



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**DANIELLA CRISTINA DE ASSIS PINTO GOMES**

**Associação de enriquecimento ambiental e exercício físico é eficiente na reabilitação de sequelas motoras em modelo murino de acidente vascular encefálico isquêmico**

VITÓRIA, ES  
2022

**Daniella Cristina de Assis Pinto Gomes**

**Associação de enriquecimento ambiental e exercício físico é eficiente na  
reabilitação de sequelas motoras em modelo murino de acidente vascular  
encefálico isquêmico**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Martins e Silva

Coorientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

G633a Gomes, Daniella Cristina de Assis Pinto, 1989-  
Associação de enriquecimento ambiental e exercício físico é eficiente na reabilitação de sequelas motoras em modelo murino de acidente vascular encefálico isquêmico. / Daniella Cristina de Assis Pinto Gomes. - 2022.  
70 f. : il.

Orientadora: Cristina Martins e Silva.  
Coorientador: Breno Valentim Nogueira.  
Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neurociências. 2. Exercícios terapêuticos. 3. Acidente vascular cerebral. 4. Bioquímica. I. Silva, Cristina Martins e. II. Nogueira, Breno Valentim. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

Daniella Cristina de Assis Pinto Gomes

**“Associação de enriquecimento ambiental e exercício físico é eficiente na reabilitação de sequelas motoras em modelo murino de acidente vascular encefálico isquêmico.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 26 de abril de 2022.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Martins e Silva – Orientadora**

---

**Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira – Coorientador**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aurélia Araújo Fernandes – Examinador Interno**



Documento assinado digitalmente

LUCIENE BRUNO VIEIRA

Data: 28/04/2022 08:00:25-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciene Bruno Vieira – Examinador Externo**

**Vitória/ES  
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
AURELIA ARAUJO FERNANDES - SIAPE 2786095  
Departamento de Morfologia - DM/CCS  
Em 28/04/2022 às 10:35

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/458131?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
BRENO VALENTIM NOGUEIRA - SIAPE 2499820  
Departamento de Morfologia - DM/CCS  
Em 28/04/2022 às 16:29

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/458695?tipoArquivo=O>

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA

O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
CRISTINA MARTINS E SILVA - SIAPE 1808073  
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS  
Em 29/04/2022 às 09:08

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/459287?tipoArquivo=O>

## AGRADECIMENTOS

À Deus, o dono da minha vida e o meu sustento durante essa jornada. A Ele dou toda honra, glória e louvor por essa conquista.

À minha família, por serem a minha base e por suportarem comigo todos os momentos, desde os felizes até os mais difíceis. Aos meus filhos, Arthur e Esther, por serem a minha motivação e minha dose de força diária para continuar lutando e não desistir. Ao meu esposo, Weverton, meu melhor amigo, por todo apoio, compreensão, paciência e amor. Aos meus pais, por me mostrarem a direção pela qual eu devia seguir e caminharem junto comigo, por todo tempo e cuidado que dedicaram a mim e aos meus filhos para que eu pudesse chegar até aqui. Sem vocês eu não teria conseguido!

À minha orientadora, Cristina, por ter me aceitado, acreditado em mim e investido muito do seu tempo e conhecimento. E ao meu coorientador, Breno, por todo o incentivo e por permitir a utilização do *grip test* para a realização dos meus experimentos. Nunca me esquecerei do que vocês fizeram por mim! Obrigada!

Aos meus colegas de LabNec e LMNC, Estela, Alessandra, Julyane, Natalie, Matheus e Tamara, pela convivência agradável mesmo em tempos de muitos desafios, pelas longas horas de experimentos, pelos sábados, domingos e feriados que escolheram estar junto comigo no laboratório. Agradeço especialmente à Tamara, porque mesmo sem precisar, investiu do seu conhecimento e do seu tempo, se tornando a referência dentro do laboratório enquanto a prof<sup>a</sup> Cristina não pôde estar fisicamente presente. Tudo isso só foi possível porque vocês estiveram comigo!

Aos meus amigos, por torcerem por mim e vibrarem com minhas vitórias. Agradeço especialmente às minhas amigas Lívia e Thatiana, por sempre me colocarem em suas orações, por escutarem meus desabafos e me ajudarem a manter a minha sanidade mental. Vocês tornaram esse caminho mais leve!

Aos meus colegas de turma, e aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em bioquímica, por todo o apoio, troca de experiências e ensinamentos.



À professora Lívia por conceder gentilmente a sala de comportamento, e ao LABIOM pelo suporte prestado durante os experimentos.

A CAPES e FAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é considerado a principal causa de incapacidade em adultos e a segunda maior causa de morte no mundo. O AVE pode ser hemorrágico (AVEh) e isquêmico (AVEi). O AVEi, mais prevalente, é causado por um trombo ou êmbolo, ou como consequência de uma parada cardíaca.

Os comprometimentos motores e cognitivos recorrentes após AVEi podem ser minimizados ou recuperados com a adoção de tratamentos adequados de reabilitação como o exercício físico (EF) e o enriquecimento ambiental (EA). No entanto, de acordo com a literatura, o efeito de tais terapias na reabilitação, quando adotadas separadamente, são limitadas. Neste contexto, esta pesquisa investigou a associação entre a exposição de um ambiente enriquecido e o exercício físico na recuperação da função motora e cognitiva em camundongos submetidos a um evento isquêmico agudo. Camundongos machos C57Bl/6 (8 a 12 semanas de idade), foram submetidos a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAo) durante 35 minutos ou cirurgia fictícia (sham). Subsequentemente, os animais foram distribuídos em oito grupos, de acordo com as condições de habitação (ambiente padrão (AP) ou ambiente enriquecido (AE)) e se foram ou não submetidos a seções de exercício físico condicionado (EF): isquemia ou sham tratados com AE sem EF (AE/S), EF em ambiente padrão (AP/E), associação de AE e EF (AE/E), e ambiente padrão sem EF (AP/S). A reabilitação teve início 48h após a cirurgia e durou 30 dias. Os animais dos grupos AE foram alocados em caixas grandes (60cm × 50cm × 22cm) com 6 brinquedos alternados semanalmente, enquanto os outros foram colocados em caixas padrão para camundongos. O modelo de EF utilizado foi a natação, realizada 3 vezes por semana durante 4 semanas. A duração das seções foi gradualmente aumentada a cada semana, até um tempo máximo de 30 minutos. As análises estatísticas indicam que os animais submetidos ao BCCAo desenvolveram déficits motores. Além disso, os animais que foram submetidos à associação EA e EF obtiveram uma melhora da função motora, mas não foi possível concluir que houve melhora da função cognitiva. Desta forma, este estudo sugere que a associação entre EA e EF é mais eficaz para o tratamento das sequelas motoras dos animais submetidos ao BCCAo.

*Palavras-chave:* isquemia cerebral, exercício físico, ambiente enriquecido, reabilitação, cognição.

## **ABSTRACT**

Stroke is the leading cause of disability in adults and the second leading cause of death in the world. The stroke can manifest itself in two ways, hemorrhagic stroke and ischemic stroke. The most common one, the ischemic stroke, is caused by the presence of thrombus or embolus in the vessel, or because of a cardiac arrest. Physical and cognitive impairment are recurrent sequelae in cerebral ischemia, and can be minimized with the adoption of appropriate post-stroke rehabilitation treatments, such as physical exercise (PE) and enriched environment exposure (EE). In this context, this research investigated the association between EE exposure and PE in motor and cognitive function recovering in mice submitted to an ischemic stroke. The animals used in the experiments, male mice C57Bl/6 (8 to 12 weeks old) were either submitted to bilateral occlusion of the common carotid arteries (BCCAO) for 35 minutes or sham-operated (sham). Subsequently, ischemic and sham animals were split into one between eight groups, according to, housing conditions (standard environment (SE) or enriched environment (EE)) and whether or not they underwent conditioned physical activity sessions (PE): ischemic or sham treated with SE without PE (SE/S), PE in standard environment (SE/E), association of EE and PE (EE/E), e standard environment without PE (SE/S). Rehabilitation started 48 h after surgery and lasted for 30 days. The animals in the EE groups were placed in large boxes (60cm × 50cm × 22cm) with 6 toys alternated weekly, while the others were placed in standard mice boxes. The PE model used was swimming, performed 3 times a week for a period of 4 weeks. The duration of the sessions was gradually increased each week, until a maximum time of 30 minutes. The statistics indicate that the animals submitted to BCCAO developed motor deficits. In addition, the animals that were submitted to the EE and PE association obtained an increase in motor, but it was not possible to conclude that there was an improvement in cognitive function. In this way, this study suggests that the association between EE and PE is more effective for motor sequelae treatment of animals submitted to BCCAO.

*Keywords:* cerebral ischemia, physical exercise, enriched environment, rehabilitation, cognition.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação dos tipos de acidente vascular encefálico.....	17
<b>Figura 2:</b> Ilustração das diferentes regiões teciduais após evento encefálico isquêmico e as diferenças regionais do fluxo sanguíneo cerebral, entrega e fração de extração de oxigênio.....	18
<b>Figura 3:</b> Representação temporal dos eventos celulares desencadeados após o AVEi.....	20
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática dos eventos celulares desencadeados após AVEi.....	21
<b>Figura 5:</b> Desenho esquemático da via PGC-1a/FNDC-5/irisina.....	27
<b>Figura 6:</b> Desenho esquemático da via lactato/PGC-1a/FNDC-5.....	27
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do ambiente enriquecido usado em estudos com roedores.....	29
<b>Figura 8:</b> Representação dos grupos de acordo com o tratamento empregado.....	33
<b>Figura 9:</b> Desenho experimental.....	34
<b>Figura 10:</b> Modelo esquemático da cirurgia de indução da isquemia cerebral global .....	35
<b>Figura 11:</b> Representação das condições de habitação utilizadas neste trabalho...	36
<b>Figura 12:</b> Representação do teste de força de agarre.....	39
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática do teste do campo aberto.....	40
<b>Figura 14:</b> Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos....	41
<b>Figura 15:</b> Cortes histológicos do cérebro de animal submetido a BCCAo após coloração com TTC.....	43
<b>Figura 16:</b> Desempenho dos animais na Escala Modificada de Severidade Neurológica (mNss).....	44
<b>Figura 17:</b> Desempenho dos animais no teste de força de agarre.....	46
<b>Figura 18:</b> Desempenho dos animais no teste do campo aberto.....	48

**Figura 19:** Desempenho motor dos animais no teste de reconhecimento de objeto na fase de treino..... 50

**Figura 20:** Desempenho cognitivo dos animais no teste de reconhecimento de objetos através do tempo de exploração dos objetos na fase de treino e teste..... 51

**Figura 21:** Desempenho cognitivo dos animais no teste de reconhecimento de objeto através do índice de discriminação (A) e de preferência (B)..... 53

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Escala Modificada de Severidade Neurológica (mNss)..... 38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AVE – acidente vascular encefálico

AHA – Associação Americana do Coração

SUS – Sistema Único de Saúde

AVEh – acidente vascular encefálico hemorrágico

AVEi – acidente vascular encefálico isquêmico

FSC – fluxo sanguíneo cerebral

ATP – adenosina trifosfato

NMDA - N-metil-D-aspartato

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izaxazolpropiónico

EROS - espécies reativas de oxigênio

DNA – ácido desoxirribonucleico

SNC – sistema nervoso central

TNF – fator de necrose tumoral

IL – interleucina

NO – óxido nítrico

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

GDNF - fator neurotrófico derivado de células gliais

IGF - fator de crescimento tipo insulina

rt-PA - ativador de plasminogênio tecidual humano recombinante

EF – exercício físico

CIMT - terapia do movimento induzido pela restrição do membro anterior não-afetado

AVERT – ensaio de reabilitação muito precoce

FNDC-5 - proteína 5 contendo domínio de fibronectina tipo III

PGC-1 $\alpha$  - peroxissoma coativador gama-receptor proliferador-ativado 1 alfa

EA – enriquecimento ambiental

AE – ambiente enriquecido

BCCAO - oclusão bilateral da artéria carótida comum

cca – artérias carótidas comuns

TTC - de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

mNss - escala modificada de severidade neurológica

EPM – erro padrão da média

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	16
<b>1.1.1. Fisiopatologia</b> .....	17
1.2. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO CLÍNICO.....	22
1.3. ESTRATÉGIAS NÃO FARMACOLÓGICAS NA REABILITAÇÃO DAS SEQUELAS DO AVEi.....	23
<b>1.3.1. Exercício físico</b> .....	23
1.3.1.1. Diferentes protocolos de exercício físico em estudos pré-clínicos de AVE.....	24
1.3.1.2. O eixo músculo – cérebro.....	25
<b>1.3.2. Enriquecimento ambiental</b> .....	28
1.4. JUSTIFICATIVA.....	30
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
2.1. GERAL.....	31
2.2. ESPECÍFICOS.....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1. ANIMAIS.....	31
3.2. DESENHO EXPERIMENTAL.....	32
3.3. ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL PELA OCLUSÃO BILATERAL DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS.....	34
3.4. CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO.....	35
3.5. PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO.....	36
3.6. QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO CEREBRAL.....	36
3.7. ESCALA MODIFICADA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA.....	37
3.8. AVALIAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR.....	37
3.9. ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DO CAMPO ABERTO).....	39
3.10. MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO (RECONHECIMENTO DE OBJETOS)..	40
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>4. RESULTADOS</b> .....	42
4.1. QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO CEREBRAL.....	42
4.2. ESCALA MODIFICADA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA (mNss).....	43



4.3.	FORÇA DE AGARRE ( <i>GRIP TEST</i> ).....	44
4.4.	CAMPO ABERTO ( <i>OPEN FIELD</i> ).....	46
4.5.	RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	48
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>

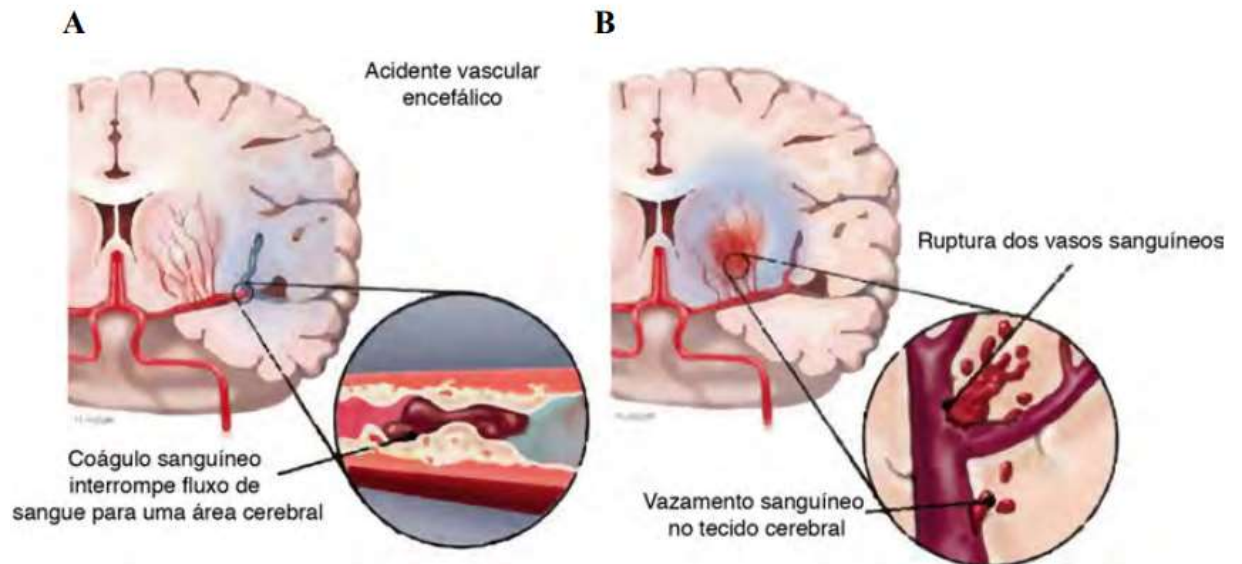
## 1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) é a principal causa de incapacidade em adultos e a segunda maior causa de morte no mundo (SIRSAT; FERMÉ; CÂMARA, 2020). O Brasil segue essas mesmas tendências mundiais, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (BRASIL, 2013). De acordo com a Associação Americana do Coração (AHA – sigla em inglês para American Heart Association) houve em média uma morte a cada 3 minutos e 42 segundos por AVE em 2016 (BENJAMIN et al., 2019). Ainda, a projeção para 2030 prevê um incremento na prevalência dessa doença, pois a letalidade está diminuindo, à medida que novos tratamentos vão sendo descobertos e aprimorados, e as comorbidades estão aumentando, associado ao envelhecimento da população, o que justifica esse aumento da prevalência (BENJAMIN et al., 2019; GORELICK, 2019). Além disso, o AVE é altamente oneroso tanto na fase hospitalar como na ambulatorial (WOLFE, 2000). Isso porque a maioria dos pacientes acometidos por essa doença sobrevivem ao evento isquêmico, porém, permanecem com sequelas sensório-motoras e cognitivas que impedem o pleno retorno ao trabalho (VAN EEDEN; VAN HEUGTEN; EVERS, 2012). Em 2012, os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com internações hospitalares foram de R\$ 163 milhões de reais (SANTOS; WATERS, 2020) e na fase ambulatorial, os gastos estão associados com o processo de reabilitação e com os benefícios de seguridade social (REIS et al., 2018).

### 1.1. O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

A etiologia do AVE demonstra que este é um evento neurológico súbito cuja ausência de perfusão sanguínea tecidual em determinado território encefálico resulta em uma lesão neuronal na área afetada (CHEN et al., 2017b; LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003). O AVE pode ser de dois tipos: hemorrágico (AVEh) e isquêmico (AVEi). O AVEh é o menos frequente e decorre de uma ruptura de um vaso sanguíneo desencadeando uma hemorragia (BAI et al., 2020). Esse tipo de AVE é o mais grave, pois reduz o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em decorrência do aumento da pressão intracerebral, gerando maiores déficits neurológicos e com maiores chances de evoluir a óbito (HASEGAWA et al., 2015;

WU et al., 2017). O AVEi é o mais frequente, e é causado pela presença de um trombo ou um êmbolo na luz do vaso, ou ainda em decorrência de uma parada cardíaca, provocando a interrupção parcial ou total do FSC (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; LEÓN-MORENO et al., 2020) (Figura 1).

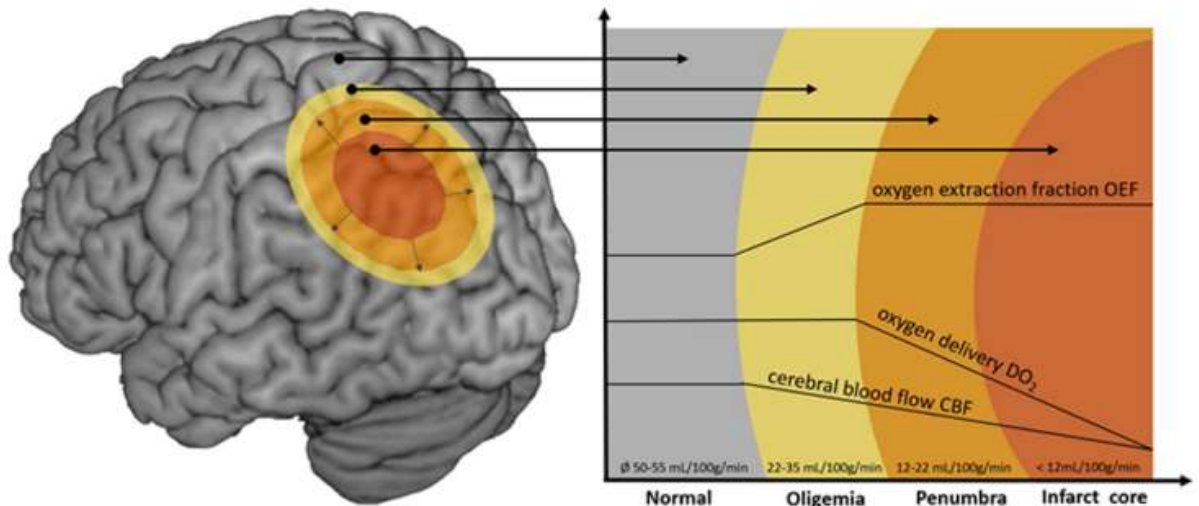


**Figura 1. Representação dos tipos de acidente vascular encefálico:** Isquêmico (A): presença de coágulo ou trombo sanguíneo interrompe o fluxo de sangue; Hemorrágico (B): ruptura de vaso sanguíneo com extravasamento de sangue no tecido encefálico. Adaptado de Heart and Stroke Foudation of Canada (2016). (Fonte: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/153213/001015503.pdf?sequence=1>).

### 1.1.1. Fisiopatologia

Após a interrupção parcial ou total do FSC é possível identificar três regiões distintas a nível tecidual na região afetada pelo evento isquêmico: núcleo, onde ocorre lesão neuronal irreversível, penumbra e oligoemia (Figura 2). A oligoemia é a região mais próxima da área tecidual com FSC normal, e onde a perfusão está reduzida, porém a níveis próximos da normalidade (JUNG et al., 2017). A região de penumbra é a área ao redor do núcleo, onde há hipoperfusão abaixo dos níveis toleráveis pelas células, com risco iminente para a ocorrência de lesão tecidual irreversível, a depender da persistência ou não da oclusão do vaso sanguíneo (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006; HEISS, 2000; JUNG et al., 2017). Na região de oligoemia, a redução do FCS é compensada pelo aumento da extração de oxigênio e pela vasodilatação de vasos colaterais, mas não na penumbra (JUNG et al.,

2017) (Figura 2). Na penumbra, o dano neuronal ainda pode ser revertido e, tanto no núcleo como na penumbra, o tamanho do comprometimento tecidual é diretamente proporcional à duração e à gravidade do evento isquêmico (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006; HEISS, 2000; XING et al., 2012). Desse modo, quanto mais demorada for a reperfusão na área de penumbra, maior será a extensão da lesão neuronal (JUNG et al., 2017).

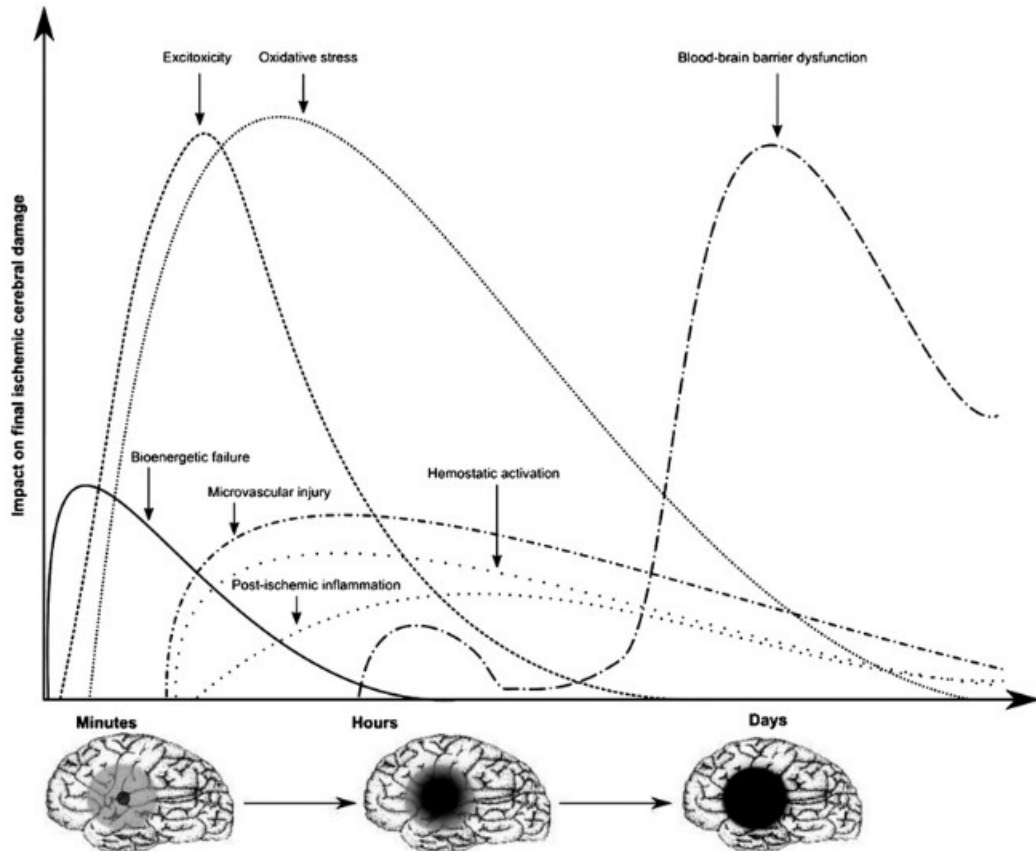


**Figura 2. Ilustração das diferentes regiões teciduais após evento encefálico isquêmico e as diferenças regionais do fluxo sanguíneo cerebral, entrega e fração de extração de oxigênio.**

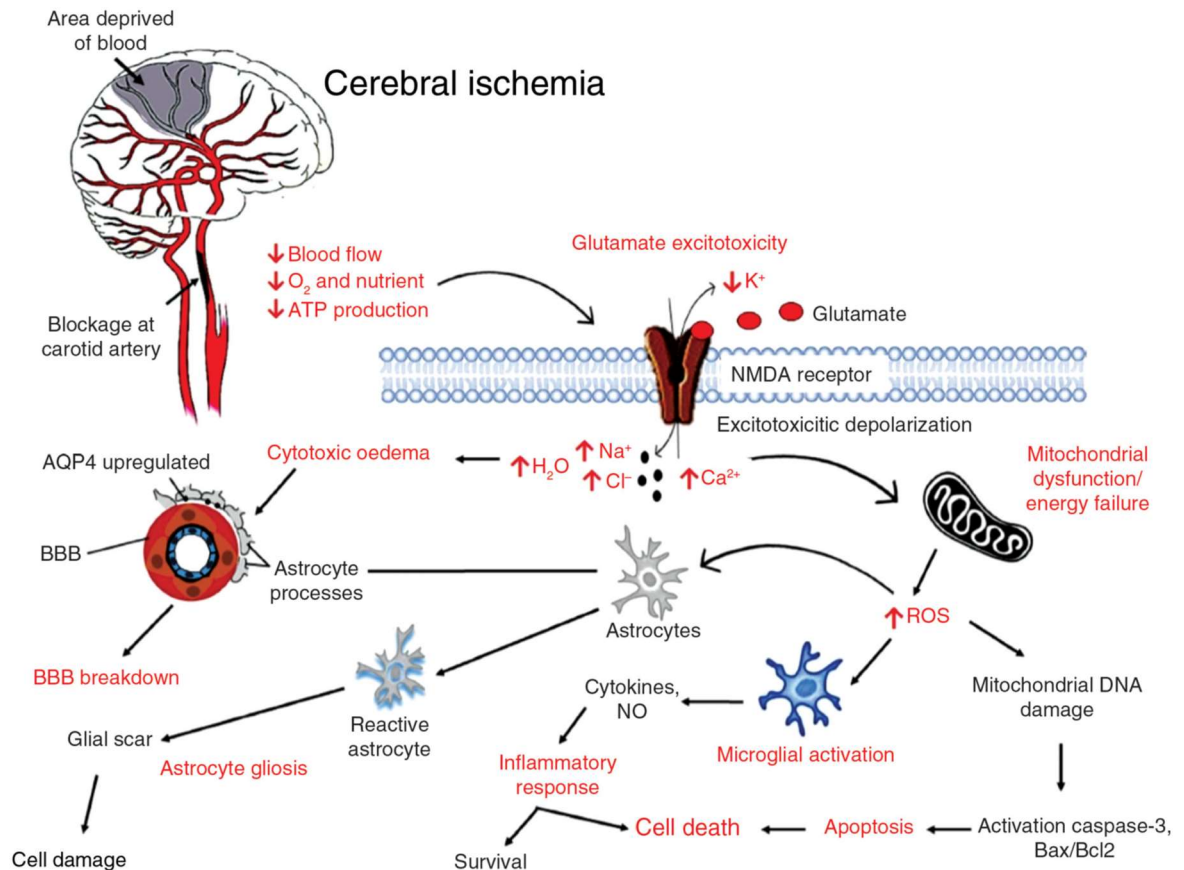
Núcleo (vermelho): tecido isquemiado e necrosado. Penumbra (alaranjado): tecido com risco de morte por necrose em caso da manutenção da oclusão da artéria. Oligoemia (amarelo): tecido hipoperfundido sem risco de morte por necrose. O aumento da fração de extração de oxigênio pelo tecido compensa a redução do fluxo sanguíneo na região de oligoemia, mas não na região de penumbra (JUNG et al., 2017).

Ainda, a redução ou interrupção do suprimento sanguíneo ao tecido cerebral desencadeia uma cascata de eventos a nível celular (Figura 3), que culmina com morte celular por necrose e por apoptose (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006; TRAYSTMAN, 2003; VIDALE et al., 2017). A redução do FSC provoca falha bioenergética pela interrupção de fornecimento de glicose e oxigênio para as células, com redução do fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) pela mitocôndria. Em seguida ocorre excitotoxicidade, decorrente da liberação excessiva de glutamato por neurônios pré-sinápticos e da inibição da recaptação desse neurotransmissor. A ativação de receptores ionotrópicos como o N-metil-D-aspartato (NMDA) e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izaxazolpropiónico (AMPA)

promove o influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula. Essa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  acima dos níveis normais resulta em ativação de enzimas responsáveis pela degradação de membrana celular e em disfunção mitocondrial. Ao mesmo tempo, receptores de glutamato também favorecem o influxo não coordenado de  $\text{Na}^+$  e água, que resulta em despolarização da membrana celular e edema celular, respectivamente. Altos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  intracelular provocam o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que acarretam dano à mitocôndria e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), resultando em morte celular por apoptose. Adicionalmente, as células microgliais residentes, imunidade inata do sistema nervoso central (SNC), detectam o desequilíbrio causado pelo evento isquêmico (LAMBERTSEN; FINSEN; CLAUSEN, 2019), e aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-1 e IL-6, além de EROS e óxido nítrico (NO) (AHAD et al., 2020; LAMBERTSEN; FINSEN; CLAUSEN, 2019; XING et al., 2012). Por fim, dias após o evento isquêmico, ocorre um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, em decorrência de diversos dos mecanismos citados anteriormente como o desequilíbrio homeostático, o edema citotóxico, a produção de EROS e a ativação da cascata inflamatória (ABDULLAHI; TRIPATHI; RONALDSON, 2018; JIANG et al., 2018) (Figura 4).



**Figura 3: Representação temporal dos eventos celulares desencadeados após o AVEi.** Minutos após o evento isquêmico ocorre falha bioenergética, excitotoxicidade, aumento do estresse oxidativo e injúria vascular. No caso de manutenção da oclusão arterial, outros eventos são desencadeados ao longo das horas e dias, como a ativação hemostática, inflamação pós-isquêmica e disfunção da barreira hematoencefálica, e consequente aumento da região de núcleo isquêmico (BROUNS; DE DEYN, 2009).



**Figura 4. Representação esquemática dos eventos celulares desencadeados após AVEi.** A redução do fluxo sanguíneo, diminuição da entrega de oxigênio e nutrientes, e a consequente redução da produção de ATP provoca um aumento da liberação do neurotransmissor glutamato na fenda sináptica (excitotoxicidade), com ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e consequente influxo descontrolado de íons cálcio e sódio. O aumento de sódio intracelular leva a edema citotóxico por aumento de água intracelular. O aumento de íons cálcio provoca disfunção mitocondrial e falha energética, que leva ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), com consequente dano no DNA mitocondrial, ativação microglial e chegada de astrócitos. O dano no DNA mitocondrial ativa caspase, e leva a morte celular por apoptose; a ativação microglial leva ao aumento de citocinas e óxido nítrico (NO), aumenta a resposta a inflamatória com posterior sobrevivência ou morte celular; e a chegada de astrócitos provoca dano celular e quebra da barreira hematocefálica (BBB) (AHAD et al., 2020).

Entretanto, além do papel pró-inflamatório, a micróglia também possui papel anti-inflamatório como: redução da produção de NO e aumento da modulação de expressão de citocinas anti-inflamatórias e fatores neurotróficos como IL-10, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e o fator de crescimento tipo insulina (IGF)-1 (LAMBERTSEN; FINSEN; CLAUSEN, 2019; XING et al., 2012).

Nesse contexto, o foco inicial do tratamento da fase aguda do AVEi é reestabelecer o FSC, com o objetivo de interromper essa cascata de eventos causados primariamente pela isquemia, e evitar que a área de núcleo aumente ao longo das horas após a isquemia (LAMBERTSEN; FINSEN; CLAUSEN, 2019). Contudo, a reperfusão desencadeia uma cascata inflamatória secundária, que culmina com morte celular por apoptose (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006; XING et al., 2012). Portanto, mesmo que a reperfusão ocorra em poucas horas após o evento isquêmico e o dano neuronal primário seja minimizado, uma lesão neuronal secundária causada pela reperfusão provocará piora do dano neuronal (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003; NIE; YANG, 2017).

## 1.2. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO CLÍNICO

O diagnóstico médico do AVEi é feito através de exame clínico e exames de imagem (MARTINS et al., 2012). A trombólise ou a trombectomia são os tratamentos indicados na fase aguda do AVEi. Ambos se baseiam na retomada do FSC por meio da remoção do trombo ou êmbolo, por via química (no caso da trombólise) ou mecânica (no caso da trombectomia) (HENNINGER; FISHER, 2016; MACRAE; ALLAN, 2018; POWERS et al., 2015). O ativador de plasminogênio tecidual humano recombinante (rt-PA), alteplase®, é a única opção farmacológica aprovada para terapia trombolítica no tratamento da fase aguda do AVEi (THOMALLA et al., 2020). Porém, a maioria dos casos não têm indicação do uso desse medicamento devido à pequena janela de tempo para aplicação, em torno de 4,5h, além da existência de muitos critérios de exclusão para o uso desse fármaco (HENNINGER; FISHER, 2016; MARTINS et al., 2012; RÖTHER; FORD; THIJS, 2013). O uso do alteplase® fora da janela de tempo de aplicação acarreta aumento do risco de hemorragia e, por esse motivo, o diagnóstico precoce deve ser priorizado (HENNINGER; FISHER, 2016; MARTINS et al., 2012; RÖTHER; FORD; THIJS, 2013). Essa limitação no uso das terapias disponíveis para a fase aguda do AVEi acarreta piora das sequelas, aumento da incapacidade e redução da qualidade de vida (MARTINS et al., 2013). Por esse motivo, tratamentos farmacológicos e não farmacológicos continuam sendo alvo de investigação (RÖTHER; FORD; THIJS, 2013).



O processo de reabilitação tem início na fase hospitalar, com o objetivo de diminuir o tempo de permanência no hospital e reduzir a ocorrência de novas complicações (BRASIL, 2013). Na fase ambulatorial, a reabilitação objetiva minimizar as sequelas e a incapacidade, e devolver assim a funcionalidade. Entre as sequelas sensório-motoras mais comuns estão as alterações na visão, audição e fala, além da redução da força muscular e da sensibilidade (MARTINS et al., 2013). O comprometimento cognitivo, como os déficits de memória, atenção, linguagem, orientação temporal e espacial são frequentes (BENJAMIN et al., 2019; MARTINS et al., 2013; ZHENG et al., 2016). Ainda, as complicações neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade, estresse pós-traumático, transtorno bipolar e mudança de personalidade, são muito comuns entre seis meses e um ano após o AVE (FERRO; CAEIRO; FIGUEIRA, 2016). Cerca de um terço a metade dos pacientes com sequelas de AVE são afetados por complicações neuropsiquiátricas, em especial a depressão (prevalência de 31%) e a ansiedade (prevalência de 18%) (FERRO; CAEIRO; FIGUEIRA, 2016).

### 1.3. ESTRATÉGIAS NÃO FARMACOLÓGICAS NA REABILITAÇÃO DAS SEQUELAS DO AVEi.

#### 1.3.1. Exercício físico

O exercício físico (EF) é amplamente utilizado para o tratamento das sequelas sensório-motoras e cognitivas em doenças do SNC (ARYA et al., 2011; HIMI et al., 2016). O EF tem impacto positivo pois provoca mudanças no SNC dentre as quais estão a estimulação da angiogênese e a neurogênese, modulação da plasticidade sináptica (CASSILHAS; TUFIK; DE MELLO, 2016; GRYGIEL-GÓRNIAK; PUSZCZEWICZ, 2017; KALOGERAKI et al., 2016; NIE; YANG, 2017; PLOUGHMAN et al., 2007), redução do volume do infarto (HONG et al., 2020), e intensificação da recuperação funcional após lesão neuronal (BIERNASKIE; CORBETT, 2001; LI et al., 2018; PLOUGHMAN et al., 2007). Estudos evidenciaram associação positiva entre o EF e o desempenho em testes motores, sensitivos e cognitivos em modelos pré-clínicos de AVEi (AHN et al., 2016; HONG et al., 2020; SCHNEIDER et al., 2014). Hong et al (2020) avaliaram o desempenho

de camundongos submetidos a modelo fototrombótico de AVEi em testes que avaliaram a função motora (equilíbrio) e cognitiva (memória de curta duração). Esse estudo mostrou que os animais tratados com exercício de corrida em esteira apresentaram melhor desempenho nos testes quando comparado com os animais isquemiados que não foram tratados com EF, sugerindo que o EF reduziu os déficits neurológicos provocados pelo modelo de AVEi.

#### 1.3.1.1. Diferentes protocolos de exercício físico em estudos pré-clínicos de AVE.

Existem quatro modelos de EF comumente utilizados em estudos pré-clínicos de AVE com roedores: forçado (corrida em esteira ou natação), voluntário (roda de corrida), terapia do movimento induzido pela restrição do membro anterior não-afetado durante atividades diárias (CIMT – sigla em inglês do termo *constraint-induced movement therapy*) e treinamento específico de tarefa exclusivamente com o membro anterior afetado (movimento repetitivo para treinar o alcance de comida com o membro anterior afetado) (SCHMIDT et al., 2014). Vários estudos mostraram resultados positivos do EF utilizando esses diferentes protocolos como tratamento do AVE (KIM et al., 2019; SAUNDERS et al., 2020; STRICKLAND; SMITH, 2016; ZHENG et al., 2016). Uma meta-análise comparou diferentes estratégias de treinamento físico em modelos pré-clínicos de AVEi e evidenciou que o EF forçado reduziu o volume de infarto em 30%, o treinamento específico de tarefa com o membro anterior afetado e o EF voluntário não afetaram o volume de infarto, e o CIMT aumentou o volume de infarto em 18% (SCHMIDT et al., 2014).

Além da discussão de qual o melhor modelo de treinamento físico (aeróbico, resistido, voluntário, forçado, etc), o tempo de início do EF na reabilitação do AVEi também é um fator bastante discutido na literatura (STEPHAN; SLEIMAN, 2021), apesar do tempo ideal de início ainda não estar bem estabelecido tanto para pesquisa clínica como para a pré-clínica (LANG; LOHSE; BIRKENMEIER, 2015). Alguns estudos em animais encontraram resultados positivos quando o EF foi iniciado nas primeiras 24 horas (h) (BIERNASKIE; CHERNENKO; CORBETT, 2004; ZHANG et al., 2013). Porém, um ensaio clínico internacional multicêntrico, AVERT (sigla em inglês do termo “ensaio de reabilitação muito precoce”),

demonstrou que o início do EF dentro das primeiras 24h não foi melhor que o protocolo padrão (BERNHARDT et al., 2015). Outro estudo pré-clínico evidenciou que protocolo de EF iniciado nas primeiras 24h após AVEi aumentaram o volume de infarto, assim como a mortalidade (ZHANG et al., 2020). Uma meta-análise de estudos em modelos animais demonstrou que protocolos com início entre 1 e 5 dias apresentaram resultados melhores na redução do volume de infarto, na melhora da função cognitiva e da função dos membros (SCHMIDT et al., 2014).

Adicionalmente, a intensidade do EF adotado nos protocolos de reabilitação também influencia na recuperação após AVEi (STEPHAN; SLEIMAN, 2021). Alguns autores evidenciaram que EF de moderada e baixa intensidade, com início 48h após o evento isquêmico, apresentaram resultados melhores na recuperação neurológica e funcional de animais em comparação com EF de alta intensidade, enquanto o EF em alta intensidade causou piora da inflamação e aumento da morte celular (ZHANG et al., 2020).

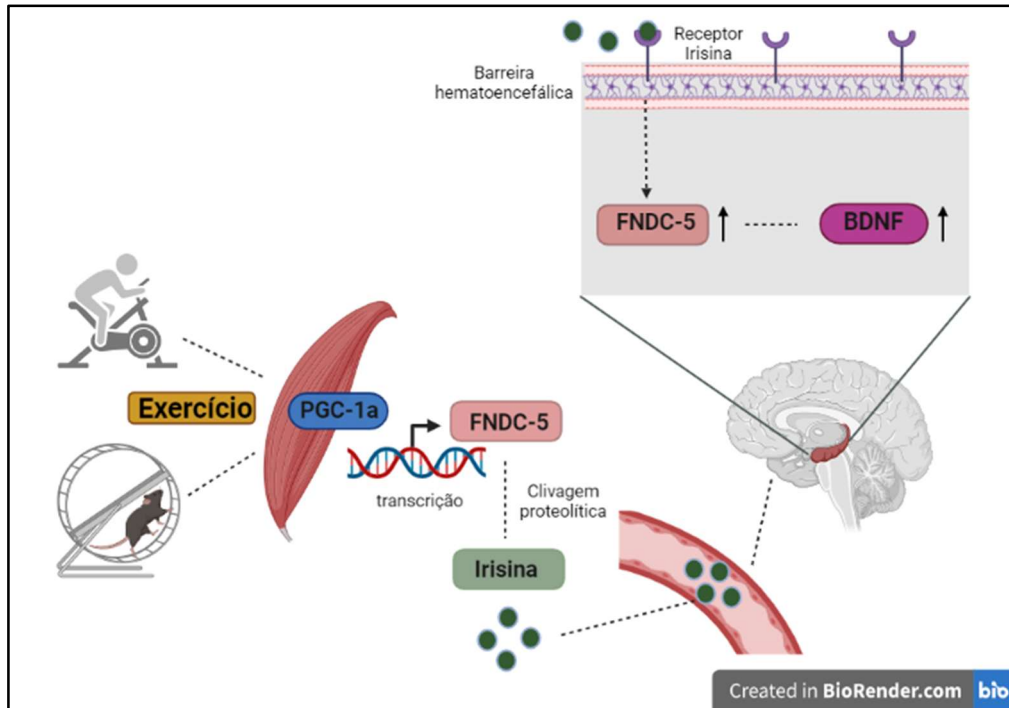
Entre as modalidades de EF empregadas em estudos com roedores, a natação é vantajosa por ser de baixo custo, quando comparada com a corrida em esteira. Ainda, a natação apresenta vantagens por ser possível o controle da duração e da carga do exercício, o que não é possível na roda de corrida (SEO et al., 2014). Além disso, na natação, a carga pode ser incrementada através da adição de peso amarrado ao corpo ou à cauda do animal (ARIDA et al., 2011). Por fim, nadar é uma habilidade natural em roedores (CARDOSO et al., 2014), o que facilita a adaptação do animal ao treinamento físico (ARIDA et al., 2011).

#### 1.3.1.2. O eixo músculo – cérebro.

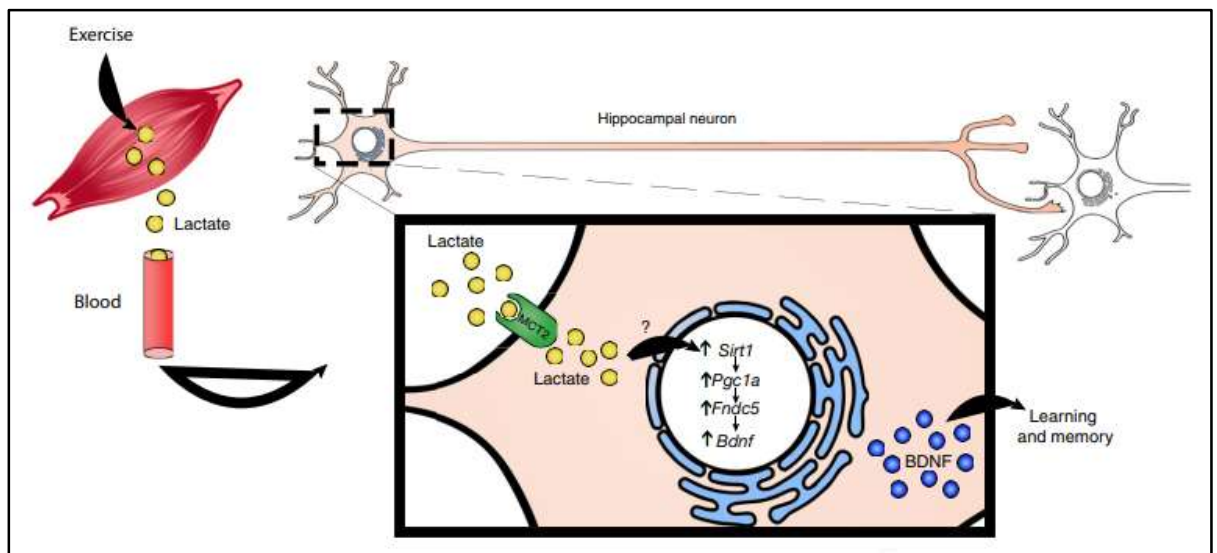
A resposta benéfica do EF sobre o SNC está relacionada com o aumento na expressão de neurotrofinas como o GDNF e, principalmente, o BDNF (FAROKHISAKHT et al., 2019; PLOUGHMAN et al., 2009; SLEIMAN; CHAO, 2016). Estudos pré-clínicos sobre o AVEi evidenciaram que o EF aumenta a expressão de BDNF em várias regiões cerebrais como o córtex e o hipocampo (HIMI et al., 2016; LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017; PLOUGHMAN et al., 2007). O BDNF estimula a neurogênese e a plasticidade sináptica, influencia a sobrevivência neuronal, a diferenciação, a migração e a arborização dendrítica, e promove

melhora da aprendizagem e da memória (MAROSI; MATTSON, 2014; SLEIMAN; CHAO, 2016). Em estudos com humanos foi observado que pacientes que sofreram AVEi tinham níveis de BDNF reduzidos, e essa redução dos níveis de BDNF foi associada a piores desfechos funcionais e ao aumento da mortalidade a longo prazo (STANNE et al., 2016).

Adicionalmente, o EF induz o músculo a liberar citocinas responsáveis pela regulação do BDNF no SNC (GRYGIEL-GÓRNIAK; PUSZCZEWICZ, 2017; STEPHAN; SLEIMAN, 2021; WRANN et al., 2013). Entre essas miocinas estão a proteína 5 contendo domínio de fibronectina tipo III (FNDC-5), a irisina e o lactato. A irisina é um hormônio, produto da clivagem proteolítica da FNDC-5 e secretado na corrente sanguínea durante o exercício (BOSTRÖM et al., 2012; JIN et al., 2021; STEPHAN; SLEIMAN, 2021). A expressão e transcrição da FNDC-5 é controlada pelo peroxissoma coativador gama-receptor proliferador-ativado 1 alfa (PGC-1a) (RAIMONDO et al., 2020), que é o regulador de transcrição responsável pela resposta do músculo esquelético ao exercício (WRANN et al., 2013). Acredita-se que a irisina seja um dos mediadores entre o EF e o aumento da expressão de BDNF no hipocampo através da via PGC-1a/FNDC5/irisina, porém os mecanismos ainda são desconhecidos (GRYGIEL-GÓRNIAK; PUSZCZEWICZ, 2017; JIN et al., 2021; WRANN et al., 2013) (Figura 5). Um estudo com cultura de célula mostrou que irisina em alta concentração estimulou a proliferação de neurônios hipocampais (MOON; DINCER; MANTZOROS, 2013). Similarmente, o lactato atravessa a barreira hematoencefálica e ativa a via hipocampal PGC-1a/FNDC-5. Uma vez no SNC, o lactato ativa fatores de transcrição que aumentam a expressão gênica de FNDC5, com consequente aumento da expressão de BDNF (STEPHAN; SLEIMAN, 2021) (Figura 6).



**Figura 5. Desenho esquemático da via PGC-1α/FNDC-5/irisina.** O músculo libera PGC-1α em resposta ao exercício físico. PGC-1α aumenta a transcrição e expressão de FNDC-5, que é liberado na corrente sanguínea na forma de irisina. No SNC, a irisina se liga ao seu receptor na barreira hematoencefálica, que desencadeia a transcrição de mais FNDC-5 e consequentemente aumenta a expressão de BDNF. (Fonte: BioRender).

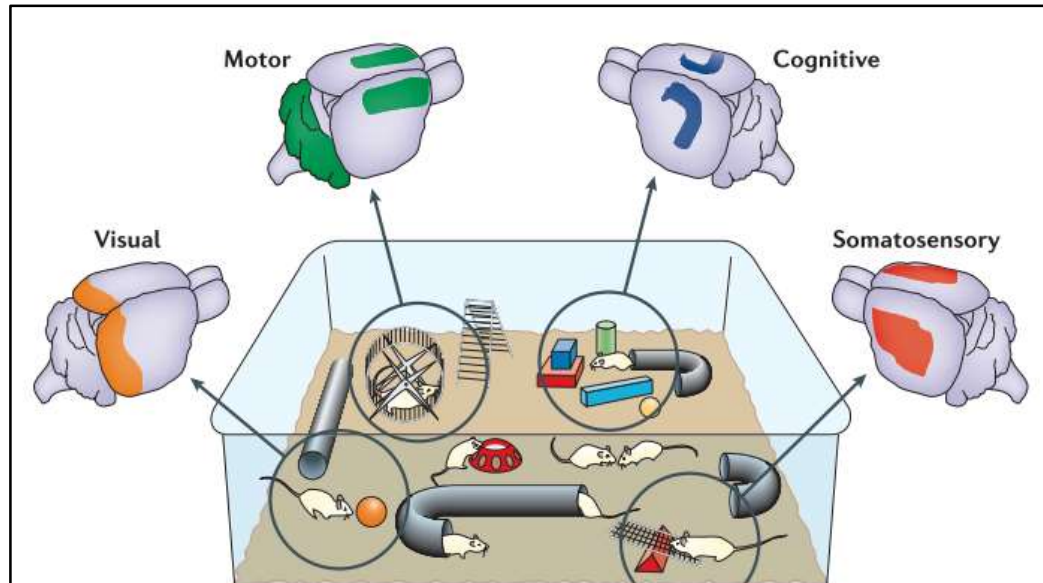


**Figura 6. Desenho esquemático da via lactato/PGC-1α/FNDC-5.** O músculo libera lactato na corrente sanguínea em resposta ao exercício físico. No SNC, o lactato atravessa a barreira hematoencefálica e estimula a expressão de PGC-1α, com consequente transcrição de FNDC-5 e aumento da expressão de BDNF em células hipocâmpais. (EL HAYEK et al., 2019).

### 1.3.2. Enriquecimento ambiental

A definição clássica para enriquecimento ambiental (EA) é “uma estimulação complexa de estímulos sociais e inanimados” (ROSENZWEIG et al., 1978). O EA foi descrito pela primeira vez no final da década de 1940 por Donald Olding Hebb após perceber que ratos que viviam em casa como “pets”, e, portanto, recebiam diferentes estímulos, apresentavam melhor desempenho comportamental que ratos que viviam em laboratório. Porém, somente em 1960 o EA e seus efeitos sobre o SNC passaram a ser estudados cientificamente (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). A utilização de um EA implica em oferecer diferentes estímulos ao indivíduo, compreendendo que é a interação destes fatores que produz modificações no SNC, e não o uso isolado de cada variável (ROSENZWEIG et al., 1978). Desse modo, os efeitos do EA sobre o SNC são consequências da complexa estimulação neural ofertada no ambiente (KEMPERMANN, 2019; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

Em estudos pré-clínicos com roedores, o EA é bem estabelecido e de fácil reprodutibilidade (QIN et al., 2021). Consiste em caixas maiores, com maior número de animais por caixa (enriquecimento social), equipadas com brinquedos de diferentes formas, tamanhos, texturas e cores, como túneis, gangorras, blocos, escadas, e uma roda de corrida para a realização de exercício voluntário (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000) (Figura 7). Os brinquedos são geralmente trocados periodicamente para aumentar a complexidade dos estímulos (DENG et al., 2021).



**Figura 7. Representação esquemática do ambiente enriquecido usado em estudos com roedores.** Trata-se de uma caixa com brinquedos de diferentes texturas, formas e cores, como túneis, gangorras, blocos, escada, além de uma roda de corrida, com o intuito de proporcionar estímulos neurais variados (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

No entanto, em humanos o conceito de EA ainda não é bem entendido, tampouco bem reproduzido na prática clínica (QIN et al., 2021). QIN et al (2021) definiram o EA como uma intervenção que objetiva facilitar atividades físicas (motoras e sensoriais), cognitivas e sociais através da disponibilização de equipamentos e organização de um ambiente estruturado e estimulante. São exemplos de intervenções para EA em humanos: disponibilização de material de leitura (livros, jornais e revistas) e de artesanato, fácil acesso a computadores com internet, atividades recreacionais individuais ou coletivas (xadrez, dama, bingo) e exercício (QIN et al., 2021). Assim como o EA em animais é oferecido para a exploração voluntária, a aplicação do modelo de EA em humanos se baseia em garantir uma equipe capacitada para motivar e incentivar os pacientes a realizarem as atividades por motivação própria, e não de maneira imposta (JANSSEN et al., 2012).

No que diz respeito às modificações morfológicas e moleculares geradas no SNC em virtude da exposição ao EA, vários autores demonstraram aumento da neurogênese e angiogênese (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000; YU et al., 2014) e aumento na modulação de neurotransmissores e de fatores neurotróficos (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2004; KEMPERMANN, 2019) como o

BDNF. Diversos estudos evidenciaram aumento dos níveis de BDNF no hipocampo, córtex e cerebelo de animais expostos a um ambiente enriquecido (AE) após AVE (ALWIS; RAJAN, 2014; CHEN et al., 2017a; TANG et al., 2019; VENNA et al., 2014). Adicionalmente, a exposição a um ambiente enriquecido (AE) promove benefícios sensório-motores e cognitivos em animais saudáveis (ALWIS; RAJAN, 2014) e em modelos animais de AVEi e outras doenças neurodegenerativas (GONÇALVES et al., 2018; LI et al., 2020; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; YU et al., 2014). Desse modo, o EA pode ser uma terapia não farmacológica importante na prevenção e na reabilitação de doenças do SNC (TIJSEN et al., 2019).

#### 1.4. JUSTIFICATIVA

Os efeitos benéficos do EF e do AE no tratamento do AVE já são bem estabelecidos na literatura científica, entretanto a associação dessas terapias tem sido pouco estudada. Ainda que os benefícios do uso EF e do AE na reabilitação do AVEi sejam amplamente conhecidos, é sabido que essas terapias apresentam limitações. Apesar de promissoras, isoladamente elas não são capazes de abranger todas as mudanças complexas provocadas pelo AVEi. (MALÁ; RASMUSSEN, 2017). Enquanto o EF estimula a divisão celular, o ambiente enriquecido aumenta a sobrevivência das células nervosas (VAN PRAAG et al., 1999). Deste modo, acredita-se que a associação de terapias gere um efeito aditivo (LIVINGSTON-THOMAS et al., 2016; MALÁ; RASMUSSEN, 2017; O'COLLINS et al., 2012; TIJSEN et al., 2019), otimizando os resultados da reabilitação, melhorando o prognóstico e reduzindo a incapacidade após o evento isquêmico.

Diante desse cenário, é evidente a necessidade de novos estudos clínicos e pré-clínicos para buscar terapias adicionais para a plena recuperação pós-AVEi e que busquem uma completa reabilitação funcional do indivíduo. Além disso, embora exista a recomendação e o incentivo de novos estudos com terapias para AVE utilizando modelos pré-clínicos (SAVER et al., 2009), não há na literatura atual muitos estudos que investiguem o efeito da associação do AE e do EF em



modelos de AVEi. Dessa forma, o presente trabalho proporcionará maiores conhecimentos acerca dessa combinação terapêutica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

Avaliar a associação da exposição ao ambiente enriquecido e do exercício físico na recuperação da função motora e cognitiva em camundongos submetidos a um evento isquêmico agudo através da oclusão bilateral das artérias carótidas médias (BCCAo).

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- Avaliar se a cirurgia de indução da isquemia cerebral global provocou déficits motores e cognitivos nos animais submetidos a essa cirurgia.
- Avaliar se o tratamento com associação de AE e EF melhora a função motora e sensorial de animais submetidos à isquemia cerebral global.
- Avaliar se o tratamento com associação do AE com o EF atenua ou reverte déficits motores de animais submetidos à isquemia cerebral global.
- Avaliar se o tratamento com associação do AE com o EF atenua o comportamento do tipo ansioso causado pela isquemia cerebral global.
- Avaliar se o tratamento com associação do AE com EF promove melhora da memória de curta duração em animais submetidos à isquemia cerebral global.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo quantitativo de natureza básica-aplicada. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), protocolo 20/2019.

### **3.1. ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6, entre 8 e 12 semanas, com peso aproximado de 20-30g. Os animais, provenientes do Biotério Central da UFES, foram alojados em sala de experimentação animal do Laboratório de Neuroquímica e Comportamento (LabNeC). Os animais foram mantidos em local com controle do ciclo claro-escuro de 12 / 12h, da temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e receberam água e ração *Ad libitum* (PERCIE DU SERT et al., 2020).

A ração fornecida foi industrial, proveniente do Biotério Central da UFES e a exaustão de ar/ventilação foi por meio de ar-condicionado. Todas as caixas eram limpas duas vezes por semana quando o ambiente era padrão e uma vez quando o ambiente era enriquecido, momento em que era realizada a troca de maravalha, fornecida pelo biotério central. Duas vezes por semana a água e a ração eram avaliadas e, quando necessário, eram renovadas em cada caixa (PERCIE DU SERT et al., 2020)

Foram utilizados 163 animais para a realização de todos os experimentos, incluindo as seis replicatas realizadas, com uma taxa de mortalidade de 35%, considerando as perdas no operatório e no pós-operatório imediato e tardio. Desse total de animais utilizados, 108 animais sobreviveram até o final do estudo, e 55 animais morreram durante a execução dos experimentos.

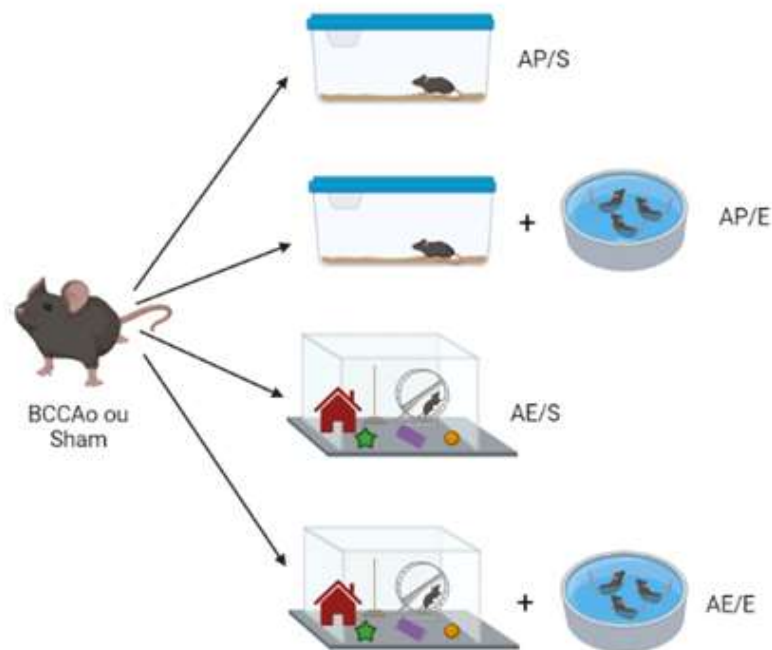
### 3.2. DESENHO EXPERIMENTAL

A divisão dos grupos está esquematizada na Figura 8, e os procedimentos experimentais bem como a sequência temporal utilizada estão representados em formato de linha do tempo na Figura 9.

Os animais foram submetidos a cirurgia de oclusão bilateral da artéria carótida comum – BCCAo - (isquemia), ou a cirurgia fictícia (sham) e posteriormente submetidos a um dos quatro tratamentos abaixo, de acordo com as condições de habitação e a realização ou não de protocolo de EF (Figura 8):

- Ambiente padrão de camundongos (*shoebox*) sem atividade física condicionada (AP/S);
- Ambiente padrão de camundongos (*shoebox*) com atividade condicionada (AP/E);
- Exposição ao AE sem atividade física condicionada (AE/S);

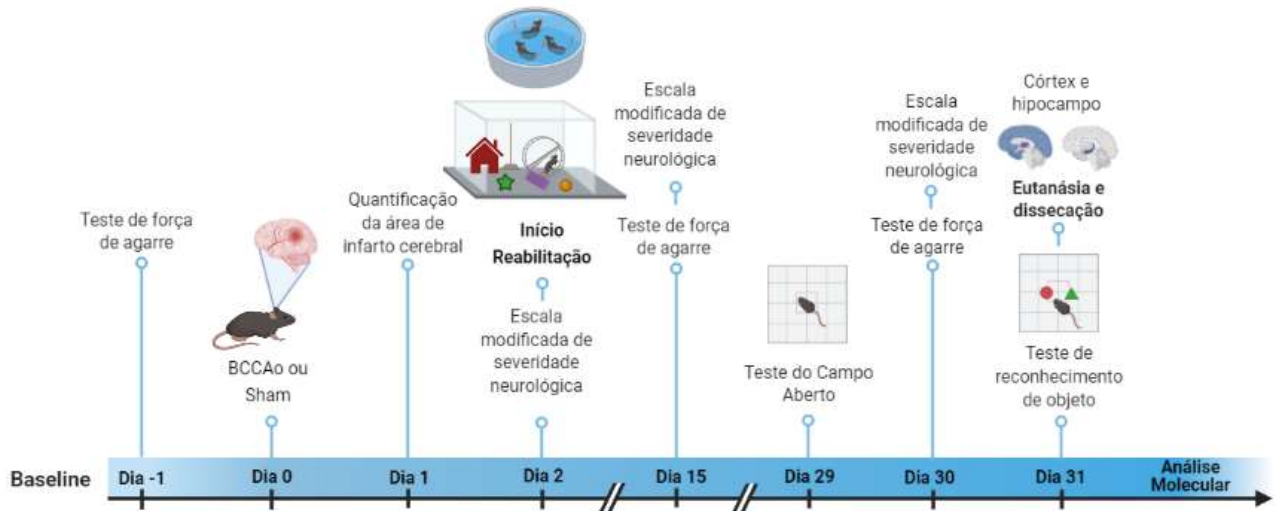
- Exposição ao AE com atividade condicionada (AE/E);



**Figura 8. Representação dos grupos de acordo com o tratamento empregado.** Após a cirurgia de oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAO) ou cirurgia fictícia (sham), os animais são divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento: ambiente padrão sem atividade física condicionada (AP/S), ambiente padrão com atividade física condicionada (AP/E), ambiente enriquecido sem atividade física condicionada (AE/S) e ambiente enriquecido com atividade física condicionada (AE/E) (Fonte: BioRender).

O dia da cirurgia (D0) marcou o início do protocolo, que teve duração de 32 dias. A reabilitação teve início 48h após a cirurgia (D2), dia em que os animais foram divididos e colocados em ambiente padrão (AP) ou em ambiente enriquecido (AE), de acordo com o grupo escolhido. Os animais dos grupos tratados com EF foram submetidos a sessões de natação 3 vezes por semana, sendo realocados para a sua habitação ao final da sessão. Para mensurar a variação de força das patas dianteiras dos animais, foi executado o teste de força de agarre antes da cirurgia (*baseline*), e nos dias 15 (D15) e 30 (D30). A análise histológica para mensuração da área de infarto foi realizada no D2 em um grupo de animais isquemiados e a função motora e sensorial foi avaliada no D2, D15 e D30 através da escala modificada de severidade neurológica. No D29 foi realizado o teste do campo aberto e no D30 feita a habituação para o teste de reconhecimento de

objeto. No último dia do protocolo (D31) foi realizado o teste de reconhecimento de objeto e, após o teste, os animais foram eutanasiados para dissecação do córtex total e hipocampo, para a realização da análise molecular (Figura 9).

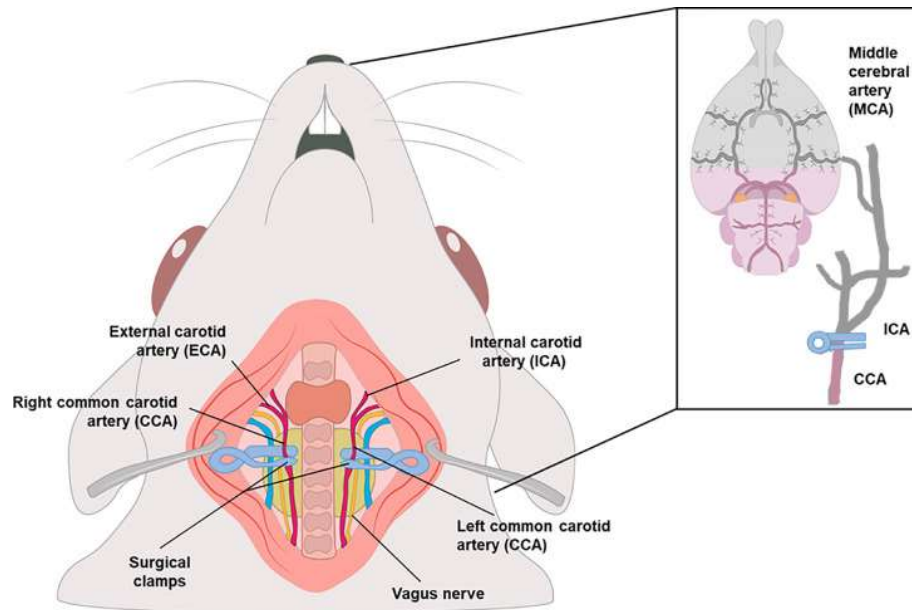


**Figura 9. Desenho experimental.** Linha do tempo do protocolo de 32 dias utilizado durante a reabilitação de camundongos submetidos a indução de isquemia cerebral global ou sham (Fonte: Biorender).

### 3.3. ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL PELA OCLUSÃO BILATERAL DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS

O modelo de indução da isquemia cerebral utilizado foi o de oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAO) (GONÇALVES et al., 2018; MARTINS-SILVA et al., 2021). Os animais foram pesados e anestesiados com xilazina (20 mg/Kg) e 2,2,2 tribromoetano (200mg/Kg). Após a indução anestésica, o camundongo foi posicionado em decúbito dorsal, com a região cervical exposta, e realizado tricotomia. Após incisão cirúrgica, os músculos cervicais das camadas superiores foram afastados, as artérias carótidas comuns (cca) foram expostas e cuidadosamente separadas do nervo vago (Figura 10). Para padronização da técnica, a cca esquerda foi aleatoriamente escolhida para oclusão permanente com fio de nylon, enquanto a cca direita foi ocluída temporariamente com fio de algodão. A reperfusão da cca direita foi realizada após 35 minutos de oclusão e a

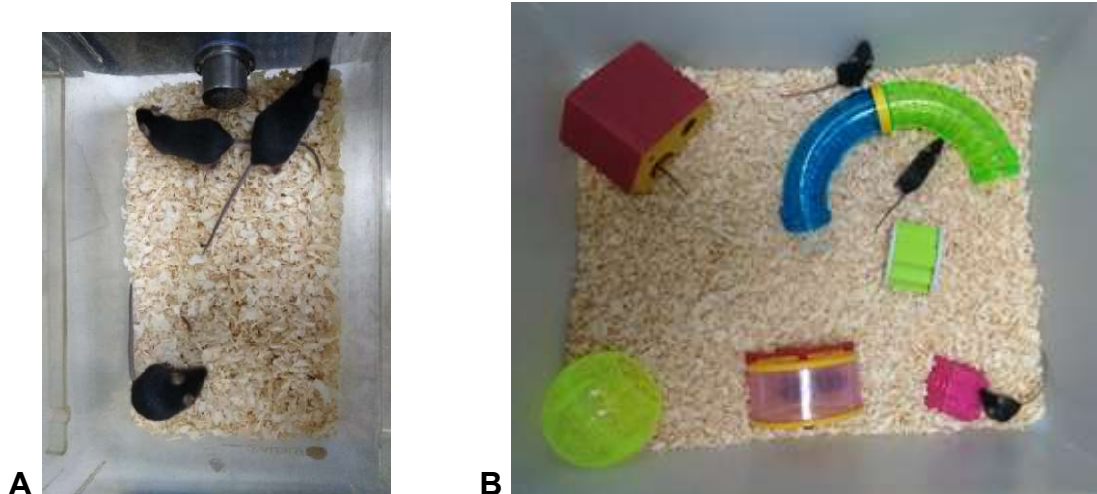
pele foi suturada com fio de nylon. Para os animais sham, ambas cca foram expostas, porém não foram ocluídas.



**Figura. 10. Modelo esquemático da cirurgia de indução da isquemia cerebral global.** Através de uma abertura na região do pescoço, anteriormente, as artérias carótidas comuns (cca) são identificadas e delicadamente separadas do nervo vago para oclusão bilateral. A cca esquerda é permanentemente ocluída com fio de nylon enquanto a cca direita é ocluída com fio de algodão por 35 minutos (LEÓN-MORENO et al., 2020).

### 3.4. CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO

Os animais do ambiente padrão foram mantidos em caixas de polipropileno com dimensões 30 x 19 x 13 cm, até 5 camundongos por caixa (Figura 11A), enquanto os animais do ambiente enriquecido foram mantidos em caixas com as dimensões 60 x 50 x 22 cm, até 7 camundongos por caixa, e que continham de quatro a cinco brinquedos (alternados semanalmente), além de uma roda de corrida e uma casa em miniatura, elementos presentes durante toda a experimentação (Figura 11B).



**Figura. 11. Representação das condições de habitação utilizadas neste trabalho:** Ambiente padrão (A); Ambiente enriquecido (B); Acervo pessoal.

### 3.5. PROTOCOLO DO EXERCÍCIO FÍSICO

O protocolo de natação conduzido nesse estudo foi baseado em diversos estudos prévios que utilizaram natação como modelo de EF em roedores (ARIDA et al., 2011; CARDOSO et al., 2014; SEO et al., 2014). Os animais incluídos nos grupos com EF foram submetidos a sessões de natação três vezes por semana durante 4 semanas. As sessões foram realizadas em balde de 35 cm de diâmetro, com no mínimo três e no máximo cinco camundongos. A profundidade da água era de 25 cm com temperatura controlada (31-33°C). A duração da sessão aumentou a cada semana, sendo 6, 15, 22 e 30 minutos na primeira, segunda, terceira e quarta semana, respectivamente.

### 3.6. QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO CEREBRAL

Do grupo de animais que foram submetidos à cirurgia de indução de isquemia cerebral, alguns foram eutanasiados por decapitação 24 horas após a cirurgia para quantificação da área de infarto cerebral. O encéfalo foi removido para secção de 4 fatias coronais, de 2mm de espessura cada. As fatias foram imersas em solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 1% (Sigma-Aldrich) por 30 minutos, a 37° C, e em seguida fixada em solução de formalina a 4%. As áreas infartadas, não coradas, foram quantificadas através do software ImageJ (1,49g / Java 1.6.0,

32 bits). Por meio do ajuste da saturação de cores, as áreas brancas foram excluídas da quantificação da área total das fatias, e o resultado foi dado em porcentagem de todas as secções coronais.

### 3.7. ESCALA MODIFICADA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA

As funções motora e sensorial dos animais foram avaliadas 2, 15 e 30 dias após a cirurgia, através da escala modificada de severidade neurológica (mNss), amplamente utilizada em modelos de indução de isquemia cerebral (ASADI et al., 2018; ZHANG et al., 2020, 2021). Essa ferramenta avalia o desempenho dos animais em testes motores (movimentos anormais, caminhada, equilíbrio), sensoriais (visual, tátil e propriocepção), e reflexos (ZHANG et al., 2021). A pontuação é dada numa escala de 0 - 14, onde 0 representa ausência de déficit neurológico e, quanto maior a pontuação, pior o déficit (10-14, severo; 5-9, moderado; 1-4, leve) (ASADI et al., 2018) (tabela 1).

### 3.8. AVALIAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR

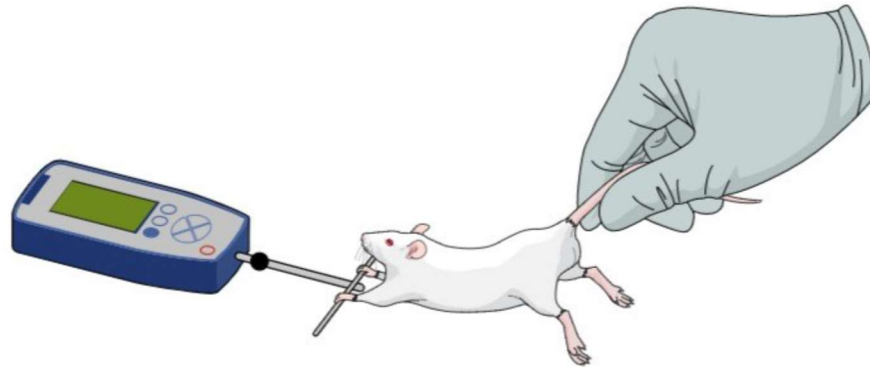
Com a finalidade de avaliar a força muscular dos animais, foi realizado o teste de força de agarre (*Grip test*) (SCHÖNFELD et al., 2017). O aparato consiste em uma pequena barra metálica horizontal ligado a um transdutor de força, o qual está acoplado a um software (DATAQ, Instruments Hardware Manager, USA) (Figura 12). Os animais foram previamente habituados à sala do teste durante 30 minutos. O teste se baseia no valor do pico de força máxima exercido pelo animal, quando a este é permitido agarrar a barra com os membros superiores, seguro pela cauda com seu corpo paralelo ao solo e ele é puxado de forma horizontal. Foram registrados 5 picos de força máxima consecutivos, dentro de no máximo 50 segundos, e o valor foi expresso em gramas (g). Para a análise dos resultados, foi utilizada a média dos cinco valores de pico de força máxima registrados, além do delta de força que consistiu no valor das médias dos picos de força máxima registrados após a cirurgia subtraído do valor das médias dos picos de força máxima do *baseline*. A análise do delta de força permite analisar o aumento ou a diminuição da força de agarre dos grupos nos dias 15 e 30 do protocolo, sendo

**Tabela 1.** Escala Modificada de Severidade Neurológica (mNss).

<b>Teste comportamental</b>		<b>Pontuação</b>
<b>Função Motora</b>		
Suspensão pela cauda (0 – 3)	Flexão dos membros anteriores	1
	Flexão dos membros posteriores	1
	Movimento da cabeça mais de 10° em relação ao eixo vertical dentro de 30 seg	1
Caminhada no chão (0 – 3)	Caminha normalmente	0
	Inabilidade para caminhar em linha reta	1
	Gira em direção ao lado parético	2
	Cai em direção ao lado parético	3
Equilíbrio na barra (0 – 6)	Equilibra-se com postura ereta	0
	Caminha agarrando o lado da barra	1
	Abraça a barra e um membro cai	2
	Abraça a barra e dois membros caem ou gira na barra (> 30 seg)	3
	Tenta equilibrar-se na barra, mas cai (> 20 seg)	4
	Tenta equilibrar-se na barra, mas cai (> 10 seg)	5
	Queda; não tenta se equilibrar ou espera na barra (<10 seg)	6
<b>Função Sensorial</b>		
Reflexos (0 – 2)	Ausência do reflexo de Pina (aceno com a cabeça ao toque no meato auditivo)	1
	Ausência do reflexo Corneal (piscar de olhos ao toque leve da córnea de um lado com algodão)	1



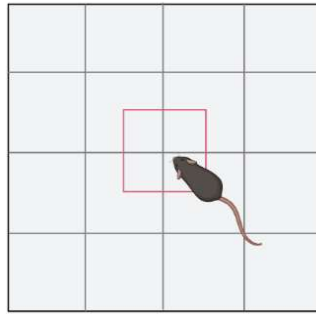
valores negativos indicativos de perda de força, e valores positivos indicativos de ganho de força de agarre.



**Figura 12: Representação do teste de força de agarre.** O animal é levantado pela cauda e, paralelamente ao solo, é permitido ao animal agarrar uma barra metálica horizontal com os membros anteriores. Através de um transdutor de força é possível medir a força de agarre dos membros anteriores do animal na barra através de software ligado a um computador. (Fonte: *Mind the graph*).

### 3.9. ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DO CAMPO ABERTO).

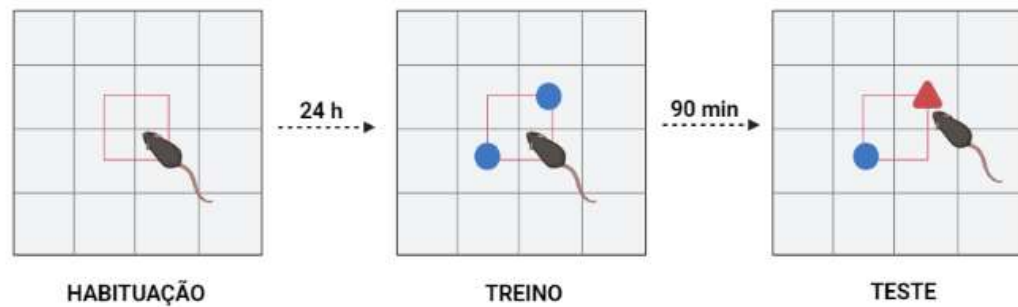
O teste do campo aberto consistiu na monitoração da livre exploração dos animais individualmente a uma caixa de acrílico quadrada (40 x 40 cm) durante cinco minutos (Figura 13) (MARTINS-SILVA et al., 2021). A limpeza da arena foi realizada com álcool 70% a cada troca de animal. Antes do início do teste os animais foram habituados à sala do teste por 30 minutos. Inicialmente o animal foi posicionado no centro da caixa, a distância percorrida total e a velocidade média foram registradas para avaliar a atividade locomotora. Ainda, o número de entradas no centro da caixa, o tempo gasto no centro da caixa, e a diferença entre a distância percorrida na periferia ( $D_p$ ) e no centro ( $D_c$ ) em relação a distância total percorrida ( $D_t$ ) ( $D_p - D_c / D_t$ ) foram calculados para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; SAKALEM et al., 2017). Todas as análises foram feitas através do software AnyMaze®.



**Figura 13. Representação esquemática do teste do campo aberto.** O animal é colocado numa arena quadrada, para livre exploração por 10 minutos. (Fonte: BioRender).

### 3.10. MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO (RECONHECIMENTO DE OBJETOS)

Nesse estudo, a avaliação da função cognitiva dos animais foi empregada através da avaliação da memória de curta duração, por meio do teste de reconhecimento de objetos (Figura 14). O protocolo utilizado foi adaptado de estudos prévios (BARBIERI et al., 2016; GONÇALVES et al., 2018; LEGER et al., 2013; MARTINS-SILVA et al., 2021). Um dia após o teste do campo aberto, os animais foram recolocados individualmente no campo aberto por 10 minutos para habituação. Após 24 horas da habituação, deu-se início à fase de treino, na qual foram introduzidos dois objetos idênticos no centro do aparato para livre exploração dos animais, individualmente, por 10 minutos. A fase de teste foi executada 90 minutos após a fase de treino, quando o animal foi recolocado no aparato do campo aberto com dois objetos, sendo um objeto familiar e outro novo, diferente em material, forma e cor, para livre exploração por 10 minutos. Em cada troca de animal, o aparato foi higienizado com álcool 70%. O tempo de exploração (T), definido como o tempo gasto pelo animal farejando ou tocando o objeto pelo nariz, a distância total percorrida e a velocidade média foram quantificadas utilizando o software AnyMaze®. Além disso foram calculados o Índice de discriminação (ID) e o Índice de Preferência (IP). O ID é uma medida relativa da diferença entre o tempo de exploração do objeto novo ( $T_n$ ) e o tempo de exploração do objeto familiar ( $T_f$ ), dividindo-se esse valor pelo tempo total de exploração dos objetos [ $ID = (T_n - T_f) / (T_n + T_f)$ ], que resulta em valor entre -1 e +1. O IP é calculado a partir da relação entre o tempo de exploração do objeto novo sobre o tempo total de exploração do objetos [ $IP = (T_n \times 100) / (T_n + T_f)$ ].



**Figura 14: Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos.** Na fase da habituação, é permitido a cada animal explorar o aparato durante 10 minutos. Após 24 horas, na fase de treino, o animal é colocado no aparato com dois objetos idênticos, para a livre exploração dos objetos durante 10 minutos. A fase de teste é realizada 90 minutos após a fase de treino, quando o animal é recolocado no aparato com dois objetos, sendo um objeto familiar e um objeto novo, e é permitido ao animal explorar os objetos por 10 minutos (Fonte: BioRender).

### 3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas através do *software* GraphPad Prism 8, expressas como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos dados e para todas as análises foi aplicado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Para a análise das pontuações na escala modificada de severidade neurológica (mNss) foi empregado o teste t não pareado. O teste t não pareado, realizado com os dados colhidos no D2, foi utilizado para verificar se os tipos de cirurgia (Isquemia e Sham) são estatisticamente diferentes, considerando a pontuação obtida nos experimentos realizados para avaliação das funções, motora e sensorial, mencionados no item 3.7. Em uma segunda etapa desse experimento foi utilizada a ANOVA de duas vias com ou sem medidas repetidas, seguidas pelo pós-teste de Bonferroni, para verificar se o tratamento influenciou na recuperação da função motora e sensorial dos animais isquemiados.

Para a análise do teste de força de agarre foram empregadas ANOVA de três vias com ou sem medidas repetidas, seguidas pelo pós-teste de Bonferroni. Primeiramente, foi realizada uma análise dos dados utilizando os valores das médias da força de agarre de cada grupo. Uma segunda análise utilizou os valores do delta da força de agarre, calculada subtraindo a média da força de agarre no D15 ou D30 da média no *baseline*. A análise do delta de força permite analisar o aumento ou a diminuição da força de agarre dos grupos nos dias 15 e 30 do

protocolo. Em ambas as análises, as variáveis envolvidas nas ANOVAS de três vias foram tempo (D15 e D30), tratamento (AP/S, AP/E, AE/S e AE/E) e tipo de cirurgia (Sham e Isquemia).

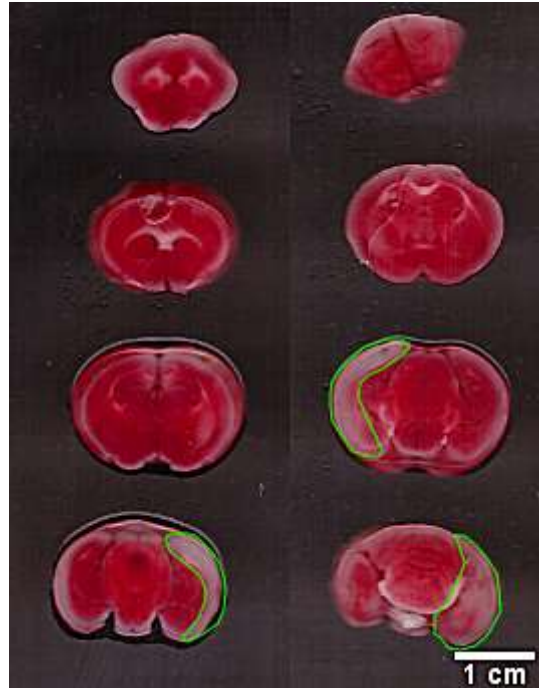
Para a análise do comportamento no teste do campo aberto, foram empregadas ANOVAs de duas vias com ou sem medidas repetidas, seguidas pelo pós-teste de Bonferroni, para verificar a influência das variáveis tipo de cirurgia (Sham e Isquemia) e tratamento (AP/S, AP/E, AE/S e AE/E) na atividade locomotora dos animais, nos paradigmas da distância percorrida, velocidade média, tempo de permanência e distância percorrida no centro do aparato e número de entradas no centro do aparato, conforme descrito no item 3.9.

Para a análise da função cognitiva no teste de reconhecimento de objetos, foram utilizadas ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni, para verificar se o tratamento influenciou o desempenho dos animais na fase de treino (distância percorrida e velocidade média) e na fase de teste (índice de discriminação e índice de preferência). Ainda, foi empregado ANOVA de duas vias com ou sem medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni, para comparar o tempo de exploração dos objetos e verificar uma possível influência da variável tratamento na atividade exploratória dos objetos tanto na fase de treino como na de teste, conforme detalhado no item 3.10.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO CEREBRAL.**

A figura 15 representa a imagem do corte histológico das fatias do cérebro de um animal submetido a BCCAo coradas com TTC. Os animais submetidos a BCCAo apresentaram  $32,5 \pm 2,99\%$  ( $n = 2$ ) de área com morte neuronal em relação à área total das fatias coronais.



**Figura 15. Cortes histológicos do cérebro de animal submetido a BCCAo após coloração com TTC.** Áreas de morte neuronal estão representadas na cor branca (não coradas), identificadas pelas linhas amarelas.

#### 4.2. ESCALA MODIFICADA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA (mNss)

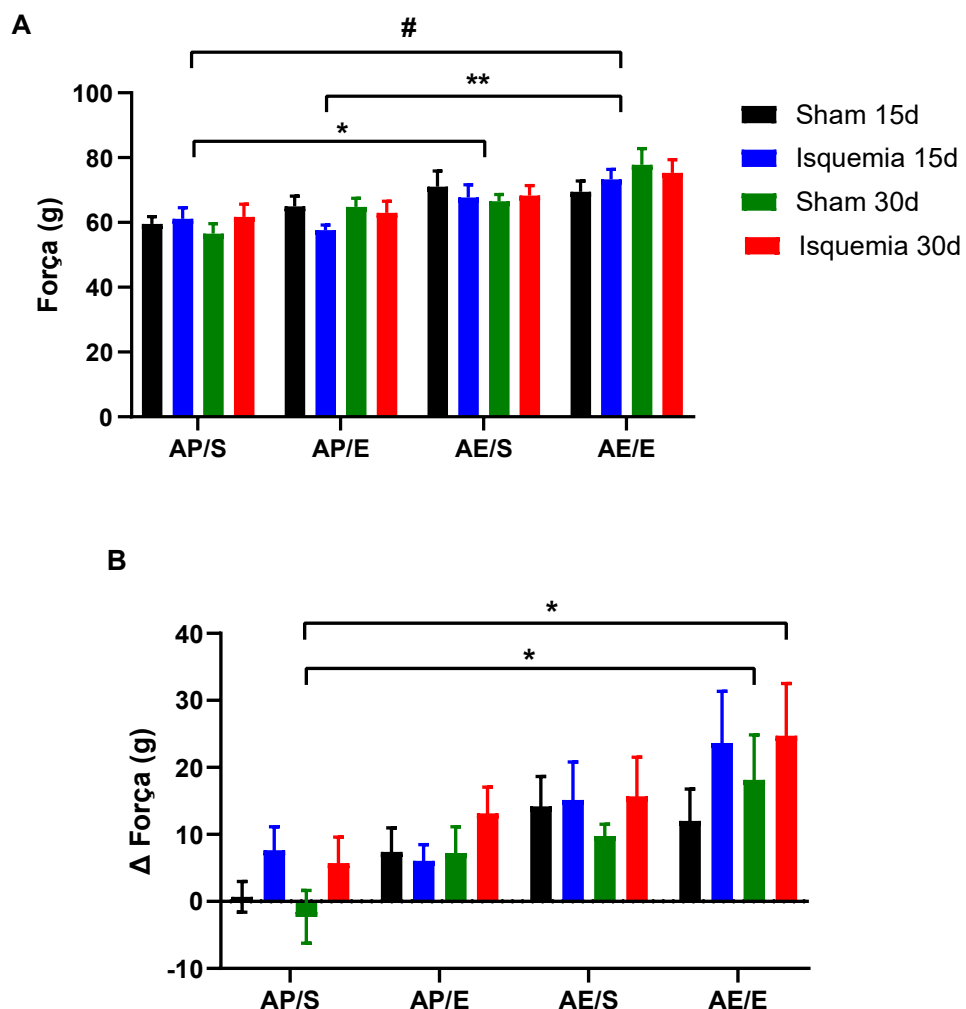
A mNss foi aplicada aos animais no D2 do protocolo com o intuito de confirmar a efetividade do nosso modelo de indução da isquemia cerebral. Foi observado que o grupo isquemia apresentou pontuações maiores que o grupo sham ( $p < 0,0001$ ) (Figura 16A).

Em um segundo momento, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias para comparar se as variáveis tratamento e tempo, além da interação entre essas variáveis tiveram influência na recuperação da função motora e sensorial dos animais submetidos à BCCAo, através do mNss (Figura 16B). Foi observado que a variável tempo e a interação entre tempo e tratamento tiveram influência nessa recuperação [ $F(2, 18) = 56.42$ ;  $p < 0,0001$  e  $F(6, 18) = 3.234$ ;  $p = 0.0246$ , respectivamente]. Nas múltiplas comparações, todos os grupos apresentaram pontuações significativamente menores do mNss no D30, em relação ao D2. Ainda, foi verificado que o grupo isquemia AE/E apresentou recuperação funcional significativa tanto entre o 2° e o 30°, como entre o 2° e o 15°, e o 15° e o 30°, enquanto o grupo isquemia AE/S apresentou recuperação significativa apenas nos



de três vias demonstrou que a variável tratamento teve influência muito significativa na força de agarre [ $F(3, 69) = 9,578$ ;  $p < 0,0001$ ], e excluiu a influência das variáveis tipo de cirurgia e tempo, bem como qualquer interação entre as variáveis. As múltiplas comparações evidenciaram que houve incremento na força de agarre dos grupos AE/S, e AE/E em relação ao grupo AP/S (respectivamente  $p = 0,02$  e  $p = 0,0001$ ), e do grupo AE/E em relação ao grupo AP/E ( $p = 0,003$ ).

Ainda, o delta da força de agarre de cada grupo no D15 e no D30 do protocolo foi ilustrada na Figura 17B. Mais uma vez, foi observada a influência da variável tratamento no incremento da força de agarre [ $F(3, 53) = 6,230$ ;  $p = 0,0011$ ]. Nas múltiplas comparações foi possível observar que o grupo isquemia AE/E apresentou maior delta de força de agarre no D15 e no D30 quando comparado com o valor do delta de força do grupo Sham AP/S no D30 ( $p = 0,0363$  e  $p = 0,0207$ , respectivamente).



**Figura 17. Desempenho dos animais no teste de força de agarre. (A)** Força de agarre (em gramas) nos dias 15 e 30 de experimentação. ANOVA de três vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc Bonferroni. Sham AP/S: n= 9; Sham AP/E: n=13; Sham AE/S: n=7; Sham AE/E: n=10; Isquemia AP/S: n=16; Isquemia AP/E: n=7; Isquemia AE/S: n=6; Isquemia AE/E: n=9. **(B)**  $\Delta$  de força de agarre (em gramas). ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc Bonferroni. Sham AP/S: n= 9; Sham AP/E: n=13; Sham AE/S: n=7; Sham AE/E: n=10; Isquemia AP/S: n=16; Isquemia AP/E: n=7; Isquemia AE/S: n=6; Isquemia AE/E: n=9. Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*p<0,05; \*\*p<0,005; #p<0,0001.

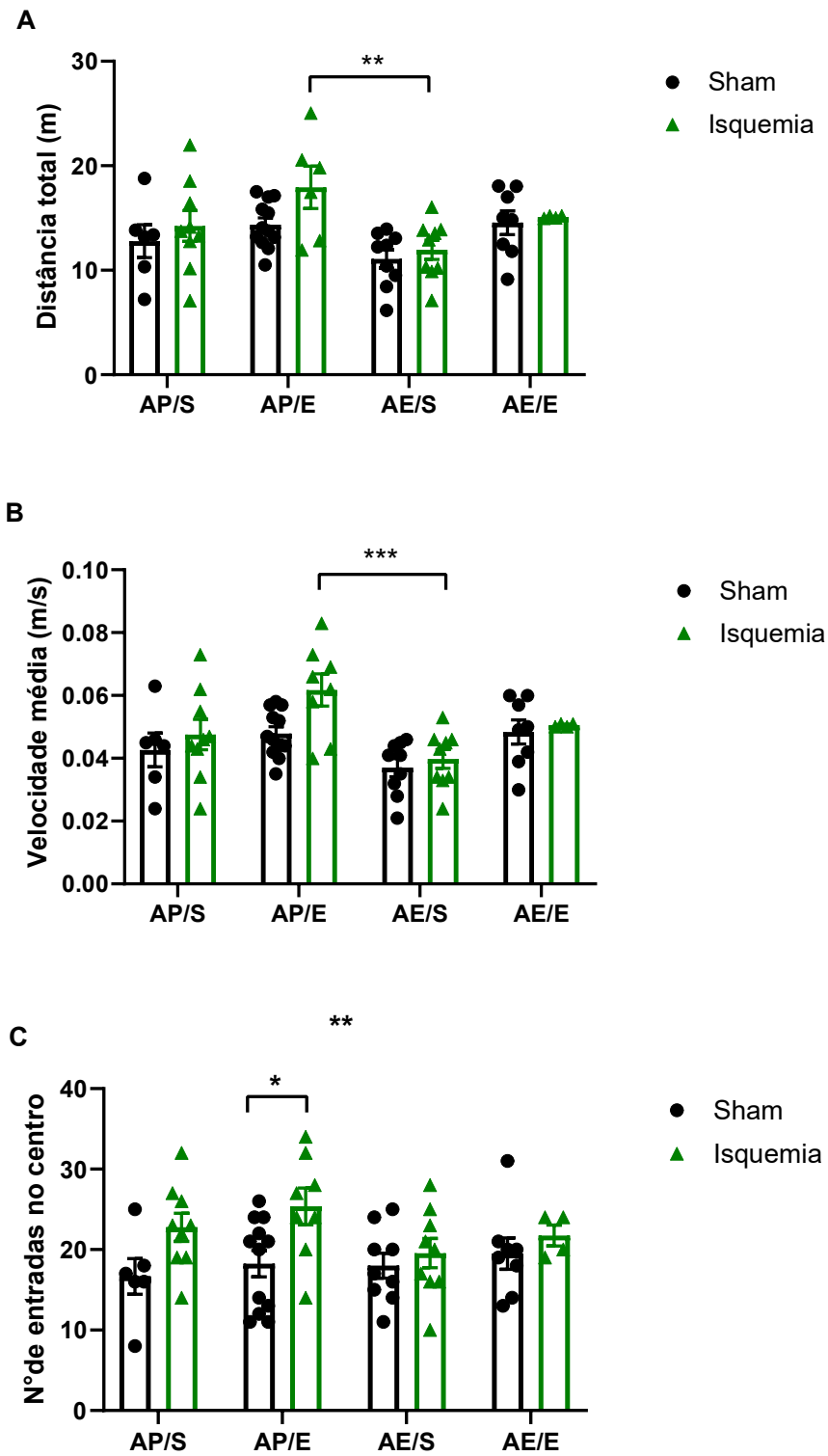
#### 4.4. CAMPO ABERTO (*OPEN FIELD*)

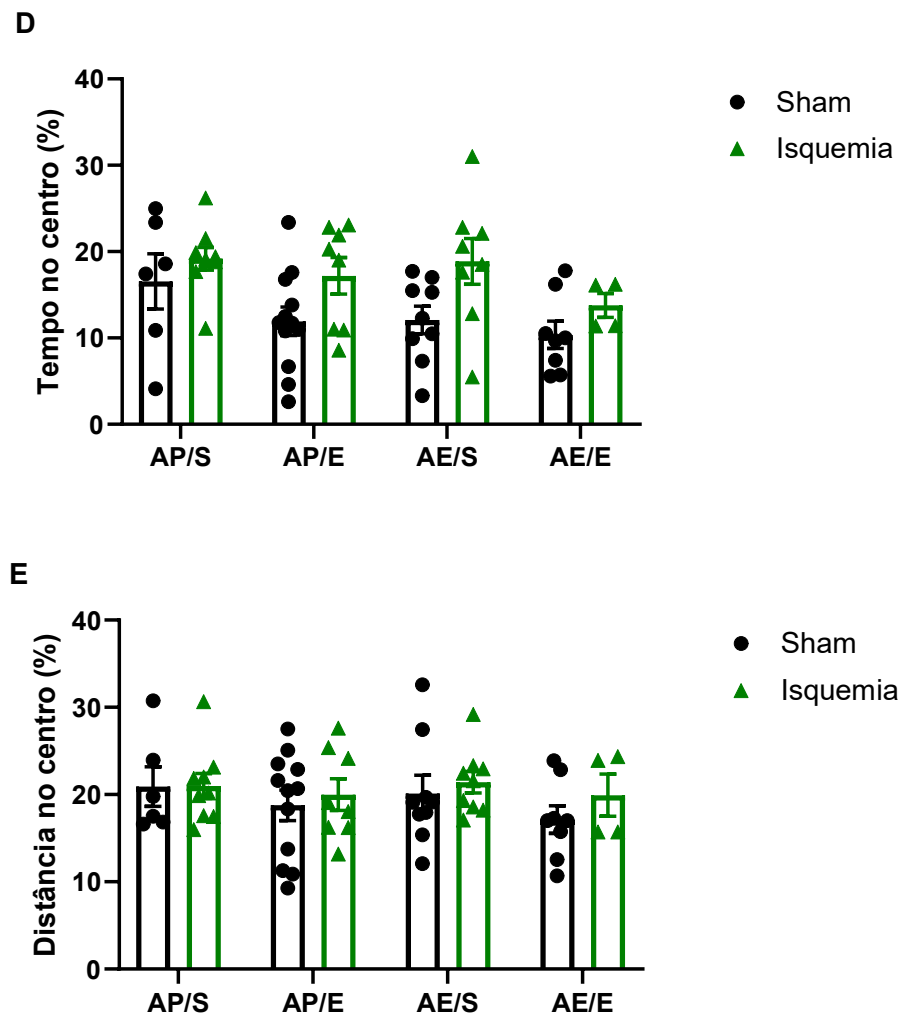
O desempenho dos animais no teste do campo aberto está representado na Figura 18. Na análise da distância total percorrida (Figura 18A), foi observado que o tratamento teve influência na atividade locomotora dos animais [ $F(3, 55) = 5.989$ ;  $p=0,0013$ ], com o grupo isquemia AE/S percorrendo distâncias menores em comparação ao grupo isquemia AP/E ( $p=0,0066$ ). Similarmente, a velocidade média dos animais (Figura 18B) sofreu influência da variável tratamento [ $F(3, 57) = 7.454$ ;  $p=0,0003$ ], com o grupo isquemia AE/S apresentando velocidades médias menores que o grupo isquemia AP/E ( $p=0,0006$ ).

O tempo gasto pelos animais no centro da caixa foi calculado em relação ao tempo total de duração do teste e expresso em porcentagem. Os dados mostraram que o número de entradas (Figura 18C) e o tempo gasto no centro da caixa (Figura 18D) sofreram influência do tipo de cirurgia, com os animais isquemiados entrando mais vezes e permanecendo mais tempo no centro da caixa em relação aos animais sham [respectivamente  $F(1, 57) = 9.283$ ;  $p=0,0035$  e  $F(1, 56) = 9.326$ ;  $p=0,0035$ ], não sendo encontradas diferenças entre os grupos de tratamento ( $p=0,3754$  e  $p=0,0921$ ).

A análise estatística da relação da diferença entre a distância percorrida na periferia e no centro da caixa (expressa em porcentagem da duração total do teste), não obteve diferenças relacionadas ao tipo de cirurgia ( $p=0,5732$ ) ou ao tratamento ( $p=0,3223$ ) (Figura 18E).





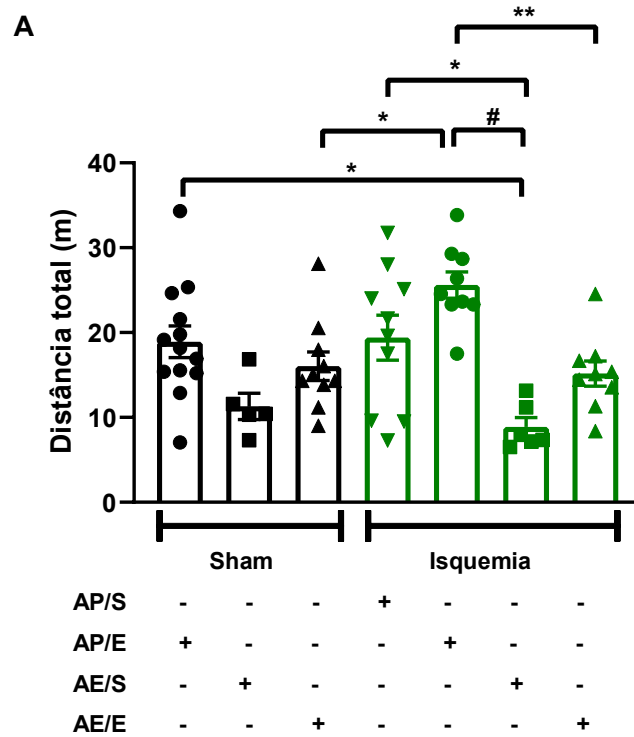


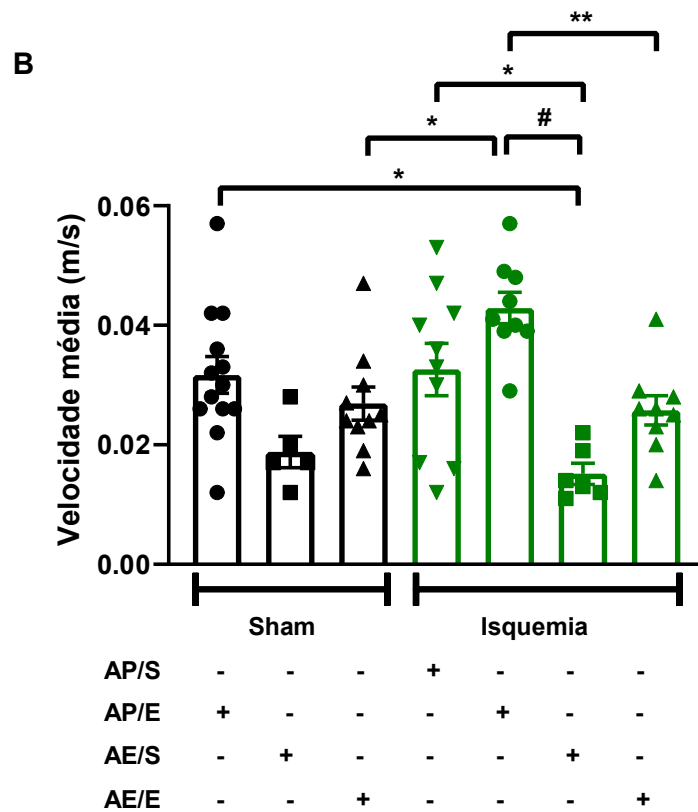
**Fig. 18. Desempenho dos animais no teste do campo aberto. (A)** Distância total percorrida em metros (m). **(B)** Velocidade média em metros por segundo (m/s). **(C)** Número de entradas no centro da caixa. **(D)** Tempo gasto no centro da caixa em relação ao tempo total do teste, em porcentagem (%). **(E)** Relação da diferença entre a distância percorrida na periferia e no centro e a distância total percorrida. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc Bonferroni. Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Sham AP/S: n=6; Sham AP/E: n=12; Sham AE/S: n=9; Sham AE/E: n=8; Isquemia AP/S: n=9; Isquemia AP/E: n=8; Isquemia AE/S: n=9; Isquemia AE/E: n=4. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ .

#### 4.5. RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Ao analisar a atividade locomotora dos animais na fase de treino, foi evidenciado através da ANOVA de uma via que o tratamento influenciou a distância percorrida [ $F(6, 55)=6.786$ ;  $p < 0,0001$ ] (Figura 19A) e a velocidade média [ $F(6, 55)=6.848$ ;  $p < 0,0001$ ] (Figura 19B). A múltiplas comparações identificaram

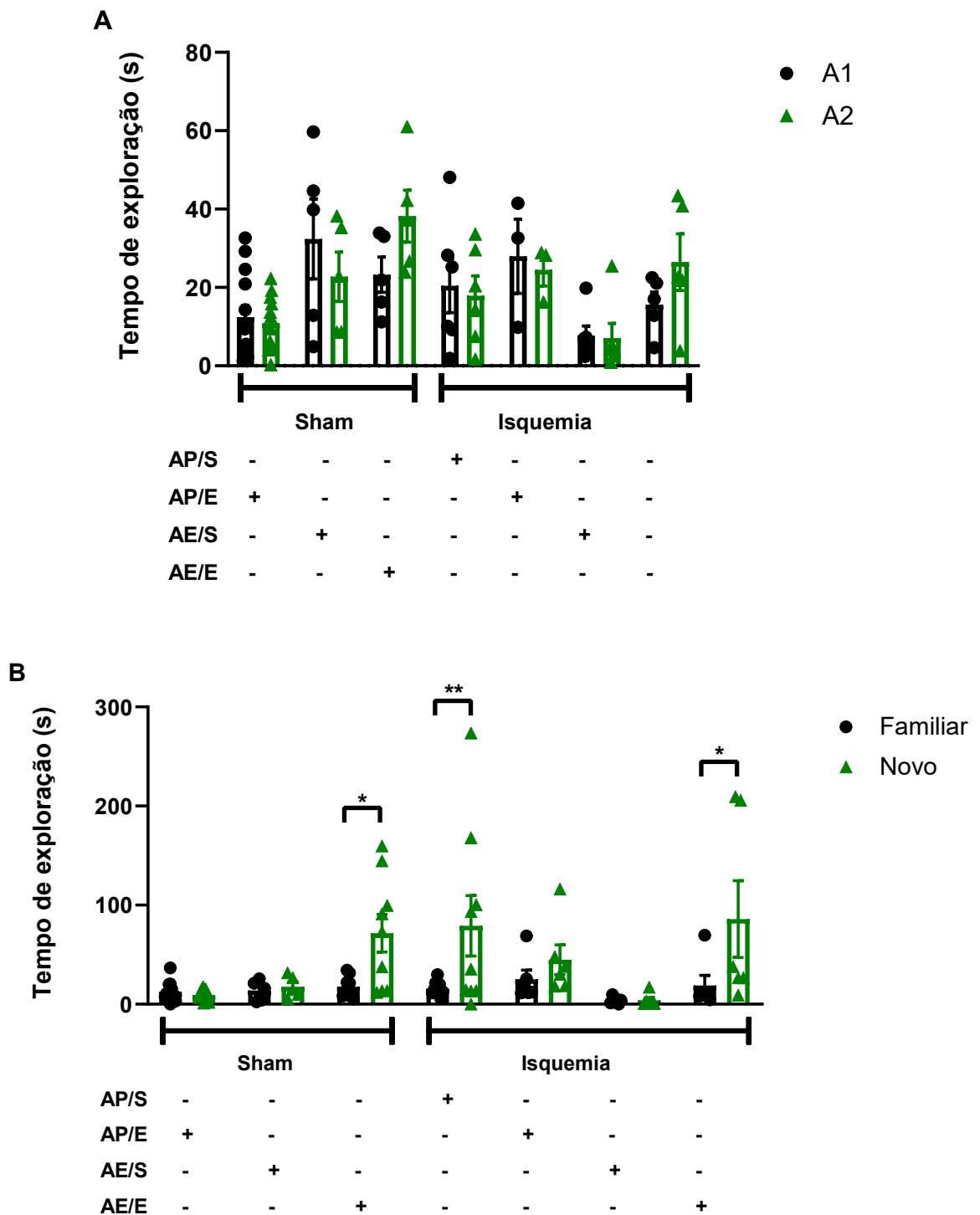
que o grupo isquemia AE/S percorreu menores distâncias em relação aos grupos sham AP/E ( $p=0,0185$ ), isquemia AP/S ( $p=0,0181$ ) e isquemia AP/E ( $p<0,0001$ ), e que o grupo isquemia AP/E percorreu maiores distâncias que os grupos sham AE/S ( $p=0,0009$ ), sham AE/E ( $p=0,0143$ ) e isquemia AE/E ( $p=0,0070$ ). As múltiplas comparações também mostraram que o grupo isquemia AE/S apresentou velocidade média menor em comparação com os grupos sham AP/E ( $p=0,0196$ ), isquemia AP/S ( $p=0,0180$ ) e isquemia AP/E ( $p<0,0001$ ), e que o grupo isquemia AP/E percorreu maiores distâncias que os grupos sham AE/S ( $p=0,0007$ ), sham AE/E ( $p=0,0128$ ) e isquemia AE/E ( $p=0,0078$ ).





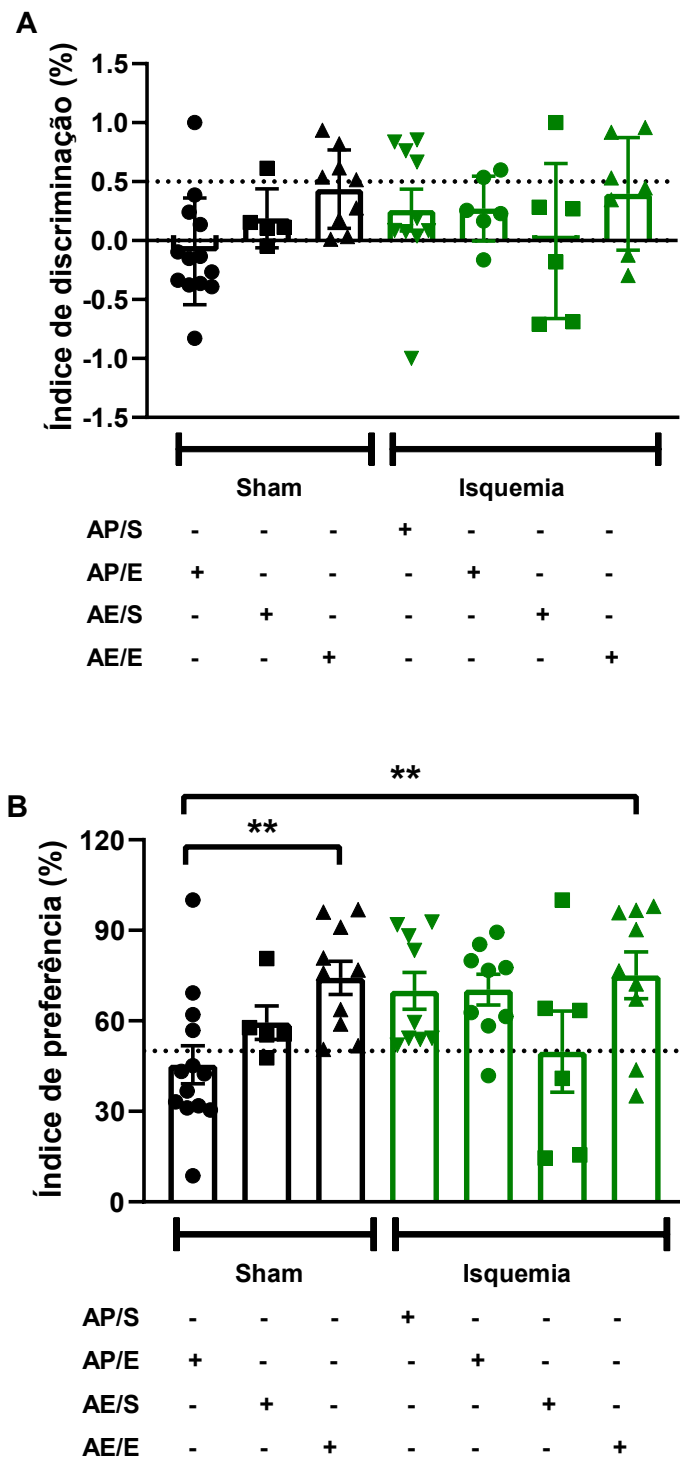
**Figura 19: Desempenho motor dos animais no teste de reconhecimento de objeto na fase de treino:** (A) Distância percorrida em metros (m); (B) Velocidade média em metros por segundo (m/s). ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc Bonferroni. Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Sham AP/E: n=13; Sham AE/S: n=5; Sham AE/E: n=10; Isquemia AP/S: n=10; Isquemia AP/E: n=9; Isquemia AE/S: n=6; Isquemia AE/E: n=9. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ .

Na análise do tempo de exploração dos objetos, a ANOVA de duas vias demonstrou, na fase de treino (Figura 20A), que todos os grupos exploraram ambos os objetos (A1 e A2) semelhantemente ( $p = 0,6943$ ). Ao analisar o tempo de exploração dos objetos na fase de teste (Figura 20B), observou-se que o objeto novo foi explorado por tempo significativamente maior que o objeto familiar [ $F(1, 94) = 12.85$ ;  $p = 0,0005$ ], e o tratamento e a interação tratamento *versus* tipo de objeto também influenciaram a exploração dos objetos [ $F(6,94) = 3.609$ ;  $p = 0,0029$ ] e  $F(6,94) = 2.392$ ;  $p = 0,0340$ , respectivamente], sendo os animais dos grupos sham AE/E, isquemia AP/S e isquemia AE/E os grupos que exploraram mais o objeto novo em detrimento do objeto familiar ( $p = 0,0393$ ,  $p = 0,0089$  e  $0,0357$ , respectivamente).



**Figura 20: Desempenho cognitivo dos animais no teste de reconhecimento de objetos através do tempo de exploração dos objetos na fase de treino e teste: (A) Tempo de exploração dos objetos familiares A1 e A2 em segundos (s); (B) Tempo de exploração dos objetos familiar e novo em segundos (s). ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc Bonferroni. Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Sham AP/E: n=13; Sham AE/S: n=5; Sham AE/E: n=10; Isquemia AP/S: n=10; Isquemia AP/E: n=9; Isquemia AE/S: n=6; Isquemia AE/E: n=9. \*p<0,05; \*\*p<0,005.**

Não foi encontrada diferença no cálculo do índices de discriminação ( $p=0,1350$ ) (Figura 21A), porém no índice de preferência houve diferença entre os grupos [ $F(6,54)=3.258$ ;  $p=0,0083$ ] (Figura 21B), sendo essa diferença observada entre os grupos sham AP/E e sham AE/E ( $p=0,0405$ ) e sham AP/E e stroke AE/E ( $p=0,0412$ ).



**Figura 21: Desempenho cognitivo dos animais no teste de reconhecimento de objeto através do índice de discriminação (A) e de preferência (B).** ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc Bonferroni. Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Sham AP/E: n=13; Sham AE/S: n=5; Sham AE/E: n=10; Isquemia AP/S: n=10; Isquemia AP/E: n=9; Isquemia AE/S: n=6; Isquemia AE/E: n=9. \*\*p<0,005.

## 5. DISCUSSÃO

O exercício físico e o enriquecimento ambiental são conhecidos pelo seus efeitos positivos no SNC durante a reabilitação das sequelas do AVEi (ARYA et al., 2011; GONÇALVES et al., 2018; HONG et al., 2020; LI et al., 2020). Entretanto este trabalho investigou os efeitos gerados pela associação dessas duas terapias. O presente estudo indicou que o grupo tratado com associação de AE com EF apresentou melhores resultados motores do que os grupos tratados apenas com AE ou EF. Alguns autores estudaram a combinação de diferentes terapias em modelos clínicos e pré-clínicos, e defendem que, devido aos diversos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no AVEi, o tratamento utilizando terapias combinadas seria mais eficaz do que o tratamento realizado com uma única terapia, por atuar em diversas frentes da cascata de eventos desencadeados pelo evento isquêmico (CHOI, 2020; MALÁ; RASMUSSEN, 2017; O'COLLINS et al., 2012; TIJSEN et al., 2019).

O evento isquêmico provoca o surgimento de uma variedade de sequelas motoras e cognitivas, a depender da extensão e da localização da lesão isquêmica (FERRO; CAEIRO; FIGUEIRA, 2016; MARTINS et al., 2013; ZHENG et al., 2016). O presente estudo utilizou modelo de indução de isquemia cerebral global por meio da técnica de oclusão de dois vasos (carótidas comuns-2VO) e o tempo de oclusão está diretamente relacionado à extensão e à severidade da lesão (LEÓN-MORENO et al., 2020). A área de isquemia cerebral provocada pela BCCAO nesse estudo, de aproximadamente 32%, foi consideravelmente extensa. Outros estudos utilizando o mesmo modelo encontraram aproximadamente 20% (GONÇALVES et al., 2018) e 40% (MARTINS-SILVA et al., 2021) de infarto cerebral.

Ainda, os dados desta pesquisa demonstraram que, na avaliação da severidade das sequelas motoras e sensoriais através do mNss, esse modelo de indução de AVEi foi capaz de provocar comprometimento motor e sensorial

moderado a severo na maioria dos animais. Na mNss, o comportamento motor do animal é testado ao levantá-lo pela cauda, durante a caminhada no chão e ao ser colocado sobre uma barra estreita, e a avaliação sensitiva é feita através da presença ou ausência dos reflexos de pinna e corneal (BEHROUZIFAR et al., 2018; SCHÖNFELD et al., 2017). Os dados deste estudo corroboram com outros estudos pré-clínicos de modelos de indução do AVE, que encontraram pontuações no mNss que representam déficits de moderado a severo, entre 1 e 3 dias após a cirurgia (ASADI et al., 2018; CHEN et al., 2017a; ZHANG et al., 2020, 2021). Uma minoria dos animais que foram isquemiados apresentaram déficit motor e sensorial leve. Essa heterogeneidade na severidade das sequelas pode ser explicada pela característica do modelo de indução de isquemia cerebral global, que gera grande variação na extensão da área de morte neuronal, levando a sequelas também heterogêneas (LEÓN-MORENO et al., 2020).

A análise das pontuações no mNss dos animais isquemiados no D2, D15 e D30 revelou que o tempo teve grande influência na recuperação das sequelas, pois no D30 todos os grupos apresentaram pontuações significativamente menores que no D2, com pontuações que indicam sequelas leves ou até com ausência de sequela. Ainda, foi possível observar a influência da interação tempo e tratamento. Os dados sugerem que o grupo com a associação das terapias parece ser capaz de melhorar a função neurológica mais rápida e progressivamente em comparação com os outros grupos, pois esse grupo foi o único que apresentou redução significativa da pontuação no mNss nos dois intervalos analisados (do D2 para o D15 e do D15 para o D30). Diferentemente, os grupos de monoterapias apresentaram melhora da função neurológica ou a partir do 15° dia (AP/S e AP/E) ou apenas nos primeiros 15 dias (AE/S). Chen et al (2017) investigou o efeito da associação do enriquecimento físico e do enriquecimento social na recuperação funcional através do mNss. Nesse estudo, ratos foram subdivididos em grupos de acordo com as condições de habitação: ambiente padrão, ambiente com enriquecimento físico (caixa grande com uma diversidade de brinquedos e uma roda de corrida para a realização de exercício, no máximo dois animais por caixa), ambiente com enriquecimento social (caixas grande com 6 a 10 animais por caixa), e ambiente com enriquecimento físico e social (caixa grande, com mesmos objetos contidos no enriquecimento físico citado acima, de 6 a 10 animais por caixa). Esses



autores encontraram que o grupo com a associação do enriquecimento físico e social apresentou melhores resultados no mNss que os grupos tratados apenas com o enriquecimento físico ou social, embora o grupo tratado apenas com o enriquecimento físico também tenha promovido recuperação funcional significativa em relação ao ambiente padrão (CHEN et al., 2017a).

A redução da força muscular é uma sequela motora comumente encontrada em indivíduos acometidos pelo AVEi (MARTINS et al., 2013). Entretanto, em roedores, as manifestações das sequelas neurológicas são diferentes devido ao uso de diferentes grupos musculares e da adoção de mecanismos musculares compensatórios, que por vezes torna a sequela motora imperceptível visualmente (SCHÖNFELD et al., 2017). O teste de força de agarre (*Grip test*) é capaz de mensurar a habilidade motora fina de roedores através da mensuração da força de preensão e da força dos músculos dos membros anteriores, sendo comumente utilizado para avaliar a função motora de ratos e camundongos após AVE ou traumatismo cranioencefálico (SCHÖNFELD et al., 2017). No presente estudo, a análise dos resultados do teste de força de agarre mostrou que o tratamento influenciou o incremento na força de agarre dos animais, e excluiu a influência das variáveis tipo de cirurgia e tempo. Na primeira análise, os grupos tratados com monoterapia (AP/E e AE/S) ou associação das terapias (AE/E) apresentaram incremento da força de agarre em relação ao grupo dos animais mantidos em ambiente padrão e sem EF (AP/S). Na segunda análise, que levou em consideração o cálculo do delta de força de agarre, os resultados sugerem que a combinação do EF com o AE possivelmente é mais eficaz em promover recuperação da força de agarre do que os tratamentos que utilizam apenas EF ou AE, pois os grupos AP/E e AE/S não apresentaram diferença no delta de força de agarre em relação ao grupo AP/S. Hong *et al* (2020) estudaram a melhora da função motora em modelo fototrombótico de isquemia em camundongos submetidos a sessões de exercício físico em esteira uma vez por dia durante 28 dias. Nesse estudo, a função motora foi mensurada através de testes que avaliaram a locomoção (por meio do teste *Foot Fault*, em que o animal precisa atravessar uma escada horizontal elevada e os passos certos e errados na escada são contabilizados) e o equilíbrio (por meio do teste *Rotarod*, em que os animais precisam se equilibrar numa roda horizontal que gira em aceleração constante e o

tempo de latência até a queda é registrado). Hong *et al* concluíram que os animais que foram isquemiados tratados com sessões de corrida em esteira apresentaram melhora da função motora em relação aos animais isquemiados não tratados. Yu *et al* (2014) investigaram a função motora de ratos isquemiados expostos a um ambiente enriquecido ou ao ambiente padrão em modelo de isquemia cerebral através da oclusão da artéria cerebral média. Nesse estudo a avaliação da função motora foi através do teste *beam-walking*, teste de equilíbrio e coordenação, em que a caminhada dos animais em cima de uma barra estreita é observado e o tempo até a queda da barra é contabilizado. Esses autores observaram que os ratos expostos ao ambiente enriquecido apresentaram melhores desempenhos no teste motor *beam-walking* em relação aos ratos do grupo de ambiente padrão (YU *et al.*, 2014). Outro estudo (PLOUGHMAN *et al.*, 2007) investigou a associação de exercício de corrida em esteira e treinamento específico de tarefa exclusivamente com o membro anterior afetado (em que o animal precisa alcançar paletes com alimento) em ratos submetidos à isquemia através do modelo de oclusão da artéria cerebral média. Nesse estudo, os testes motores utilizados foram o *skilled reaching* (em que o animal precisa alcançar paletes com alimento com o membro anterior acometido pela sequela motora) e o teste do cilindro (em que o animal é colocado num cilindro transparente para livre exploração e o número de toques do animal com o membro anterior afetado na parede é contabilizado em relação ao número de toques total com os dois membros anteriores), muito utilizados na avaliação das disfunções assimétricas dos membros anteriores após indução de AVEi. Esses autores encontraram que os ratos reabilitados com a associação das terapias apresentaram desempenho dos testes motores parecidos com os animais do grupo sham ao final das cinco semanas de reabilitação, enquanto os animais tratados com apenas uma das duas terapias continuaram com a função motora comprometida em comparação ao grupo sham (PLOUGHMAN *et al.*, 2007). Os dados do presente estudo demonstram que o tratamento com a associação do AE com o EF promove melhores resultados, corroborando com a nossa hipótese de possível efeito aditivo gerado quando os tratamentos são combinados, o que também foi sugerido por outros autores.

No que diz respeito ao tempo, na presente pesquisa não foi encontrada influência dessa variável no incremento da força de agarre. Entretanto, na mNss

foi demonstrado que a função motora e sensorial foi influenciada pelo tempo e pela interação tempo *versus* tratamento conforme discutido anteriormente. Nesta pesquisa, não é possível determinar se o efeito aditivo da associação do AE com o EF perdura no médio e no longo-prazo, sendo possível apenas sugerir que no 15º e no 30º dia foi observado um incremento da função motora na força de agarre, com aumento da significância estatística no D30. Esse dado diverge de estudos que avaliaram o efeito da combinação de terapias em doenças neurológicas. Biernaskie e Corbett (2001) avaliaram a função motora de ratos com lesão isquêmica focal, utilizando o teste *skilled reaching* (explicado anteriormente), após quatro e nove semanas de tratamento com AE associado a exercício específico de tarefa no membro superior afetado. Neste estudo, o grupo submetido à reabilitação com associação de terapias apresentou melhor desempenho no teste, em comparação com o grupo que não recebeu nenhum tipo de reabilitação. Malá e Rasmussen (2017), em revisão sistemática de estudos pré-clínicos, investigaram o efeito da combinação de terapias farmacológicas e não farmacológicas na função motora, dentre outras funções. Nessa revisão, foi observado que a combinação de um AE com um protocolo que continha variadas sessões de treinamentos sensoriais (estímulo aos sentidos de audição, visão e olfato, por meio de sons intermitentes em determinadas frequências, flashes de luz branca e tiras de papel perfumados duas vezes ao dia) e motor (equilíbrio e coordenação no *rotarod*) resultou em melhor incremento da função motora no 15º dia após lesão cerebral de ratos com lesão cerebral traumática em relação a ratos que foram submetidos apenas ao AE. Porém, esse efeito diminuiu no 30º dia após a lesão e desapareceu após 30 dias. Resultado oposto foi observado no estudo de Biernaskie e Corbett (2001), que mostrou que o tratamento com terapias combinadas apresentou efeito altamente significativo no 30º e no 67º dia. Dessa forma, são necessários mais estudos que adotem protocolos mais longos, para a melhor compreensão da influência do tempo e da interação tratamento *versus* tempo em animais isquemiados e tratados com associação de um AE com EF.

A avaliação da atividade locomotora dos animais foi realizada no teste do campo aberto e na fase de treino do teste de reconhecimento de objetos, através da análise da distância total percorrida e da velocidade média. Foi encontrado que os animais que foram isquemiados tratados com AE apresentaram distância total

percorrida e velocidade média reduzidas em comparação com os outros grupos de animais isquemiados. Semelhantemente aos nossos dados, um estudo avaliou a atividade locomotora de ratos, através do teste do campo aberto, em condições ambientais diferentes (ambiente padrão, ambiente enriquecido e ambiente isolado), e também observou que os ratos que foram mantidos em AE percorreram distâncias menores e com menores velocidades médias em relação aos animais mantidos isolados e em ambiente padrão, além de apresentarem uma rápida diminuição da atividade locomotora ao longo do teste (BRENES; PADILLA; FORNAGUERA, 2009). Muitos estudos discutiram os efeitos do ambiente enriquecido na atividade locomotora no teste do campo aberto (BRENES; PADILLA; FORNAGUERA, 2009; CAMPÊLO et al., 2017; ELLIOTT; GRUNBERG, 2005; ROJAS-CARVAJAL et al., 2018). Possivelmente, o AE promove uma maior rapidez na habituação dos animais a novos ambientes, acarretando em distância total percorrida e velocidade média menores nos grupos de animais mantidos em AE em relação aos do ambiente padrão (AMARAL et al., 2008; DEL ARCO et al., 2007; ELLIOTT; GRUNBERG, 2005; SCHRIJVER et al., 2002). Essa menor exploração do grupo exposto ao AE pode ser ocasionada pelo contato constante a novos artefatos, oportunizado em um AE (LEGER et al., 2013), o que provoca uma redução na exploração desses animais (LEGER et al., 2012)

Ainda, sabe-se que ansiedade e o déficit de memória são sequelas comuns após evento isquêmico (BENJAMIN et al., 2019; CAROTA et al., 2005; FERRO; CAEIRO; FIGUEIRA, 2016; LI; WANG, 2020; ZHENG et al., 2016), e em estudos pré-clínicos são frequentemente avaliadas através do teste do campo aberto e de reconhecimento de objetos, respectivamente. Esses testes se baseiam na tendência natural dos roedores de explorar a novidade em detrimento do que já é conhecido, sejam ambientes ou objetos, em local sem fatores que interfiram no comportamento do animal (ANTUNES; BIALA, 2012; LEGER et al., 2012). Os dados deste estudo mostraram que animais sham apresentaram maior comportamento do tipo ansioso em comparação com o grupo isquemia. No teste de reconhecimento de objetos, foi observado que os grupos sham não aprenderam a tarefa de explorar os objetos no teste, e nos grupos isquemia, o grupo que não foi tratado com nenhuma terapia apresentou desempenho semelhante ao grupo tratado com associação das terapias. Nesta pesquisa era esperado que os animais

dos grupos isquemia apresentassem maior comportamento do tipo ansioso do que os animais falso operados, e que os animais tratados com monoterapia ou com a associação das terapias apresentassem redução do comportamento ansiogênico, assemelhando-se com o comportamento dos grupos sham. Diferentemente do que foi observado neste estudo, alguns autores demonstraram que animais que foram isquemiados apresentaram maior comportamento do tipo ansioso em comparação com os animais sham no teste do campo aberto (VAHID-ANSARI; LAGACE; ALBERT, 2016). Ainda, Brenes, Padilla e Fornaguera (2009), observaram que, o grupo de animais isquemiados que foram tratados com AE apresentaram comportamento semelhante aos animais do grupo sham, sugerindo que o tratamento com AE atenua o comportamento do tipo ansioso em animais isquemiados. Muitos estudos avaliaram a função cognitiva em modelos de AVEi em roedores, porém poucos investigaram a influência da associação do AE com o EF. Li *et al* (2020) avaliaram a memória espacial de referência de animais isquemiados e tratados com AE através do teste labirinto aquático de Morris. Nesse estudo os animais tratados com AE apresentaram capacidade de aprendizado espacial, que foi prejudicada após a indução do AVEi. Sakalen *et al* (2017) avaliaram a função cognitiva de camundongos transgênicos com redução da neurogênese através do teste de reconhecimento de objetos, dentre outros testes. Nesse estudo, os animais com redução da neurogênese apresentaram exploração semelhante dos objetos novo e familiar, sugerindo a existência de déficit de memória nesses animais em comparação aos animais selvagens, não transgênicos. Nesse mesmo estudo de Sakalen *et al*, os animais foram tratados com associação de EF e AE e foi identificado que o déficit de memória apresentado nos camundongos transgênicos estava presente apenas no grupo de ambiente padrão, sugerindo que os animais transgênicos do grupo de combinação do AE com o EF apresentaram desempenho semelhante ao dos animais selvagens no teste de reconhecimento de objetos. Outro estudo investigou o efeito da combinação do AE com o EF na função cognitiva, no paradigma da memória espacial de referência através do teste labirinto aquático de Morris, em animais saudáveis (XU *et al.*, 2021). Nesse estudo, foi observado que tanto os animais expostos às monoterapias (AE ou EF) como os animais expostos à combinação das terapias (AE e EF) apresentaram incremento da função cognitiva em

comparação ao grupo controle, porém o incremento foi significativamente maior no grupo com combinação das terapias.

Diante disso, neste estudo, tanto no teste do campo aberto, como no teste de reconhecimento de objeto, não foi possível inferir que os animais que foram isquemiados apresentaram comportamento do tipo ansioso, bem como não foi possível sugerir que a associação de terapias melhorou a memória de curta duração desses animais. A divergência identificada nos dados desta pesquisa em relação aos resultados da maioria dos estudos anteriormente publicados pode ser explicada por possível interferência de fatores ambientais no momento da realização dos testes. Como discutido anteriormente, esses testes comportamentais são influenciados por fatores como temperatura, luminosidade, umidade, ruído e odor, que se tornam fatores de estresse se não estiverem em condições ideais, e que comumente interferem o comportamento de roedores, influenciando diretamente o resultado desses testes (ANTUNES; BIALA, 2012; LEGER et al., 2013). Ainda, no teste de reconhecimento de objetos, o número pequeno de animais por grupo pode ter contribuído para esses resultados. Como foi demonstrado, embora haja estudos que observaram melhora da função cognitiva em animais isquemiados que foram tratados com AE, EF e com a associação dessas terapias, esses estudos ainda são poucos. Assim, são necessários mais estudos para investigar e elucidar se a combinação de AE e EF promove incremento da função cognitiva em animais submetidos a indução de AVEi.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo sugere que a associação do AE com o EF é capaz de promover melhora mais significativa na reabilitação de sequelas motoras após AVEi, em comparação com os tratamentos que utilizaram apenas o AE ou o EF. Entretanto, não é possível sugerir que a combinação do AE com o EF ameniza o comportamento do tipo ansioso em animais submetidos a isquemia cerebral global, bem como não é possível afirmar que a associação do AE com o EF promova melhora da função cognitiva em animais submetidos a isquemia cerebral global.

Mais estudos são necessários para elucidar os efeitos da combinação dessas terapias nas sequelas cognitivas após AVEi.

Como perspectivas futuras, faremos a análise bioquímica e molecular dos níveis de BDNF e irisina no córtex e hipocampo através das técnicas de imunoblot e qPCR, além do aumento no número amostral na Escala Modificada de Severidade Neurológica (mNss) e na quantificação da área de infarto cerebral.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, W.; TRIPATHI, D.; RONALDSON, P. T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: Targeting tight junctions and transporters for vascular protection. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 315, n. 3, p. C343–C356, 2018.

AHAD, M. A. et al. Insights into the neuropathology of cerebral ischemia and its mechanisms. **Reviews in the Neurosciences**, v. 31, n. 5, p. 521–538, 2020.

AHN, J. H. et al. Long-Term Exercise Improves Memory Deficits via Restoration of Myelin and Microvessel Damage, and Enhancement of Neurogenesis in the Aged Gerbil Hippocampus after Ischemic Stroke. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 30, n. 9, p. 894–905, 2016.

ALWIS, D. S.; RAJAN, R. Environmental enrichment and the sensory brain: The role of enrichment in remediating brain injury. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, n. SEP, p. 1–20, 2014.

AMARAL, O. B. et al. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. **Physiology and Behavior**, v. 93, n. 1–2, p. 388–394, 2008.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.

ARIDA, R. M. et al. Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 90, n. 6, p. 452–465, 2011.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 6, p. 657–668, 2004.

ARYA, K. N. et al. Movement therapy induced neural reorganization and motor recovery in stroke: A review. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 15, n. 4, p. 528–537, 2011.

ASADI, Y. et al. Irisin Peptide Protects Brain Against Ischemic Injury Through Reducing Apoptosis and Enhancing BDNF in a Rodent Model of Stroke. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 8, p. 1549–1560, 2018.

BAI, Q. et al. Intracerebral haemorrhage: From clinical settings to animal models. **Stroke and Vascular Neurology**, v. 5, n. 4, p. 388–395, 2020.

BARBIERI, M. et al. Synthetic cannabinoid JWH-018 and its halogenated derivatives JWH-018-Cl and JWH-018-Br impair Novel Object Recognition in mice: Behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 254–

269, 2016.

BEHROUZIFAR, S. et al. Neuroprotective nature of adipokine resistin in the early stages of focal cerebral ischemia in a stroke mouse model. **Neurochemistry International**, v. 114, p. 99–107, 2018.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 141–149, 2001.

BENJAMIN, E. J. et al. **Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association**. [s.l.: s.n.]. v. 139

BERNHARDT, J. et al. Efficacy and safety of very early mobilisation within 24 h of stroke onset (AVERT): A randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 386, n. 9988, p. 46–55, 2015.

BIERNASKIE, J.; CHERNENKO, G.; CORBETT, D. Efficacy of Rehabilitative Experience Declines with Time after Focal Ischemic Brain Injury. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 5, p. 1245–1254, 2004.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5272–5280, 2001.

BOSTRÖM, P. et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 2012.

BRASIL. **Diretrizes de Atenção à Reabilitação da Pessoa com Acidente Vascular Cerebral**. [s.l.: s.n.].

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 125–137, 2009.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, n. 6, p. 483–495, 2009.

CAMPÊLO, C. L. C. et al. Exposure to an enriched environment facilitates motor and prevents short-term memory impairment and reduction of striatal BDNF in a progressive pharmacological model of parkinsonism in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 328, n. April, p. 138–148, 2017.

CARDOSO, A. M. et al. Swimming training prevents alterations in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 27, n. 4, p. 522–529, 2014.

CAROTA, A. et al. A prospective study of predictors of poststroke depression. **Neurology**, v. 64, n. 3, p. 428–433, 2005.

CASSILHAS, R. C.; TUFIK, S.; DE MELLO, M. T. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 5, p. 975–983, 2016.

CHEN, X. et al. Effect of Physical and Social Components of Enriched Environment on Astrocytes Proliferation in Rats After Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 5, p. 1308–1316, 2017a.

CHEN, Y. et al. Morin Mitigates Oxidative Stress, Apoptosis and Inflammation in Cerebral Ischemic Rats. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM**, v. 14, n. 2, p. 348–355, 2017b.

CHOI, D. W. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. **Frontiers in**



**Neuroscience**, v. 14, n. October, 2020.

DEL ARCO, A. et al. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 2, p. 267–273, 2007.

DENG, Y. H. et al. Enriched environment boosts the post-stroke recovery of neurological function by promoting autophagy. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 5, p. 813–819, 2021.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–397, 1999.

EL HAYEK, L. et al. Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through sirt1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 13, p. 2369–2382, 2019.

ELLIOTT, B. M.; GRUNBERG, N. E. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. **Behavioural Brain Research**, v. 165, n. 2, p. 187–196, 2005.

FAROKHI-SISAKHT, F. et al. Cognitive Rehabilitation Improves Ischemic Stroke-Induced Cognitive Impairment: Role of Growth Factors. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 28, n. 10, p. 104299, 2019.

FERRO, J. M.; CAEIRO, L.; FIGUEIRA, M. L. Neuropsychiatric sequelae of stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, n. 5, p. 269–280, 2016.

GONÇALVES, L. V. et al. Environmental enrichment cognitive neuroprotection in an experimental model of cerebral ischemia: biochemical and molecular aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 348, n. 2010, p. 171–183, 2018.

GORELICK, P. B. The global burden of stroke: persistent and disabling. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 5, p. 417–418, 2019.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B.; PUSZCZEWICZ, M. A review on irisin, a new protagonist that mediates muscle-adipose-bone-neuron connectivity. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 20, p. 4687–4693, 2017.

HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 1–21, 2006.

HASEGAWA, Y. et al. Characteristics of Cerebrovascular Injury in the Hyperacute Phase After Induced Severe Subarachnoid Hemorrhage. **Translational Stroke Research**, v. 6, n. 6, p. 458–466, 2015.

HEISS, W. Ischemic Penumbra: Evidence From Functional Imaging in Man EXPERIMENTAL BASIS OF THE. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, p. 1276–1293, 2000.

HENNINGER, N.; FISHER, M. Extending the Time Window for Endovascular and Pharmacological Reperfusion. **Translational Stroke Research**, v. 7, n. 4, p. 284–293, 2016.

HIMI, N. et al. Exercise in the Early Stage after Stroke Enhances Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression and Memory Function Recovery. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 12, p. 2987–2994, 2016.

HONG, M. et al. Treadmill exercise improves motor function and short-term memory by enhancing synaptic plasticity and neurogenesis in photothrombotic stroke mice. **International Neurology Journal**, v. 13, n. 5, p. S28–S38, 2020.

- JANSSEN, H. et al. Translating the use of an enriched environment poststroke from bench to bedside: Study design and protocol used to test the feasibility of environmental enrichment on stroke patients in rehabilitation. **International Journal of Stroke**, v. 7, n. 6, p. 521–526, 2012.
- JIANG, X. et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 163–164, p. 144–171, 2018.
- JIN, Z. et al. Exercise-Linked Irisin Prevents Mortality and Enhances Cognition in a Mice Model of Cerebral Ischemia by Regulating Klotho Expression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.
- JUNG, S. et al. Relevance of the cerebral collateral circulation in ischaemic stroke: time is brain, but collaterals set the pace. **Swiss medical weekly**, v. 147, n. December, p. w14538, 2017.
- KALOGERAKI, E. et al. Physical exercise preserves adult visual plasticity in mice and restores it after a stroke in the somatosensory cortex. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. SEP, p. 1–15, 2016.
- KEMPERMANN, G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 235–245, 2019.
- KIM, Y. et al. Exercise Training Guidelines for Multiple Sclerosis, Stroke, and Parkinson Disease: Rapid Review and Synthesis. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 98, n. 7, p. 613–621, 2019.
- LAMBERTSEN, K. L.; FINSEN, B.; CLAUSEN, B. H. Post-stroke inflammation—target or tool for therapy? **Acta Neuropathologica**, v. 137, n. 5, p. 693–714, 2019.
- LANG, C. E. ; LOHSE, K. R. ; BIRKENMEIER, R. L. Dose and timing in neurorehabilitation: Prescribing motor therapy after stroke. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 6, p. 549–555, 2015.
- LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. **BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 104
- LEGER, M. et al. Environmental Enrichment Enhances Episodic-Like Memory in Association with a Modified Neuronal Activation Profile in Adult Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.
- LEÓN-MORENO, L. C. et al. Challenges and Improvements of Developing an Ischemia Mouse Model Through Bilateral Common Carotid Artery Occlusion. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 5, 2020.
- LI, M. et al. Enhanced white matter reorganization and activated brain glucose metabolism by enriched environment following ischemic stroke: Micro PET/CT and MRI study. **Neuropharmacology**, v. 176, n. June, p. 108202, 2020.
- LI, X.; WANG, X. Relationships between stroke, depression, generalized anxiety disorder and physical disability: some evidence from the Canadian Community Health Survey-Mental Health. **Psychiatry Research**, v. 290, n. February, p. 113074, 2020.
- LI, Z. et al. Effects of Early Mobilization after Acute Stroke: A Meta-Analysis of Randomized Control Trials. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 27, n. 5, p. 1326–1337, 2018.
- LIVINGSTON-THOMAS, J. et al. Exercise and Environmental Enrichment as Enablers of

Task-Specific Neuroplasticity and Stroke Recovery. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 2, p. 395–402, 2016.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Neurological diseases: Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 399–414, 2003.

MACRAE, I. M.; ALLAN, S. M. Stroke: The past, present and future. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 239821281881068, 2018.

MALÁ, H.; RASMUSSEN, C. P. The effect of combined therapies on recovery after acquired brain injury: Systematic review of preclinical studies combining enriched environment, exercise, or task-specific training with other therapies. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 25–64, 2017.

MAROSI, K.; MATTSON, M. P. BDNF Mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 2, p. 89–98, 2014.

MARTINS-SILVA, C. et al. Polygala sabulosa A.W. Bennett extract mitigates motor and cognitive deficits in a mouse model of acute ischemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 3, p. 453–462, 2021.

MARTINS, S. C. O. et al. Guidelines for acute ischemic stroke treatment - Part I. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 70, n. 8, p. 621–629, 2012.

MARTINS, S. C. O. et al. **Manual de rotinas para atenção ao AVC** Ministério da Saude, 2013. Disponível em: <<http://www.redebrasilavc.org.br/para-profissionais-de-saude/manual-de-rotinas/>>

MOON, H. S.; DINCER, F.; MANTZOROS, C. S. Pharmacological concentrations of irisin increase cell proliferation without influencing markers of neurite outgrowth and synaptogenesis in mouse H19-7 hippocampal cell lines. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 62, n. 8, p. 1131–1136, 2013.

NIE, J.; YANG, X. Modulation of Synaptic Plasticity by Exercise Training as a Basis for Ischemic Stroke Rehabilitation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 1, p. 5–16, 2017.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697–709, 2006.

O'COLLINS, V. E. et al. Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 585–597, 2012.

PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **BMJ Open Science**, v. 4, n. 1, 2020.

PLOUGHMAN, M. et al. Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 11, p. 3453–3460, 2007.

PLOUGHMAN, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 40, n. 4, p. 1490–1495, 2009.

POWERS, W. J. et al. 2015 American Heart Association/American stroke association focused update of the 2013 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke regarding endovascular treatment: A guideline for healthcare professionals from the American . **Stroke**, v. 46, n. 10, p. 3020–3035, 2015.

- QIN, H. et al. Environmental enrichment for stroke and other non-progressive brain injury. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2021, n. 11, 2021.
- RAIMONDO, D. DI et al. Role of regular physical activity in neuroprotection against acute ischemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 1–31, 2020.
- REIS, M. et al. Análise do gasto ambulatorial do acidente vascular cerebral na perspectiva do sistema público. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 10, n. 32, p. 219–225, 2018.
- ROJAS-CARVAJAL, M. et al. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. **Animal Behaviour**, v. 137, p. 225–235, 2018.
- ROSENZWEIG, M. R. et al. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain Research**, v. 153, p. 563–576, 1978.
- RÖTHER, J.; FORD, G. A.; THIJS, V. N. S. Thrombolytics in acute ischaemic stroke: Historical perspective and future opportunities. **Cerebrovascular Diseases**, v. 35, n. 4, p. 313–319, 2013.
- SAKALEM, M. E. et al. Environmental enrichment and physical exercise revert behavioral and electrophysiological impairments caused by reduced adult neurogenesis. **Hippocampus**, v. 27, n. 1, p. 36–51, 2017.
- SANTOS, L. B.; WATERS, C. Perfil epidemiológico dos pacientes acometidos por acidente vascular cerebral: revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 2749–2775, 2020.
- SAUNDERS, D. H. et al. Physical fitness training for stroke patients. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2020, n. 3, p. 1–3, 2020.
- SAVER, J. . et al. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for Extended Window Acute Stroke Therapy Trials. **Stroke**, v. 40, n. 7, p. 2594–2600, 2009.
- SCHMIDT, A. et al. Meta-analysis of the efficacy of different training strategies in animal models of ischemic stroke. **Stroke**, v. 45, n. 1, p. 239–247, 2014.
- SCHNEIDER, A. et al. Forced arm use is superior to voluntary training for motor recovery and brain plasticity after cortical ischemia in rats. **Experimental and Translational Stroke Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2014.
- SCHÖNFELD, L. M. et al. Evaluating rodent motor functions: Which tests to choose? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 83, n. October, p. 298–312, 2017.
- SCHRIJVER, N. C. A. et al. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 209–224, 2002.
- SEO, D. Y. et al. Humanized animal exercise model for clinical implication. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 466, n. 9, p. 1673–1687, 2014.
- SIRSAT, M. S.; FERMÉ, E.; CÂMARA, J. Machine Learning for Brain Stroke: A Review. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 10, 2020.
- SLEIMAN, S. F.; CHAO, M. V. Downstream Consequences of Exercise Through the Action of BDNF. **Brain Plasticity**, v. 1, n. 1, p. 143–148, 2016.
- STANNE, T. M. et al. Low circulating acute brain-derived neurotrophic factor levels are associated with poor long-term functional outcome after ischemic stroke. **Stroke**, v. 47, n.

7, p. 1943–1945, 2016.

STEPHAN, J. S.; SLEIMAN, S. F. Exercise Factors Released by the Liver, Muscle, and Bones Have Promising Therapeutic Potential for Stroke. **Frontiers in Neurology**, v. 12, n. May, 2021.

STRICKLAND, J. C.; SMITH, M. A. Animal models of resistance exercise and their application to neuroscience research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 273, p. 191–200, 2016.

TANG, Y. et al. Delayed exposure to environmental enrichment improves functional outcome after stroke. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 140, n. 2, p. 137–143, 2019.

THOMALLA, G. et al. Intravenous alteplase for stroke with unknown time of onset guided by advanced imaging: systematic review and meta-analysis of individual patient data. **The Lancet**, v. 396, n. 10262, p. 1574–1584, 2020.

TIJSEN, L. M. J. et al. Challenging rehabilitation environment for older patients. **Clinical Interventions in Aging**, v. 14, p. 1451–1460, 2019.

TRAYSTMAN, R. J. Animal models of focal and global cerebral ischemia. **ILAR Journal**, v. 44, n. 2, p. 85–95, 2003.

VAHID-ANSARI, F.; LAGACE, D. C.; ALBERT, P. R. Persistent post-stroke depression in mice following unilateral medial prefrontal cortical stroke. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 8, p. e863-11, 2016.

VAN EEDEN, M.; VAN HEUGTEN, C. M.; EVERS, S. M. A. A. The economic impact of stroke in the Netherlands: The €-restore4stroke study. **BMC Public Health**, v. 12, n. 1, p. 122, 2012.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427–13431, 1999.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191–198, 2000.

VENNA, V. R. et al. Social interaction plays a critical role in neurogenesis and recovery after stroke. **Translational Psychiatry**, v. 4, n. November 2013, 2014.

VIDALE, S. et al. Postischemic inflammation in acute stroke. **Journal of Clinical Neurology (Korea)**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2017.

WOLFE, C. D. A. The impact of stroke. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 275–286, 2000.

WRANN, C. D. et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 649–659, 2013.

WU, X. et al. The roles of thrombospondins in hemorrhagic stroke. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

XING, C. et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 7, n. 5, p. 378–385, 2012.

XU, L. et al. Moderate exercise combined with enriched environment enhances learning and memory through bdnf/trkb signaling pathway in rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, 2021.

YU, K. et al. Enriched environment induces angiogenesis and improves neural function outcomes in rat stroke model. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 347, n. 1–2, p. 275–280, 2014.

ZHANG, L. et al. An Animal Trial on the Optimal Time and Intensity of Exercise after Stroke. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 52, n. 8, p. 1699–1709, 2020.

ZHANG, P. et al. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. **Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2013.

ZHANG, X. et al. Differential Effects of Physical and Social Enriched Environment on Angiogenesis in Male Rats After Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 15, n. March, p. 1–12, 2021.

ZHENG, G. et al. Aerobic Exercises for Cognition Rehabilitation following Stroke: A Systematic Review. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 11, p. 2780–2789, 2016.