

Maira de Castro Lima

**EFEITO DO TREINAMENTO MOTOR SOBRE
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS ISQUEMIA
CEREBRAL EM RATOS**



Belo Horizonte

2006

Maira de Castro Lima

**EFEITO DO TREINAMENTO MOTOR SOBRE
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS ISQUEMIA
CEREBRAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, ICB-UFMG, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: André Ricardo Massensini

Co-orientador: Márcio Flávio Dutra Moraes

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
UFMG
2006

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Programa Institutos do Milênio 2005-2008. Instituto do Milênio para o desenvolvimento de fármacos baseados em toxinas peptídicas.

Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG – PRPq/UFMG

Dedico esse trabalho aos meus pais,

Rafael e Imaculada,

aos meus irmãos,

Maurício, Marcelo e Marcus

ao meu namorado,

João

... porque sem o amor e o apoio incondicional de cada um, nada seria possível.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador Prof. André Ricardo Massensini por ter acreditado em mim quando tudo era incerteza. Por ter caminhado sempre ao meu lado sendo minha referência e meu ponto de apoio. Por ser meu pai científico e por me ensinar dedicação e amor ao trabalho de todo dia.

Ao Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes por colocar toda sua brilhante inteligência a favor da educação e da ciência. Por não deixar que seus alunos se esqueçam do retorno que devem ao cidadão brasileiro que financia nossa formação. Obrigada pelas grandes discussões científicas e filosóficas que recebemos no dia a dia do laboratório.

À prof. Maria Carolina Doretto, pelo exemplo de amor e dedicação ao próximo. Por nos mostrar que o conhecimento deve ser sempre colocado a serviço da sociedade e do bem comum. Por me inspirar a ser mais que uma profissional competente, um ser humano competente.

Ao prof. Cândido pelas sábias opiniões e colocações durante o treinamento físico dos animais. Por disponibilizar os recursos de seu laboratório para a realização desse trabalho.

Ao Roberto pela dedicação e competência na realização dos testes funcionais. Por ter perdido tantas festas para estar no laboratório aos finais de semana. Esse trabalho é nosso!

Ao Fumega por ter sido meu “orientador” por tanto tempo. Por ter investido sua inteligência na resolução de inúmeras questões do meu trabalho. Obrigada, meu amigo!

Aos meus animais experimentais que perderam a própria vida para a geração de novos conhecimentos.

À Luciana e à Patrícia pela amizade, pelo carinho e apoio. Pelo exemplo de pessoas dedicadas ao trabalho bem executado.

Ao Léo e ao Elvano por nossa amizade ter atravessado os limites da universidade e existir na certeza do “até que a morte nos separe”.

Aos “Lords NNC”, Gabriel, Fuscaldi, Vinícius, Eric, João Doretto, Bocão, Tupete, Gustavo, Túlio, Guilherme pela ajuda em tudo o que foi necessário para a realização desse trabalho. Pela disposição em resolver meus problemas com computadores ou com animais. Pela simples presença que tornou sempre melhor o nosso ambiente de trabalho.

Às “Ladies NNC”, Maura, Gioconda, Jerusa, Mariele, Daniela, Aline, Aila (madrinha), Cláudia pela amizade e pelo apoio. Por formarem um grupo de pessoas nobres que foram o meu apoio durante todo o mestrado.

À Ana Luiza pela amizade sincera. Pela cumplicidade nas dificuldades do mestrado.

Aos colegas do laboratório de endocrinologia, Virgínia, Daniel, Laura, Ana Cristina, Cláudio, Simonton pelos conselhos no experimento e pelas agradáveis conversas.

Aos colegas de departamento, Priscila, Kátia, Ana Paula, Éder pela amizade que nasceu nos corredores.

Ao Taquinho pela ajuda técnica nos trabalhos do laboratório. Pela amizade e pelo companheirismo que nasceu entre nós. Pelas músicas que alegraram nossas manhãs.

À Rose por sempre zelar pelo ambiente de trabalho seja com sua super vassoura ou com sua alegria contagiante e sua presença sempre prazerosa.

Às minhas amigas de infância Camila, Fernanda, Renata Miranda e Renata Lacerda por terem me feito tão feliz em momentos de descanso. Por me mostrarem que amizades verdadeiras nunca morrem.

Aos meus padrinhos, Petrônio e Gorett, por serem exemplos de pessoas competentes profissionalmente e mais competentes ainda no serviço ao próximo.

A todos os meus familiares que entenderam minha ausência em inúmeros momentos e que torcem pelo meu sucesso profissional e pessoal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **087/05** relativo ao projeto intitulado: **"Efeito do treinamento motor sobre recuperação funcional e neurogênese após isquemia cerebral em ratos"**, que tem como responsável André Ricardo Massensini, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal** (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **14.09.2005**.

Este certificado expira-se em **14.09.2010**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **087/05** related to the project entitled **"Effect of motor training on functional recovery and neurogenesis after cerebral ischemia in rats"**, under the supervision André Ricardo Massensini, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** (CETEA/UFMG) and was approved in **14.09.2005**.

This certificate expires in **14.09.2010**.

Belo Horizonte, 15 de setembro de 2005


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)-
Fmail – cetea@proa.ufmg.br

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC _ artéria carótida comum

ACE _ artéria carótida externa

ACI _ artéria carótida interna

ACM _ artéria cerebral média

AVE _ acidente vascular encefálico

b.p.m. _ batimentos por minuto

BrdU _ bromodeoxiuridine

ECG _ eletrocardiograma

FC _ frequência cardíaca

IE _ isquemia/ exercício

i.p. _ intraperitoneal

IS _ isquemia/sedentário

SE _ sham/exercício

SNC _ sistema nervoso central

SS _ sham/sedentário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fio de oclusão da artéria cerebral média.....	17
Figura 2. Visão superior da caixa preta em que foram realizados os testes de campo aberto..	22
Figura 3. Visão superior da grade em que foram realizados os testes passo em falso.	23
Figura 4. Animal caminhando sobre as barras paralelas durante o teste.....	24
Figura 5. Eletrodos de registro de ECG.....	26
Figura 6. Animal após a realização da cirurgia de implantação de eletrodos para registro de ECG.	27
Figura 7. Aparato de registro de ECG.	28
Figura 8. Registro de ECG.	30
Figura 9. Parâmetros do Paxinos para a localização das fatias avaliadas na medida do volume de infarto.	32
Figura 10. Radiografia do crânio do animal com o fio de oclusão de aço em seu interior.	36
Figura 11. Cérebro de animal perfundido com o corante Azul de Evans após oclusão da ACM.	37
Figura 12. Visão inferior de cérebro de animal perfundido com o corante Vermelho Neutro após oclusão da ACM.	37
Figura 13. Medida da FC durante treinamento na esteira (valores de Δ FC)	39
Figura 14. Medida da FC durante treinamento na esteira.....	40
Figura 15. Medida do peso corporal dos animais ao longo do experimento	42
Figura 16. Distância percorrida pelos animais no teste de campo aberto.	44
Figura 17. Número de erros cometidos pelos animais no teste passo em falso.....	47
Figura 18. Erros cometidos pelos animais no teste das barras paralelas (em escala).....	50
Figura 19. Volume de infarto do hemisfério esquerdo em relação ao direito.	52
Figura 20. Fatias cerebrais dos animais dos diversos grupos experimentais.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala dos erros cometidos pelos animais na realização do teste das barras paralelas.	34
Tabela 2: Valores de ΔFC dos grupos controle, sham e isquemia em todas as velocidades de treinamento.	38
Tabela 3: Valores da porcentagem da distância percorrida (cm) pelos animais no teste de campo aberto.....	43
Tabela 4. Velocidade máxima desenvolvida pelos animais no teste de campo aberto.	45
Tabela 5: Distância percorrida pelos animais no teste passo em falso	48
Tabela 6. Velocidade máxima desenvolvida pelos animais no teste passo em falso.	48
Tabela 7. Valores das razões entre as áreas do hemisfério direito sobre a área do hemisfério esquerdo nas fatias.....	51

RESUMO

Após isquemia cerebral, os animais apresentam déficits motores e sensoriais do lado contralateral à lesão. O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do exercício sobre a recuperação funcional e área de infarto de ratos Wistar machos submetidos à isquemia cerebral. O modelo de oclusão transitória da artéria cerebral média foi utilizado para indução de isquemia. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais sham/sedentário, sham/exercício, isquemia/sedentário, isquemia/exercício. Foi realizado um experimento para adequar o esforço realizado pelos animais do grupo isquemia/exercício na esteira àquele do grupo sham/exercício. Os animais sham treinaram a uma velocidade de 15m/min e os isquemiados a 3m/min. A avaliação comportamental foi realizada através dos testes funcionais campo aberto, passo em falso e barras paralelas no pré-operatório e nos 10^o e 31^o dias pós-operatórios. O teste campo aberto avalia atividade exploratória espontânea, o passo em falso a coordenação motora das patas anteriores e as barras paralelas a coordenação motora das patas posteriores. A área de lesão foi calculada dividindo-se a área do hemisfério direito pela área do hemisfério esquerdo em cada fatia cerebral. Os animais do grupo isquemia/exercício recuperaram mais peso que os animais do grupo isquemia/sedentário. A lesão isquêmica e o treinamento físico na esteira não influenciaram a atividade exploratória espontânea do animal. Os animais do grupo isquemia/sedentário mostraram recuperação motora espontânea da coordenação das patas anteriores. Os animais do grupo isquemia/exercício mostraram recuperação da coordenação motora das patas posteriores com o treinamento motor na esteira. A área de infarto foi menor nos animais do grupo isquemia/exercício. O exercício físico após lesão cerebral é capaz de promover recuperação funcional e reduzir a área de infarto em ratos Wistar machos que foram submetidos a isquemia cerebral.

ABSTRACT

Cerebral ischemia resulting from artery occlusion leads to neuronal cell death and eventually causes neurological impairments. The goal of this work was to study the effect of the motor training on functional recovery and infarction region after cerebral ischemia in rats. Stroke was induced by a 1 hour middle cerebral artery occlusion using an intraluminal filament. Adult male Wistar rats were divided into four groups: sham/sedentary, sham/exercise, ischemia/sedentary, and ischemia/exercise. Motor training of exercise groups consisted of sham animals running at a speed of 15m/min and ischemic animals running at a speed of 3m/min. Animals from the four groups were examined with three different motor tests (open field, passo em falso and parallel bar) before (0 day) and at 10 and 31 days after surgery in order to quantify functional recovery. Open field assesses spontaneous exploratory activity, the footfault test measures the precise grip and placement of the forelimbs and the parallel bar measures the precise grip and placement of the hind limbs. Infarction was calculated by dividing the areas of the right hemisphere and the left hemisphere of sequential cerebral coronal cuts. The ischemia/exercise group showed higher body weight than the group ischemia/sedentary. Cerebral injury and motor training did not change the spontaneous exploratory activity of the animals. Animals from the ischemia/sedentary group showed spontaneous motor recovery of the forelimb. Animals from the ischemia/exercise group showed motor recovery of the forelimb and hindlimb induced by motor training. The infarction area in the ischemia/exercise group was lower than in the ischemia/sedentary group. In conclusion, motor training after cerebral injury induced functional recovery and reduced the infarction area in Wistar rats.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Neuroplasticidade Induzida por Lesão Isquêmica.....	5
1.2. Atividade Física e Neuroplasticidade em Condições Fisiológicas e Patológicas.....	7
1.3 Atividade física adequada para promoção de benefícios após lesão cerebral	12
2. OBJETIVO GERAL.....	14
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Animais.....	15
3.2. Grupos Experimentais	15
3.3. Cuidados Pré-operatórios	15
3.4. Confeção do Fio de Oclusão.....	16
3.5. Cirurgia de Oclusão Transitória da Artéria Cerebral Média	17
3.5.1. Sistema de aquecimento dos animais durante procedimento cirúrgico.....	18
3.5.2. Teste da eficácia do método de oclusão da ACM	19
3.5.3. Cuidados pós-operatórios	20
3.5.4. Critérios de Inclusão (índice de gravidade e recuperação pós-cirúrgica).....	20
3.6. Testes Funcionais	20
3.6.1. Campo Aberto	21
3.6.2. Passo em falso Teste.....	22
3.6.3. Barras Paralelas	23
3.7. Protocolo de Treinamento Motor na Esteira.....	24
3.8. Experimento para Determinar a Velocidade de Treinamento do Grupo Isquemiado.	25
3.8.1. Grupos Experimentais	25
3.8.2. Critérios de Inclusão	25
3.8.3. Confeção do Eletrodo para Registro do ECG.....	26
3.8.4. Cirurgia de Implantação de Eletrodos para Registro do ECG.....	26
3.8.5. Registro do ECG.....	28
3.8.6. Protocolo de Treinamento	29
3.8.7. Cálculo da Frequência Cardíaca.....	30
3.9. Perfusão	31
3.10. Medida do Volume de Infarto	31
3.11. Análise Estatística	33
4. RESULTADOS	36

4.1.	Caracterização do modelo de oclusão transitória da artéria cerebral média.....	36
4.2.	Efeito da intensidade de exercício sobre a frequência cardíaca nos diferentes grupos de animais	38
4.3.	Efeito do exercício e da isquemia sobre o peso corporal dos animais	41
4.4.	Efeito da isquemia e do exercício sobre a performance dos animais no teste de Campo Aberto	43
4.4.1.	Distância Percorrida pelos animais durante o teste	43
4.4.2.	Velocidade máxima desenvolvida pelos animais durante o teste.....	45
4.4.3.	Número de Quadrantes Visitados pelos animais durante o teste.....	45
4.5.	Efeito da isquemia e do exercício sobre a performance dos animais no teste Passo em falso	46
4.5.1.	Número de Erros Cometidos pelos animais em 3 minutos de teste.....	46
4.5.2.	Distância Percorrida	48
4.5.3.	Velocidade Máxima Desenvolvida pelos animais durante o teste	48
4.5.4.	Número de Quadrantes Visitados pelos animais durante o teste.....	49
4.6.	Efeito da isquemia e do exercício sobre a performance dos animais no teste das Barras Paralelas	49
4.6.1.	Erros cometidos pelos animais ao atravessar as barras paralelas	49
4.6.2.	Efeito do exercício após isquemia sobre a capacidade de realização do teste das barras paralelas	49
4.7.	Medida do Volume de Infarto	51
5.	DISCUSSÃO	54
5.1.	Caracterização do modelo de oclusão transitória da artéria cerebral média.....	54
5.2.	Efeito da intensidade de exercício sobre a frequência cardíaca nos diferentes grupos de animais	56
5.3.	Efeito do exercício e da isquemia sobre o peso corporal dos animais	57
5.4.	Protocolo de Treinamento	58
5.5.	Testes Funcionais	59
5.6.	Neuroplasticidade e recuperação funcional.....	61
5.7.	Medida do volume de infarto	62
6.	CONCLUSÕES	63
7.	BIBLIOGRAFIA	64

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes vasculares encefálicos (AVEs) são clinicamente definidos como uma síndrome neurológica caracterizada pela rápida progressão dos sintomas e sinais de perda de função cerebral focal resultante de alteração isquêmica ou hemorrágica (Feuerstein and Wang, 2000). Ocorrem como resultado de hemorragia ou de isquemia no tecido encefálico. Uma hemorragia ocorre quando uma artéria perde sua elasticidade e se rompe, causando um extravasamento de sangue dentro ou ao redor do tecido encefálico. Isquemia, por outro lado, refere-se a uma restrição do suprimento sanguíneo para o encéfalo, conseqüente de um bloqueio, determinado pela presença de trombo ou êmbolo nas artérias que irrigam determinada área (Brown, 2002;Nudo and Nelson, 2003).

AVEs são a terceira causa de morte e a principal causa de incapacidade entre adultos nos Estados Unidos (Thirumala et al., 2002). Somente no ano de 2000 foram registrados 700.000 novos casos apenas nesse país, o que corresponde a 1 AVE a cada 45 segundos. Cerca de 25% desses indivíduos morrem e 75% deles sobrevivem. Dentre os sobreviventes, de 50 a 75% recuperam alguma independência funcional, mas cerca de 15 a 30% desses permanecem completamente incapacitados (Nudo and Nelson, 2003).

A isquemia corresponde a 61% - 81% dos casos de AVE, onde a maioria resulta de infartos da circulação anterior que envolve as artérias cerebrais anterior e média (Winstein et al., 1999). Mais do que qualquer outro órgão do corpo, a integridade cerebral depende de um contínuo fornecimento de oxigênio e glicose através do sangue para suprir as necessidades energéticas do tecido. Redução severa ou completa do fluxo sanguíneo promove déficits funcionais e bioquímicos instantâneos e irreversíveis em neurônios (Hossmann, 1998). Um breve período de privação de energia induz plasticidade sináptica patológica que pode

contribuir para a morte de neurônios no hipocampo e no estriado após isquemia global e para a conversão da área de penumbra isquêmica no centro do infarto em casos de isquemia focal (Calabresi et al., 2003). Os processos de isquemia e reperfusão envolvem múltiplos mecanismos letais (perda de integridade de membrana no transporte de íons, ativação proteolítica, indução de apoptose, incapacidade de monitorar os próprios mecanismos de sobrevivência celular) que levam a morte neuronal pós-isquemia (White et al., 2000). Durante o processo isquêmico, a concentração de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, aumenta significativamente no compartimento extracelular levando inúmeros neurônios à morte por hiperestimulação (Danbolt, 2001;Nishizawa, 2001). Este fenômeno conhecido como excitotoxicidade é a principal causa de morte celular no processo de isquemia e dá origem a uma cascata de eventos que aumenta a área de morte celular (Nishizawa, 2001). Os neurônios lesados do centro do infarto não se regeneram e produzem déficits neurológicos muitas vezes graves e permanentes (White et al., 2000;Danbolt, 2001).

A oclusão da Artéria Cerebral Média (ACM) representa a forma mais prevalente de AVE e corresponde à aproximadamente 60% das isquemias em humanos (Modo et al., 2000). Essa artéria irriga primariamente a região lateral posterior do córtex frontal e a região lateral anterior dos córtices parietal, motor e sensorial primários. Ramos profundos da ACM irrigam estruturas subcorticais, tais como núcleos basais e cápsula interna (Paxinos, 1995;Winstein et al., 1999). Os sinais clínicos comumente observados após oclusão da ACM são: prejuízos nas funções motora e sensorial no lado contralateral ao hemisfério envolvido, déficits visuais, afasia de expressão e de compreensão e apraxia (Winstein et al., 1999;Biernaskie and Corbett, 2001;Wang et al., 2001;Ding et al., 2002b). AVEs que envolvem a área da ACM e atingem o córtex pré-motor induzem grave perda de mobilidade em humanos (Miyai et al., 1999).

Durante os últimos anos, houve uma explosão no conhecimento sobre lesão neurológica e recuperação. A pesquisa animal foi a grande responsável por esse avanço, uma vez que importantes achados se originaram de pesquisas com células isoladas *in vitro* e também estudos comportamentais complexos envolvendo animais (Turkstra et al., 2003). No entanto, para que se possa chegar a grandes resultados, um modelo de isquemia cerebral experimental deve ser relevante para a situação clínica, fácil de ser executado, altamente reprodutível e deve evitar efeitos colaterais. Além disso, a interpretação das informações experimentais sobre isquemia cerebral requer íntimo conhecimento dos modelos utilizados e das condições em que os dados foram coletados. As três maiores categorias de redução de fluxo sanguíneo, em modelos experimentais, são a isquemia global transitória, a isquemia focal transitória ou permanente e o microembolismo. A isquemia global transitória é obtida através da indução de parada cardíaca ou oclusão das quatro artérias que irrigam o encéfalo. O modelo de microembolismo mais comum é a injeção de micro esferas no interior da carótida (Hossmann, 1998).

Modelos experimentais de isquemia têm sido desenvolvidos em muitas espécies animais (camundongos, ratos, gatos, primatas) usando-se numerosos procedimentos. Estudos têm surgido a favor de modelos de isquemia focal em animais de grande e pequeno porte, com preferência pela oclusão da ACM (Feuerstein and Wang, 2000). O modelo experimental de oclusão da ACM em ratos além de ser o mais utilizado para estudos de lesão isquêmica e para teste da eficácia de drogas neuroprotetoras (Reglodi et al., 2003), é também o mais relevante clinicamente (Hossmann, 1998). Como permite a sobrevivência do animal por longos períodos, esse modelo 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 motor na recuperação de funções (Bland et al., 2001; Ding et al., 2004a), aprendizado motor após lesão (Winstein et al., 1999; Ding et al., 2002b) e efeito

neuroprotetor do exercício antes e após isquemia (Lee et al., 2003;Ding et al., 2004b). Dentre as várias técnicas cirúrgicas que resultam em oclusão permanente ou transitória dessa artéria, aquela que não utiliza a craniotomia é uma das mais eficientes (Longa et al., 1989;Memezawa et al., 1992). Nos últimos anos, a exposição cirúrgica da ACM tem sido substituída pela introdução de um filamento intraluminal via artéria carótida externa (Hossmann, 1998). A cirurgia sem craniotomia não altera a pressão intracraniana e é considerada uma técnica simples e pouco invasiva (Longa et al., 1989;Memezawa et al., 1992). O tempo de isquemia tolerado pelo cérebro depende, entre outros fatores, do tipo de oclusão da artéria (parcial ou completa), do conteúdo energético, 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 e o tamanho do infarto aumentou progressivamente com o aumento do tempo de oclusão (Memezawa et al., 1992).

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, 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;Hudzik et al., 2000;Reglodi et al., 2003). 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, o passo em falso teste e o teste das barras paralelas são muito utilizados. Enquanto o passo em falso teste 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 animal e apresentam

grande reprodutividade de resultados entre os avaliadores (Modo et al., 2000;Ding et al., 2002b;Ding et al., 2004a).

1.1.Neuroplasticidade Induzida por Lesão Isquêmica

Os sobreviventes de um AVE apresentam déficits neurológicos que variam de acordo com o tamanho e a localização da área atingida, bem como da disponibilidade de fluxo sanguíneo colateral (Winstein et al., 1999;Thirumala et al., 2002). Após os danos iniciais de um AVE, todos os pacientes apresentam melhora espontânea em diferentes graus de recuperação (Thulborn et al., 1999;Nudo, 1999;Teasell, 2003). Por exemplo, inicialmente de 80% a 90% dos pacientes apresentam fraqueza significativa dos membros de um lado do corpo, mas essa porcentagem se reduz para 45% a 62% com o passar do tempo (Carmichael, 2003). Essa melhora ocorre predominantemente nas semanas iniciais após AVE podendo continuar durante todo o primeiro ano (Thulborn et al., 1999;Hallett, 2001;Chen et al., 2002). Imagens do cérebro em funcionamento oferecem a oportunidade de se visualizar a ativação cerebral associada com recuperação. Além do exame clínico, exames modernos revelam reorganização de função de áreas cerebrais após lesão. Imagem de ressonância magnética funcional, tomografia por emissão de pósitrons e estimulação magnética transcranial são os principais exames que permitem analisar o cérebro em funcionamento e investigar sua reorganização para a promoção de recuperação espontânea (Thulborn et al., 1999;Hamdy et al., 2000;Thirumala et al., 2002;Teasell, 2003;Dijkhuizen et al., 2003). A recuperação espontânea envolve pelo menos três processos (Carmichael, 2003). O primeiro é a resolução do dano agudo provocado pelo AVE ao tecido cerebral. Melhoras iniciais na função neurológica ocorrem nos primeiros dias após a lesão e são devidas, dentre outras causas, à redução do edema local, reperusão da área de penumbra isquêmica e resolução de processos inflamatórios (Hallett, 2001;Chen et al., 2002;Carmichael, 2003). O segundo processo envolve neuroplasticidade, profundas mudanças estruturais e fisiológicas no tecido cerebral

(Weiller and Rijntjes, 1999;Calabresi et al., 2003). E finalmente, as estratégias comportamentais adotadas pelo paciente, de semanas a meses depois do AVE, para compensar déficits neurológicos. Compensações comportamentais melhoram a funcionalidade, mas representam atividades aprendidas e não mudanças em circuitos cerebrais (Carmichael, 2003). Numerosas teorias e hipóteses tentam explicar a recuperação neurológica presente após AVE, entretanto os mecanismos de recuperação permanecem pobremente entendidos (Weiller and Rijntjes, 1999;Nudo, 1999;Hallett, 2001;Chen et al., 2002;Teasell, 2003).

Neuroplasticidade refere-se à habilidade do sistema nervoso de alterar sua função em resposta a mudanças nas aferências, em situações fisiológicas e patológicas (Hamdy et al., 2000). Alterações plásticas ocorrem em processos de aprendizagem em situações fisiológicas ou em resposta a lesões centrais ou periféricas (Weiller and Rijntjes, 1999). Muito da recuperação após as duas semanas iniciais é provavelmente devido à plasticidade cerebral (Carmichael, 2003). Os papéis precisos da neuroplasticidade em modelar e remodelar comportamentos são ainda desconhecidos, embora estudos realizados nas duas últimas décadas tenham melhorado o entendimento dos mecanismos de plasticidade em si e daqueles relacionados com lesões. Esses estudos têm demonstrado que a neuroplasticidade pode ser benéfica na recuperação da função após lesão no SNC. Mas essas mudanças também podem ser mal adaptativas, por exemplo, gerando dor do membro fantasma após amputação (Nudo, 1999;Hamdy et al., 2000). Vários estudos sustentam a hipótese de que após um AVE, o funcionamento do cérebro reassume características específicas do período de desenvolvimento (Cramer and Chopp, 2000). Os mecanismos envolvidos provavelmente dependem da extensão da lesão. Quando o dano funcional é parcial, dentro do sistema a recuperação é possível, porém após destruição completa, substituição por um sistema funcionalmente relacionado torna-se a única alternativa (Chen et al., 2002).

Após um episódio de isquemia cerebral, há formação de novas sinapses no SNC. Esses novos botões sinápticos são encontrados em regiões neocortical ipsilateral e contralateral à lesão, e parecem estar envolvidos com recuperação funcional (Stroemer et al., 1995; Stroemer et al., 1998).

A lesão isquêmica induz mudanças estruturais contínuas em regiões corticais vizinhas e conectadas à área do infarto cerebral. Em direção à penumbra isquêmica ocorre crescimento do cone axonal de neurônios que circundam a área de infarto e daqueles que estão no córtex contralateral homotópico. O brotamento axonal é apontado como o substrato anatômico que permite a outras áreas cerebrais assumir a função daquela lesada (Carmichael et al., 2001; Carmichael and Chesselet, 2002; Carmichael, 2003).

Estudos realizados em roedores demonstram que há proliferação celular no hipocampo (Jin et al., 2001; Sharp et al., 2002) e em região cortical (Magavi et al., 2000; Jiang et al., 2001) após isquemia cerebral. A neurogênese (formação de novos neurônios) persiste no cérebro adulto e pode ser regulada por eventos fisiológicos e patológicos (Jin et al., 2001). O papel desses novos neurônios na recuperação do animal ainda é desconhecido, mas acredita-se que essas células desempenham alguma função (Kempermann et al., 2004).

1.2. Atividade Física e Neuroplasticidade em Condições Fisiológicas e Patológicas

Inúmeros estudos têm mostrado que o exercício não exerce influência apenas sobre o bem estar físico, mas também sobre o mental, sendo capaz de aumentar a plasticidade e a saúde cerebral (Kolb and Whishaw, 1998; Mattson, 2000; Cotman and Berchtold, 2002). A prática de atividade física tem se mostrado importante para melhora da função cognitiva, além de diminuir os riscos para o desenvolvimento de demências em geral e Alzheimer. Os exercícios físicos e intelectuais podem promover aumento de sobrevivência de neurônios e

resistência a lesões, promovem vascularização cerebral, estimulam neurogênese, aumentam o aprendizado, além de contribuir para a manutenção da função cognitiva durante o processo de envelhecimento (Cotman and Berchtold, 2002). Várias investigações têm sido realizadas para que se entenda o mecanismo de ação do exercício sobre a saúde cerebral (Kolb and Whishaw, 1998; Mattson, 2000; Cotman and Berchtold, 2002). Esses estudos têm concluído que o exercício ativa cascatas de reações moleculares e celulares que induzem e mantêm a plasticidade cerebral através da expressão de genes associados com alterações plásticas e com fatores neurotróficos endógenos, além de promover mudanças na estrutura e na resistência do neurônio à lesão (Cotman and Berchtold, 2002). A atividade física, associada à restrição calórica, aumenta a produção de fatores neurotróficos que potencializam a proliferação celular, aumentam a resistência celular ao envelhecimento e promovem plasticidade sináptica (Mattson, 2000).

Estudos têm demonstrado que o treinamento físico realizado ao longo da vida é capaz de minimizar os efeitos do envelhecimento sobre o SNC. Camundongos C57BL/6J, que apresentam uma média de vida de 27 meses, realizaram exercício físico espontâneo na roda de correr a partir dos 3 meses de idade até completar 24 meses, uma hora por dia durante 5 dias na semana. Quando comparados com animais da mesma idade, porém sedentários, os animais que haviam realizado exercício físico mostraram menor perda da expressão de proteínas relacionadas com brotamento axonal e sinaptogênese no hipocampo. Embora o processo de envelhecimento tenha diminuído a expressão de tais proteínas nesses animais em relação a camundongos jovens de 3 meses, essa perda foi menor que a apresentada pelo grupo de animais sedentários (Chen et al., 1998).

A melhora da habilidade motora do animal normal está relacionada com plasticidade sináptica no tálamo após treinamento físico. Ratas Sprague-Dawley foram treinadas durante 20 minutos por 28 dias em atividades na esteira ou no *Rota-rod* (treino de equilíbrio e

coordenação) e posteriormente avaliadas quanto ao desempenho motor e número de sinapses no tálamo. Aquelas que se exercitaram no *Rota-rod* tiveram melhor desempenho nos testes motores em relação ao grupo que treinou na esteira e ao grupo sedentário, além de apresentarem aumento significativo de sinapses no núcleo mediodorsal e ventromedial do tálamo (Ding et al., 2002a).

Animais normais treinados na esteira, por uma semana, revelaram aumento de células marcadas positivamente com bromodeoxiuridina (BrdU) no giro denteado do hipocampo em relação aos sedentários. BrdU é um análogo da timina que marca células submetidas a replicação do DNA, portanto recém-formadas. Esse marcador biológico foi injetado nos animais (50mg/Kg via intraperitoneal) 1 hora antes da realização do exercício na esteira (Kim et al., 2002).

Em casos de isquemias que envolvem a área da ACM, o exercício físico realizado antes da lesão tem efeito neuprotetor (Wang et al., 2001;Ang et al., 2003;Ding et al., 2004b). Ratos machos que realizaram duas ou quatro semanas de exercício na esteira, antes de serem submetidos à oclusão da ACM por 60 minutos, apresentaram menor volume de infarto e edema cerebral menos severo, quando comparados ao grupo sedentário e ao grupo de animais que se exercitou por uma semana (Wang et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que o treinamento anterior à lesão isquêmica potencializa a expressão de neurotrofinas. Animais que se exercitaram na esteira por 12 semanas, antes da indução da isquemia cerebral focal, mostraram maior expressão de genes relacionados ao fator de crescimento neural. Também apresentaram significativa redução do volume de infarto, provavelmente devido a ação de fatores neurotróficos endógenos (Ang et al., 2003).

Animais treinados em uma esteira por 3 semanas, a uma velocidade de 15m/min, durante 30 minutos diários, antes da oclusão transitória da ACM, apresentaram menos déficits

neurológicos em relação aos não treinados. Além de demonstrarem melhores avaliações neurológicas durante a isquemia, 20 minutos, 24 horas e 48 horas após lesão, também apresentaram menor volume de infarto cerebral, maior expressão de fatores neurotróficos (fator de crescimento neural e fator neurotrófico derivado do encéfalo) no córtex e no estriado e maior número de vasos sanguíneos no estriado (Ding et al., 2004b).

O sistema nervoso periférico também é beneficiado pela atividade física prévia a lesão. Neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, que se exercitaram espontaneamente em uma roda de correr por 3 ou 7 dias, apresentaram maior crescimento em cultura quando comparados ao de sedentários. Após lesão por esmagamento desses neurônios sensoriais *in vivo*, houve maior regeneração nervosa nos ratos que se exercitaram. Também foi demonstrado que esse crescimento é diretamente proporcional à distância percorrida pelo animal (Molteni et al., 2004).

O exercício físico realizado após lesão cerebral pode ser capaz de promover inúmeros benefícios (Will et al., 2004). Após isquemia transitória global, gerbils foram treinados na esteira por 7 dias consecutivos durante 30 minutos. Embora a morte celular apoptótica e a proliferação celular no giro dentado do hipocampo tenham aumentado após lesão, o exercício foi capaz de diminuir a morte celular por apoptose nos animais treinados (Lee et al., 2003). Além do exercício na esteira, outras modalidades de treinamento motor promovem melhora funcional e alterações plásticas após lesão cerebral. Animais submetidos à oclusão transitória da ACM por duas horas foram treinados no *Rota-rod* ou na esteira. O estudo comparou o efeito do treinamento no *Rota-rod*, que envolve equilíbrio e coordenação, com o treinamento na esteira sobre a recuperação funcional. O treinamento de equilíbrio e coordenação motora se mostrou mais eficiente em promover melhora funcional e alterações plásticas após lesão cerebral (Ding et al., 2004a). Em um outro estudo, animais que se

exercitaram espontaneamente na roda de correr mostraram maior recuperação funcional, após oclusão da ACM por 60 minutos (Marin et al., 2003).

Após indução de oclusão da ACM através de microinjeção de endotelina-1, animais foram treinados na atividade de alcance de objetos com a pata anterior afetada. Alguns desses animais em treinamento foram colocados em ambiente enriquecido (inúmeros estímulos diferentes) e outros em ambiente sem estímulos. Ao final do experimento, animais mantidos em ambiente enriquecido mostraram aumento do comprimento e da complexidade dendrítica em relação aos mantidos em ambiente sem estímulos (Biernaskie and Corbett, 2001).

Animais lesionados no córtex sensório-motor da pata anterior e treinados em tarefas motoras complexas (atravessar barras paralelas e cordas suspensas, escalar grades, saltar obstáculos) foram comparados com aqueles que realizaram tarefa motora simples na esteira. Aqueles que foram submetidos a tarefas motoras complexas apresentaram melhor performance nos testes de coordenação da pata anterior e mostraram maior número de sinapses na camada V do córtex motor oposto ao lesado. Esses achados confirmam a relação entre experiência comportamental e plasticidade estrutural após lesão cerebral (Jones et al., 1999). Gerbils submetidos à isquemia global por 5 minutos e colocados em gaiolas com ambiente enriquecido a partir do terceiro dia pós-isquemia, mostraram melhor desempenho em testes funcionais que aqueles colocados em gaiolas sem estímulo. No entanto, apesar do melhor desempenho funcional, esses animais apresentaram aumento da área de lesão isquêmica (Farrell et al., 2001).

Os estímulos ambientais são de extrema importância para a recuperação funcional após dano cerebral. Ratos submetidos à oclusão permanente da ACM e que foram colocados em ambiente enriquecido após lesão apresentaram melhor desempenho nos testes motores

quando comparados com animais treinados na roda de correr, mas não colocados em ambiente enriquecido (Risedal et al., 2002).

1.3 Atividade física adequada para promoção de benefícios após lesão cerebral

Os benefícios promovidos pela atividade física após lesão dependem das condições em que os exercícios são realizados. O tipo de atividade realizada, a intensidade de treinamento e o tempo de início da realização do exercício após lesão são alguns dos parâmetros que devem ser observados (Bland et al., 2001; Ra et al., 2002; Yang et al., 2003; Arida et al., 2004).

Arida e colaboradores realizaram um estudo que teve como objetivo investigar qual tipo de treinamento motor (forçado ou espontâneo) era capaz de promover maior alteração plástica cerebral. Um grupo de ratos Wistar se exercitou voluntariamente na roda de correr, enquanto outro grupo de animais realizou atividade forçada na esteira por 10 dias. Ambos os grupos apresentaram maiores mudanças plásticas no hipocampo em relação ao grupo sedentário. No entanto, os animais que se exercitaram na esteira sofreram alterações menores em relação ao grupo da roda de correr. Esses achados sugerem que o estresse (nesse estudo, induzido pela atividade forçada) é capaz de prejudicar as alterações plásticas cerebrais (Arida et al., 2004).

Para se verificar se havia relação entre a intensidade do treinamento e a formação de novas células no hipocampo, animais normais foram submetidos à natação e a corrida na esteira. Os ratos que praticaram natação foram divididos em 3 grupos de acordo com o tempo de exercício. O grupo de treinamento leve nadou por 1 minuto, o moderado por 5 minutos e o severo por 20 minutos. Os animais que foram treinados na esteira foram divididos em grupos de treinamento leve, moderado e severo de acordo com a velocidade, uma vez que o tempo de corrida foi de 30 minutos para todos. Os resultados mostraram que ratos do grupo de

treinamento moderado na natação e os do grupo de treinamento leve (8m/min) na esteira sofreram as maiores alterações plásticas. Os animais do grupo de treinamento severo (22m/min) na esteira mostraram diminuição no número de novas células no hipocampo em relação aos sedentários. Embora essa queda não seja estatisticamente significativa, esse resultado mostra que o estresse induzido por cargas severas de treinamento é capaz de influenciar negativamente as alterações plásticas cerebrais (Ra et al., 2002).

O tempo após lesão em que a atividade física é iniciada é um parâmetro importante a ser observado. Ratos Sprague-Dawley machos, entre 2 e 3 meses de idade, foram submetidos a treinamento na esteira a uma velocidade de 20m/min, durante 30 minutos, por 5 vezes na semana, após oclusão por 60 minutos da ACM. Os animais que começaram o treinamento 24 horas após a lesão mostraram menos danos neurológicos que aqueles que não treinaram ou começaram o treinamento uma semana depois. Esses resultados comprovam que o exercício físico promove recuperação em qualquer época que é iniciado, mas tem seu efeito potencializado se iniciado precocemente (Yang et al., 2003).

Vários estudos demonstraram que a atividade física promove benefícios após lesão quando realizada de maneira adequada sem provocar sobrecarga de trabalho para os animais. Apesar de todas essas evidências, nenhum trabalho adaptou a carga de treinamento do animal lesado ao do animal não lesado. Em todos os estudos, os animais isquemiados treinaram na mesma intensidade que os normais. Diante dessas evidências, é necessária a adaptação do esforço físico realizado pelo animal isquemiado àquele realizado pelo animal normal.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do exercício sobre a recuperação funcional e área de infarto de ratos Wistar machos submetidos à isquemia cerebral.

2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar o modelo de oclusão da artéria cerebral média.
- Determinar a carga de exercício (velocidade e inclinação da esteira) necessária para promover o mesmo esforço físico nos grupos de animais isquemiados, sham operados e controles não operados.
- Investigar o efeito do treinamento motor sobre o volume de infarto cerebral em animais que sofreram oclusão transitória da artéria cerebral média e avaliar, através de testes comportamentais nestes animais, o grau de recuperação funcional motora.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 275 e 325 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.2. Grupos Experimentais

O estudo foi conduzido com quatro grupos experimentais. Os animais submetidos à isquemia e reperfusão da ACM e conduzidos para o exercício na esteira após lesão cerebral formaram o grupo isquemia/exercício (IE, n=7), enquanto os que não se exercitaram integraram o grupo isquemia/sedentário (IS, n=7). Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico, mas não à oclusão transitória da ACM, e que foram treinados na esteira formaram o grupo sham/exercício (SE, n=8) e os que não realizaram exercício físico fizeram parte do grupo sham/sedentário (SS, n=8).

3.3. Cuidados Pré-operatórios

Cerca de 10 dias antes da realização da cirurgia, os animais foram transferidos para gaiolas individuais para que se adaptassem ao isolamento social. Foram mantidos em um ciclo de 14 horas (6:00 às 20:00) claro e 10 horas escuro, com livre acesso à água e à comida, a uma temperatura controlada entre 22 e 23°C. Durante esse período, todos os animais foram conduzidos à esteira por 3 dias para que pudessem se exercitar a 8, 11 e 15m/min por 2 minutos em cada velocidade. Somente os ratos que conseguiram desempenhar essa tarefa foram utilizados nos experimentos. Os animais também foram conduzidos às barras paralelas um dia antes da realização do teste pré-operatório, para que pudessem explorar livremente o aparato de experimentação. Essa ambientação teve como objetivo diminuir o estresse do animal durante a realização do teste.

3.4. Confeção do Fio de Oclusão

Para a confecção do fio de oclusão, foi utilizado fio de nylon 4-0, Ultralon 4-0 PG – 244 S, monofilamento, preto de 150 cm (Biosut, Belo Horizonte, Brasil). Para que as dobras do fio desaparecessem, o mesmo foi retirado da embalagem, aberto dentro de um livro e colado em suas extremidades com fita crepe, permanecendo esticado por aproximadamente dois dias entre as páginas. Logo em seguida, foi cortado em pequenos pedaços de 25mm de comprimento. Os primeiros 5mm de uma das extremidades da porção do fio tiveram sua espessura aumentada de 200 μ m para 300 μ m, quando foram recobertos por silicone de condensação fluido para impressões (Silon2 APS Fluido, Petrópolis, Brasil) e catalisador concentrado para silicone de condensação (Silon2 APSC, Petrópolis, Brasil). Para isso, o fio foi coberto de forma homogênea com o catalisador utilizado para secagem rápida do silicone, e em seguida revestido pelo silicone. O excesso de silicone foi retirado para que a cobertura da extremidade do fio tivesse a mesma espessura em todos os 5mm cobertos. Após esse procedimento, o fio foi colocado para secar e utilizado 48 horas depois. A espessura dos 5mm de fio cobertos com silicone foi mensurada utilizando uma micro forja para confecção de microeletrodos (Micro Forge, MF – 830, Marishige, Japão). O fio de oclusão está ilustrado na figura 1.

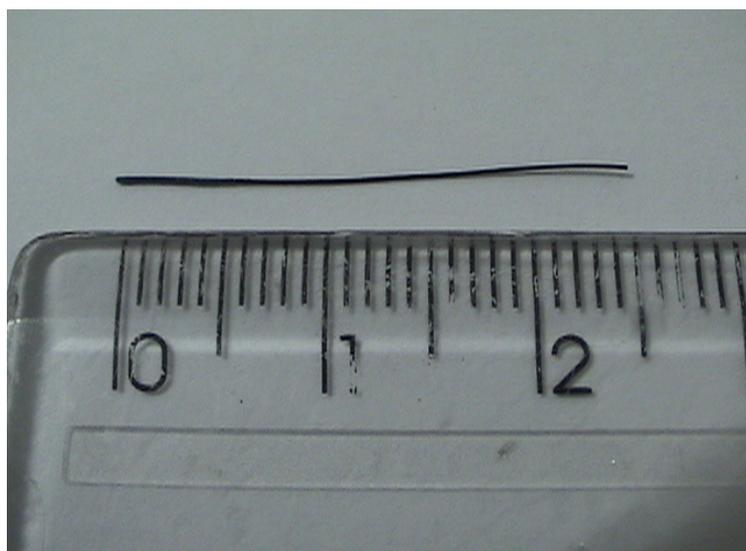


Figura 1 – Fio de oclusão da artéria cerebral média.

Fio de nylon 4-0 utilizado para interrupção transitória do fluxo sanguíneo na artéria cerebral média esquerda. Esse fio possui o comprimento de 25mm e em seus 5mm iniciais tem a espessura de 300 μm de acordo com o calibre da artéria carótida interna no momento em origina as artérias cerebrais média e anterior. Esse fio foi confeccionado de acordo com as referências descritas por Longa, 1989.

3.5.Cirurgia de Oclusão Transitória da Artéria Cerebral Média

O procedimento cirúrgico utilizado para a realização da oclusão transitória da ACM foi descrito em 1989 (Longa et al., 1989). Os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália, Itapira, Brasil) através de uma máscara facial (indução anestésica com 4% Halotano e oxigênio, manutenção com 2-1% Halotano e oxigênio). Após a anestesia, foi injetada atropina diluída em salina a 2% (0,1ml por rato) via intra peritoneal (i.p.) para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à estimulação mecânica do nervo vago durante o procedimento cirúrgico. Foi também administrado Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge, São Paulo, Brasil) (0,1 ml por rato) via intra muscular para cobertura antibiótica profilática. Em seguida, os animais foram tricotomizados na região ventral do pescoço. Essa região foi limpa com álcool iodado e em seguida foi feita uma incisão sagital mediana. Os tecidos foram divulsionados até a bifurcação

da artéria carótida comum (ACC) esquerda ser visualizada. Logo após, o ramo da artéria carótida interna (ACI), pterigo palatino, foi clipado junto a sua origem. A artéria carótida externa (ACE) foi ligada com um fio de seda em sua porção distal da bifurcação da ACC. Após a ACC e a ACI terem sido clipadas, a ACE foi seccionada. O fio de oclusão foi introduzido, através da ACE esquerda no interior da ACI até o local em que se encontrava o clipe colocado anteriormente. Nesse momento, era feito um sorteio para se determinar em qual grupo o animal seria incluído, sham ou isquemiado. Para o animal sham, o fio de oclusão foi retirado da ACI e o fluxo sanguíneo liberado para o SNC. Para o isquemiado, 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 20-21mm da bifurcação da ACC e/ou se houve uma discreta resistência à passagem do fio nessa determinada distância. Em ambos os grupos, a ACE permaneceu clipada durante 60 minutos após a passagem do fio obstrutor. Durante esse período, o animal permaneceu anestesiado com a menor dose de Halotano possível para a manutenção desse estado. Foram monitorados quaisquer efeitos adversos, como parada cardíaca e respiratória, hipersecreção brônquica ou hipotermia, durante a indução da isquemia. Após os 60 minutos de oclusão, o fio foi retirado, a porção da ACE proximal à bifurcação da ACC foi ligada com fio de seda, os afastadores foram retirados e a incisão cirúrgica foi suturada com fio de Nylon 3-0 (Biosut, Belo Horizonte, Brasil). A temperatura corporal dos animais foi mantida a 36-38°C durante todo o procedimento cirúrgico.

3.5.1. Sistema de aquecimento dos animais durante procedimento cirúrgico

Para a manutenção da temperatura corporal (36-38°C) durante o procedimento cirúrgico, foi montado um sistema de aquecimento. Os animais permaneceram sobre uma bolsa de água quente (40°C) durante toda a cirurgia. Montamos um sistema formado por um

banho maria e uma cama de madeira com uma bolsa de borracha conectada por mangueiras à água no interior do banho maria. Através de uma bomba de aquário, a água quente circulou constantemente do banho maria para a bolsa de borracha. Esse sistema mostrou-se eficiente em manter a temperatura corporal dos animais entre 36-38°C por longos períodos. A hipotermia deve ser evitada durante e após o procedimento cirúrgico porque tem efeito neuroprotetor. (Kawai et al., 2000; Kollmar et al., 2002) Foi utilizado um termistor acoplado a um multímetro para a medida da temperatura retal dos animais.

3.5.2. Teste da eficácia do método de oclusão da ACM

Foram realizados dois testes para verificar a eficácia do método de oclusão da ACM. O primeiro teve como objetivo verificar se o fio de oclusão estava seguindo o trajeto da ACI. Para isso, o fio de oclusão de nylon foi substituído por um fio de aço que também teve sua espessura aumentada para 300µm, em seus 5mm iniciais, com silicone. O procedimento cirúrgico foi realizado e a extremidade do fio de oclusão de aço foi posicionada a 20-21mm da bifurcação da ACC. Em seguida, foi feita uma radiografia (0,4 segundos de exposição ao raio-x) com o aparelho odontológico (Gnatus, Ribeirão Preto, Brasil). O segundo teste teve como objetivo verificar se o método empregado na oclusão intraluminal da ACM era eficiente em interromper o fluxo sanguíneo para a área cerebral irrigada por essa artéria. Para a realização desse teste, os animais foram anestesiados com Uretana (140mg/100g) e submetidos à cirurgia para a colocação do fio de oclusão na ACI, no local em que essa se divide nas artérias cerebrais anterior e média. Em seguida, foi realizada perfusão transcardíaca com o fio de oclusão devidamente posicionado. O cérebro dos animais foi perfundido com salina durante 10 minutos e depois com 10 ml de corante (Vermelho Neutro ou Azul de Evans). Depois de retirados dos crânios, os cérebros foram fotografados.

3.5.3. Cuidados pós-operatórios

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em uma sala de recuperação por cerca de duas horas sob luz quente para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38°C. Também foram monitorados quaisquer efeitos adversos. Água e comida foram disponibilizadas. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente por até 12 horas após o fim da cirurgia, em seguida os animais foram transferidos para caixas forradas com maravalha. Os ratos receberam uma dose diária de 2ml de salina i. p. para a reposição de líquidos até o quarto dia pós-operatório. Os animais foram pesados todos os dias, desde o dia da cirurgia até o 32^o dia para acompanhamento do ganho de peso.

3.5.4. Critérios de Inclusão (índice de gravidade e recuperação pós-cirúrgica)

Após a cirurgia, os animais foram classificados em um índice de gravidade de 0 a 4 descrito por Menzies e colaboradores (Menzies et al., 1992). O valor 0 significou ausência de déficit aparente, 1-flexão da pata anterior direita, 2-diminuição da preensão da pata direita quando suspenso pela cauda, 3-movimentação espontânea para todas as direções, mas movimento circular para a esquerda, quando suspenso pela cauda e 4-movimento circular espontâneo para a esquerda. Os animais isquemiados que apresentaram índice quatro de gravidade foram incluídos no experimento e encaminhados por sorteio para seus grupos experimentais (sedentário ou exercício). Os animais sham, incluídos no estudo, apresentaram índice de gravidade igual a zero. Esse exame foi realizado até o 3^o dia pós-operatório.

3.6. Testes Funcionais

São inúmeros os testes propostos para avaliação do desempenho motor dos animais após oclusão da ACM. Os testes funcionais utilizados nesse estudo foram campo aberto, passo em falso e barras paralelas. Os animais foram avaliados em um teste pré-operatório e nos dias

10 e 31 após cirurgia, sempre a partir das 18 horas. Os animais foram levados para a sala de avaliação comportamental cerca de uma hora antes do início dos testes. O avaliador desconhecia o grupo experimental do animal. Os testes funcionais foram realizados sempre na seguinte ordem: campo aberto, passo em falso e barras paralelas.

3.6.1. Campo Aberto

Este teste mensura atividade exploratória. O roedor colocado em um ambiente novo começa a explorá-lo imediatamente.

O animal foi colocado dentro de uma caixa de superfície lisa, de fundo preto e com medidas de 50 x 30 cm, mostrada na figura 2. Essa área foi dividida, virtualmente, em quatro quadrantes. O animal sempre foi colocado no quadrante de número 1 para iniciar o teste. Toda a extensão da superfície da caixa foi filmada de cima por uma câmera de vídeo durante 12 minutos.

Posteriormente, os 10 primeiros minutos desses filmes foram digitalizados e as imagens transferidas para um disco DVD. As imagens foram analisadas através de uma rotina para análise de imagens desenvolvida por pesquisadores do Núcleo de Neurociências usando-se o programa MatLab (The Math Works. Inc., Massachusetts, EUA). Esse programa analisou o contraste entre o conjunto de pixels pretos do fundo da caixa e o conjunto de pixels brancos formados pela imagem do rato. Conhecendo-se o centro de massa do animal, toda sua atividade exploratória pôde ser minuciosamente descrita de forma automatizada pelo computador. Distância percorrida, velocidade máxima desenvolvida e número de quadrantes visitados foram os parâmetros analisados nesse teste.



Figura 2. Visão superior da caixa preta em que foram realizados os testes de campo aberto.

Os animais exploraram a caixa por 10 minutos, em seguida os filmes foram digitalizados e analisados para se descobrir a distância percorrida pelos animais durante a realização do teste. A caixa foi dividida virtualmente em 4 quadrantes. O quadrante 1 localiza-se à esquerda na porção superior e o 2, ao seu lado à direita. O quadrante 3 está à esquerda na região inferior, ao lado do 4 à direita. Os animais sempre foram colocados no quadrante 1 para início do teste.

3.6.2. Passo em falso

Esse teste, utilizado em inúmeros trabalhos que avaliam desempenho funcional após isquemia cerebral, mensura habilidade em integrar respostas motoras. A preensão precisa e o posicionamento das patas anteriores foram analisados.

Os animais foram colocados sobre uma grade (3x3cm) de arame (50 x 100cm) suspensa a 50 cm de altura, mostrada na figura 3, e a correta colocação das patas foi analisada por 3 minutos. Foi considerado um erro toda vez que o animal falhou em pegar a grade e a pata anterior passou por entre o espaço vazio de 9cm². A grade e suas laterais foram pintadas de preto e o fundo coberto por papel preto. Toda a extensão da grade foi filmada de uma visão superior e as imagens geradas foram analisadas após terem sido digitalizadas, da mesma maneira que descrito para o teste de campo aberto. O número de erros que o animal cometeu

com a pata anterior direita em três minutos de teste, distância percorrida, velocidade máxima e número de quadrantes visitados foram analisados.

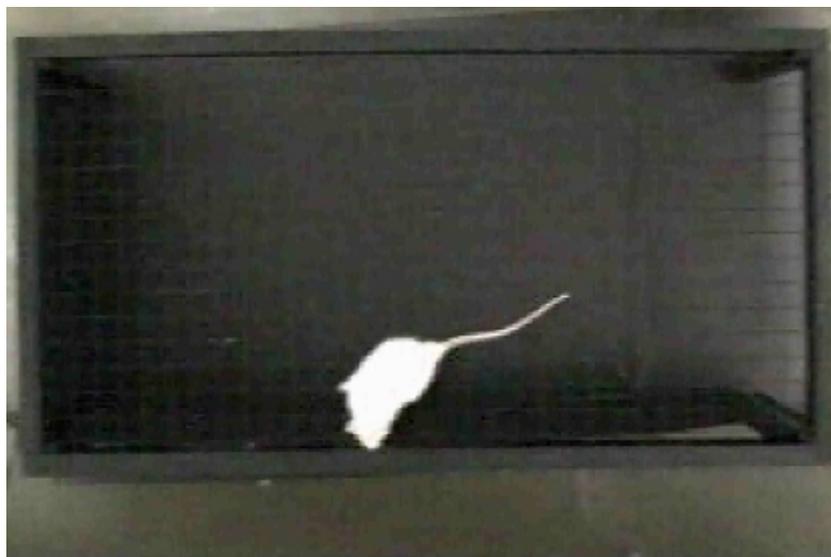


Figura 3. Visão superior da grade em que foram realizados os testes do passo em falso.

A grade (50 x 100 cm) suspensa a 50 cm do chão foi pintada de preto e papel preto foi colocado no fundo. Os animais caminharam sobre a barra durante 3 minutos e um avaliador contou o número de erros (o animal passar a pata anterior por entre as grades) cometidos pelo animal.

3.6.3. Barras Paralelas

Esse teste é utilizado para avaliar coordenação motora de patas posteriores. O aparato consiste de duas plataformas de madeira (30x40cm com 50 cm de altura) unidas por duas barras de metal de 1 cm de diâmetro e 115 cm de comprimento, mostrada na figura 4. A distância entre as barras é de 2,5cm.

O animal foi estimulado a se deslocar de uma plataforma para outra, atravessando as barras, através de um estímulo aversivo (choque). Os animais receberam, inicialmente, um choque de intensidade de 0,23 mA. Caso o animal não atravessasse a barra, esse choque era aumentado a cada 30 segundos até 0,83 mA. Caso o animal permanecesse por 30 segundos recebendo o estímulo máximo, o teste era interrompido e o animal classificado como incapaz de deixar a plataforma de teste. Para avaliar a coordenação motora, o número de erros

cometidos pelo animal foi contado, considerado-se erro quando o animal colocava as duas patas posteriores na mesma barra, deixava uma ou as duas patas para fora ou entre as barras.



Figura 4. Animal caminhando sobre as barras paralelas durante o teste.

As barras paralelas são formadas por duas plataformas de madeira (30x40cm com 50 cm de altura) unidas por duas barras de metal de 1 cm de diâmetro e 115 cm de comprimento. A distância entre as barras é de 2,5cm.. Os animais são encorajados a atravessar as barras através de um estímulo aversivo (choque). Durante a travessia do animal, o avaliador observou as patas posteriores do animal, foi contado erro toda vez que o animal colocou as duas patas posteriores na mesma barra, deixou uma ou as duas patas para fora ou entre as barras.

3.7. Protocolo de Treinamento Motor na Esteira

O protocolo de treinamento foi iniciado no 4^o dia pós-operatório. Os animais dos grupos SE e IE foram submetidos ao exercício na esteira 5 dias/semana, por 30 minutos, durante 4 semanas. Os animais do grupo SE correram a uma velocidade de 8m/min por 5 minutos, 11m/min por 5 minutos e 15m/min por 20 minutos (Diaz, 2004). Os animais do grupo IE correram a uma velocidade de 3m/min por 30 minutos. Essa velocidade foi determinada pelo experimento descrito adiante. As sessões de exercício foram iniciadas sempre após as 17 horas. O treinamento foi realizado em uma esteira (Treadmill LE 8706, LSI

Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha) no laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica. ICB, UFMG.

3.8. Experimento para Determinar a Velocidade de Treinamento do Grupo Isquemiado.

Esse experimento teve como objetivo adaptar o esforço físico realizado pelos animais isquemiados, durante treinamento na esteira, ao dos animais sham. Para determinar esse valor, a frequência cardíaca (FC) foi utilizada como parâmetro de esforço (Brooks, 1978).

3.8.1. Grupos Experimentais

O estudo foi conduzido com três grupos experimentais. O grupo controle foi formado por animais submetidos à implantação de eletrodos para registro do eletrocardiograma (ECG) durante o esforço na esteira (n=6). O grupo sham foi integrado por animais submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos para registro do ECG e apenas ao procedimento cirúrgico dos animais isquemiados, porém sem a oclusão da ACM, e avaliados sob esforço na esteira posteriormente (n=6). O grupo isquemia foi composto por animais submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos para registro do ECG e à oclusão da ACM e avaliados sob esforço na esteira (n=5).

3.8.2. Critérios de Inclusão

Antes de serem incluídos no experimento, os animais foram levados à esteira para se exercitarem a uma velocidade de 8, 11 e 15m/min por dois minutos em cada velocidade. Somente os animais que foram capazes de desempenhar essa tarefa em três dias diferentes foram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos.

3.8.3. Confeção do Eletrodo para Registro do ECG

Os eletrodos para registro do ECG foram confeccionados utilizando-se um fio AWG 26 (Eletrônica General Ltda., São Paulo, Brasil). Os fios foram desencapados em seus 10 cm iniciais e os filamentos de cobre ficaram expostos. Esses filamentos foram divididos em dois feixes, enrolados entre si e em seguida posicionados para formar uma argola. O filamento de cobre que restou da formação da argola foi coberto com isolante termoretrátil. Em seguida, os filamentos de cobre (da argola) foram recobertos por solda comum de estanho. Os eletrodos estão ilustrados na figura 5.

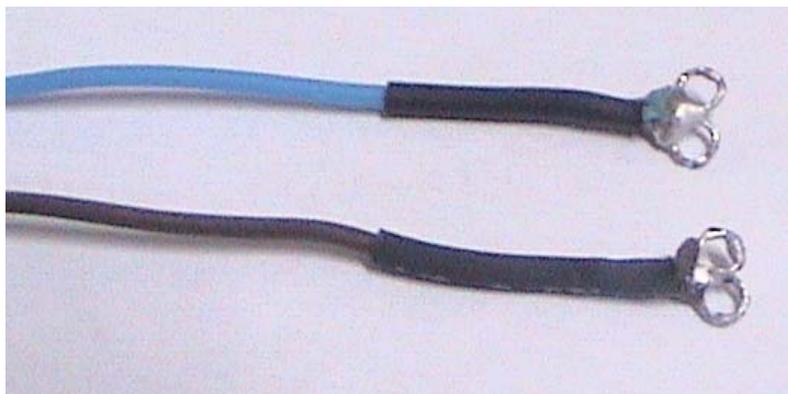


Figura 5. Eletrodos de registro de ECG.

Eletrodos de registro de ECG confeccionados com fios AWG 26. Os filamentos de cobre do interior do fio foram expostos e em seguida enrolados para assumir a forma de uma argola. Os filamentos restantes foram cobertos com isolante termoretrátil (cobertura preta do fio logo abaixo da argola formada pelos filamentos de cobre). A argola de filamentos de cobre foi coberta por solda comum de estanho.

3.8.4. Cirurgia de Implantação de Eletrodos para Registro do ECG

Primeiramente, uma cirurgia de implantação de eletrodos periféricos para registro do ECG foi realizada. Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (40 mg /kg) i.p.. Após a anestesia, foi injetada atropina diluída em salina a 2% (0,1ml por rato) via i.p. para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à administração do anestésico. Foi também administrado Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort DodgeÒ,

São Paulo, Brasil) (0,1 ml por rato) via intra muscular para cobertura antibiótica profilática. Os animais foram mantidos, durante toda a cirurgia, sobre uma bolsa de água quente para manutenção da temperatura corporal entre 36 e 38°C. O eletrodo de registro foi implantado no lado direito da região anterior do tórax do animal. Em seguida, outro eletrodo foi colocado no lado esquerdo da região inferior do dorso do animal. Os eletrodos foram suturados em músculos utilizando-se uma linha de nylon para minimizar registro de eletromiografia. Através de um trocáter, os fios dos eletrodos foram conduzidos até a porção superior da cabeça do animal sob o tecido subcutâneo. Após a limpeza de todo o tecido subcutâneo dessa região, foram colocados dois parafusos de fixação no crânio. Os fios dos eletrodos foram desencapados e soldados no conector. Logo em seguida, o conector foi fixado ao crânio do animal com acrílico odontológico. A figura 6 mostra um animal após a realização da cirurgia de implantação de eletrodos para registro de ECG.



Figura 6. Animal após a realização da cirurgia de implantação de eletrodos para registro de ECG.

Os eletrodos foram suturados nos músculos utilizando-se uma linha de nylon. Em seguida, através de um trocáter, os fios dos eletrodos foram conduzidos até a porção superior da cabeça do animal sob o tecido subcutâneo. Os fios dos eletrodos foram desencapados e soldados no conector. Logo em seguida, o conector foi fixado ao crânio do animal com acrílico odontológico.

3.8.5. Registro do ECG

O registro do ECG foi realizado no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica. O conector na cabeça do animal foi ligado a um amplificador de ECG (desenvolvido por pesquisadores do Núcleo de Neurociências) através de um cabo blindado, com o objetivo de minimizar a interferência do funcionamento do motor da esteira no sinal registrado. O sinal de ECG amplificado foi então registrado no computador através do transdutor de sinal Biopac (Biopac Systems, Inc, Santa Bárbara, EUA). O aparato utilizado para registro de ECG está ilustrado na figura 7.

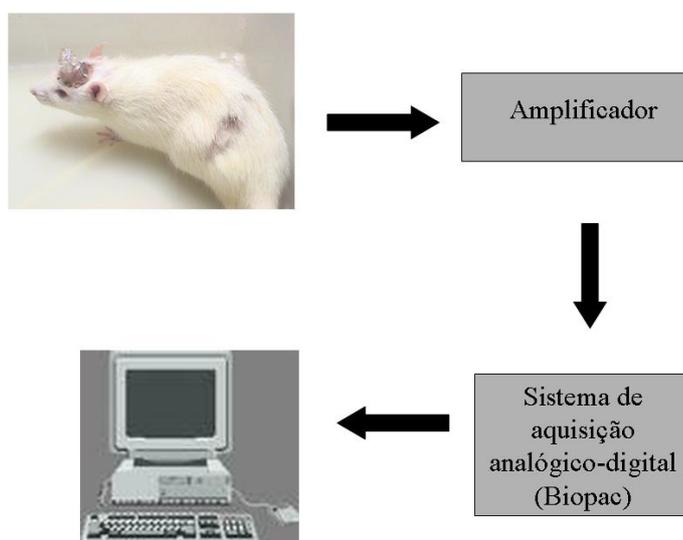


Figura 7. Aparato de registro de ECG.

O animal foi colocado para correr na esteira. Durante o treinamento motor, o conector na cabeça do animal foi ligado a um amplificador de ECG (desenvolvido por pesquisadores do Núcleo de Neurociências) através de um cabo blindado, com o objetivo de minimizar a interferência do funcionamento do motor da esteira no sinal registrado. O sinal de ECG amplificado foi então registrado no computador através do transdutor de sinal Biopac (Biopac Systems, Inc, Santa Bárbara, EUA).

3.8.6. Protocolo de Treinamento

Os animais controle começaram o protocolo de atividade física 2 dias após a implantação de eletrodos. O registro do ECG foi feito por 3 dias consecutivos, durante 33 minutos. Nos 3 minutos iniciais, o animal permaneceu em repouso. Logo em seguida, foram feitos 5 minutos de registro com o animal correndo a 8m/min na esteira, mais 5 minutos de registro a 11m/min e 20 minutos de registro a 15m/min.

Os animais dos grupos sham e isquemiado foram submetidos a uma nova cirurgia 5 a 7 dias após a implantação de eletrodos para registro do ECG. O grupo isquemia foi submetido à oclusão da ACM, enquanto o grupo sham passou pelos mesmos procedimentos cirúrgicos sem a oclusão da artéria. O critério de inclusão desses animais no experimento foi o índice de gravidade, descrito anteriormente, tomando-se zero para o animal sham e quatro para o isquemiado.

Quatro dias após a segunda cirurgia, o exercício na esteira foi iniciado. Para o grupo sham, o protocolo de treinamento foi o mesmo do grupo controle, enquanto o grupo isquemia foi submetido a diversas velocidades de treinamento. Foram feitos 33 minutos de registro de ECG em 3 dias consecutivos. Os três primeiros minutos foram em repouso. Logo em seguida, o animal correu em 10 velocidades diferentes por 3 minutos em cada uma delas. As velocidades foram 3m/min, 4m/min, 5m/min, 6m/min, 7m/min, 8m/min, 9m/min, 11m/min, 13m/min e 15 m/min. O tempo de 3 minutos para cada velocidade é utilizado em testes de esforço, pois permite a estabilização da FC em uma determinada intensidade de exercício (McArdle et al., 1998). Os animais do grupo isquemia treinaram sob inúmeras condições diferentes de esforço para que fosse descoberto o valor de FC que correspondesse ao esforço realizado pelos animais do grupo controle e sham.

3.8.7. Cálculo da Frequência Cardíaca

O valor da FC foi calculado tomando-se 10 segundos dentro de um minuto de registro do ECG e contando-se quantos batimentos cardíacos havia nesse intervalo. Em seguida, o número resultante foi multiplicado pelo valor de batimentos por minuto (bpm) fornecido pelo programa AcqKnowledge (Biopac System, Inc., Goleta, EUA). Para os grupos sham e controle, os 10 segundos selecionados para a contagem da FC sempre foram retirados do 3º minuto de repouso, do 5º minuto de registro das velocidades 8m/min e 11m/min. E do 5º, 10º, 15º e 20º minuto de corrida à 15m/min. Para o grupo isquemia, sempre foi analisado o 3º minuto do período de repouso e de cada uma das velocidades de treinamento. Como cada animal ao final do experimento possuía três registros de FC, foi retirada a mediana das três mensurações para a análise estatística final. A figura 8 mostra um registro de ECG com uma porção selecionada.

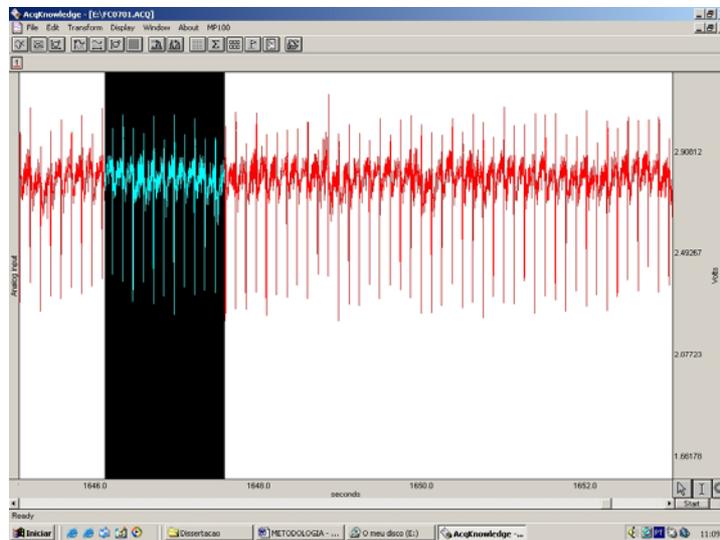


Figura 8. Registro de ECG.

A figura mostra parte do registro de ECG selecionado (barra preta com registro em azul). Para a contagem da FC foram selecionados 10 segundos dentro de um minuto de registro do ECG e foram contados quantos batimentos cardíacos havia nesse intervalo. Em seguida, o número resultante foi multiplicado pelo valor de batimentos por minuto (bpm) fornecido pelo programa AcqKnowledge e obtido o valor da FC em um minuto.

3.9. Perfusão

No 32º dia de experimento, os ratos foram anestesiados com Uretana (140mg/100g) e em seguida submetidos à perfusão transcardíaca. Primeiramente, os vasos sanguíneos foram perfundidos com salina por 10 minutos e, posteriormente, com paraformaldeído tamponado 4% por mais 15 minutos. Após perfusão, o cérebro dos animais foi retirado do crânio e fixado por uma hora em paraformaldeído 4% à 4°C.

3.10. Medida do Volume de Infarto

A medida do volume de infarto é um dado importante para estudos de recuperação após isquemia, porque está relacionado com o desempenho funcional do animal (Lyden et al., 1997). Após fixação, o cérebro dos animais foi fatiado no vibratome (Series 1000, Technical Products International, Inc., Saint Louis, EUA) em uma espessura de 100 µm. As fatias foram coradas com vermelho neutro para que os núcleos dos neurônios pudessem ser visualizados. As fatias já coradas foram então visualizadas em uma lupa (Stemi 2000-C, Zeiss, Alemanha) e fotografadas por uma câmera CCD (TCZ-984P, Fujitsu, Japão). Essas fotos foram analisadas no programa Image Tool for Windows (versão 3.0, The University of Texas Health Science Center in San Antonio, EUA). Para cada fatia do cérebro do animal foi traçado um contorno envolvendo o tecido íntegro de cada um dos hemisférios cerebrais. Todo o tecido cerebral em que não havia neurônios foi incluído na área de infarto. A partir desse contorno, o programa foi capaz de mensurar a área, em mm², daquele hemisfério cerebral. Em seguida, a área do hemisfério direito (não lesado) foi dividida pela do hemisfério esquerdo (lesado). As fatias foram agrupadas de acordo com sua referência de localização em relação ao Bregma. Os intervalos determinados foram os seguintes de 4,2 a 3,7mm; 3,7 a 3,2mm; 3,2 a 2,7mm; 2,7 a 2,2mm; 2,2 a 1,7mm; 1,7 a 1,2mm; 1,2 a 0,7mm, -3,3 a -3,6mm, -3,6 a -3,9mm, -3,9 a -4,2mm de distância do Bregma (Paxinos and Watson, 1998) e estão ilustrados na figura 9.

Todas as fatias que pertenciam ao mesmo intervalo foram reunidas e a média das razões entre a área do hemisfério direito e esquerdo calculada.

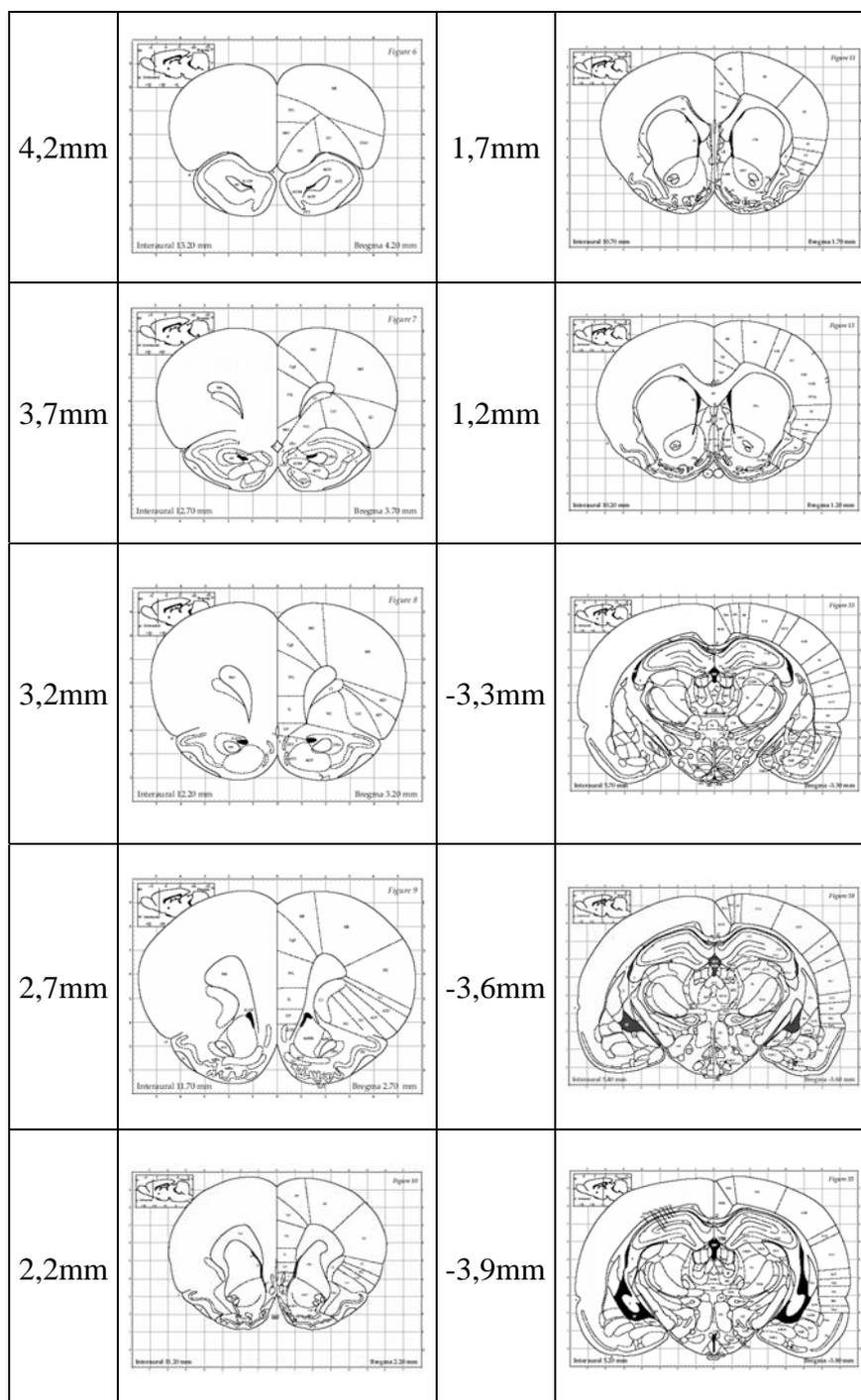


Figura 9. Parâmetros do Paxinos para a localização das fatias avaliadas na medida do volume de infarto.

Todas as fatias que pertenciam ao mesmo intervalo (distância em relação ao Bregma) foram reunidas e a média das razões entre a área do hemisfério direito e esquerdo calculada. Em seguida, a média de cada intervalo foi comparada entre os quatro grupos.

3.11. Análise Estatística

A análise dos valores da FC foi feita a partir do Δ (diferença entre a FC em determinada velocidade e o repouso). Foi utilizada Two Way Anova com medidas repetidas para comparar os grupos (isquemia, controle e sham) ao longo das diversas velocidades de treinamento seguido do *Post-hoc* de Tukey. One Way R M Anova, seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls, foi utilizada para análise da variação de Δ FC dentro de um mesmo grupo. A análise dos valores absolutos da FC também foi realizada. Foram utilizados os mesmos testes que analisaram os valores de Δ FC.

Para a análise do peso dos animais, o valor mensurado no pré-operatório (gramas) foi fixado como 100% e todos os valores posteriores foram calculados em relação a esse valor inicial. Foi utilizada Two Way Anova com medidas repetidas para a comparar os grupos (SS, SE, IS e IE) ao longo do tempo (peso pré-operatório, 1 a 32 dias pós-cirúrgico) seguido do *Post-hoc* de Tukey. Foi utilizado também o teste *t de Student* pareado para comparar a variação de um dia subsequente ao outro, ao longo de todo o experimento, dentro de um mesmo grupo. Todos os testes consideraram ($p < 0,05$) para diferenças estatísticas.

Para a análise da distância percorrida pelos animais no campo aberto, o valor mensurado no pré-operatório (cm) foi fixado como 100% e todos os valores posteriores foram calculados em relação a esse valor inicial. Foi utilizada Two Way Anova com medidas repetidas para a comparar os grupos (SS, SE, IS e IE) ao longo do tempo (pré-operatório, 10 e 31 dias pós-cirúrgico) seguido do *Post-hoc* de Tukey. Para a análise da velocidade máxima atingida e número de quadrantes visitados foram utilizados testes não paramétricos. Teste de Kruskal-Wallis fez a comparação entre os grupos no mesmo dia de teste (pré-operatório, 10 e 31 dias pós-operatório). Teste de Friedman foi utilizado para a comparação entre os dias de teste dentro do mesmo grupo.

Para análise dos erros cometidos pelo animal durante os 3 minutos de Passo em falso teste foi utilizada estatística não paramétrica, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para comparação entre os grupos no mesmo dia de teste (pré-operatório, 10 e 31 dias pós-operatório). O teste de Friedman, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls, foi utilizado para a comparação entre os dias de avaliação dentro do mesmo grupo. Os mesmos testes foram utilizados para analisar a distância percorrida, a velocidade máxima desenvolvida e o número de quadrantes visitados.

O número de erros cometidos pelo animal nas barras paralelas foram adequados a uma escala de 0 a 5. Essa escala foi descrita no trabalho de Ding e colaboradores e surgiu devido ao fato de muitos animais isquemiados (submetidos a oclusão da ACM) não conseguirem desempenhar as tarefas motoras necessárias a avaliação funcional. A pontuação dentro da escala foi adequada ao desempenho motor demonstrado pelo animal durante o teste (Ding et al., 2002b).

Tabela 1. Escala dos erros cometidos pelos animais na realização do teste das barras paralelas.

Pontuação	Critérios de pontuação
0	Sem erros
1	Menos de 1 erro cometido por metro percorrido nas barras
2	Igual ou mais de 1 erro cometido por metro percorrido nas barras
3	Mais de 2 erros cometidos por metro percorrido nas barras
4	Mais de 3,5 erros cometidos por metro percorrido nas barras
5	Mais de 6 erros cometidos ou incapacidade de atravessar as barras

De acordo com os valores dessa escala, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para a comparação entre os grupos no mesmo dia de teste (pré-operatório, 10 e 31 dias pós-operatório) e o Teste de Friedman, seguido do pós-teste de

Student-Newman-Keuls, para a comparação entre os dias de teste dentro do mesmo grupo. Para analisar se havia correlação entre o sedentarismo após isquemia e a capacidade de atravessar as barras, foi utilizado o teste exato de Fisher.

Para análise do volume de infarto, foi considerado o valor da razão entre a área do hemisfério direito sobre a área do esquerdo. As médias dos valores das fatias que foram agrupadas de acordo com a distância de sua localização em relação ao Bregma foram utilizadas. Como os valores adquiridos não apresentaram distribuição normal, foi utilizada estatística não paramétrica. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, para análise entre os grupos para a mesma distância em relação ao Bregma e teste de Wilcoxon para variação ponto a ponto dentro de um mesmo grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do modelo de oclusão transitória da artéria cerebral média

O teste que teve como objetivo verificar se o fio de oclusão seguiu o trajeto da artéria carótida interna teve resultado positivo, como mostrado na figura 10. Nessa radiografia, o fio de oclusão de aço pode ser visualizado no interior do crânio do animal. Caso o fio seguisse dentro do lúmen do ramo pterigo palatino, ele alcançaria a região externa da face.

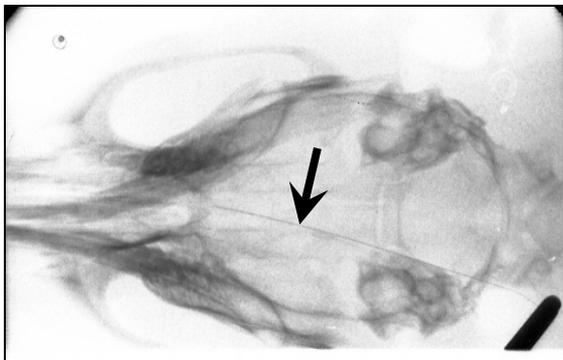


Figura 10. Radiografia do crânio do animal com o fio de oclusão de aço em seu interior.

Com o objetivo de verificar se o fio de oclusão estava seguindo o trajeto da ACI, o fio de oclusão de nylon foi substituído por um fio de aço que também teve sua espessura aumentada para 300 μ m, em seus 5mm iniciais, com silicone. O procedimento cirúrgico foi realizado e a extremidade do fio de oclusão de aço foi posicionada a 20-21mm da bifurcação da ACC. Em seguida, foi feita uma radiografia (0,4 segundos de exposição ao raio-x) com o aparelho odontológico (Gnatus, Ribeirão Preto, Brasil). A seta mostra o fio de oclusão de aço no interior do crânio.

O segundo teste teve como objetivo verificar se o método empregado na oclusão intraluminal da ACM era eficiente em interromper o fluxo sanguíneo para a área cerebral irrigada por essa artéria. A figura 11A mostra que o sistema vascular do hemisfério direito foi corado pelo Azul de Evans, enquanto a figura 11B mostra que a presença do fio de oclusão na origem da artéria não permitiu a entrada do corante no hemisfério esquerdo. O Vermelho Neutro corou o lúmen da ACM desde sua origem proximal no hemisfério direito, mas o mesmo não foi possível no hemisfério esquerdo (figura 12).

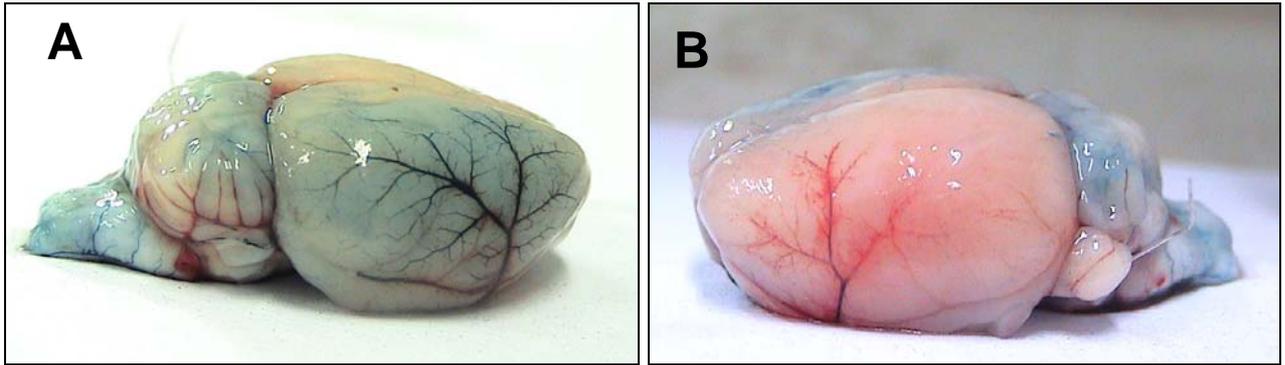


Figura 11. Cérebro de animal perfundido com o corante Azul de Evans após oclusão da ACM.

Após perfusão transcárdica com o corante Azul de Evans, na presença do fio de oclusão na origem da ACM esquerda, podemos visualizar a ACM direita corada. (A). O corante Azul de Evans não foi capaz de penetrar a ACM esquerda devido à presença do fio de oclusão na origem proximal dessa artéria (B).

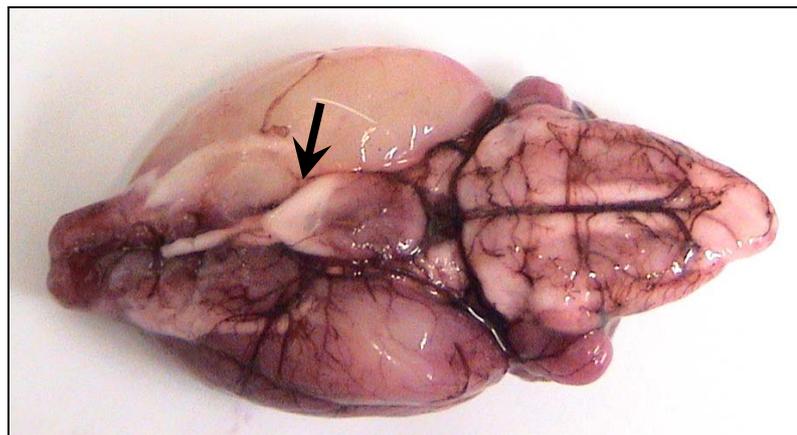


Figura 12. Visão inferior de cérebro de animal perfundido com o corante Vermelho Neutro após oclusão da ACM.

Após perfusão transcárdica com o corante Vermelho Neutro, na presença do fio de oclusão na origem da ACM esquerda, podemos visualizar a origem da ACM direita corada. O corante não foi capaz de penetrar a ACM esquerda devido à presença do fio de oclusão na origem proximal dessa artéria (indicado pela seta).

4.2.Efeito da intensidade de exercício sobre a frequência cardíaca nos diferentes grupos de animais

Os valores de ΔFC não foram diferentes para as diversas velocidades no grupo isquemia. A variação dos valores foi pequena entre as diversas velocidades como pode ser observado na tabela 2. No grupo controle e no grupo sham, o ΔFC para a velocidade de 15m/min é maior que para as velocidades de 8m/min e 11m/min ($p<0,05$). Esses resultados são expressos em média \pm erro padrão da média e podem ser melhor observados na forma de gráficos mostrados na figura 13. Durante os 20 minutos de treinamento na esteira a 15m/min não houve variação estatisticamente significativa na FC para os grupos controle e sham.

Os valores de FC foram diferentes do repouso para todas as velocidades de treinamento nos grupos isquemia, controle e sham. Os animais do grupo isquemia apresentam maior valor de FC em repouso e nas diversas velocidades de treinamento em relação aos animais dos grupos controle e sham, mas esse aumento não é estatisticamente significativo. Esses valores são mostrados na figura 14.

Tabela 2: Valores de ΔFC dos grupos controle, sham e isquemia em todas as velocidades de treinamento.

VELOCIDADE (M/MIN.)	ΔFC DOS GRUPOS		
	Controle	Sham	Isquemia
3			81,6 \pm 12,2
4			71,8 \pm 12,3
5			88,6 \pm 11,3
6			76 \pm 15,9
7			86,2 \pm 13,4
8	112,8 \pm 20,1	95,8 \pm 19,0	92,8 \pm 17,3
9			96,4 \pm 18,5
11	123 \pm 19,6	110,5 \pm 22,0	101 \pm 17,4
13			92,3 \pm 31,1
15	151,8 \pm 19,7	130,7 \pm 20,4	86 \pm 30,1

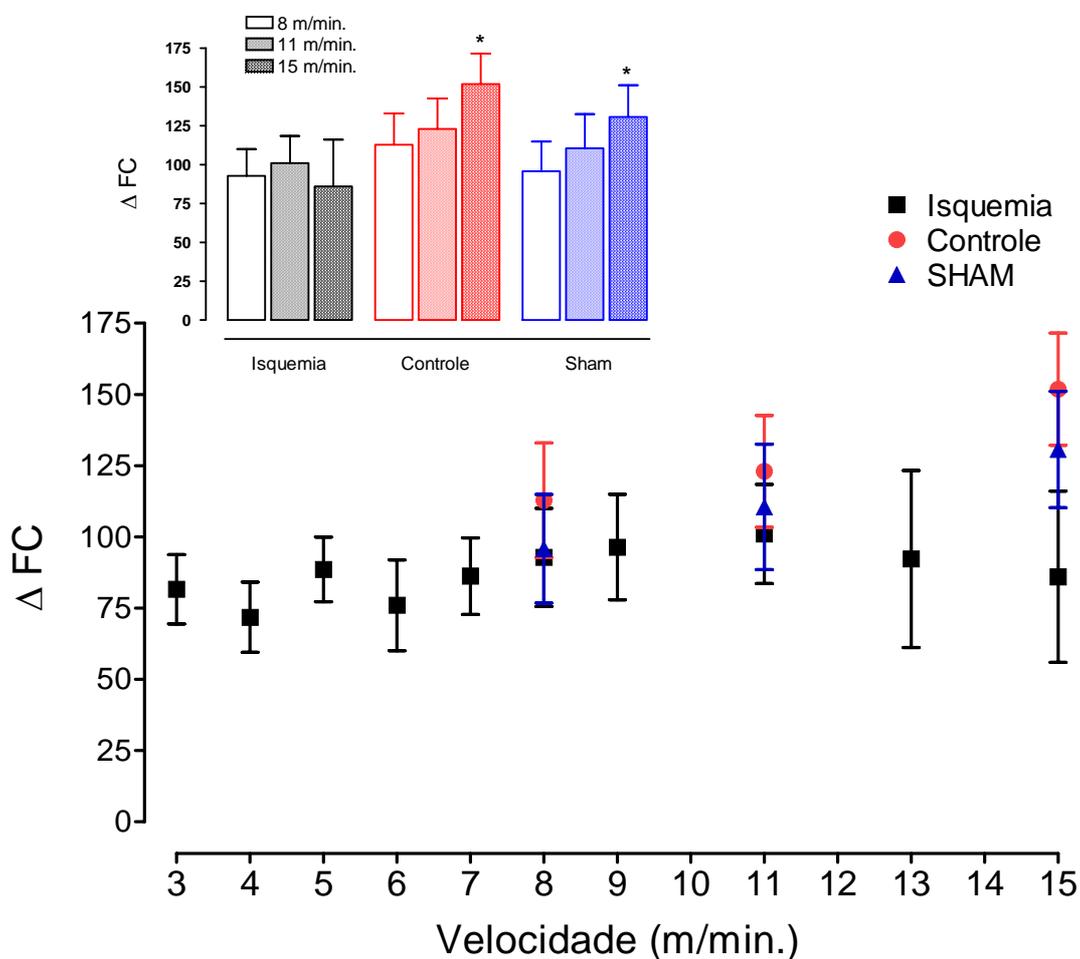


Figura 13. Medida da FC durante treinamento na esteira (valores de ΔFC)

Os valores de ΔFC são mostrados para todos os grupos nas diversas velocidades de treinamento na esteira. Nos grupos controle e sham, a ΔFC na velocidade de 15m/min foi diferente daquela registrada a 8m/min e 11m/min, teste One Way R M Anova ($p < 0,05$) como mostrado no gráfico de barras em detalhe. No entanto, para o grupo isquemia, não houve diferença estatística no ΔFC entre as 10 velocidades de treinamento em que os animais foram submetidos. As barras indicam o erro padrão da média.

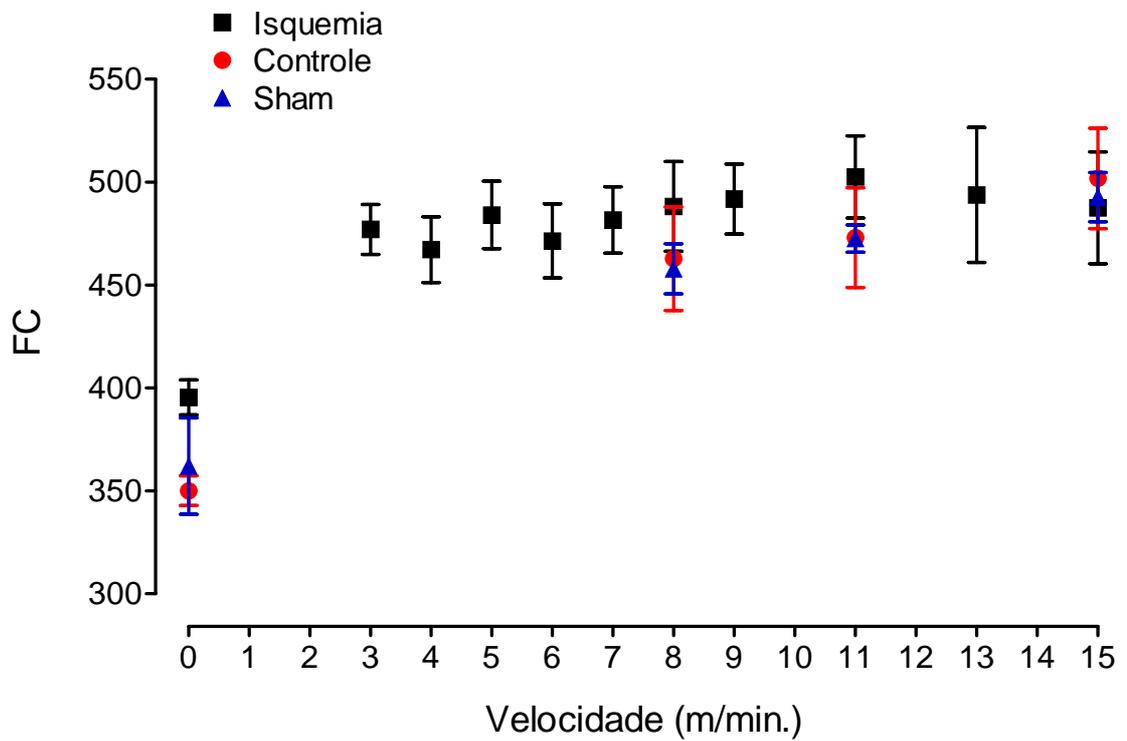


Figura 14. Medida da FC durante treinamento na esteira

Os animais do grupo isquemia apresentam maior valor da FC em repouso que os animais dos grupos controle e sham, porém esse aumento não é estatisticamente significativo. Os valores da FC dos animais do grupo isquemia não variam ao longo das 10 velocidades de treinamento, mas foram diferentes da FC em repouso ($p < 0,05$). As barras indicam erro padrão da média.

4.3.Efeito do exercício e da isquemia sobre o peso corporal dos animais

O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente ao longo do experimento, como mostra a figura 15. Os valores de peso foram normalizados em relação ao período pré-operatório tomando-se tais valores como 100%. Todos os animais tiveram queda significativa de peso corporal no 1º dia pós-operatório (SS: $96,41 \pm 0,77$; SE: $94,39 \pm 0,79$; IS: $90,93 \pm 0,63$ e IE: $93,25 \pm 0,46$). Os animais do grupo SS e SE começaram a recuperar o peso a partir do 5º dia pós-operatório, enquanto os do grupo IS e IE recuperaram o peso a partir do 12º e 8º dias respectivamente ($p < 0,05$). A partir do 7º dia pós-operatório, os animais do grupo IE já não apresentavam diferença estatisticamente significativa de peso em relação aos dos grupos SS e SE. Somente a partir do 18º dia de experimento, o peso dos animais do grupo IS deixou de ser diferente dos outros três grupos. As curvas de peso, ao longo de todo o experimento, são iguais para os grupos SS e SE. A curva desses dois grupos é diferente da curva do grupo IE, que por sua vez é diferente da curva do grupo IS. Somente os animais do grupo IS não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o peso pré-operatório e o peso do 32º dia de experimento.

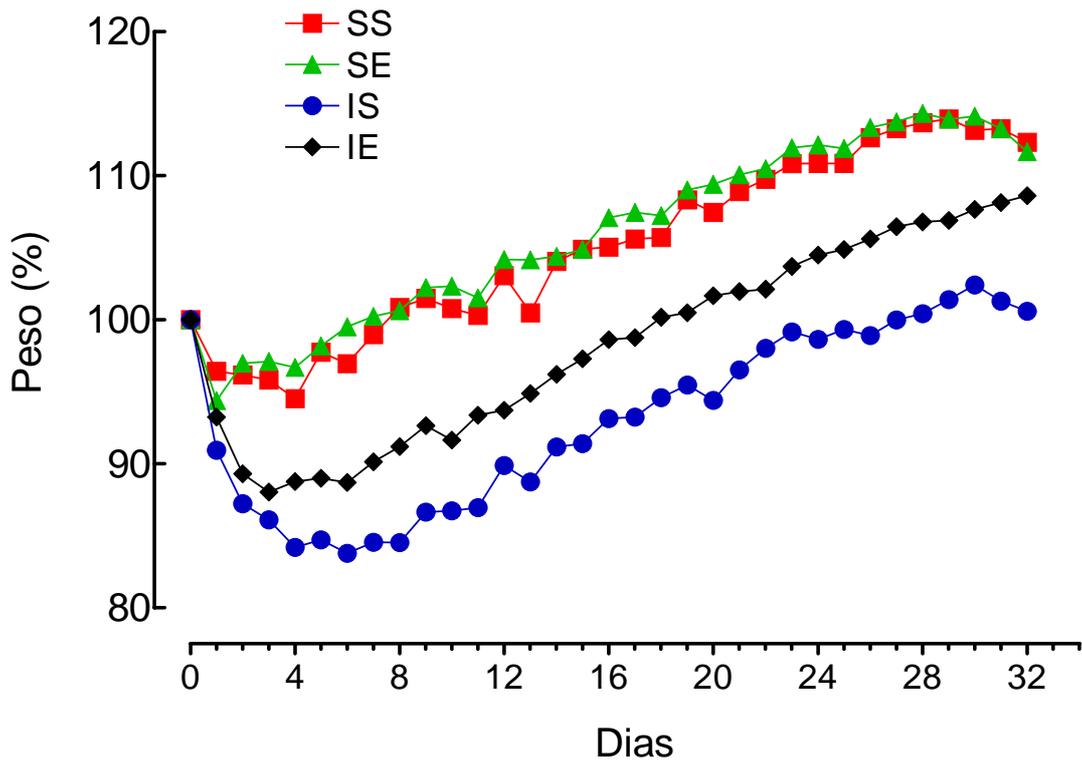


Figura 15. Medida do peso corporal dos animais ao longo do experimento

O peso corporal dos animais foi avaliado todos os dias ao longo do experimento. O dia 0 é o dia em que foi realizada a cirurgia (peso pré-operatório). Todos os animais perderam peso no primeiro dia pós-operatório, mas os animais dos grupos SS e SE recuperaram mais rapidamente que os animais dos grupos IS e IE. As curvas de peso dos animais dos grupos SS e SE são iguais, no entanto as dos grupos IS e IE são diferentes entre si. Somente os animais do grupo IS não mostraram diferença estatisticamente significativa entre o peso pré-operatório e o do 32^o dia pós-cirurgia. Todas as diferenças estatisticamente significativas apresentam $p < 0,05$.

4.4.Efeito da isquemia e do exercício sobre a performance dos animais no teste de Campo Aberto

4.4.1. Distância Percorrida pelos animais durante o teste

Na análise da distância percorrida pelos animais no teste de campo aberto não foi encontrada diferença entre os grupos nos três dias de teste. Os valores das porcentagens da distância percorrida estão mostrados na tabela 3 (resultados expressos em média \pm erro padrão da média). Os dados da tabela 3 são mostrados na forma de gráfico de barras na figura 16. Através desse gráfico é possível visualizar a grande variação da atividade exploratória dos animais entre os grupos nos três dias de testes.

Tabela 3: Valores da porcentagem da distância percorrida (cm) pelos animais no teste de campo aberto.

Grupos	Teste pré-operatório	Teste de 10 dias	Teste de 31 dias
SS	(100 \pm 0)	(82,1 \pm 40,3)	(93,4 \pm 31,9)
SE	(100 \pm 0)	(120,5 \pm 28,5)	(163,8 \pm 41,0)
IS	(100 \pm 0)	(188,3 \pm 66,0)	(170,3 \pm 57,8)
IE	(100 \pm 0)	(122,4 \pm 16,8)	(88,9 \pm 17,0)

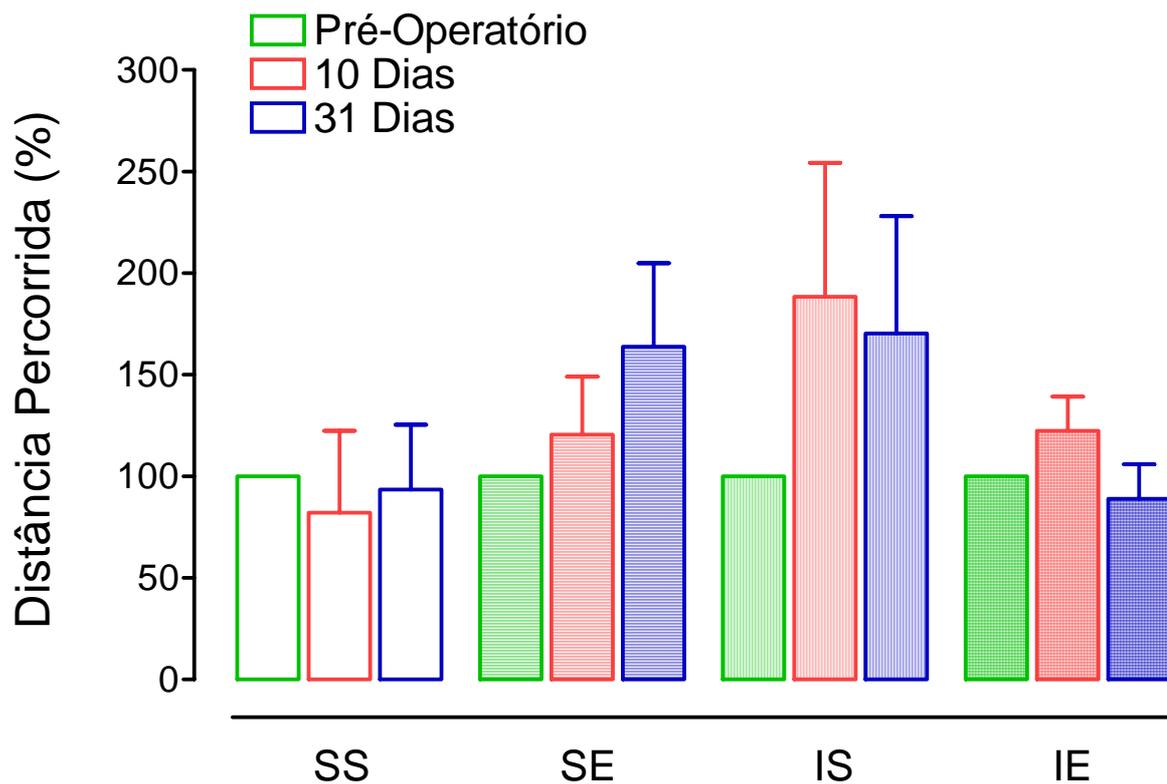


Figura 16. Distância percorrida pelos animais no teste de campo aberto.

Os animais do grupo SS exploraram menos nos testes do 10^o e 31^o dia pós-operatório em relação ao teste pré-operatório. Os animais do grupo SE, IS e IE exploraram mais nos dois últimos testes em relação ao teste inicial. No entanto, nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa entre os três dias de teste (Two Way Anova com medidas repetidas seguido do *Post-hoc* de Tukey). As barras indicam erro padrão da média.

4.4.2. Velocidade máxima desenvolvida pelos animais durante o teste

Na análise da velocidade máxima (m/s) desenvolvida pelos animais não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos três dias de teste. Os valores de velocidade máxima desenvolvida pelos animais estão expressos na tabela 4 (mediana \pm primeiro/terceiro quartis).

Tabela 4. Velocidade máxima desenvolvida pelos animais no teste de campo aberto.

Grupos	Teste Pré-operatório	Teste de 10 dias	Teste de 31 dias
SS	(0,16 \pm ^{0,04/0,24})	(0,12 \pm ^{0,04/0,28})	(0,16 \pm ^{0,04/0,24})
SE	(0,16 \pm ^{0,10/0,18})	(0,16 \pm ^{0,12/0,20})	(0,18 \pm ^{0,14/0,20})
IS	(0,20 \pm ^{0,16/0,23})	(0,20 \pm ^{0,16/0,27})	(0,16 \pm ^{0,05/0,23})
IE	(0,04 \pm ^{0,04/0,07})	(0,04 \pm ^{0,04/0,07})	(0,04 \pm ^{0,04/0,04})

4.4.3. Número de Quadrantes Visitados pelos animais durante o teste

Somente um animal do grupo SS não visitou os quatro quadrantes no teste pré-operatório e outro não percorreu todos os quadrantes no 10º dia de teste. Três animais do grupo SE não visitaram os quatro quadrantes no teste pré-operatório e outros dois não percorreram todos os quadrantes no 10º dia de teste. Todos os animais dos grupos IS e IE visitaram os quatro quadrantes em todos os três dias de testes. Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa no número de quadrantes visitados entre os grupos em nenhum dos três dias de teste.

4.5.Efeito da isquemia e do exercício sobre a performance dos animais no teste Passo em falso

4.5.1. Número de Erros Cometidos pelos animais em 3 minutos de teste.

Os animais do grupo IS ($7 \pm^{3,75/8,75}$) cometeram mais erros no teste passo em falso do que os animais do grupo SS ($1 \pm^{0/3,5}$) e SE ($1 \pm^{0/1}$) no teste realizado no 10º dia após a cirurgia ($p < 0,05$). Esse grupo também mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no teste do 10º dia pós-cirurgia ($7 \pm^{3,75/8,75}$) em relação ao pré-operatório ($0 \pm^{0/1}$) e ao do 31º dia pós-cirurgia ($1 \pm^{0,25/5,75}$). Os resultados estão expressos (mediana \pm primeiro/terceiro quartis) no gráfico da figura 17.

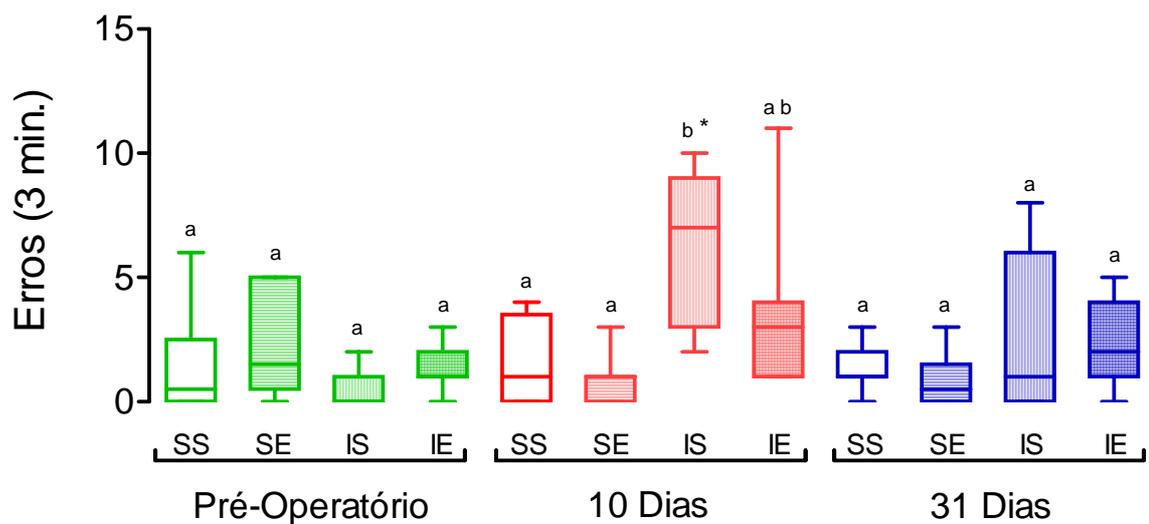


Figura 17. Número de erros cometidos pelos animais no teste passo em falso.

Os animais do grupo IS cometeram mais erros no teste realizado no 10^o dia pós-cirurgia em relação ao teste pré-operatório e do 31^o dia. O asterisco mostra diferença dentro do mesmo grupo entre os três dias de avaliação, teste de Friedman seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls, ($p < 0,05$). Os animais do grupo IS cometeram mais erros que os dos grupos SS e SE no teste do 10^o dia pós-operatório (letra b). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos no mesmo dia de avaliação, teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em mediana \pm primeiro/terceiro quartis.

4.5.2. Distância Percorrida

Na análise da distância percorrida (cm) pelos animais no teste passo em falso não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos três dias de teste. Os valores da distância percorrida pelos animais estão expressos na tabela 5 (mediana \pm primeiro/terceiro quartis).

Tabela 5: Distância percorrida pelos animais no teste passo em falso .

Grupos	Teste pré-operatório	Teste de 10 dias	Teste de 31 dias
SS	(370, 4 \pm ^{133, 8/ 685 ,8})	(162, 7 \pm ^{8, 45/ 278, 8})	(225, 0 \pm ^{47, 74/ 397, 9})
SE	(336, 4 \pm ^{176, 4/ 438, 5})	(224, 3 \pm ^{97, 29/ 364, 1})	(164, 3 \pm ^{8, 59/ 417, 5})
IS	(324, 6 \pm ^{112, 7/ 426, 3})	(191, 0 \pm ^{46, 11/ 438, 1})	(6, 08 \pm ^{0, 0/ 520, 5})
IE	(435, 2 \pm ^{314, 9/ 572, 1})	(344, 1 \pm ^{193, 0/ 513, 7})	(216, 7 \pm ^{169, 87/ 428, 6})

4.5.3. Velocidade Máxima Desenvolvida pelos animais durante o teste

Na análise da velocidade máxima (m/s) desenvolvida pelos animais no teste passo em falso não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos três dias de teste. Os valores de velocidade máxima desenvolvida pelos animais estão expressos na tabela 6.

Tabela 6. Velocidade máxima desenvolvida pelos animais no teste passo em falso.

Grupos	Teste Pré-operatório	Teste de 10 dias	Teste de 31 dias
SS	(0,14 \pm ^{0,06/0,60})	(0,08 \pm ^{0,08/0,20})	(0,24 \pm ^{0,04/0,34})
SE	(0,24 \pm ^{0,20/0,40})	(0,38 \pm ^{0,08/0,54})	(0,20 \pm ^{0,06/0,50})
IS	(0,40 \pm ^{0,16/0,46})	(0,28 \pm ^{0,08/0,38})	(0,04 \pm ^{0,04/0,38})
IE	(0,08 \pm ^{0,08/0,14})	(0,08 \pm ^{0,04/0,08})	(0,08 \pm ^{0,04/0,08})

4.5.4. Número de Quadrantes Visitados pelos animais durante o teste

A maior parte dos animais visitou os quatro quadrantes durante a realização dos testes. Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa no número de quadrantes visitados entre os animais do mesmo grupo em nenhum dos três dias de teste.

4.6. Efeito da isquemia e do exercício sobre a performance dos animais no teste das Barras Paralelas

4.6.1. Erros cometidos pelos animais ao atravessar as barras paralelas

Os animais do grupo IS ($5 \pm^{5/5}$) cometeram mais erros no teste das barras paralelas do que os animais dos grupos SS ($0, 5 \pm^{0/1, 5}$) e IE ($2 \pm^{1/2}$) no teste realizado no 10º dia após a cirurgia ($p < 0,05$). No teste do 31º dia pós-operatório, os animais do grupo IS ($5 \pm^{4,5 5}$) cometeram mais erros que os dos grupos SS ($1 \pm^{0/2}$), SE ($2 \pm^{0,5/3,5}$) e IE ($1 \pm^{1/1}$). Os animais do grupo IS cometeram mais erros no teste do 10º dia ($5 \pm^{5/5}$) e do 31º dia pós-cirúrgico ($5 \pm^{4,25/5}$) do que no teste pré-operatório ($1 \pm^{1/2,75}$) ($p < 0,05$). Esses resultados estão expressos na figura 18 (mediana \pm primeiro/terceiro quartis).

4.6.2. Efeito do exercício após isquemia sobre a capacidade de realização do teste das barras paralelas

Entre os sete animais do grupo IS, três não conseguiram sair da plataforma para atravessar as barras paralelas no teste realizado 10 dias após a cirurgia. Entretanto, no teste do 31º dia pós-operatório, apenas um animal não foi capaz de deixar a plataforma para realizar a travessia. Enquanto no grupo IE, todos os animais deixaram a plataforma inicial de teste e atravessaram as barras paralelas nos testes do 10º e 31º dias pós-cirurgia. No entanto, a análise realizada para descobrir se havia relação entre sedentarismo após isquemia e capacidade de atravessar as barras paralelas não mostrou relação entre os fenômenos.

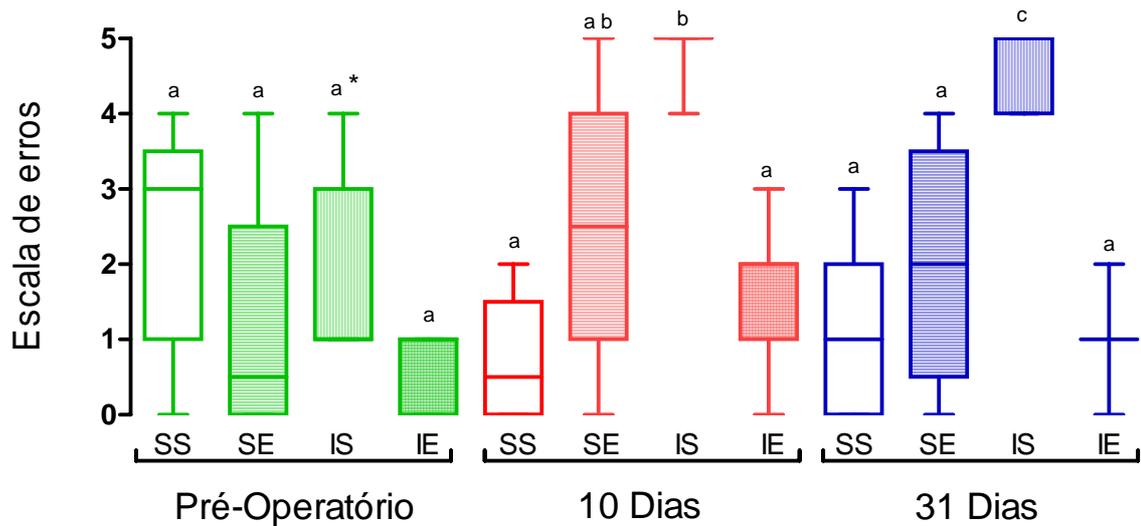


Figura 18. Erros cometidos pelos animais no teste das barras paralelas (em escala).

Os animais do grupo IS cometeram mais erros nos testes realizados nos 10^o e 31^o dia pós-cirurgia em relação ao teste pré-operatório. O asterisco mostra diferença dentro do mesmo grupo entre os três dias de avaliação, teste de Friedman seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls, ($p < 0,05$). Os animais do grupo IS cometeram mais erros que os dos grupos SS e IE no teste do 10^o dia pós-operatório (letra b) e mais erros que os demais grupos no teste do 31^o dia pós-operatório (letra c). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos no mesmo dia de avaliação, teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em mediana \pm primeiro/terceiro quartis.

4.7. Medida do Volume de Infarto

No intervalo de 4,2/3,7mm em relação ao Bregma não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No entanto, a partir do intervalo 3,7/3,2mm até o 1,2/0,7mm o grupo IS apresentou volume de infarto maior que os grupos SS e SE. Nos intervalos de -3,3/-3,6 a -3,9/-4,2 os grupos IS e IE apresentaram maior volume de infarto que os grupos SS e SE. Os valores das medianas (primeiro/ terceiro quartis) das razões da área do hemisfério direito sobre a área do hemisfério esquerdo são mostrados na tabela 7 e na figura 19.

A figura 20 ilustra as áreas de lesão do hemisfério esquerdo nos animais isquemiados e mostra a real extensão da lesão em relação ao cérebro dos demais animais dos grupos sham.

Tabela 7. Valores das razões entre as áreas do hemisfério direito sobre a área do hemisfério esquerdo nas fatias.

	4,2 a 3,7	3,7 a 3,2	3,2 a 2,7	2,7 a 2,2	2,2 a 1,7	1,7 a 1,2	1,2 a 0,7	-3,3 a -3,6	-3,6 a -3,9	-3,9 a -4,2
SS	1,1 (1/1,1)	1,1 (1/1,1)	1,1 (1/1,1)	1 (1/1,1)	1 (1/1,1)	1 (1/1)	1 (0,95/1,25)	1 (1/1)	1 (1/1)	1 (1/1)
SE	1 (1/1,1)	1,1 (1/1,1)	1 (1/1,1)	1,1 (1/1,1)	1 (1/1,1)	1 (1/1)	1 (1/1,05)	1 (1/1)	1 (0,9/1)	1 (1/1)
IS	1,4 (1,2/1,6)	1,3 (1,1/1,6)	1,4 (1,3/1,6)	1,5 (1,3/1,9)	1,7 (1,4/2)	1,9 (1,6/2,2)	1,9 (1,8/2,2)	1,7 (1,7/2,3)	1,6 (1,6/2)	1,6 (1,6/1,9)
IE	1,2 (1,1/1,3)	1,2 (1,1/1,3)	1,3 (1,1/1,4)	1,3 (1,2/1,4)	1,3 (1,2/1,6)	1,5 (1,4/1,7)	1,5 (1,5/1,7)	1,9 (1,7/2,1)	1,7 (1,5/2)	1,7 (1,5/1,8)

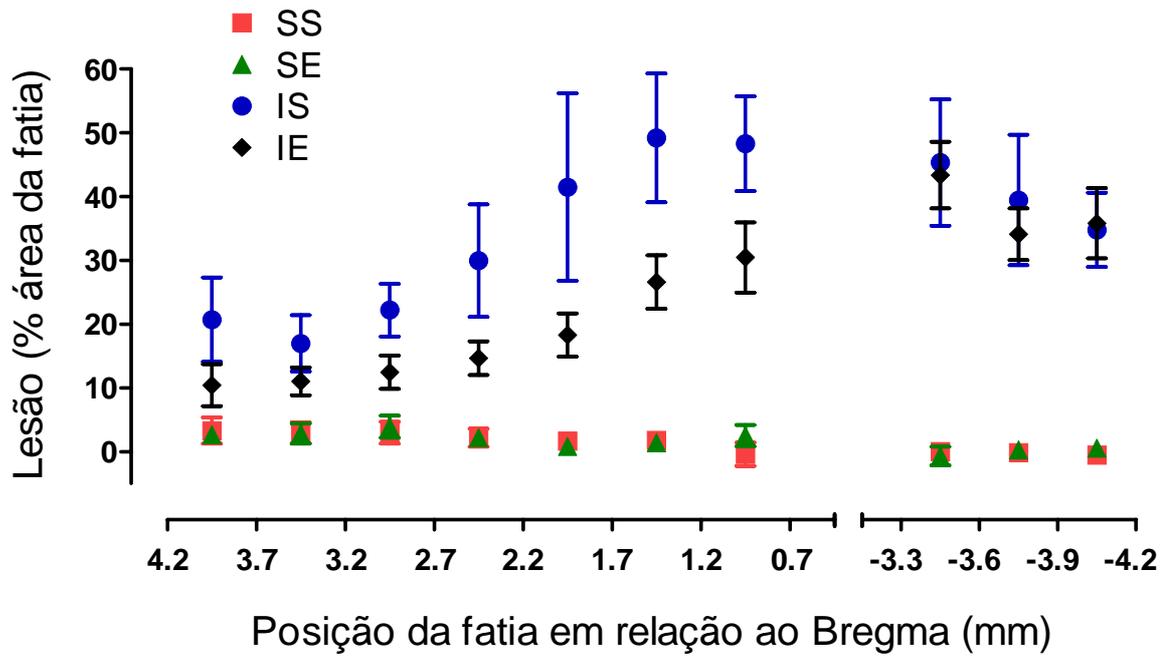


Figura 19. Volume de infarto do hemisfério esquerdo em relação ao direito.

Os animais dos grupos SS e SE incluídos no estudo não apresentaram lesão em nenhum dos hemisférios cerebrais. Os animais dos grupos IS apresentaram maior volume de infarto que os animais do grupo IE. A quebra no gráfico separa medidas do córtex motor e do hipocampo do animal. As barras indicam erro padrão da média.

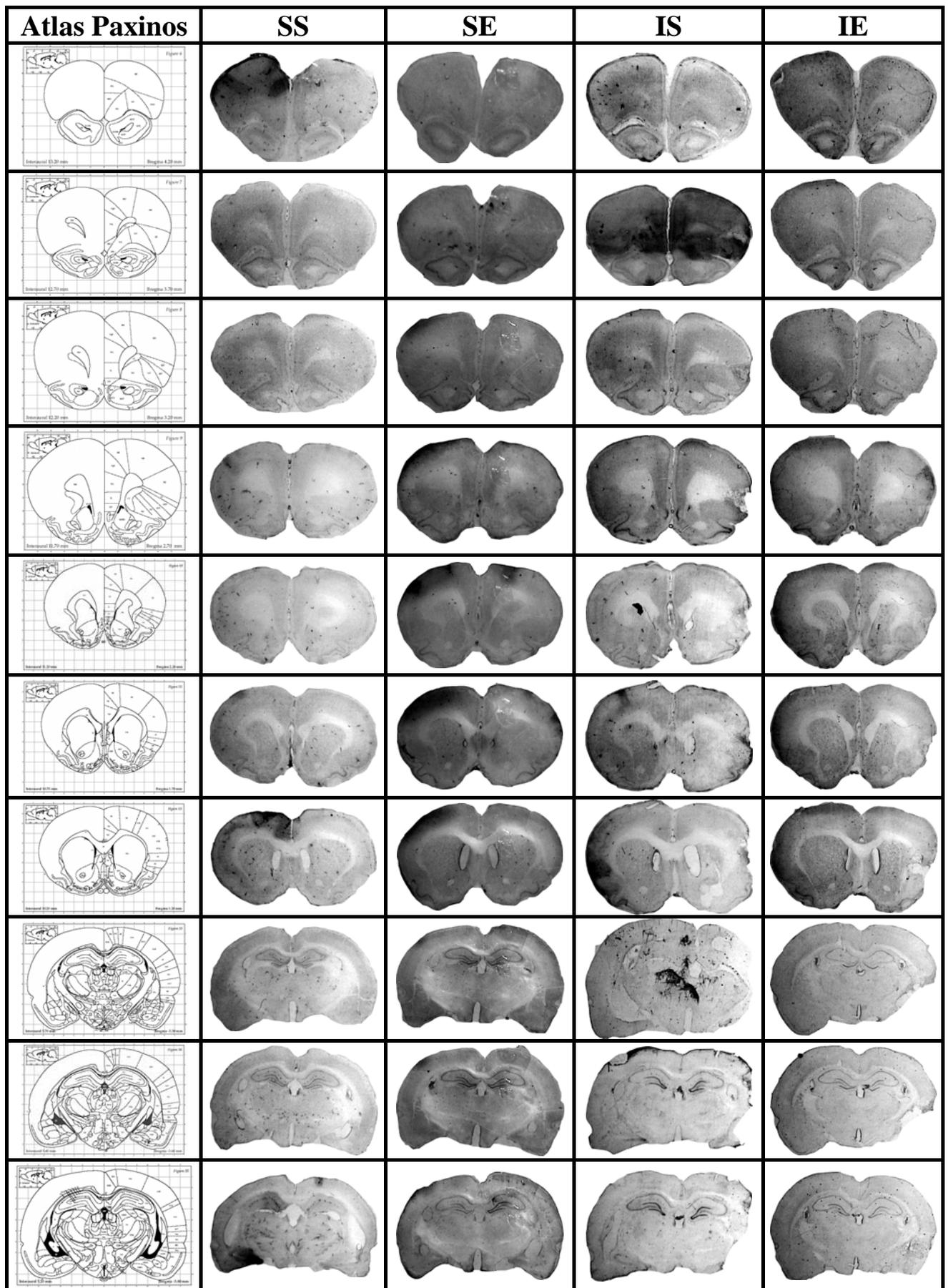


Figura 20. Fatias cerebrais dos animais dos diversos grupos experimentais.

A figura mostra uma fatia cerebral para cada intervalo de referência do Paxinos para cada um dos grupos. Pode-se observar que o cérebro dos animais sham encontra-se íntegro em todas as fatias mostradas. No entanto, o cérebro dos animais isquemiados revela extensa área de lesão.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do modelo de oclusão transitória da artéria cerebral média

A técnica cirúrgica utilizada para oclusão transitória da ACM mostrou-se eficaz sem a necessidade de realização de craniotomia, procedimento extremamente invasivo. A presença do fio de oclusão na porção proximal da ACM foi capaz de impedir que o corante penetrasse nessa artéria. Esse fato confirma que a distância de 20-21mm da bifurcação ACC é um parâmetro adequado para a colocação do fio em ratos com peso entre 275 e 325 gramas. A espessura do fio por volta de 300µm também é suficiente para oclusão do lúmen da artéria carótida interna, onde essa dá origem a ACM e a artéria cerebral anterior no polígono de Willis em animais na faixa de peso utilizada em nossos experimentos.

O modelo experimental de oclusão da ACM é muito relevante clinicamente porque permite a sobrevivência do animal por longos períodos após lesão (Hossmann, 1998). Intensos cuidados pós-operatórios precisam ser tomados para que o animal sobreviva por longos períodos e seu desempenho motor possa ser avaliado (Modo et al., 2000). Dos animais que sobreviveram às primeiras 48 horas pós-cirurgia, nenhum morreu ao longo do experimento. Isso demonstra que os cuidados pós-operatórios imediatos foram eficientes em assegurar a sobrevivência dos animais por todo o período do experimento. Somente animais isquemiados morreram no período pós-operatório imediato.

Foram isquemiados 45 animais ao longo do experimento. Desse total, 13 morreram dentro de 48 horas pós-cirurgia, 19 foram encaminhados para os experimentos e 13 apresentaram déficits com índice de gravidade menor que quatro e não foram incluídos no estudo. Esses valores estão de acordo com a literatura. Aspey descreveu que cerca de 33% dos animais submetidos à oclusão da ACM morrem no período de 48 horas após lesão (Aspey et al., 1998).

Todos os esforços foram realizados para que o tempo de cirurgia fosse reduzido. Entre a incisão cirúrgica e a colocação do fio de oclusão foram gastos em média 20 minutos. Um menor tempo de cirurgia diminui as seqüelas induzidas pelo procedimento e torna o modelo de lesão neurológica mais fidedigno.

A maior parte dos experimentos que utilizam o modelo de oclusão transitória da ACM mantém o animal acordado durante a indução da isquemia. Após o período determinado para a oclusão, o animal é reanestesiado para a retirada do fio e a realização da sutura cirúrgica (Modo et al., 2000;Hudzik et al., 2000;Ding et al., 2002b). Como em nosso estudo o animal permaneceu anestesiado durante a fase de isquemia, foi necessário manter o fornecimento de anestésico o mais baixo possível durante esse período para minimizar efeitos neuroprotetores (Kapinya et al., 2002). Durante o período de oclusão da ACM, os níveis de halotano foram mantidos entre 2-1% de acordo com a tolerância do animal. No entanto, o fato de o animal estar anestesiado durante o procedimento cirúrgico não impediu o sucesso do modelo em provocar lesão cerebral extensa no hemisfério privado do fluxo sanguíneo da ACM. Memezawa, em 1992, utilizou animais anestesiados para a realização do seu estudo que investigou relação entre tempo de isquemia e de reperfusão sobre a área de volume de infarto (Memezawa et al., 1992). A lesão cerebral presente no cérebro de 2 animais sham (excluídos do estudo) foi, provavelmente, induzida por um êmbolo formado durante manipulação dos vasos. No entanto, nenhum outro animal sham apresentou lesão cerebral visível ao exame macroscópico.

Alguns estudos mantêm a oclusão da ACM por um período de 2 horas (Zhang et al., 2000;Ding et al., 2004a). No entanto, o tempo de 60 minutos de oclusão transitória dessa artéria foi escolhido baseado em evidências que períodos isquêmicos menores que 30 minutos podem não produzir lesão e aqueles maiores que 120 minutos induzem a lesão semelhantes a oclusões permanentes (Marin et al., 2003). O tempo de 1 hora de oclusão utilizado em nosso estudo foi suficiente para produzir déficits motores nos animais.

5.2.Efeito da intensidade de exercício sobre a frequência cardíaca nos diferentes grupos de animais

Os valores da FC não foram diferentes para as diversas velocidades no grupo isquemia, embora esses animais tenham começado a treinar a 3m/min e tenham passado por mais oito velocidades diferentes até atingirem 15m/min. Esse resultado indica que nos animais isquemiados a FC não responde proporcionalmente ao aumento de velocidade na esteira, provavelmente devido ao fato destes animais já estarem realizando esforço máximo a uma velocidade de 3m/min. Embora o valor da FC não tenha alterado significativamente ao longo do treinamento, dois dos cinco animais isquemiados fadigaram, em pelo menos dois dias de registro, a uma velocidade de 13m/min. Esse fato mostra que a estabilização da FC se deve a uma incapacidade do sistema cardíaco do animal em responder ao aumento da carga de treinamento e não a uma ineficiência da carga em aumentar o esforço cardíaco do animal.

Diante desses resultados, os animais do grupo IE foram treinados na esteira a uma velocidade de 3m/min. Esse experimento mostrou que, tendo como parâmetro de esforço a FC, para animais submetidos à oclusão da ACM o esforço a 3m/min já é suficiente para estressar o sistema cardiovascular como a 15m/min.

Os animais isquemiados apresentaram maior FC de repouso que os animais dos grupos controle e sham. Embora esse aumento não seja estatisticamente significativo, ele indica que o animal com lesão cerebral exerce um esforço físico maior que os normais para realizar atividades diárias (como explorar o ambiente).

Os animais dos grupos controle e sham responderam ao aumento da carga de exercício durante treinamento. Para ambos os grupos, o Δ FC a uma velocidade de 15m/min foi maior que a 8m/min e a 11m/min. Isso significa que o sistema cardiovascular desses animais é capaz de responder ao aumento da carga de treinamento e que a medida da FC é um bom parâmetro para mensurar o esforço físico realizado durante exercício na esteira.

O fato de o grupo sham apresentar as mesmas respostas cardiovasculares que o controle tornam evidente que a cirurgia não foi capaz de induzir as alterações observadas na medida da FC no grupo isquemia. O procedimento cirúrgico não modificou a resposta da FC ao exercício.

5.3.Efeito do exercício e da isquemia sobre o peso corporal dos animais

O peso corporal dos animais após cirurgia de oclusão transitória da ACM é um dado importante acerca de recuperação pós-operatória (Modo et al., 2000). Nesse estudo, todos os animais perderam peso após a cirurgia (sham ou efetiva) para oclusão da ACM. Os animais sham perderam peso por causa do estresse cirúrgico. Os animais isquemiados perderam peso devido ao estresse cirúrgico e à lesão cerebral.

O exercício físico isoladamente não foi capaz de induzir ganho de peso nos animais sham, uma vez que as curvas de pesos dos grupos SS e SE são iguais. A cirurgia sham de oclusão da ACM teve pouco efeito sobre a curva de peso desses animais, uma vez que eles recuperaram rapidamente o peso pré-operatório e seguiram ganhando peso durante o experimento.

O exercício físico promoveu ganho de peso entre os animais isquemiados que foram treinados na esteira. Os animais do grupo IE recuperaram o peso pré-operatório antes dos animais do grupo IS. Além disso, os animais isquemiados sedentários foram os únicos que não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os pesos pré-operatório e do 32^o dia pós-cirurgia. Esse ganho de peso dos animais isquemiados treinados pode ser devido a uma melhora no quadro neurológico global, uma vez que o hipotálamo (estrutura responsável pela ingestão de alimentos) não é afetado diretamente pela oclusão da ACM. Esse resultado está de acordo com a literatura. Marin, 2003, mostrou que animais treinados após a isquemia recuperaram o peso pré-operatório antes dos não treinados (Marin et al., 2003).

5.4. Protocolo de Treinamento

É muito variável, entre diversos estudos, o dia pós-operatório em que um protocolo de treinamento é iniciado. Há experimentos em que o animal é submetido à realização de exercício 24 horas após lesão (Marin et al., 2003; Yang et al., 2003), outros em que o treinamento começa até 15 dias após isquemia (Biernaskie and Corbett, 2001). No entanto, na maior parte dos trabalhos, o treinamento motor começa entre o 2º e o 5º dias pós-operatório (Jones et al., 1999; Farrell et al., 2001; Risedal et al., 2002; Lee et al., 2003; Ding et al., 2004a). Nesse estudo, o protocolo de treinamento foi iniciado no quarto dia pós-operatório, pois esse intervalo de tempo está de acordo com a literatura e permitiu a avaliação das seqüelas neurológicas apresentadas pelo animal por três dias.

A velocidade de treinamento na esteira para animais normais e após dano cerebral varia bastante de um trabalho para outro. Alguns estudos utilizam a velocidade de 20m/min por até 30 minutos para treinamento (Wang et al., 2001; Yang et al., 2003). Entretanto, a maioria dos experimentos determina a intensidade entre 8m/min e 15m/min para o exercício (Ding et al., 2002b; Ding et al., 2004a; Ding et al., 2004b). Para animais do grupo sham, esse trabalho utilizou a velocidade de treinamento de 8m/min e 11m/min (por 5 minutos cada uma) e 15m/min por 20 minutos, totalizando um tempo de 30 minutos de exercício por quatro semanas. A velocidade de 15m/min foi escolhida para o grupo sham de acordo com um estudo de Ding (Ding et al., 2004b) que mostrou que animais não lesados treinados nessa velocidade por 30 minutos durante 3 semanas apresentavam aumento no número de vasos sanguíneos no estriado, além de aumento de fator de crescimento neural e fator neurotrófico derivado do encéfalo. As duas velocidades anteriores (8m/min e 11m/min) foram utilizadas para que houvesse um tempo de adaptação do animal às condições de treinamento na esteira.

Os animais isquemiados treinaram a uma velocidade de 3m/min de acordo com o experimento realizado para igualar o esforço realizado pelos animais sham e isquemiados. Embora nesse estudo, a velocidade de treinamento após lesão tenha sido baixa se comparado aos demais, foi suficiente para promover recuperação funcional. Seong-Min Ra, em 2002,

mostrou os benefícios do exercício na esteira a baixas velocidades. Animais treinados a baixas intensidades mostraram maior proliferação celular hipocampal quando comparados com os que treinaram com velocidades moderadas e severas (Ra et al., 2002). Por outro lado, a velocidade de treinamento de 3m/min pode ter sido alta para o animal isquemiado, tendo em vista que a FC nessa velocidade é igual à 15m/min.

5.5. Testes Funcionais

O teste de campo aberto mostrou que a atividade exploratória dos animais não foi afetada pela lesão isquêmica induzida por oclusão transitória da ACM. Esse achado está de acordo com a literatura. Lyden, em 1997, realizou um trabalho que correlacionou volume de infarto isquêmico com alteração comportamental e concluiu que independente da área de infarto, a atividade exploratória do animal não é alterada (Lyden et al., 1997). Em nosso experimento, nem o exercício nem a lesão isquêmica, isolados ou associados, foram capazes de influenciar a atividade exploratória do animal.

O teste de campo aberto foi realizado de maneira diferente nesse estudo. Como o teste foi todo filmado, ele pode ser reavaliado e checado quantas vezes se julgar necessário. A análise computacional das imagens mostrou-se capaz de fornecer uma medida correta da distância percorrida pelo animal (informação mais importante fornecida pelo teste) minimizando erros do avaliador. Além dessa medida fidedigna, a obtenção dos dados é mais fácil para os pesquisadores que possuem esse recurso. Essa tecnologia forneceu, além da distância percorrida, informações como número de quadrantes visitados e velocidade máxima desenvolvida ao longo do teste. Essas informações permitiram uma descrição detalhada da atividade exploratória do animal.

O teste passo em falso é muito utilizado em trabalhos que investigam recuperação funcional após lesão cerebral (Modo et al., 2000; Ding et al., 2002b; Ding et al., 2004a). Nesse estudo, os animais do grupo IS cometeram mais erros que os dos grupos SS e SE no teste realizado no 10^o dia pós-operatório. Esse resultado mostra que os animais do grupo IE

também apresentaram déficits motores nas patas anteriores, mas não tão graves quanto aqueles do grupo IS, ou seja, mostraram melhoras funcionais com apenas uma semana de treinamento. O teste realizado no 31^o dia pós-operatório mostrou que houve recuperação espontânea da habilidade motora das patas anteriores dos animais do grupo IS, uma vez que não houve diferença entre os grupos. Esse achado está de acordo com a literatura que relata recuperação funcional espontânea ao longo dos dias pós-isquemia (Modo et al., 2000). Essa recuperação espontânea fica evidente no grupo IS, quando não são encontradas diferenças entre os testes pré-operatório e o realizado no 31^o dia após cirurgia.

Esse teste também foi enriquecido pelos mesmos recursos computacionais utilizados no campo aberto. Embora o número de erros cometidos pelos animais seja a medida mais importante nesse teste, foi possível descrever toda a atividade exploratória espontânea do animal ao longo de 3 minutos. Assim como no campo aberto, no teste passo em falso não foi encontrada diferença na atividade exploratória dos animais após lesão. Nos dois testes ficou claro que o dano cerebral não influencia a distância percorrida pelo animal, o número de quadrantes visitados nem a velocidade máxima desenvolvida.

No teste das barras paralelas, os animais do grupo IE apresentaram melhora na habilidade das patas posteriores já no 10^o dia pós-operatório. Os animais do grupo IS cometeram mais erros nas barras paralelas que os dos demais grupos no teste realizado no 31^o dia após cirurgia, portanto as patas posteriores não mostraram a mesma recuperação espontânea em sua habilidade que as patas anteriores. Após a lesão cerebral, os animais do grupo IS apresentaram déficits motores das patas posteriores no teste do 10^o dia pós-operatório que permaneceram até o 31^o dia.

Em alguns trabalhos, a travessia das barras é usada como treinamento de tarefas motoras complexas que são capazes de promover melhora funcional e induzir alterações plásticas estruturais no cérebro (Jones et al., 1999).

O exercício na esteira foi capaz de promover recuperação motora em ratos isquemiados, embora seja considerado uma tarefa motora simples (Ding et al., 2004a).

5.6. Neuroplasticidade e recuperação funcional

Os animais isquemiados sedentários apresentaram recuperação espontânea da habilidade motora das patas anteriores de acordo com o teste passo em falso. Essa recuperação pode ser explicada pela neuroplasticidade cerebral. Pode ser devida à reorganização das projeções corticais, com áreas vizinhas ao infarto ou mesmo áreas do outro hemisfério cerebral assumindo a função daquela lesada (Carmichael et al., 2001; Carmichael and Chesselet, 2002; Carmichael, 2003), à neurogênese cortical induzida por oclusão transitória da ACM (Jiang et al., 2001), à sinaptogênese e brotamento axonal no hemisfério lesado e no contralateral (Stroemer et al., 1995; Stroemer et al., 1998).

Os animais isquemiados treinados apresentaram maior recuperação funcional que os sedentários de acordo com os testes funcionais passo em falso e barras paralelas. Essa maior recuperação funcional pode ser explicada pela capacidade do exercício em potencializar as alterações plásticas induzidas pela lesão. Jones, 1999, mostrou que lesão isquêmica induz a formação de novas sinapses no córtex lesado. Animais treinados após a lesão apresentaram maior recuperação funcional e maior número de sinapses no córtex lesado e no contralateral em relação aos não-treinados (Jones et al., 1999). Assim como o exercício, o ambiente enriquecido também potencializa alterações plásticas induzidas por lesão. Biernaskie, 2001, mostrou que a lesão isquêmica induz a aumento na arborização dendrítica de neurônios. Animais isquemiados colocados em ambientes enriquecidos apresentaram arborização dendrítica ainda maior que aqueles isquemiados, mas mantidos em ambiente sem estímulo (Biernaskie and Corbett, 2001). Esses dois trabalhos mostram que a intervenção externa adequada sobre o animal lesado potencializa a resposta do cérebro à lesão. O resultado é uma reorganização cerebral aumentada que se reflete na maior recuperação funcional.

5.7. Medida do volume de infarto

Os animais submetidos ao treinamento motor podem ter apresentado menor volume de infarto devido ao efeito neuroprotetor promovido pela atividade física. A literatura mostra diminuição do volume de infarto no grupo de animais submetidos a treinamento motor após lesão (Yang et al., 2003; Ding et al., 2004a). Além disso, animais treinados antes da lesão cerebral apresentam menor volume de infarto quando submetidos a oclusão transitória da ACM (Wang et al., 2001; Ang et al., 2003; Ding et al., 2004b).

A neuroproteção associada com exercício físico pode estar relacionada com o aumento de fatores neurotróficos endógenos. Fatores neurotróficos derivados do encéfalo e fatores de crescimento neural são os candidatos naturais a mediar os benefícios do exercício sobre a saúde cerebral e estão aumentados em animais treinados na esteira (Cotman and Berchtold, 2002; Ang et al., 2003).

O menor volume de infarto nos animais do grupo IE pode se dever ao fato de que a morte celular foi reduzida pelo exercício físico. O trabalho de Lee, 2003, sugeriu que o exercício na esteira, após isquemia global em gerbils, protege células da morte apoptótica (Lee et al., 2003). A formação de novos neurônios (neurogênese) também pode ajudar a explicar esse fenômeno. Kim, 2002, mostrou que o treinamento na esteira foi capaz de aumentar a proliferação celular sem alterar a apoptose no giro dentado do hipocampo de ratos normais (Kim et al., 2002). Por fim, a redução no volume de infarto dos animais que se exercitaram na esteira pode ter ocorrido devido ao acontecimento desses dois fenômenos simultaneamente (proteção celular contra morte apoptótica e formação de novas células).

Os animais isquemiados treinados mostraram maior recuperação funcional que aqueles sedentários. Portanto, a relação entre menor volume de infarto e melhor desempenho funcional foi confirmada por esse estudo. Lyden, 1997, mostrou que o volume de lesão cerebral isquêmica tem relação com o desempenho motor do animal (Lyden et al., 1997).

6. CONCLUSÕES

O exercício físico realizado após isquemia cerebral é eficiente em promover recuperação funcional e redução da área de infarto em ratos Wistar machos.

O animal isquemiado exerce um esforço muito maior que o animal sham para a mesma carga de exercício. A manutenção da atividade diária pode ser um esforço grande para o animal isquemiado.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ang ET, Wong PTH, Moochhala S, Ng YK (2003) Neuroprotection associated with running: Is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience* 118: 335-345
- Arida RM, Scorza CA, da Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EA (2004) Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neuroscience Letters* 364: 135-138
- Aspey BS, Cohen S, Patel Y, Terruli M, Harrison MJ (1998) Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 487-497
- Biernaskie J, Corbett D (2001) Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *Journal of Neuroscience* 21: 5272-5280
- Bland ST, Pillai RN, Aronowski J, Grotta JC, Schallert T (2001) Early overuse and disuse of the affected forelimb after moderately severe intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Behavioural Brain Research* 126: 33-41
- Brown MM (2002) Brain attack: a new approach to stroke. *Clinical Medicine* 2: 60-65
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Cupini LM, Bernardi G (2003) Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *Lancet Neurology* 2: 622-629
- Carmichael ST (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist* 9: 64-75
- Carmichael ST, Chesselet MF (2002) Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *Journal of Neuroscience* 22: 6062-6070
- Carmichael ST, Wei L, Rovainen CM, Woolsey TA (2001) New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiology of Disease* 8: 910-922
- Chen R, Cohen LG, Hallett M (2002) Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 111: 761-773
- Chen YC, Chen QS, Lei JL, Wang SL (1998) Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse. *Brain Research* 806: 238-245
- Cotman CW, Berchtold NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences* 25: 295-301
- Cramer SC, Chopp M (2000) Recovery recapitulates ontogeny. *Trends in Neurosciences* 23: 265-271
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1-105
- Dijkhuizen RM, Singhal AB, Mandeville JB, Wu O, Halpern EF, Finklestein SP, Rosen BR, Lo EH (2003) Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: A functional magnetic resonance imaging study. *Journal of Neuroscience* 23: 510-517

- Ding Y, Li J, Lai Q, Rafols JA, Luan X, Clark J, Diaz FG (2004a) Motor balance and coordination functional outcome in rat with cerebral artery occlusion training enhances transient middle. *Neuroscience* 123: 667-674
- Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, Phillis JW, Clark JC, Diaz FG (2004b) Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience* 124: 583-591
- Ding YC, Li J, Lai Q, Azam S, Rafols JA, Diaz FG (2002a) Functional improvement after motor training is correlated with synaptic plasticity in rat thalamus. *Neurological Research* 24: 829-836
- Ding YC, Zhou YD, Lai Q, Li J, Park H, Diaz FG (2002b) Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion. *Behavioural Brain Research* 132: 29-36
- Farrell R, Evans S, Corbett D (2001) Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death. *Neuroscience* 107: 585-592
- Feuerstein GZ, Wang XK (2000) Animal models of stroke. *Molecular Medicine Today* 6: 133-135
- Hallett M (2001) Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke. *Brain Research Reviews* 36: 169-174
- Hamdy S, Rothwell JC, Aziz Q, Thompson DG (2000) Organization and reorganization of human swallowing motor cortex: implications for recovery after stroke. *Clinical Science* 99: 151-157
- Hossmann KA (1998) Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular Research* 39: 106-120
- Hudzik TJ, Borrelli A, Bialobok P, Widzowski D, Sydserff S, Howell A, Gendron P, Corbett D, Miller J, Palmer GC (2000) Long-term functional end points following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65: 553-562
- Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA (2000) Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39: 806-816
- Jiang W, Gu WG, Brannstrom T, Rosqvist R, Wester P (2001) Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32: 1201-1207
- Jin KL, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4710-4715
- Jones TA, Chu CJ, Grande LA, Gregory AD (1999) Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *Journal of Neuroscience* 19: 10153-10163
- Kapinya KJ, Lowl D, Futterer C, Maurer M, Waschke KF, Isaev NK, Dirnagl U (2002) Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 33: 1889-1898

- Kawai N, Okauchi M, Morisaki K, Nagao S (2000) Effects of delayed intraischemic and postischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31: 1982-1989
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004) Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 186-191
- Kim SH, Kim HB, Jang MH, Lim BV, Kim YJ, Kim YP, Kim SS, Kim EH, Kim CJ (2002) Treadmill exercise increases cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. *Life Sciences* 71: 1331-1340
- Kolb B, Whishaw IQ (1998) Brain plasticity and behavior. *Annual Review of Psychology* 49: 43-64
- Kollmar R, Schabitz WR, Heiland S, Georgiadis D, Schellinger PD, Bardutzky J, Schwab S (2002) Neuroprotective effect of delayed moderate hypothermia after focal cerebral ischemia - An MRI study. *Stroke* 33: 1899-1904
- Lee MH, Kim H, Kim SS, Lee TH, Lim BV, Chang HK, Jang MH, Shin MC, Shin MS, Kim CJ (2003) Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils. *Life Sciences* 73: 2455-2465
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible Middle Cerebral-Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats. *Stroke* 20: 84-91
- Lyden PD, Lonzo LM, Nunez SY, Dockstader T, MathieuCostello O, Zivin JA (1997) Effect of ischemic cerebral volume changes on behavior. *Behavioural Brain Research* 87: 59-67
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405: 951-955
- Marin R, Williams A, Hale S, Burge B, Mense M, Bauman R, Tortella F (2003) The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. *Physiology & Behavior* 80: 167-175
- Mattson MP (2000) Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Research* 886: 47-53
- McArdle WD, Katch FI, Katch VL (1998) Atividade Física, Saúde e Envelhecimento. In *Fisiologia do Exercício*, pp 604-635. Baltimore
- Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK (1992) Penumbra Tissues Salvaged by Reperfusion Following Middle Cerebral-Artery Occlusion in Rats. *Stroke* 23: 552-559
- Menzies SA, Smith RR, Hoff JT, Betz AL (1992) Middle Cerebral-Artery Occlusion in Rats - A Neurological and Pathological Evaluation of A Reproducible Model. *Neurosurgery* 31: 100-107
- Miyai I, Suzuki T, Kang J, Kubota K, Volpe BT (1999) Middle cerebral artery stroke that includes the premotor cortex reduces mobility outcome. *Stroke* 30: 1380-1383
- Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H (2000) Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods* 104: 99-109

- Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Twiss JL (2004) Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8473-8478
- Nishizawa Y (2001) Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sciences* 69: 369-381
- Nudo RJ (1999) Recovery after damage to motor cortical areas. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 740-747
- Nudo RJ, Nelson RJ (2003) Animal models of stroke and rehabilitation - Introduction. *Ilar Journal* 44: 81-82
- Paxinos G (1995) Cerebral Vascular System. In *The Rat Nervous System*, Academic Press (ed) pp 3-35. San Diego
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. San Diego
- Ra SM, Hong K, Jang MH, Shin MC, Lee TH, Lim BV, Kim CJ, Kim EH, Kim KM, Kim SS (2002) Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Neuroscience Letters* 333: 123-126
- Reglodi D, Tamas A, Lengvari I (2003) Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research Bulletin* 59: 459-466
- Riek-Burchardt M, Henrich-Noack P, Metz GA, Reymann KG (2004) Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia. *Journal of Neuroscience Methods* 137: 227-233
- Risedal A, Mattsson B, Dahlqvist P, Nordborg C, Olsson T, Johansson BB (2002) Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. *Brain Research Bulletin* 58: 315-321
- Sharp FR, Liu JL, Bernabeu R (2002) Neurogenesis following brain ischemia. *Developmental Brain Research* 134: 23-30
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE (1995) Neocortical Neural Sprouting, Synaptogenesis, and Behavioral Recovery After Neocortical Infarction in Rats. *Stroke* 26: 2135-2144
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE (1998) Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke* 29: 2381-2393
- Teasell R (2003) Stroke recovery and rehabilitation. *Stroke* 34: 365-366
- Thirumala P, Hier DB, Patel P (2002) Motor recovery after stroke: Lessons from functional brain imaging. *Neurological Research* 24: 453-458
- Thulborn KR, Carpenter PA, Just MA (1999) Plasticity of language-related brain function during recovery from stroke. *Stroke* 30: 749-754
- Turkstra LS, Holland AL, Bays GA (2003) The neuroscience of recovery and rehabilitation: What have we learned from animal research? *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 84: 604-612

- Wang RY, Yang YR, Yu SM (2001) Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *Brain Research* 922: 140-143
- Weiller C, Rijntjes M (1999) Learning, plasticity, and recovery in the central nervous system. *Experimental Brain Research* 128: 134-138
- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences* 179: 1-33
- Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR (2004) Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Progress in Neurobiology* 72: 167-182
- Winstein CJ, Merians AS, Sullivan KJ (1999) Motor learning after unilateral brain damage. *Neuropsychologia* 37: 975-987
- Yang YR, Wang RY, Wang PSG (2003) Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neuroscience Letters* 339: 91-94
- Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ, Schmid-Elsaesser R (2000) Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Research* 863: 94-105
- Zhang L, Chen JL, Li Y, Zhang ZG, Chopp M (2000) 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* 174: 141-146