

## Efeito neuroprotetor do exercício físico em ratos com isquemia cerebral

DAMÁZIO, L.C.M.<sup>1</sup>, MELO, R. T. R.<sup>1</sup>, LIMA, M. C.<sup>2</sup>, CARVALHO, P. H.<sup>4</sup>, OKANO, B. S.<sup>3</sup>, RIBEIRO, R. I. M. A.<sup>2</sup>, ALVES, N. R.<sup>2</sup>, NATALI, A. J.<sup>3</sup>, CARLO, R. J. D.<sup>4</sup>, MALDONADO, I. R. S. C.<sup>1</sup>.

### RESUMO

*O objetivo do estudo foi demonstrar o efeito neuroprotetor do exercício físico em ratos com isquemia cerebral. Foram utilizados 39 ratos Wistar, machos, com peso entre 138-400g, distribuídos nos seguintes grupos: AI-isquemia/exercício antes (n=8); DI-isquemia/exercício depois (n=8), SI-isquemia/sedentário (n=5), AS-sham/exercício antes (n=6); DS-sham/exercício depois (n=6) e SS-sham/sedentário (n=6). Os ratos que exercitaram antes e depois da cirurgia foram submetidos a um programa de exercício físico de seis semanas, durante 30 minutos/dia por 5 dias na semana. A indução da isquemia cerebral foi feita através da oclusão transitória da artéria cerebral média (OACM) por 60 minutos. Os cérebros foram seccionados e corados com uma solução de 2% de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) para o cálculo do volume de infarto cerebral. A análise do volume de infarto cerebral demonstrou diferenças entre os grupos SI e AI, com  $p < 0.05$ . Os animais que exercitaram antes da OACM apresentaram menor volume de infarto cerebral.*

Palavras-chave: isquemia cerebral; atividade física; volume de infarto cerebral.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Biologia Celular e Estrutural, CEP: 36570-000, Viçosa-MG

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del Rei – Grupo de Atuação Docente de Morfologia, CEP: 35501296, Divinópolis – MG,

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

<sup>4</sup> Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Medicina Veterinária, CEP: 36570-000, Viçosa – MG

E-mail: (lailacmdamazio@gmail.com)

### INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral é uma importante causa tanto de mortalidade, quanto de morbidade no mundo<sup>1,2</sup>. Os estudos têm utilizado o modelo de OACM como o mecanismo de promover a isquemia cerebral em ratos<sup>3,4</sup>. Com isso, estes modelos permitem o estudo de intervenções, tratamento e prevenção das lesões isquêmicas<sup>5,6</sup>.

Existem mecanismos neuroprotetores que previnem as complicações da isquemia cerebral<sup>7</sup>. Estudos demonstram que a atividade física realizada antes ou depois das lesões cerebrais isquêmicas promovem neuroproteção e diminuição da incidência de mortalidade.<sup>7,8</sup> No entanto, a maioria dos autores investiga o efeito benéfico do exercício físico antes ou depois da isquemia, não havendo estudos que comparem os dois momentos ao mesmo tempo. Com isso, o objetivo do estudo foi demonstrar o efeito neuroprotetor do exercício físico em ratos com isquemia cerebral.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 39 ratos Wistar, machos, com peso entre 138-400g, com 30 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram inicialmente separados em dois grupos experimentais: isquemia por OACM e sham. Os animais do primeiro grupo (isquemia por OACM) foram distribuídos nos seguintes subgrupos: AI: animais que realizaram exercício na esteira (Insight Instrumentos® – Ribeirão Preto, SP) antes (n=8); DI: animais que realizaram exercício na esteira depois (n=8) e SI: animais que não realizaram exercício (n=5). O segundo grupo de animais (sham) foi submetido ao procedimento cirúrgico, mas não à OACM, sendo subdividido nos seguintes subgrupos: AS: animais treinados antes da incisão cirúrgica (n=6); DS: animais treinados após a incisão cirúrgica (n=6) e SS: animais não treinados na esteira (n=6). Os animais do grupo AI e AS realizaram treinamento na esteira sem inclinação por seis semanas, cinco dias por semana, durante 30 minutos/dia, na velocidade de 25 m/min.<sup>8</sup> Os ratos destinados ao treinamento físico após o terceiro dia da OACM

e o procedimento cirúrgico (sham) correram na esteira por seis semanas, durante 30 minutos/dia, cinco dias por semana, com velocidade controlada de 10 a 20m/min.<sup>9,10</sup>

Para a realização da OACM, os animais foram anestesiados com 4% de Halotano, recebendo atropina diluída em salina 2% via intraperitoneal para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica. A OACM foi realizada por 60 minutos para reproduzir o modelo experimental de isquemia cerebral em ratos.<sup>9,11,12</sup> Depois de seis semanas da cirurgia de OACM e dos procedimentos cirúrgicos foi realizada a perfusão transcárdica com solução de cloreto de sódio 0,9% durante 5 minutos e depois com paraformaldeído tamponado 4% por mais 5 minutos.<sup>13</sup> Logo o cérebro foi removido e seccionamento em fatias de 1 milímetro de espessura no plano coronal. As fatias de cérebro foram imersas em solução dissolvida em PBS (0.1mol/L) na concentração de 2% de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 37°C por 30 minutos<sup>14</sup> para marcação da área de isquemia cerebral. Em seguida, as fatias foram reunidas e digitalizadas em um scanner de mesa (HP ScanJet M1120MFP resolução 300dpi). O volume de infarto do hemisfério cerebral direito e esquerdo foram calculadas com auxílio do programa Axio Vision Rel. 4.8 (microscópio Zeiss Axiophot). A análise estatística dos dados do volume de infarto total foi realizada pela *One Way Anova*, estatística não paramétrica, para comparar os grupos (SI, AI, DI), seguido do *Post-hoc* de Bonferroni, considerando ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das fatias coronais do cérebro dos ratos dos grupos SS, AS e DS, coradas com TTC, revelou um padrão íntegro e normal. Já nos animais do grupo isquemiado (SI, AI, DI) foi possível identificar, no hemisfério cerebral esquerdo, áreas de coloração mais clara correspondentes à região de infarto. O grupo SI apresentou maiores áreas corticais de infarto no hemisfério cerebral esquerdo que os grupos AI e DI. A análise do volume de infarto cerebral demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre

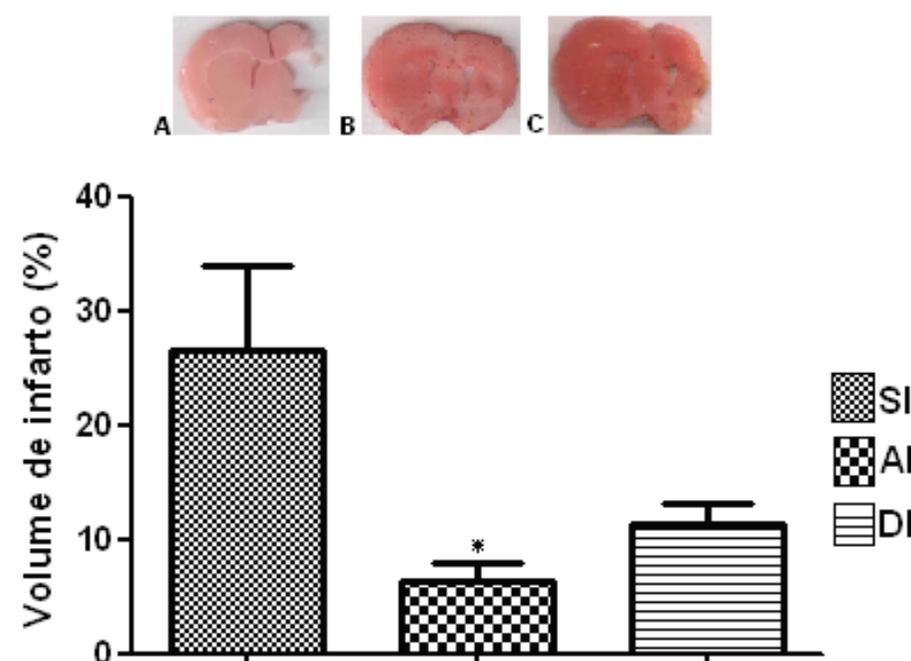
os grupos SI e AI ( $p < 0,05$ ), com diminuição do volume de lesão cerebral no grupo exercitado antes da isquemia cerebral. (Tabela I e Figura 2).

Tabela I: Volume de infarto cerebral (%) nos ratos submetidos à OACM

Grupos de animais com isquemia	Volume da área de infarto (%)
Sedentário/Isquemiado (SI)	26,44 ± 7,46 (5)
Exercício antes/Isquemiado (AI)	6,28 ± 1,60* (8)
Exercício depois/Isquemiado (DI)	11,29 ± 1,76 (8)

Os valores representam as médias e erro padrão das médias. Entre parênteses encontra-se o número de ratos analisados. \* $P < 0,05$  vs A;  $P = 0,0049$ .

Figura 2. Imagens de secções do hemisfério cerebral direito e esquerdo coradas por TTC de ratos dos grupos SI (A), AI (B) e DI (C). As barras representam as médias dos valores de cada grupo e os traços indicam erro padrão da média. \* $P < 0,05$  vs SI.



Os animais com isquemia cerebral que treinaram antes do evento isquêmico apresentaram menores volumes de infarto cerebral ( $p < 0,05$ ). No estudo de Ding *et al.*<sup>15</sup> foi evidenciado os benefícios de um programa de 3 semanas de atividade física na esteira rolante motorizada antes da isquemia cerebral, onde a indução da neuroproteção cerebral foi presenciada pela melhora da integridade microvascular com o aumento da espessura da lâmina basal e diminuição do edema cerebral. O exercício físico antes da lesão isquêmica cerebral promove aumento da densidade microvascular e induz a angiogênese, que é um mecanismo de proteção aos eventos isquêmicos no cérebro.

### CONCLUSÕES

Os animais que exercitaram antes da OACM apresentaram menor volume de infarto cerebral que o grupo de animais que exercitaram após o evento isquêmico, demonstrando os benefícios do exercício físico quando realizado antes da isquemia cerebral em ratos.

### REFERÊNCIAS

- (1) BODEN-ALBALA, B., SACCO, R.L. The stroke prone individual. *Rev.Soc.Cardiol. Estado de São Paulo*, v. 4, p.501-8, 1999.
- (2) STURM. J., DONNAN, G., DEWEY, H., MACDONELL, R., GILLIGAN, A., THRIFT, A. Determinants of handicap after stroke: the North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). *Stroke*, v.35, p.715-20, 2004.
- (3) SACCO, R.L, et al. Leisure-time physical activity and ischemic stroke risk: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*,v. 29, p.380– 7, 1998.
- (4) KINGA, S., BOZENA, K., ANDREA, B., CHRIS, G.P.; WOJCIECH, D. Neuroprotective activity of selective mGlu1 and mGlu5 antagonists in vitro and in vivo. *Eur. J.Pharmacol.*, v.554, p.18-29, 2007.
- (5) MENZIES, SA, SMITH RR, HOFF JT, BETZ et al. Middle Cerebral-Artery Occlusion in Rats - A Neurological and Pathological Evaluation of A Reproducible Model. *Neurosurgery*, v. 31,p.100-107, 1992.
- (6) MARIN, R., WILLIAMS, A., HALE, S., BURGE, B., MENSE, M., BAUMAN, R., TORTELLA, F. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. *Physiology & Behavior*,v. 80, p.167-175, 2003.
- (7) JONES, T.A., et al. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *J.Neurosci.*, v.19, p.1153– 63, 1999.
- (8) ZHANG, F., JIA, J., WU, Y., HU, Y., WANG, Y. The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia. *Int.J.Mol. Sci.*, v.11, p.2658-2669, 2010.
- (9) YANG, Y.R. et al. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett.*, v.339,p.91-94, 2003.
- (10) HUMM, J.L., et al. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Res.*, v.783,p.286– 92, 1998.
- (11) LONGA, E.Z., WEINSTEIN, P.R, CARLSON, S., CUMMINS R. Reversible Middle Cerebral-Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats. *Stroke*, v.20,p. 84-91,1989.
- (12) MA, J., ZHAO, L., NOWAK JR., T.S.Selective, reversible occlusion of the middle cerebral artery in rats by an intraluminal approach optimized filament design and methodology. *J. Neurosci. Methods.*, v.156, p.76-83, 2006.
- (13) YANG, Y., SHUAIB, A., LI, Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. *J.Neurosci. Methods*, v. 84, p.9-16,1998.
- (14) ISAYAMA, K., PITTS, L.H., NISHIMURA, M.C. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarct. *Stroke*, v.22, p.1394-1398,1991.
- (15) DING, Y.H.; DING, Y.C.; LI, J.; BESSERT, D.A.; RAFOLS, J.A. Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. *Neurol. Res.*, v. 28, p.184-189, 2006.