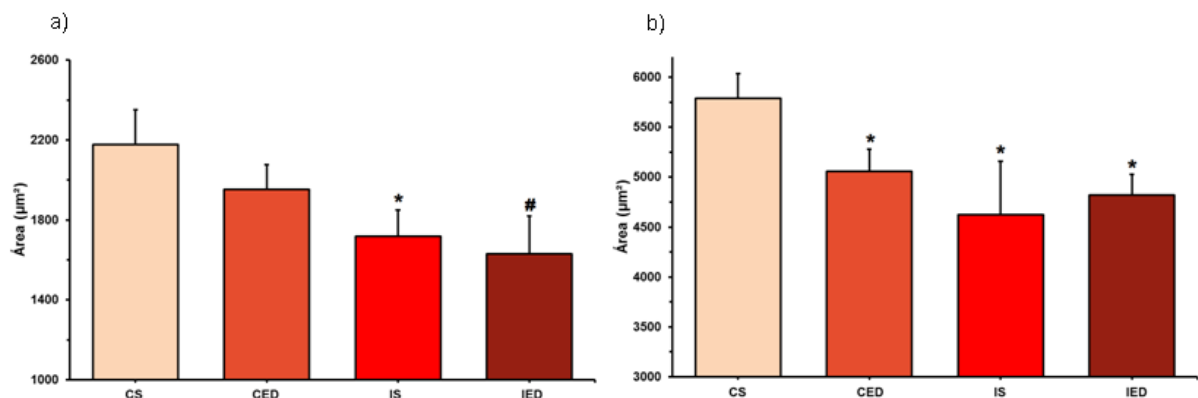


Figura 36 - Área de secção transversal de fibras na região profunda do tibial anterior. a) Fibras tipo I. \* $P < 0,05$  vs grupo CS. # $P < 0,05$  vs grupos controle; b) Fibras tipo II. \* $P < 0,05$  vs grupo CS. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Assim como no experimento I, na região superficial do tibial anterior (Fig. 35) alterações significativas na área das fibras foram observadas apenas nas fibras tipo I (Fig. 35a), onde detectou-se menor área destas fibras nos animais isquemiados sedentários (IS:  $1508,23 \pm 222,26$ ) em relação aos animais controle sedentários (CS:  $1909,13 \pm 57,72$ ). Foi observada maior área das fibras tipo I no grupo isquemiado exercitado (IED:  $1698,67 \pm 200,54$ ) em relação ao grupo isquemiado sedentário (IS). Quanto às fibras tipo II (Fig. 35b) não houve alterações significativas na área de secção transversal (CS:  $5242,58 \pm 102,96$ ; CED:  $5346,25 \pm 339,92$ ; IS:  $5036,78 \pm 451,06$  e IED:  $5083,66 \pm 270,04$ ).

Na região profunda do tibial anterior (Fig. 36) também foi detectada atrofia das fibras tipo I e tipo II nos animais isquemiados. Detectou-se menor área das fibras tipo I (Fig. 36a) dos grupos IS ( $1954,33 \pm 121,90$ ) e IED ( $1629,57 \pm 189,74$ ) quando comparados ao grupo CS ( $2177,49 \pm 174,01$ ). Nas fibras tipo II (Fig. 36b) observou-se

menor área das fibras dos grupos CED (5056,78±219,99), IS (4625,53±532,61) e IED (4821,17±203,68) em relação ao grupo controle sedentário (CS: 5786,93±248,07).

Portanto, assim como observado no experimento I, a oclusão da ACM causou atrofia seletiva de fibras tipo I na região superficial, e atrofia de fibras tipo I e tipo II da região profunda dos animais do grupo IS, sendo que o exercício de baixa intensidade após a cirurgia do grupo IED promoveu melhoras apenas na região superficial do tibial anterior, prevenindo a atrofia das fibras tipo I.

### **6.5) Proporção volumétrica**

Assim como no experimento I, a avaliação histológica dos músculos bíceps braquial, sóleo e tibial anterior dos diferentes grupos mostrou predominância de fibras musculares com morfologia preservada (Fig. 37). Os valores médios encontrados para a frequência dos componentes musculares (citoplasma de fibras musculares normais, núcleo da fibra, interstício, elementos vasculares, mastócitos, leucócitos, fibras alteradas e núcleos de fibras deslocados) dos diversos grupos estão apresentados nas Figs. 38, 39 e 40.

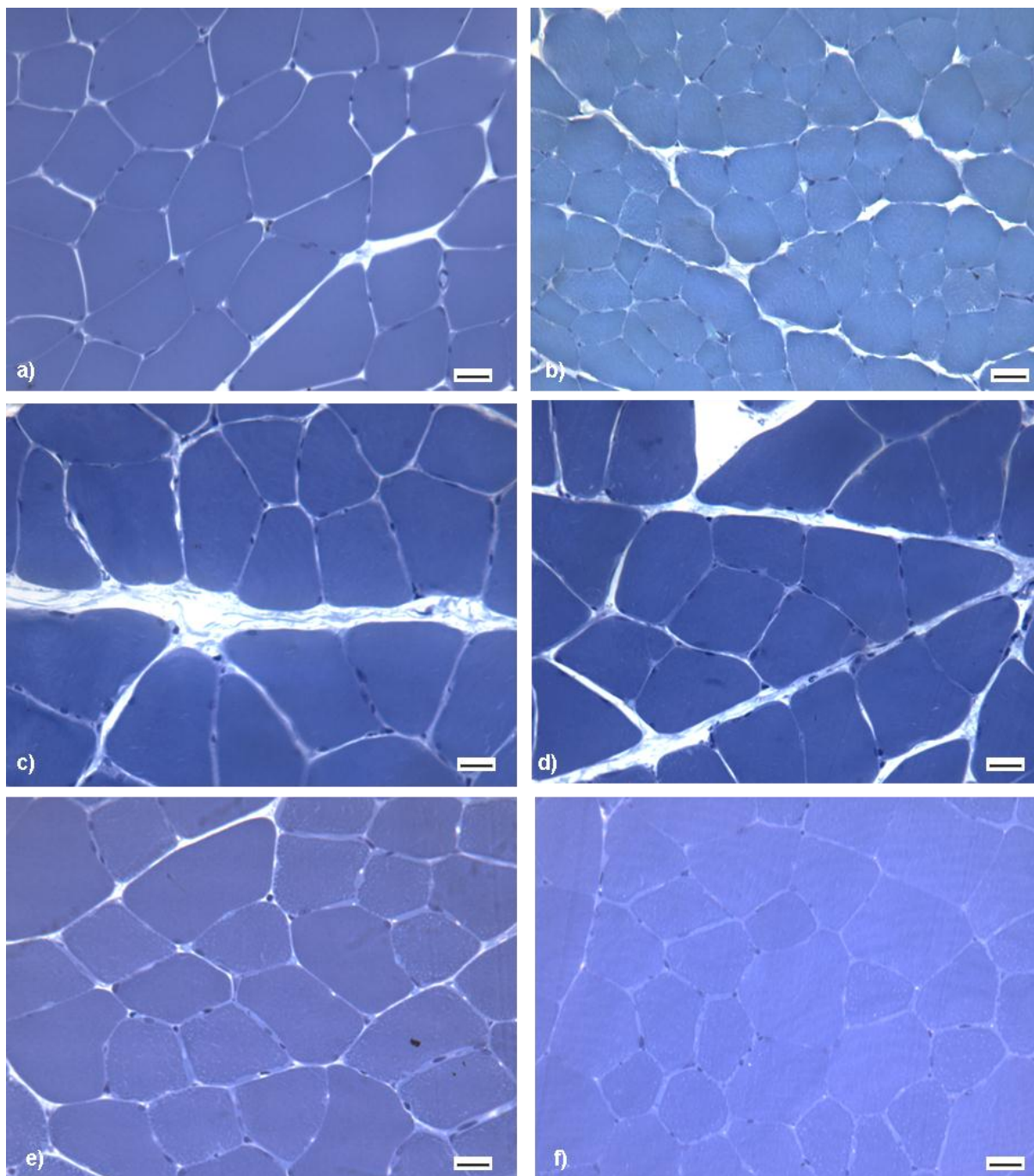


Figura 37 - Fibras musculares, em corte transversal, de animais controle (a,b,c) e isquemiados (d,e,f) sedentários. a,d – bíceps braquial; b,e – sóleo; c,f – tibial anterior. Coloração: Azul de Toluidina + Borato de sódio. Barra: 20  $\mu$ m.

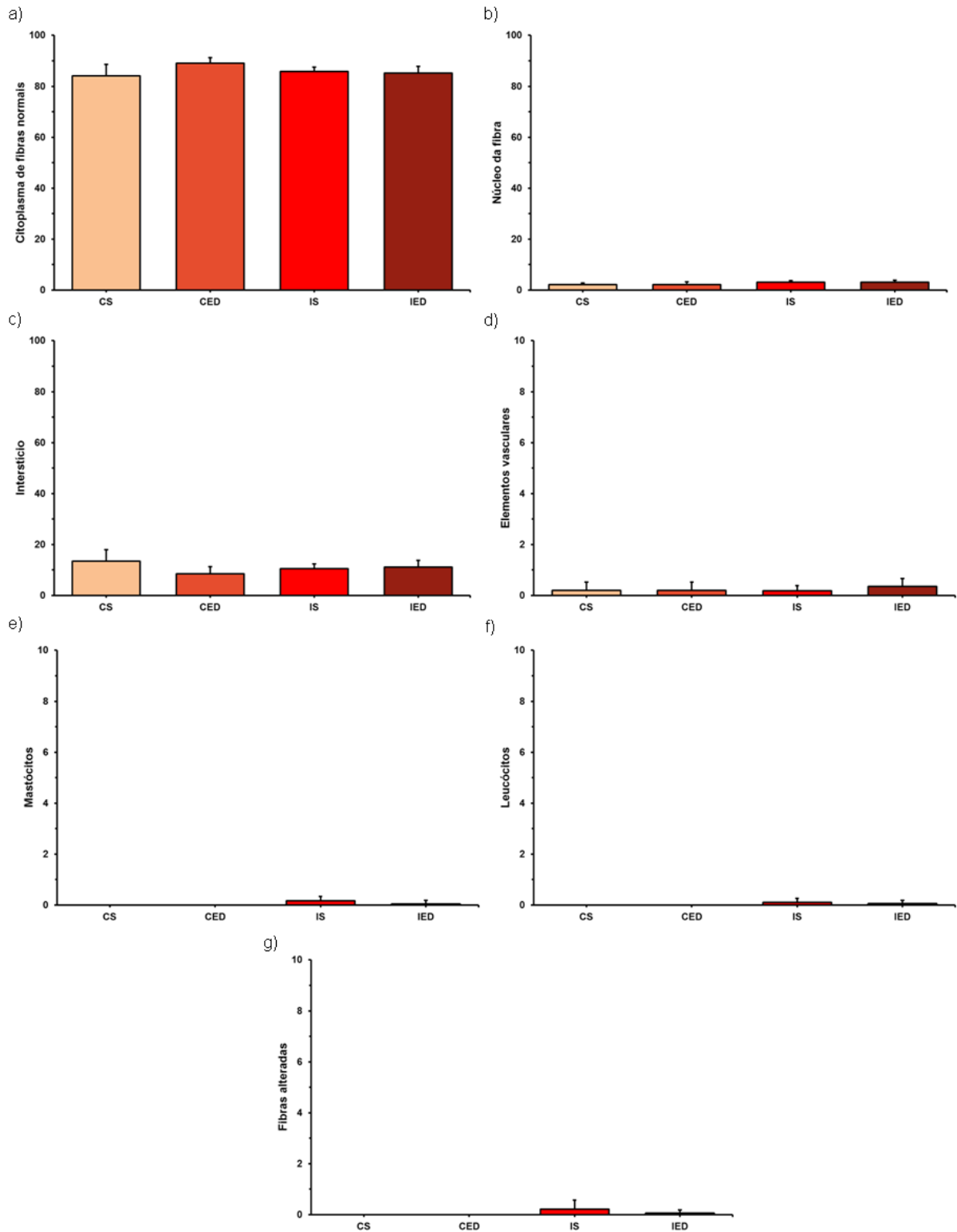


Figura 38 - Frequência dos componentes do bíceps braquial. a) Citoplasma de fibras musculares normais; b) Núcleo das fibras; c) Interstício; d) Elementos vasculares; e) Mastócitos; f) Leucócitos; g) Fibras alteradas. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Em relação à frequência dos constituintes do bíceps braquial (Fig. 38) não foram observadas alterações significativas na proporção de citoplasma de fibras normais (Fig. 38a) – CS:  $84,07 \pm 4,55$ ; CED:  $89,07 \pm 2,22$ ; IS:  $85,77 \pm 1,78$  e IED:  $85,25 \pm 2,60$  –, núcleos das fibras (Fig. 38b) – CS:  $2,16 \pm 0,58$ ; CED:  $2,16 \pm 1,09$ ; IS:  $3,02 \pm 0,64$  e IED:  $3,06 \pm 0,87$  –, interstício (Fig. 38c) – CS:  $13,55 \pm 4,45$ ; CED:  $8,54 \pm 2,69$ ; IS:  $10,48 \pm 1,94$  e IED:  $11,12 \pm 2,67$  – e elementos vasculares (Fig. 38d) – CS:  $0,20 \pm 0,33$ ; CED:  $0,20 \pm 0,33$ ; IS:  $0,19 \pm 0,19$  e IED:  $0,36 \pm 0,31$  – entre os diferentes grupos. Mastócitos (Fig. 38e), Leucócitos (Fig. 38f) e fibras alteradas (Fig. 38g) foram encontrados apenas nos animais isquemiados (grupos IS e IED).

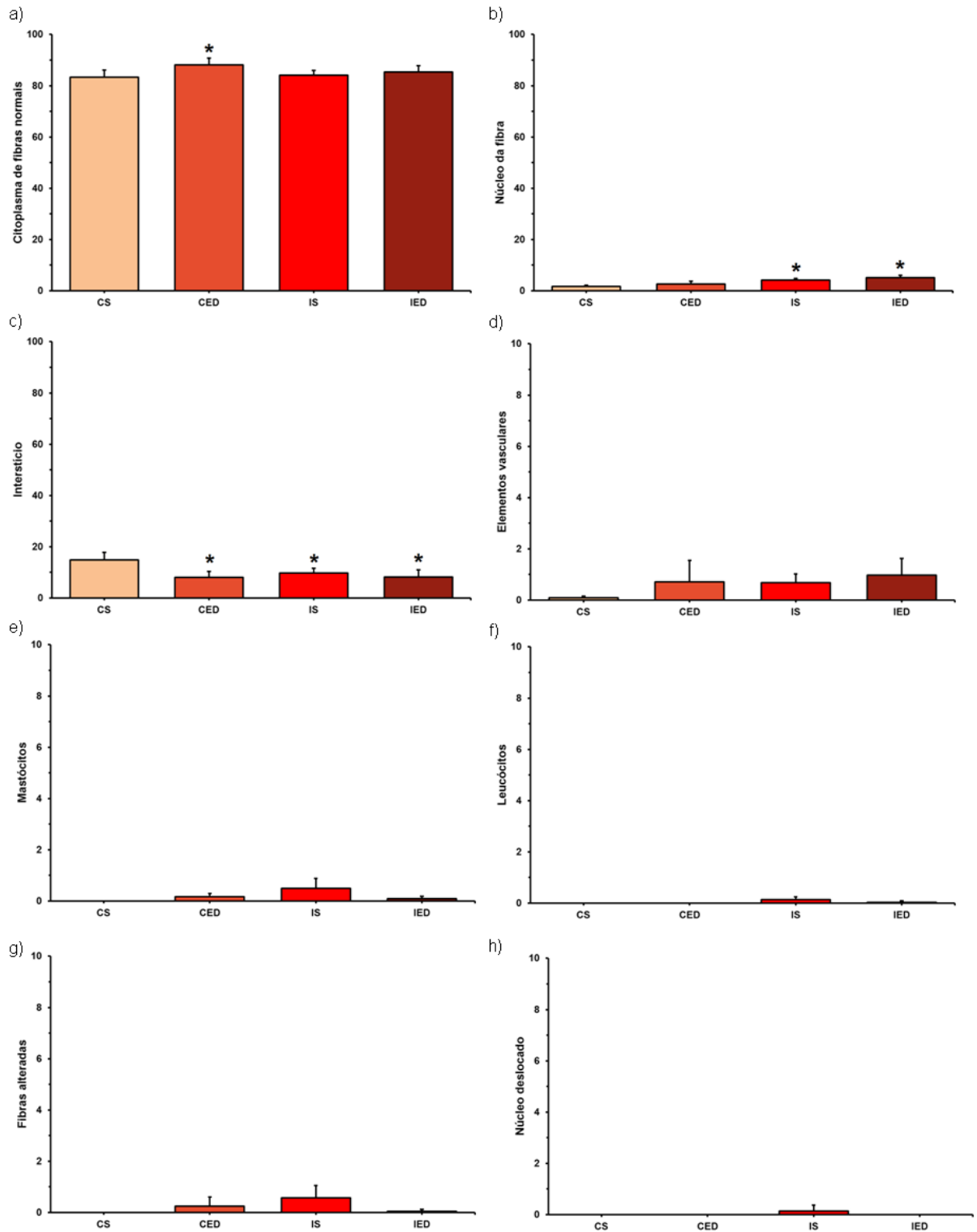


Figura 39 - Frequência dos componentes do sóleo. a) Citoplasma de fibras musculares normais. \* $P < 0,05$  vs grupos CS e IS; b) Núcleo das fibras. \* $P < 0,05$  vs grupos controle; c) Interstício. \* $P < 0,05$  vs grupo CS; d) Elementos vasculares; e) Mastócitos; f) Leucócitos; g) Fibras alteradas; h) Núcleos de fibras deslocados. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Quanto à frequência dos constituintes do sóleo (Fig. 39), foi observada maior frequência no número de pontos sobre o citoplasma de fibras normais (Fig. 39a) do grupo CED ( $88,20 \pm 2,54$ ) em relação aos grupos CS ( $83,27 \pm 2,80$ ) e IS ( $84,13 \pm 1,86$ ). Quanto à proporção de núcleos das fibras (Fig. 39b), percebe-se maior frequência nos animais isquemiados (IS:  $4,11 \pm 0,67$  e IED:  $5,16 \pm 0,86$ ) em relação aos animais controle (CS:  $1,70 \pm 0,42$  e CED:  $2,57 \pm 1,20$ ). A proporção de interstício (Fig. 39c) apresentou redução em todos os grupos (CED:  $8,05 \pm 2,25$ ; IS:  $9,76 \pm 1,83$ ; IED:  $8,27 \pm 2,74$ ) em relação ao grupo CS ( $14,93 \pm 2,85$ ). Em relação à vascularização do sóleo (Fig. 39d) não houve diferença significativa entre os diferentes grupos (CS:  $0,08 \pm 0,06$ ; CED:  $0,72 \pm 0,83$ ; IS:  $0,67 \pm 0,34$  e IED:  $0,97 \pm 0,65$ ), apesar do aumento na proporção dos elementos vasculares nos animais isquemiados e nos animais controle exercitados. Mastócitos (Fig. 39e) foram encontrados nos grupos CED, IS e IED, com presença relevante no grupo isquemiado sedentário (IS). Leucócitos (Fig. 39f) e núcleos deslocados (Fig. 39h) foram visualizados somente nos animais isquemiados sedentários (IS). Fibras alteradas (Fig. 39g) apareceram nos grupos CED, IS e IED.

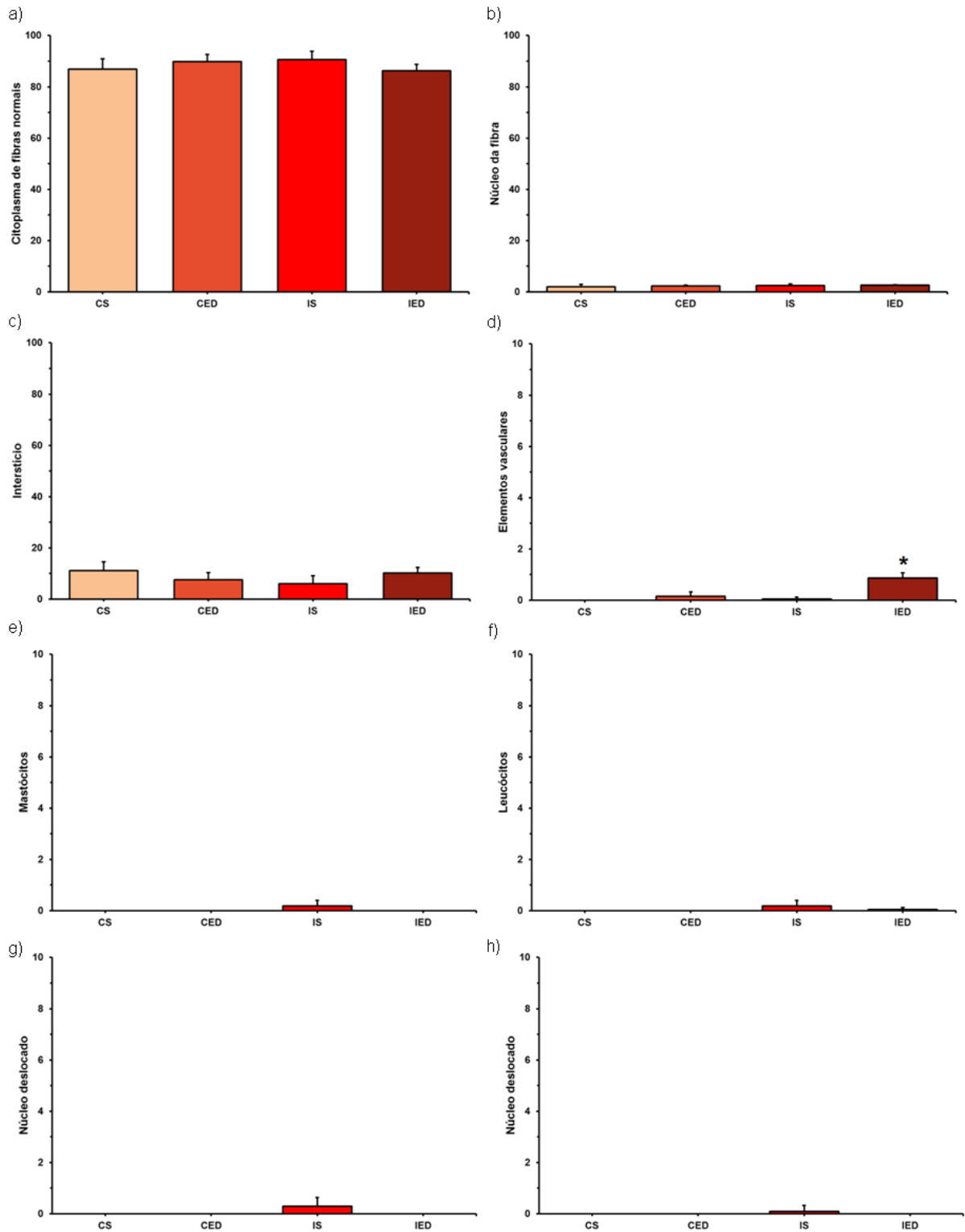


Figura 40 - Frequência dos componentes do tibial anterior. a) Citoplasma de fibras musculares normais; b) Núcleo das fibras; c) Interstício; d) Elementos vasculares. \*P<0,05 vs demais grupos; e) Mastócitos; f) Leucócitos; g) Fibras alteradas h) Núcleos de fibras deslocados. CS = Grupo controle sedentário; CED = Grupo controle exercitado depois da falsa cirurgia; IS = Grupo isquemiado sedentário; IED = Grupo isquemiado exercitado depois da cirurgia de OACM.

Para a frequência dos constituintes do tibial anterior (Fig. 40), não foram observadas alterações significativas na proporção de citoplasma de fibras normais (Fig. 40a) – CS:  $86,84 \pm 4,04$ ; CED:  $89,87 \pm 2,81$ ; IS:  $90,52 \pm 3,27$  e IED:  $86,35 \pm 2,43$  –, núcleos das fibras (Fig. 40b) – CS:  $2,02 \pm 0,84$ ; CED:  $2,29 \pm 0,39$ ; IS:  $2,52 \pm 0,58$  e IED:  $2,54 \pm 0,23$  – e interstício (Fig. 40c) – CS:  $11,12 \pm 3,47$ ; CED:  $7,65 \pm 2,79$ ; IS:  $6,01 \pm 3,15$  e IED:  $10,17 \pm 2,27$  – entre os diferentes grupos. Em relação à vascularização do tibial anterior (Fig. 40d) percebe-se maior frequência no grupo IED ( $0,87 \pm 0,20$ ) quando comparado aos demais grupos (CS:  $0 \pm 0$ ; CED:  $0,16 \pm 0,17$  e IS:  $0,04 \pm 0,09$ ). Mastócitos (Fig. 40e), fibras alteradas (Fig. 40g) e núcleos de fibras deslocados (Fig. 40h) foram encontrados apenas no grupo isquemiado sedentário (IS). Leucócitos (Fig. 40f) foram identificados apenas nos animais isquemiados (grupos IS e IED).

Apesar da redução significativa da área das fibras observadas no sóleo e em determinadas regiões do bíceps braquial e do tibial anterior dos animais isquemiados, a frequência de citoplasma de fibras musculares normais entre os diferentes grupos não mostrou alterações significativas. Houve diminuição na proporção de interstício apenas no sóleo dos animais dos grupos CED, IS e IED, acompanhando a redução significativa na área das fibras musculares (Fig. 34) nestes grupos, confirmando que a atrofia atingiu o sóleo como um todo.

Com relação à proporção de núcleos das fibras musculares, observou-se aumento no sóleo dos animais isquemiados em relação aos animais controle sedentários, assim como no experimento I, confirmando que o músculo poderia estar em processo de regeneração, uma vez que o aumento no número de mionúcleos pode estar associado a eventos de regeneração muscular.

Novamente, elementos vasculares foram mais frequentes nos animais isquemiados quando comparados aos animais controle. Entre os animais isquemiados, aqueles que foram submetidos ao treinamento em esteira, apresentaram maior proporção de elementos vasculares em relação aos animais sedentários, tanto no sóleo quanto no tibial anterior.

Mastócitos e leucócitos, assim como no experimento I, foram identificados principalmente nos animais isquemiados sedentários e treinados, com maior incidência nos animais do grupo IS. A menor frequência destas células nos músculos dos animais treinados pode ser um indicativo de que o exercício físico de fato promoveu uma melhor recuperação e regeneração dos músculos afetados.

A ocorrência de fibras alteradas novamente coincidiu com a presença de mastócitos e/ou leucócitos, sendo identificadas principalmente nos animais isquemiados sedentários, confirmando que estas células talvez possam estar envolvidas nos processos de regeneração muscular.

Núcleos deslocados para o centro da fibra foram identificados apenas em animais isquemiados sedentários, no sóleo e no tibial anterior, coincidindo com a ocorrência de fibras alteradas, mastócitos e leucócitos. Novamente, a identificação destes núcleos pode ser um forte indicativo de lesão muscular prévia.

Portanto, à semelhança do experimento I, acreditamos que as principais alterações detectadas nos músculos dos animais isquemiados são processos normais de regeneração muscular.

## **7) CONCLUSÕES**

O exercício físico de baixa intensidade, iniciado após uma semana da indução da isquemia, além de promover a recuperação motora dos animais, atenua a atrofia muscular nos membros do lado parético e também pode influenciar a reparação muscular por meio da estimulação da angiogênese.

## 8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, G. Effect of DHEA on hindlimb muscles in a focal cerebral ischemia model rat. **Taehan Kanho Hakhoe Chi**, v. 34, p.150 – 159, 2004.

AN, G. Y.; LEE, Y. K.; IM, J. H.; CHOI, S.; CHOE, 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.

ARASAKI, K.; IGARASHI, O.; ICHIKAWA, Y.; MACHIDA, T.; SHIROZU, I.; HYODO, A.; USHIJIMA, R. Reduction in the motor unit number estimate (MUNE) after cerebral infarction. **Journal of Neurological Sciences**, v, 250, p. 27-32, 2006.

ASTRUP, J., SIESJO, B.K., SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia – The ischemic penumbra. **Stroke**, v. 12, p. 723 – 725, 1981.

BACIGALLUPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D. M. Animal models of ischemic stroke. Part one: modeling risk factors. **The Open Neurology Journal**, v. 4, p. 26 – 33, 2010A.

BACIGALLUPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D. M. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. **The Open Neurology Journal**, v. 4, p. 34 – 38, 2010B.

BACIGALUPPI, M.; HERMANN, D. M. New targets of neuroprotection in ischemic stroke. **Scientific World Journal**, v. 8, p. 698 – 712, 2008.

BACICH, D. J.; WOZNIAK, K. M.; LU, C. M.; O'KEEFE, D. S.; CALLIZOT, N.; HESTON, H. D. W.; SLUSHER, B. S. Mice lacking glutamate carboxypeptidase II are protected from peripheral neuropathy and ischemic brain injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, p. 314 – 323, 2005.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. Porto Alegre: ArtMed, 2008.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 5272-5280, 2001.

BLAND, S.T.; PILLAI, R.N.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J.C.; SCHALLERT, T. Early overuse and disuse of the affected forelimb after moderately severe intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126, p. 33 - 41, 2001.

BRANDSTATER, M. E. Reabilitação no Derrame. In: DeLisa JA, Gans, BM, editores. **Tratado de Medicina de Reabilitação: princípios e prática**. 3a ed. São Paulo: Manole, p. 1227-53, 2002.

BROOKE, M. H., KAISER, K. K., Three “myosin ATPase” systems: the nature of their ph lability and sulfhydryl dependence. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 18, p. 670 - 672, 1970.

BROWN, D.A.; KAUTZ, S.A. Increased workload enhances force output during pedaling exercise in persons with poststroke hemiplegia. **Stroke**, v. 29, p. 598 - 606, 1998.

BROWN, M.M. Brain attack: a new approach to stroke. **Clinical Medicine**, v. 2, p.60-65, 2002.

CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. **NeuroRx**, v. 2, p. 396 – 409, 2005.

CHANG, H.; YANG, Y.; WANG, P. KUO, C.; WANG, R. Effects of insulin like growth factor 1 on muscle atrophy and motor function in rats with brain ischemia. **Chinese Journal of Physiology**, v. 53, p. 337 - 348, 2010.

CHANG, H.; YANG, Y.; WANG, S. P.; WANG, R. Effects of treadmill training on motor performance and extracellular glutamate level in striatum in rats with or without transient middle cerebral artery occlusion. **Behavioural Brain Research**, v. 205, p. 450 – 455, 2009.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 209 – 238, 2004.

CHOE, M.; AN, G. J.; LEE, Y. K.; IM, J. H.; CHOI-KWON, S.; HEITKEMPER, M. Effect of early low-intensity exercise on rat hind-limb muscles following acute ischemic stroke. **Biological Research for Nursing**, v. 7,p. 163 – 174, 2006.

CHOE, M. A.; AN, G. J.; LEE, Y. K.; IM, J. H.; CHOI-KWON, S.; HEITKEMPER, M. Effect of inactivity and undernutrition after acute ischemic stroke in rats hindlimb muscle model. **Nursing Research**, v. 53, p. 283 - 292, 2004.

CHOE, M. A.; SHIN, G. S. Effect of periodic low-intensity exercise on the hindlimb muscles of hindlimb suspended rats. **Journal of Korean Biological Nursing Science**, v. 15, p. 57 - 66, 1999.

CICILIOT, S.; STEFANO SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p.906 – 914, 2010.

DAMÁZIO, L. C. M.; MELO, R. T. R.; CARVALHO, P. H.; OKANO, B. S.; AUGUSTO, L. E. F.; LIMA, M. C.; RIBEIRO, R. I. M. A.; ALVES, N. R.; NATALI, A. J.; DEL CARLO, R. J.; MALDONADO, I. R. S. C. Physical activity promoting neuroprotection structural and functional brain ischemia in rats with occlusion by transient middle cerebral artery. **Simpósio de Biologia Celular da UFMG**. Resumo disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/sbc/?q=cadastrarresumo/physical-activity-promoting-neuroprotection-structural-and-functional-brain-ischemia>

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

DATTOLA, R.; GIRLANDA, P.; VITA, G.; SANTORO, M.; ROBERTO, M. L.; TOSCANO, A.; VENUTO, C.; BARADELLO, A.; MESSINA, C. Muscle rearrangement

in patients with hemiparesis after stroke: An Electrophysiological and Morphological Study. **European Neurology**, v. 33, p.109-114, 1993.

DIETZ, V.; KETELSEN, U.; BERGE, W.; QUINTERN, J. Motor unit involvement in spastic paresis. **Journal of Neurological Science**, v. 75, p. 89 – 103, 1986.

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.

DOCCOL CORPORATION [www.doccol.com](http://www.doccol.com) (Acesso em 06/07/12 às 12:05).

DONNAN, G. A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, S. M. **Stroke**. *Lancet*, v. 371, p. 1612 – 1623, 2008.

DUARTE, J. A. **Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício**. Tese de Doutoramento em Ciências do Desporto, Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física, Universidade do Porto, 1993.

DUARTE, J. A.; MOTA, M. P.; NEUPARTH, M. J.; APPELL, H. J.; SOARES, J. M. C. Miopatia do exercício. Anatomopatologia e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 1, p. 73 – 80, 2001.

ENCARNACION, A.; HORIE, N.; KEREN-GILL, H.; BLISS, T. M.; STEINBERG, G. K.; SHAMLOO, M. Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 196, p. 247 – 257, 2011.

ENGARDT, M; KNUTSSON, E.; JONSSON, M.; STEHANG, M. Dynamic muscle strength training in stroke patients: effects on knee extension torque, electromyographic activity and motor achievements. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 67, p. 419 - 425, 1995.

EWEKA, A. O.; EWEKA, A.; OM'INIABOHS, F. A. E. Histological studies of the effects of monosodium glutamate of the fallopian tubes of adult female Wistar rats. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 2, p. 146 – 149, 2010.

FARRELL, R.; EVANS, S.; CORBETT, D. Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death. **Neuroscience**, v. 107, p. 585 - 592, 2001.

FUENTES, I.; COBOS, A. R.; SEGADE, L. A. G. Muscle fibre types and their distribution in the biceps and triceps brachii of the rat and rabbit. **Journal of Anatomy**, v. 192, p. 203 – 210, 1998.

GARBER, K. Stroke treatment--light at the end of the tunnel? **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 838 – 840, 2007.

[GREEN, H. J.](#); [THOMSON, J. A.](#); [DAUB, W. D.](#); [HOUSTON, M. E.](#); [RANNEY, D. A.](#) Fiber composition, fiber size and enzyme activities in vastuslateralis of elite athletes involved in high intensity exercise. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 18, p. 109 – 117, 1979.

GREEN, H; TUPLING, R; ROY, B; O'TOOLE, D; BURNETT, M; GRANT, S. Adaptations in skeletal muscle exercise metabolism to a sustained session of heavy intermittent exercise. **American Journal of Endocrinology Metabolic**, v. 278, p.118 - 126, 2000.

HACHISUKA, K.; UMEZU, Y.; OGATA, H. Disuse atrophy of lower limbs in hemiplegic patients. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 78, p. 13 – 18, 1997.

HAFER-MACKO, C. E.; YU, S. RYAN, A. S.; IVEY, F. M.; MACKO, R. F. Elevated tumor necrosis factor-alpha in skeletal muscle after stroke. **Stroke**, v. 36, p. 2021 – 2023, 2005.

HAINSWORTH, A. H.; MARKUS, H. S. Do in vivo experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 28, p. 1877 – 1891, 2008.

HAMILL, J.; KNUTZEN, K.M. **Bases biomecânicas do movimento humano**. Manole, São Paulo, 1999.

HATA R, MAEDA K, HERMANN D, MIES G, HOSSMANN KA. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 20 p. 937 – 946, 2000.

HERMANN DM, KILIC E, HATA R, HOSSMANN KA, MIES G. Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice. **Neuroscience**, v. 104, p. 947 – 955, 2001.

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

HOWELLS, D. W.; PORRITT, M. J.; REWELL, S. S. J.; O'COLLINS, V.; SENA, E. S.; WORTH, H. B.; TRAYSTMAN, R. J.; MACLEOD, M. R. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, p. 1412 – 1431, 2010.

HUNTER, A.J.; HATCHER, J.; VIRLEY, D.; NELSON, P.; IRVING, E.; HADINGHAM, S.J.; PARSONS, A.A. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 806 - 816, 2000.

IVEY, F. M.; HAFER-MACKO, C. E.; MACKO, R. F. Exercise training for cardiometabolic adaptation after stroke. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation**, v. 28, p. 2 – 11, 2008.

IVEY, F. M.; RYAN, A. S.; HAFER-MACKO, C. E. High prevalence of abnormal glucose metabolism and poor sensitivity of fasting plasma glucose in the chronic phase of stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 22, p. 368 – 371, 2006.

IWABE, C.; DIZMAR M.; BARUDY, D.P. Análise cinemática da marcha em indivíduos com acidente vascular encefálico. **Revista de Neurociências**, v. 16, p. 292-296, 2008.

KHANNA, S.; ROY, S.; SLIVKA, A.; CRAFT, T.K. S.; CHAKI, S.; RINK, C.; NOTESTINE, M. A.; DEVRIES, A. C.; PARINANDI, N. L.; SEN. C. K. Neuroprotective properties of the natural vitamin E  $\alpha$ -tocotrienol. **Stroke**, v. 36, p. 2258- 2264, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins-Patologia Básica**. Trad. Adriana Pittela Sodr  et al., 8<sup>a</sup>. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p. 941 – 945, 2008.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 97, 2009.

LAUGHLIN, M . H.; MOHRMAN, S. J.; AMSTRONG, B. Molecular blood flow distribution patterns in the hindlimb of swimming rats. **The American Journal of Physiology**, v. 246, p. 398 – 403, 1984.

LEE, M.H.; KIM, H.; KIM, S.S.; LEE, T.H.; LIM, B.V.; CHANG, H.K.; JANG, M.H.; SHIN, M.C.; SHIN, M.S.; KIM, C.J. Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils. **Life Sciences**, v. 73, p. 2455-2465, 2003.

LEE, S.; SHIN, J.; HONG, Y.; LEE, M.; KIM, K.; LEE, S.; CHANG, K.; HONG, Y. Beneficial effects of melatonin on stroke-induced muscle atrophy in focal cerebral ischemic rats. **Laboratory of Animal Research**, v. 28, p. 47 – 54, 2012.

LEE, Y.; CHOE, M.; AN, G. J. Effects of isometric contraction training by electrostimulation on type I and II hindlimb muscles in cerebral ischemia model rats. **Taehan Kanho Hakhoe Chi**, v. 36, p. 1232 – 1241, 2006.

LEITE, H. R.; NUNES, A. P.N.; CORR A, C. L. Perfil epidemiol gico de pacientes acometidos por acidente vascular encef lico cadastrados na estrat gia de sa de da fam lia em Diamantina, MG. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 16, p. 34 - 39, 2009.

LEMON, R.N. & GRIFFITHS, J. Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? **Muscle Nerve**, v. 32, p. 261-279, 2005.

LI, J.; LUAN, X.D.; CLARK, J.C.; RAFOLS, J.A.; DING, Y.C. Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise pre-conditioning in rats. **Neurology Research**, v.26, p. 404 – 408, 2004.

LI, L.; RONG, W.; KE, Z.; HU, X.; YIP, S. P.; TONG, K. Y. Muscle activation improvement during treadmill training at ischemia rat. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 21, p. 318 – 326, 2011.

- LIU, F.; MCCULLOUGH, L. D.; Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, V. 20, p. 1 – 9, 2010.
- LONGA, E.Z.; WEINSTEIN, P.R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. Reversible middle cerebral-artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke**, v. 20, p. 84-91, 1989.
- LOPEZ, A. D.; MATHERS C. D.; EZZATI, M.; JAMISON, D. T.; MURRAY, C. J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. **Lancet**, v. 367, p. 1747 – 1757, 2006.
- LYDEN, P.D.; LONZO, L.M.; NUNEZ, S.Y.; DOCKSTADER, T.; MATHIEUCOSTELLO, O.; ZIVIN, J.A. Effect of ischemic cerebral volume changes on behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 87, p. 59 - 67, 1997.
- MACKO, R. F.; DESOUZA, C. A.; TRETTER, L. D. Treadmill aerobic exercise training reduces the energy expenditure and cardiovascular demands of hemiparetic gait in chronic stroke patients: A preliminary report. **Stroke**, v. 28, p. 326 – 330, 1997.
- MARIN, R.; WILLIAMS, A.; HALE, S.; BURGE, B.; MENSE, M.; BAUMAN, R.; TORTELLA, F. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 80, p. 167– 175, 2003.
- McCOMAS. A. J.; SICA, R. E. P.; UPTON, A. R. M.; AGUILERA, N. Functional changes in motoneurons of hemiparetic patients. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 36, p. 183-193, 1973.
- MCKINNELL, I. W.; RUDNICKI, M. A. Molecular mechanisms of muscle atrophy. **Cell**, v. 119, p. 907 – 910, 2004.
- MEMEZAWA, H.; SMITH, M. L.; SIESJO, B.K. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral-artery occlusion in rats. **Stroke**, v. 23, p. 552 - 559, 1992.
- MENZIES, S.A.; SMITH, R. R.; HOFF, J.T.; BETZ, A.L. Middle cerebral-artery occlusion in rats - A neurological and pathological evaluation of a reproducible model. **Neurosurgery**, v. 31, p. 100 – 107, 1992.
- MIYAI, I.; SUZUKI, T.; KANG, J.; KUBOTA, K.; VOLPE, B.T. Middle cerebral artery stroke that includes the premotor cortex reduces mobility outcome. **Stroke**, v. 30, p. 1380 - 1383, 1999.
- MODO, M.; STROEMER, R. P.; TANG, E.; VEIZOVIC, T.; SOWNISKI, P.; HODGES, H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 104, p. 99 - 109, 2000.
- NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. **Life Sciences**, v. 69, p. 369 - 381, 2001.

NUDO, R.J.; NELSON, R.J. Animal models of stroke and rehabilitation - Introduction. **IilarJournal**, v. 44, p. 81 - 82, 2003.

OLIVEIRA, R. J. Atividade física e doença cerebrovascular. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 9, p. 65-78, 2001.

OTERO, R. M.; GUIMARÃES, A. G.; COELHO, P. M. P.; FREITAS, G. R. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 99 – 103, 2009.

PAPADOPOULOS, C. M., TSAI, S. Y., GUILLEN, V., ORTEGA, J., KARTJE, G. L., WOLF, A. Motor recovery and axonal plasticity with short-term amphetamine after stroke. **Stroke**, V. 40, P. 294 – 302, 2009.

PAXINOS, G. **Cerebral Vascular System. In The Rat Nervous System**, Academic Press (ed) p. 3 - 35. San Diego, 1995.

POTEMPA, K.; BRAUN, L. T.; TINKNELL, T.; POPOVICH, J. Benefits of aerobic exercise after stroke. **Sports Medicine**, v. 21, p. 337 - 346, 1996.

PULLEN, A. H. The distribution and relative sizes of three histochemical fibre types in the rat tibialis anterior muscle. **Journal of Anatomy**, v. 123, p. 1 – 19, 1977.

RAHME, R.; ABRUZZO, T. A.; RINGER, A. J. Acute ischemic stroke in the setting of cervical carotid occlusion: A proposed management strategy. **World Neurosurg**, v. 76, p. 60 – 65, 2011.

RAMSAY, J. W.; BARRANCE, P. J.; BUCHANAN, T. S.; HIGGINSON, J. S. Paretic muscle atrophy and non-contractile tissue content in individual muscles of the post-stroke lower extremity. **Journal of Biomechanics**, v. 44, p. 2741 – 2746, 2011.

REGLODI, D.; TAMAS, A.; LENGVARI, I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 59, p. 459 - 466, 2003.

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, p. 227 - 233, 2004.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 13, p. 67 - 82, 1999.

ROTHMAN, S. M.; OLNEY, J. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. **Annals of Neurology**, v. 19, p. 105 – 111, 1986.

RYAN, A. S.; DOBROVOLNY, C. L.; SMITH, G. V.; SILVER, K. H.; MACKO, R. F. Hemiparetic muscle atrophy and increased intramuscular fat in stroke patients. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, p. 1703 – 1707, 2002.

SALMELA, L.F.T.; OLIVEIRA, E.S.G.; SANTANA, E.G.S.; RESENDE, G.P. Fortalecimento muscular e condicionamento físico em hemiplégicos. **Acta Fisiátrica**, v. 7, p. 108 - 118, 2000.

SCELSI, R.; LOTTA, S.; LOMMI, G.; POGGI, P.; MARCHETTI, C. Hemiplegic atrophy. Morphological findings in the anterior tibial muscle of patients with cerebral vascular accidents. **Acta Neuropathology**, v. 62, p.324 -331, 1984.

SCHERBAKOV, N.; DOEHNER, W. Sarcopenia in stroke—facts and numbers on muscle loss accounting for disability after stroke. **Journal of Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 2, p. 5 – 8, 2011.

SHARP, S. A.; BROUWER, B. J. Isokinetic strength training of the hemiparetic knee: Effects on function and spasticity. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 78, p. 1231 - 1236, 1997.

SHEEHAN, D.C.; HRAPCHAK, B.B. **Theory and Practice of Histotechnology**.2<sup>a</sup>. th., Saint Louis, Battelle Memorial Institute, 1987.

SIMONEAU, J. A.; LORTIE, G.; BOULAY, M. R.; MARCOTTE, M; THIBAUT. M. C.; BOUCHARD, C. Human skeletal muscle fiber type alteration with high-intensity intermittent training. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v.54, p. 250 – 253, 1985.

SNOW, L. M.; LOW, W. C.; THOMPSON, L.V. Skeletal muscle plasticity after hemorrhagic stroke in rats: influence of spontaneous physical activity. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 91, p. 1 – 13, 2012.

TEIXEIRA-SALMELA, L.F.; LIMA, R.C.M.; LIMA, L.A.O. Assimetria e desempenho funcional em hemiplégicos crônicos antes e após programa de treinamento em academia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 9, p. 227 - 233, 2005.

VOOS, M.C.; RIBEIRO, V.L.E. Estudo comparativo entre a relação do hemisfério acometido no acidente vascular encefálico e a evolução funcional em indivíduos destros. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 2, p. 113 – 120, 2008.

WHITE, B.C.; SULLIVAN, J.M.; DEGRACIA, D.J.; O'NEIL, B.J.; NEUMAR, R.W.; GROSSMAN, L.I.; AFOLS, J.A.; KRAUSE, G.S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 179, p. 1 - 33, 2000.

WINSTEIN, C. J.; MERIANS, A. S.; SULLIVAN, K. J. Motor learning after unilateral brain damage. **Neuropsychologia**, v. 37, p. 975 - 987, 1999.

YAN, Z.; OKUTSU, M.; AKHTAR, Y. N.; LIRA , V. A. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, p. 264 – 274, 2011.

YANG, Y.; CHANG, H.; WANG, P. S.; WANG, R. Motor performance improved by exercises in cerebral ischemic rats. **Journal of Motor Behavior**, v.44, p. 97 – 103, 2012.

ZAUSINGER, S.; HUNGERHUBER, E.; BAETHMANN, A.; REULEN, H.J.; SCHMID-ELSAESSER, R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. **Brain Research**, v. 863, p. 94-105, 2000.

ZHANG, F., JIA, J., WU, Y., HU, Y., WANG, Y. The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2658 – 2669, 2010.

ZHANG, L.; CHEN, J.L.; LI, Y.; ZHANG, Z.G.; CHOPP, M. Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 174, p. 141 - 146, 2000.

ZHENG, L.; YIP, S. P.; LI, L.; ZHENG, X.; TONG, K. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: A rat brain ischemia model. **Plos One**, v. 6, p. 1 – 8, 2011.

ZHENG, Q.; ZHU, D.; BAI, Y.; WU, Y.; J, J.; HU, Y. Exercise improves recovery after ischemic brain injury by inducing the expression of angiotensin-1 ad Tie-2 in rats. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 224, p. 221 – 228, 2011.