



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Marina Pacheco Leardini Tristão

**Efeitos do exercício físico sobre a microcirculação cerebral em um modelo
de hipoperfusão cerebral em ratos**

Rio de Janeiro

2015

Marina Pacheco Leardini Tristão

Efeitos do exercício físico sobre a microcirculação cerebral em um modelo de hipoperfusão cerebral em ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

Coorientadora: Dra. Vanessa Estato de Freitas Almeida

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T838 Tristão, Marina Pacheco Leardini.
Efeitos do exercício físico sobre a microcirculação cerebral em um modelo de hipoperfusão cerebral em ratos / Marina Pacheco Leardini Tristão. – 2015
73 f.

Orientador: Eduardo Vera Tibiriça.
Coorientadora: Vanessa Estado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Exercícios físicos - Teses. 2. Cérebro - Vasos sanguíneos - Teses. 3. Microcirculação - Teses. 4. Sistema nervoso – Degeneração - Teses. I. Tibiriça, Eduardo Vera. II. Estado, Vanessa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 613.71

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marina Pacheco Leardini Tristão

Efeitos do exercício físico sobre a microcirculação cerebral em um modelo de hipoperfusão cerebral em ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de maio de 2015.

Orientador: Dr. Eduardo Vera Tibiriçá
Fundação Oswaldo Cruz

Coorientadora: Dra. Vanessa Estado de Freitas Almeida
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Paulo de Tarso Veras Farinatti
Instituto de Educação Física e Desportos - UERJ

Prof.^a Dra. Maria das Graças Coelho de Souza
Laboratório de Biologia Vascular – UERJ

Prof.^a Dra. Juliana Pereira Borges
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aquele que alguns chamam de Deus, mas que acredito ser uma energia muito forte, inteligência suprema capaz de colocar pessoas tão especiais no meu caminho, como a minha família, meus amigos, professores e funcionários do Pavilhão Ozório de Almeida (Fiocruz) e os da Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, que de alguma forma auxiliaram o meu caminho.

Eduardo Tibiriçá e Vanessa Estado, muito obrigada pelo apoio, confiança, dedicação e paciência que tiveram comigo. Aos amigos do laboratório de investigação cardiovascular, em especial Bárbara Antunes, Beatriz Gonzaga, Edgar Flores, Fabiana Gomes, Juliana Borges, Laura Coelho, Líndice Mitie, Nathalie Obadia e Raquel Rangel (obrigada pela PCR !!), que me ajudaram nos experimentos, nos estudos e que tornaram o ambiente da pesquisa tão agradável!

Agradeço também a amizade, o companheirismo e o carinho dos grandes amigos que fiz ao longo do mestrado: Alessandro Nascimento, Anissa Daliry, Felipe Freitas e Vanessa Estado, obrigada por tudo!

RESUMO

TRISTÃO, Marina Pacheco Leardini. *Efeitos do exercício físico sobre a microcirculação cerebral em um modelo de hipoperfusão cerebral em ratos*. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A diminuição no fluxo sanguíneo cerebral pode estar relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a demência que pode ser caracterizada por prejuízos na memória e na cognição. Atualmente o exercício físico vem sendo proposto como uma ferramenta capaz de auxiliar na saúde e função cerebral, no entanto os mecanismos envolvidos ainda não estão muito claros. O presente trabalho investigou os efeitos de um modelo experimental de hipoperfusão cerebral por oclusão bilateral das carótidas comuns (2VO) em ratos Wistar adultos e os efeitos do exercício físico moderado de curto prazo (uma semana), quando iniciado de durante a fase aguda da hipoperfusão cerebral (intervenção precoce) ou na fase crônica (intervenção tardia) sobre os parâmetros microcirculatórios e inflamatórios. A hipoperfusão cerebral nos animais sedentários foi capaz de reduzir a densidade capilar funcional cerebral e o fluxo sanguíneo cerebral e aumentar a interação leucócito-endotélio em vênulas cerebrais. Além disso, foram observados aumentos não significativos estatisticamente, da expressão gênica de NADPH-oxidase e de IL-6 no cérebro dos animais 2VO. A intervenção precoce com o exercício físico foi capaz de reverter os danos na densidade capilar funcional cerebral e na adesão dos leucócitos e melhora na expressão gênica da eNOS. Embora na fase tardia da hipoperfusão cerebral não sejam mais evidentes as alterações na microcirculação e no perfil inflamatório cerebrais dos animais 2VO, a intervenção tardia não induziu alterações significativas nos parâmetros analisados. Conclui-se que as alterações microcirculatórias e inflamatórias cerebrais são desencadeadas na fase inicial da hipoperfusão cerebral. Sendo assim, a intervenção precoce do exercício físico pode ser considerada uma abordagem preventiva para doenças neurodegenerativas decorrentes da hipoperfusão cerebral crônica.

Palavras-chave: Exercício físico. Microcirculação cerebral. Interação leucócito-endotélio.

Doenças neurodegenerativas.

ABSTRACT

TRISTÃO, Marina Pacheco Leardini. *Effects of physical exercise on brain microcirculation in a cerebral hypoperfusion model in rats*. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The decrease in cerebral blood flow is an important risk factor for dementia and cognitive dysfunctions. Currently, exercise has been proposed as an ameliorative intervention to promote better functioning of brain, however the mechanisms are not yet clear. The aims of this study was to investigated the effects of an experimental model of cerebral hypoperfusion by bilateral occlusion of the common carotid (2VO), and the impact of early versus late short-term-moderate exercise on brain microcirculatory and inflammatory parameters in rats after brain hypoperfusion. This 2VO model was able to decrease brain functional capillary density and cerebral blood flow, increase leukocyte-endothelial interactions, and although not significant, induced increases of gene expression of NADPH oxidase and IL-6. Early intervention with physical exercise was able to reverse the alterations in brain functional capillary density and adherent leukocyte-endothelial interactions and increases of gene expression of eNOS. Although in the late phase of cerebral hipoperfusion functional and inflammatory changes in brain microcirculation are no longer evident, the late exercise intervention did not induced significant alterations in the analyzed parameters. We concluded that the cerebral microcirculatory and inflammatory changes are triggered in first days after 2VO and therefore, early exercise intervention can be considered a preventive approach for neurodegenerative diseases caused by chronic cerebral hipoperfusion.

Keywords: Physical exercise. Cerebral microcirculation. Leukocyte-endothelial interactions. Neurodegenerative disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Resumo das fases após a 2VO	17
Figura 2 -	Pletismógrafo Caudal	26
Figura 3 -	Divisão dos grupos experimentais	27
Figura 4 -	Esteira de treinamento adaptada para ratos	28
Figura 5 -	Fotomicrografia representativa da microcirculação cerebral de rato Wistar Kyoto	29
Figura 6 -	Imagem representativa da interação leucócito-endotélio.....	30
Figura 7 -	Imagem representativa da densidade capilar estrutural	32
Figura 8 -	Protocolo experimental.....	34
Figura 9 -	Efeito agudo da 2VO no fluxo sanguíneo cerebral	36
Figura 10 -	Imagens do fluxo sanguíneo cerebral por LSCI de animais dos grupos estudados	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca antes e 48 horas após o procedimento de hipoperfusão cerebral (2VO) ou cirurgia fictícia (Sham) em animais WKY.....	37
Gráfico 2 -	Densidade capilar funcional após 10 de 2VO em ratos Sham ou 2VO.....	38
Gráfico 3 -	Interação leucócito-endotélio após 10 dias de 2VO em ratos Sham ou 2VO.....	39
Gráfico 4 -	Fluxo sanguíneo cerebral após 10 dias de 2VO em ratos Sham ou 2VO	39
Gráfico 5 -	Densidade capilar estrutural após 10 dias de 2VO em ratos Sham ou 2VO.....	40
Gráfico 6 -	Análise de RT-PCR após 10 dias de 2VO em ratos Sham ou 2VO	41
Gráfico 7 -	Teste incremental máximo.....	42
Gráfico 8 -	Média da intensidade do treino (60%) com base no TIM	43
Gráfico 9 -	Pressão arterial sistólica após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo.....	45
Gráfico 10 -	Frequência cardíaca após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	46
Gráfico 11 -	Pressão arterial sistólica após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo.....	47
Gráfico 12 -	Rolamento de leucócitos após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo.....	49
Gráfico 13 -	Adesão de leucócitos à parede das vênulas após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	50
Gráfico 14 -	Fluxo sanguíneo cerebral após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	52
Gráfico 15 -	Densidade capilar estrutural após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	54
Gráfico 16 -	Análises de RT-PCR após 7 dias de exercício físico ou sedentarismo em ratos Sham ou 2VO.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência dos primers utilizados	33
Tabela 2 -	Média da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo.....	42
Tabela 3 -	Velocidade média do treinamento físico para cada grupo	43
Tabela 4 -	Média da pressão arterial sistólica após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	44
Tabela 5 -	Média da frequência cardíaca após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	45
Tabela 6 -	Densidade capilar funcional após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	47
Tabela 7 -	Rolamento de leucócitos após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo	48
Tabela 8 -	Efeito de 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo sobre a adesão de leucócitos nas vênulas cerebrais	50
Tabela 9 -	Efeito do treinamento físico ou sedentarismo sobre o fluxo sanguíneo cerebral de animais submetidos à hipoperfusão cerebral crônica	51
Tabela 10 -	Densidade capilar estrutural do cérebro de animais 2VO ou sham submetidos ao treinamento físico ou sedentarismo	54
Tabela 11 -	Expressão gênica da enzima e-NOS após o protocolo de treinamento.....	56
Tabela 12 -	Expressão gênica da enzima NADPH-oxidase após o protocolo de treinamento	56
Tabela 13 -	Expressão gênica da IL-6 após o protocolo de treinamento.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2VO	Oclusão de dois vasos (<i>Two vessel occlusion</i>)
APU	Unidades arbitrárias de perfusão (<i>arbitrary perfusion units</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
AVE	Acidente vascular encefálico
BCCAO	Oclusão bilateral das carótidas comuns (<i>Bilateral carotid common artery</i>)
BHE	Barreira hematoencefálica
BPM	Batimentos por minuto
CBF	Fluxo sanguíneo cerebral (<i>cerebral blood flow</i>)
Ex	Exercício
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HIIT	Treino intervalado de alta intensidade (<i>High intensity interval training</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM	Molécula de adesão intercelular (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IL	Interleucina
LSCI	Laser speckle com contraste de imagem (<i>laser speckle contrast imaging</i>)
MCAO	Oclusão da artéria cerebral média (<i>middle cerebral artery occlusion</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PECAM	Moléculas de adesão plaquetária (<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
ROI	Região de interesse (<i>Region of interest</i>)
Sed	Sedentário
SNC	Sistema nervoso central
TIM	Teste incremental máximo
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão celular-vascular (<i>vascular adhesion molecule</i>)
VO ₂ máx	Consumo máximo de oxigênio
WKY	Wistar Kyoto

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
β	Beta
mL	Mililitro
cm	Centímetro
mm ²	Milímetro quadrado
α	Alfa
n	Tamanho amostral
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	JUSTIFICATIVA	23
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivo específico	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Animais	25
3.2	Medidas hemodinâmicas	25
3.3	Modelo de hipoperfusão cerebral: procedimento cirúrgico de Oclusão bilateral das carótidas comuns (two vessel occlusion, 2VO)	26
3.4	Protocolo experimental de exercício físico	27
3.5	Teste Incremental Máximo e Protocolo de Treinamento Físico	27
3.6	Microscopia Intravital Cerebral por Epi-Iluminação e Florescência	28
3.6.1	<u>Análise da Densidade Capilar Funcional (DCF)</u>	29
3.6.2	<u>Avaliação da Interação Leucócito-endodélio</u>	30
3.7	Avaliação do Fluxo Sanguíneo Microvascular Cerebral por Fluxometria à Laser	30
3.8	Análise histológica	31
3.8.1	<u>Análise da Densidade Capilar Estrutural (DCE)</u>	32
3.9	Avaliação da Expressão Gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)	33
3.10	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Modelo de Hipoperfusão Cerebral (2VO)	35
4.1.1	<u>Confirmação do modelo de hipoperfusão cerebral</u>	35
4.2	Efeito da hipoperfusão cerebral (2VO) sobre a Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC)	36
4.3	Efeito da hipoperfusão cerebral (2VO) após 10 dias sobre a microcirculação cerebral e inflamação	37
4.3.1	<u>Análise da densidade capilar funcional cerebral (DCF)</u>	37
4.3.2	<u>Avaliação da interação leucócito-endotélio na parede vascular cerebral</u>	38

4.4	Avaliação do Fluxo Sanguíneo Cerebral.....	39
4.5	Análise da densidade capilar estrutural cerebral (DCE).....	40
4.6	Análises da expressão gênica de parâmetros inflamatórios no cérebro de animais submetidos à 2VO.....	40
4.7	Parâmetros do Exercício Físico.....	41
4.7.1	<u>Resultado do Teste Incremental Máximo (TIM) e Velocidade Média dos Treinamentos.....</u>	41
4.8	Efeito do treinamento físico iniciado de forma precoce ou tardia sobre os parâmetros hemodinâmicos de animais submetidos à 2VO.....	44
4.8.1	<u>Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC).....</u>	44
4.9	Efeitos do treinamento físico iniciado de forma precoce ou tardia sobre a microcirculação cerebral de animais submetidos à hipoperfusão cerebral...	46
4.9.1	<u>Densidade Capilar Funcional.....</u>	46
4.9.2	<u>Interação Leucócito-Endotélio: Rolamento e Adesão.....</u>	48
4.9.3	<u>Avaliação do Fluxo Sanguíneo Cerebral por LSCI com contraste de imagem após 7 dias de exercício físico.....</u>	51
4.9.4	<u>Densidade Capilar Estrutural (DCE).....</u>	53
4.10	Efeitos da intervenção do exercício físico precoce ou tardio sobre a expressão gênica de parâmetros inflamatórios no cérebro de animais submetidos à 2VO.....	55
5	DISCUSSÃO.....	58
	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

INTRODUÇÃO

As alterações no fluxo sanguíneo cerebral (FSC) podem estar relacionadas com distúrbios neurológicos, sendo a causa ou um fator coadjuvante para o seu desenvolvimento. Relatos da literatura apontam a relação entre a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral, a demência e o envelhecimento (1, 2). Em um estudo feito com adultos entre 18 e 72 anos de idade de ambos os sexos, foi verificada uma relação entre a queda do fluxo sanguíneo cerebral e a idade, corroborando a relação entre o envelhecimento e a redução da perfusão sanguínea cerebral (3).

O envelhecimento é um dos principais fatores de risco para a degeneração neurológica que pode ser resultado de alterações vasculares, neurodegenerativas ou ambas. No entanto, muitos fatores de risco modificáveis como o diabetes mellitus, a hipertensão arterial, a obesidade e o sedentarismo aumentam as chances do desenvolvimento do déficit cognitivo e principalmente para o tipo de demência mais comum, a Doença de Alzheimer (2, 4, 5).

Atualmente, o aumento da população idosa se faz presente não só em países desenvolvidos, como também nos países em desenvolvimento como o Brasil (6). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida do brasileiro cresceu 12,4 anos entre 1980 e 2013, representando um aumento de 13% da população, totalizando 26,1 milhões de pessoas idosas (IBGE).

A queda no fluxo sanguíneo cerebral e todas as alterações desencadeadas por essa condição são fatores preponderantes em diversos tipos de demência (1, 2, 7). No ano de 2010, 35 milhões de pessoas foram diagnosticadas com demência e estima-se que este número duplicará em 2030 (Organização Mundial da Saúde, OMS). Sendo assim, torna-se importante o estudo dos mecanismos envolvidos nesse processo isquêmico e, portanto, o uso de ferramentas terapêuticas alternativas, como o exercício físico, que possam amenizar ou reverter o quadro de hipoperfusão cerebral evitando no futuro, o impacto socioeconômico negativo dos agravos desse processo na memória, no comportamento e na cognição.

Embora o cérebro represente apenas 2% do peso corporal total e seu consumo seja de 15-20% do débito cardíaco, ele é considerado um órgão com uma grande demanda metabólica. Em um adulto normal, o fluxo sanguíneo cerebral varia entre 50 a 60ml/100 g de tecido/min e o consumo de glicose cerebral em torno de 23 μ mol/100 g de tecido/ min, normalmente, cerca de 15% da glicose no sangue arterial. Portanto, o aporte sanguíneo

constante tanto para o fornecimento adequado de glicose e oxigênio quanto para a retirada de metabólitos, garantem a manutenção da estrutura e função neuronal (5, 8, 9).

O metabolismo cerebral é predominantemente aeróbio, já que não é capaz de armazenar oxigênio e possui uma pequena reserva de glicogênio. Sendo assim, necessita de um fornecimento constante de nutrientes do sangue, principalmente glicose, para a manutenção da síntese de neurotransmissores, do potencial da membrana, ou seja, a homeostase do microambiente cerebral (5, 9, 10). O cérebro é um tecido vulnerável às mudanças nos níveis de oxigênio e glicose, por exemplo, e a interrupção desses nutrientes em um evento isquêmico pode conduzir a um quadro de depleção energética de forma rápida podendo gerar lesão cerebral (11, 12).

A revisão de Paulson (2002) (9) defende que a circulação cerebral se ajusta às demandas metabólicas do tecido e o estudo de Otori *et al.* (2003)(13), demonstrou que as áreas corticais dentre outras eram as que mais utilizavam a glicose e curiosamente eram também as áreas com maior fluxo sanguíneo, ressaltando a importância da relação entre o metabolismo cerebral e o fluxo sanguíneo.

Estudos apontam que a hipoperfusão cerebral crônica, caracterizada pela redução moderada, porém persistente no FSC, está relacionada com o desenvolvimento e a progressão da disfunção cognitiva e da demência vascular (2, 14-16) e a hipoperfusão sanguínea principalmente no córtex parietal e temporal está bem estabelecida com a Doença de Alzheimer (1, 17, 18).

A microcirculação é a parte da circulação sistêmica e pulmonar especialmente adaptada para a nutrição dos tecidos e remoção dos produtos de excreção celular, ou seja, as trocas do sangue com os tecidos (19, 20). O limite entre a macro e microcirculação não possui uma definição exata, porém usualmente classificam-se como microvasos, aqueles que possuem diâmetros inferiores a 150 μm (20).

Pelo fato da organização do leito microvascular ser semelhante a uma estrutura arborescente, as divisões vasculares sucessivas definem as diferentes ordens de arteríolas, com suas estruturas e funções características (20). Os capilares são ramificações de arteríolas e apresentam um diâmetro entre 3-7 micrômetros enquanto que as arteríolas entre 80-100 micrômetros de diâmetro (19). A presença e a necessidade dos capilares é tão evidente que nenhuma célula funcional está a uma distância maior do que 20-30 micrômetros de um capilar (21).

No cérebro, a presença da homeostase no microambiente cerebral garante o bom funcionamento dos neurônios que desempenham funções de comunicação entre eles e entre as

células da glia (células de defesa no sistema nervoso), assim como a liberação de neurotransmissores e a propagação dos impulsos elétricos ao longo dos dendritos e axônios. A fim de garantir o equilíbrio no microambiente e no metabolismo cerebral, a barreira hematoencefálica exerce um importante papel na circulação cerebral (9). É uma estrutura membranar que protege o Sistema Nervoso Central (SNC) de substâncias químicas presentes no sangue. Formada pela presença de junções endoteliais que controlam a abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula. Essas junções são compostas de diferentes complexos multi-protéicos, como as junções oclusivas ou zônula de oclusão (*tight junctions*), e junções aderentes que são os principais reguladores da permeabilidade seletiva celular. A permeabilidade seletiva da BHE acrescenta dificuldade às moléculas penetrarem nesta barreira, de modo que, somente a água, gases como oxigênio e o dióxido de carbono e determinadas moléculas lipossolúveis pequenas podem passar de forma íntegra. As moléculas hidrofílicas, que são essenciais para o metabolismo do cérebro, tais como íons, glicose, aminoácidos e componentes de ácido nucléico, passam pela BHE através de canais especializados e pela difusão facilitada (5, 9, 22).

Quanto maior for a necessidade metabólica de um tecido, maior é a demanda de oxigênio e nutrientes, e portanto, maior é o recrutamento de capilares. Alterações na parede dos vasos, como o aumento de fibras de colágeno e de componentes da matriz extracelular estão presentes em quadros de arteriosclerose cerebral, constrição focal e o envelhecimento, resultando na perda da distensão e elasticidade dos vasos podendo prejudicar a perfusão cerebral. As mudanças microvasculares no tecido cerebral causam irregularidades na permeabilidade da barreira hematoencefálica afetando a nutrição tecidual e conseqüentemente a dinâmica e o funcionamento da unidade neurovascular. Essas as alterações vasculares podem levar ao comprometimento do fluxo sanguíneo cerebral (5).

Modelo Experimental de Hipoperfusão Cerebral Crônica

Ao longo da última década, a hipoperfusão cerebral crônica vem sendo apontada como um fator preditor para as alterações neurodegenerativas, cujas conseqüências mais comuns são a disfunção cognitiva, e a doença de Alzheimer (1, 2, 14, 15, 23).

O modelo experimental de oclusão bilateral das carótidas comuns, que pode ser denominado como 2VO (*two vessel occlusion*; oclusão de dois vasos) ou BCCAO (*bilateral*

common carotid artery occlusion; oclusão bilateral das carótidas comuns) é um modelo de isquemia moderada, comumente usada para investigar os mecanismos fisiopatológicos induzidos por uma hipoperfusão cerebral crônica, e assim possibilitar a avaliação dos efeitos de intervenções terapêuticas (1, 2, 14, 15, 23, 24). Este modelo é caracterizado por uma isquemia global, não apresentando sinais evidentes de disfunção motora ou convulsões, não sendo caracterizado assim como um modelo de acidente vascular encefálico (AVE), no qual há uma isquemia focal (2, 25). Nesse trabalho utilizamos “2VO” para denominar “hipoperfusão cerebral”.

Um estudo em roedores conduzido por Otori e colaboradores (2003) (13), acompanhou o fluxo sanguíneo cerebral durante dois dias, 1, 4 e 8 semanas após a 2VO. Eles observaram que o fluxo sanguíneo cerebral foi reduzido entre 33-58% em algumas áreas como no córtex frontal, parietal, temporal e occipital, substância branca e corpo caloso após dois dias. A partir da 1ª semana iniciava-se a recuperação, porém os valores do fluxo sanguíneo cerebral ainda eram significativamente baixos. Na 4ª semana, o fluxo sanguíneo foi parcialmente restabelecido em todas as regiões e o retorno do fluxo sanguíneo aos valores basais só ocorreu na 8ª semana. Corroborando com estes achados, os estudos de Schmidt-Kaster *et al.* (2001) (16) e o de Tomimoto *et al.* (2003) (26) mostram que a recuperação do FSC após a 2VO inicia-se de forma gradual na primeira semana, e que 4 semanas após ainda apresentavam valores significativamente inferiores quando comparados com os animais controle.

A hipoperfusão cerebral crônica induzida pelo modelo 2VO pode ser dividida em três fases: aguda, crônica e de restituição ou recuperação. A primeira delas apresenta uma queda acentuada na perfusão cerebral que persiste até o terceiro dia de isquemia, conduzindo um quadro de hipóxia-isquêmica. A fase crônica pode permanecer até aproximadamente entre a oitava e décima segunda semana e é a que se assemelha com a diminuição do fluxo sanguíneo no envelhecimento humano e a demência, nessa fase o processo neurodegenerativo é mais extenso. E por fim, a fase final onde ocorre a restituição do fluxo sanguíneo cerebral (2). As fases deste modelo estão exemplificadas na figura a seguir.

Figura 1 - Resumo das fases após a 2VO



Legenda: A primeira fase denominada, fase aguda; a segunda denominada como fase crônica e a última fase, restituição do fluxo. FSC=fluxo sanguíneo cerebral; 2VO= *two vessel occlusion* (oclusão de dois vasos) (2).

Consequências hemodinâmicas e inflamatórias da hipoperfusão cerebral crônica

Após a oclusão bilateral das carótidas comuns, é observado o aumento da pressão arterial sistêmica, que pode ser explicado como um mecanismo de retrocontrole dos barorreceptores, localizados no seio carotídeo, que respondem às mudanças no estiramento e à pressão. A queda drástica de fluxo sanguíneo que ocorre após a oclusão desses vasos desencadeia uma ativação dos barorreceptores que então aumentam o tônus simpático, iniciando uma resposta hipertensiva. O aumento entre 10-20 mmHg na pressão arterial foi observado em alguns estudos, sendo mantido por até 9 semanas após a oclusão bilateral das carótidas, sugerindo uma ativação persistente no tônus simpático (2, 13).

O hipocampo é local mais estudado nesse modelo, por ser a região cerebral envolvida no processo de consolidação de memória, assim como uma das áreas mais sensíveis à isquemia (2). No trabalho de Ohtaki e colaboradores (2006) (27), foi analisada a morte neuronal em animais submetidos à 2VO até a 4ª semana. A presença de morte neuronal no hipocampo foi vista em aproximadamente 36% dos animais uma semana após a 2VO, aumentou para 57% dos animais na segunda semana e se manteve até quarta semana. No neocórtex dos animais não foi observado morte neuronal na primeira semana, porém foi aumentando gradualmente para 28% dos animais na segunda semana e na quarta semana, 54% dos animais apresentavam neurodegeneração do neocórtex. O dano neuronal também foi visto após 12 semanas de 2VO, no córtex e hipocampo de ratos (28), sugerindo que o dano

neuronal acontece de forma gradual (2, 29). Ainda é incerto quanto ao tipo de morte neural, apoptose ou necrose, mas como o fator chave para o seu desencadeamento é a quantidade de ATP e que durante a fase aguda há uma queda acentuada deste nucleotídeo, é provável que a necrose predomine nesta fase, enquanto a morte por apoptose ocorra na fase crônica. Sendo assim, não se sabe se o dano neural é induzido na fase aguda ou se é resultado de um longo período de hipoperfusão, mas é provável que ambas as fases contribuam para esse dano (2, 29).

Outra alteração neuropatológica suscetível à hipoperfusão cerebral é a ativação das células da glia (astrócitos e micróglia) (2). Um marcador de ativação dos astrócitos é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (30). Em ratos submetidos à 2VO, esse marcador se mostrou aumentado a partir da primeira semana e se manteve até o sexto mês. A redução do aporte adequado de nutrientes e a hipóxia dos neurônios, podem desencadear a ativação dos astrócitos adjacentes, ativando-os, assim como a própria auto-ativação (24).

A micróglia que é uma célula de defesa do SNC, e em condições patológicas pode se transformar em uma célula citotóxica. Qualquer sinal que desestabilize a homeostase cerebral induz a ativação da micróglia. Em ratos submetidos à 2VO sua ativação no hipocampo foi notada a partir de 20 minutos após a oclusão (31) sendo mantida até 13 semanas (2). Além disso, as células da glia podem secretar citocinas, como a Interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), durante eventos nos quais há uma perturbação na homeostase cerebral (32).

A hipoperfusão cerebral crônica induz inflamação tecidual que pode durar mais de um mês, incluindo o recrutamento de leucócitos periféricos, ativação das células da glia, liberação de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β) e IL-6 (15, 33)

Durante o processo inflamatório o recrutamento dos leucócitos da corrente sanguínea para o tecido inflamado é mediado, principalmente, por fatores inflamatórios como a IL-1 β e TNF- α . Essa interação leucócito-endotélio pode ser dividida (de forma didática) em quatro processos: marginação, rolamento (*rolling*), adesão e transmigração (34, 35).

Na marginação, ocorre o movimento dos leucócitos em direção à periferia, ou seja, à parede do vaso sanguíneo. As moléculas de adesão que intervêm nessa etapa são as selectinas: L-selectina (expressa pelos leucócitos), E-selectina (expressa pelo endotélio) e P-selectina (expressa pelas plaquetas e células endoteliais), essas duas últimas após a ativação por quimiocinas e citocinas, como o TNF- α , aumentam a sua expressão (36). O rolamento é

classificado como uma etapa de baixa afinidade entre os leucócitos e o endotélio já que os mesmos rolam em uma velocidade mais baixa do que o fluxo sanguíneo (36-38).

A adesão é um processo regulado pelas integrinas, que são proteínas de adesão presentes na membrana celular, a integrina- $\alpha 1\beta 2$ é a mais envolvida nesse processo e pode ser conhecida por CD11a/CD18, são expressas na maioria dos leucócitos e são moduladas por componentes microbianos, citocinas inflamatórias e quimiocinas (37, 39). Os receptores de interação das integrinas, presentes na superfície das células endoteliais como as ICAM (*intercelular adhesion molecule-1*) e VCAM (*vascular adhesion molecule*), proporcionam uma ligação mais forte leucócito-endotélio promovendo a adesão à parede do vaso. A transmigração (diapedese) é o estágio final no qual ocorre a passagem dos leucócitos pelas junções estreitas do endotélio até o tecido inflamado, a molécula de adesão que auxilia esse estágio é a PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) (34, 35, 38, 39). Essa interação leucócito-endotélio foi estudada por Sancesario e colaboradores, 1997 (40) que verificaram alterações locais e sistêmicas nas veias jugular e femoral após o 2VO, induzindo aumento na agregação de leucócitos em ambas as veias após 5 horas de hipoperfusão. Resultados similares são vistos em outros modelos de isquemia, como a isquemia-reperfusão e o de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) (41).

As citocinas podem ser divididas em pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, regulando de forma positiva ou negativa, respectivamente, a produção de mediadores inflamatórios (42). Níveis altos de citocinas inflamatórias podem prejudicar os circuitos neurais induzindo danos na aprendizagem, memória e plasticidade neural (43). Normalmente a ativação inflamatória é feita a partir de estímulos periféricos que ao chegarem ao cérebro ativam particularmente, a micróglia e desencadeiam a produção e a secreção de mediadores inflamatórios (43, 44). A síntese e a produção desses mediadores podem ser iniciadas no cérebro quando ocorre uma injúria tecidual, infecções ou traumas cerebrais (43). Sabendo que as injúrias cerebrais podem desencadear a produção dessas citocinas, Khojasteh *et al*, 2015 (45) demonstraram que no modelo de hipoperfusão cerebral induzido pela oclusão das duas carótidas comuns ocorre um aumento dos níveis séricos de IL-6 quando comparada com o grupo controle não isquêmico.

Três décadas após a sua descoberta, a IL-6 assume um papel versátil dentro do organismo, atuando em um estado patológico ou fisiológico (46). Em trabalhos como os de Matsuda *et al* (1996) (47) e Yamada *et al* (1994) (48) foi observado um papel neuro protetor da IL-6 (diminuição da perda de neurônios) no hipocampo de ratos. Vandenabeele e Fiers (1991) (32) propuseram que algumas citocinas, como a IL-1, IL-6 poderiam estar envolvidos na patogênese da Doença de Alzheimer. E Goldgaber *et al*. (1989) (49) sugerem que a IL-1

como responsável pelo aumento da síntese de um marcador para esta doença, a proteína amilóide β . Por outro lado, as citocinas IL-1, IL-6 também podem mostrar propriedades neuroprotetoras (43, 46, 50, 51).

Dentre outras alterações já mencionadas, o estresse oxidativo também é induzido durante um quadro de hipoperfusão cerebral crônica podendo promover a apoptose e a morte neuronal, mecanismos que estão ligados ao prejuízo cognitivo e o desenvolvimento do Alzheimer (15, 52-54). Esse desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua retirada, é cada vez mais aceito como o fator chave para o processo neurodegenerativo (7, 52, 55). Existem várias formas de verificar o estresse oxidativo, uma delas é medindo a atividade do complexo da NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Nox) uma enzima que exerce um papel importante na geração de espécies reativas de oxigênio (56). Em estudo recente foi observado que a atividade da Nox 1 no hipocampo de ratos submetidos à 2VO começou a aumentar a partir da primeira semana após a cirurgia de forma gradual até a 15ª semana acompanhado do aumento da GFAP, caspase 3, diminuição no número de neurônios no hipocampo e comprometimento cognitivo (53). Sendo assim, torna-se mais claro que os mecanismos que ocorrem na fase aguda podem interferir de maneira oxidativa e inflamatória no cérebro dos animais submetidos à 2VO e, portanto, uma intervenção que previna o estresse oxidativo e a inflamação cerebral de forma precoce pode permitir um melhor prognóstico e restabelecimento da função cerebral.

Exercício Físico como uma estratégia terapêutica

Os efeitos benéficos do exercício físico na capacidade de aprendizagem e memória vêm sendo objeto de estudo nos últimos anos (7, 57, 58). O *American College of Sports Medicine* (59) sugere que a prática de atividades físicas é uma ferramenta importante na melhora da função cognitiva, especialmente na população idosa.

Dentre as novas estratégias terapêuticas utilizadas para reduzir os danos causados pela hipoperfusão cerebral crônica, encontra-se o treinamento físico (7). Já foi demonstrado que o exercício físico regular é tido como um componente importante para um estilo de vida saudável, capaz de diminuir o risco de desenvolvimento e progressão de doenças crônicas, como diabetes mellitus e hipertensão arterial (58, 60-63). O exercício físico também pode promover benefícios na saúde cerebral como a melhora na cognição e memória (7, 64, 65),

melhora no fluxo sanguíneo cerebral (66, 67) e diminuição dos sintomas de depressão (68). No entanto, sabe-se pouco acerca dos mecanismos induzidos ou influenciados pelo exercício físico na integridade estrutural e na função da microcirculação cerebral.

Na meta-análise feita por Haykowsky e colaboradores (2011)(69), pacientes que iniciaram o programa de exercício em até uma semana depois do infarto agudo do miocárdio, tiveram melhora na recuperação quando comparados com aqueles que iniciaram a reabilitação mais tarde, entre quatro e seis semanas. A recuperação neurológica começa logo após o evento isquêmico ou hemorrágico, porém a maior parte dos pacientes que sofre um AVE apresenta desordens neurológicas. (66). Já está descrito na literatura que o início precoce do exercício físico em modelos de AVE como o de isquemia-reperfusão da MCAO têm efeitos positivos na perfusão sanguínea, na diminuição da apoptose neural e na extensão da área isquêmica, e esses efeitos foram vistos com intensidade moderada e a curto prazo (de 3 até 14 dias de exercício físico), porém a intervenção precoce no modelo 2VO nunca foi proposto (66, 70-72).

O exercício físico moderado é conhecido por reduzir os parâmetros inflamatórios e circulatórios, como a redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento das citocinas anti-inflamatórias (73-77). A contração muscular pode induzir a produção e liberação de citocinas, que são denominadas de miocinas (74, 76). Uma citocina estudada em modelos de exercício físico é a IL-6, por exercer um papel pró ou anti-inflamatório, podendo influenciar a produção de citocinas em outros órgãos e células (74-76). A IL-6 secretada pelo músculo esquelético durante e após o exercício físico inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β e em contra partida induz um aumento do fator anti-inflamatórias como a IL-1RA (antagonista do receptor da IL-1) e a IL-10, esta que inibe a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e um dos fatores de adesão celular, o ICAM (76, 77). A intensidade, a duração, o grupamento muscular e o nível de treinamento influenciam em uma maior ou menor produção da IL-6, sendo o HIIT (*high intensity interval training*, exercício intervalado de alta intensidade) o que mais auxilia nesse processo (74-76), no entanto o exercício moderado já apresenta efeitos na liberação da IL-6 pelo músculo (74-76).

Citocinas pró-inflamatórias são potentes estimuladores da produção de espécies reativas de oxigênio por células endoteliais e imunológicas induzindo a um quadro de estresse oxidativo (56, 78). Uma das adaptações do exercício físico é o aumento das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase, assim como a diminuição da NADPH-oxidase (79-81). Estudos como o de Pittaluga et al. (2015) (82) verificaram que após

4 meses de exercício moderado ocorria uma diminuição do estresse oxidativo. Azizbeigi et al. (2015) (83) sugerem que a intensidade do treinamento em exercícios de força (contra a resistência) não influencia as respostas antioxidante e inflamatória de indivíduos saudáveis, embora o exercício extenuante esteja associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (84).

O efeito do exercício aeróbio sobre a função endotelial está principalmente relacionado com a melhora na biodisponibilidade de um potente vasodilatador, o óxido nítrico (79, 85). A produção de óxido nítrico pelo endotélio é mediada pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (86), porém ainda não estão claros os mecanismos que envolvem o exercício físico e a óxido nítrico sintase (NOS) (85, 87). A literatura sugere que o aumento do débito cardíaco induzido pelo exercício físico contribui para o *shear stress* (força de cisalhamento) nos vasos sanguíneos, que por sua vez estimularia a liberação de óxido nítrico e aumento da expressão da iNOS – óxido nítrico sintase induzível (em atividades físicas extenuantes) e da eNOS (87, 88) e que no estudo de Tanaka et al (2015) (85) foi observado um aumento após uma sessão de exercício físico moderado em ratos. Por fim, a angiogênese induzida pelo exercício físico tem sido relacionada com o aumento de fatores angiogênicos (20, 79, 89). No trabalho desenvolvido por Huang *et al.* (2013) (90) foi verificado que o exercício físico durante 16 semanas foi capaz de induzir o crescimento capilar no córtex de ratos adultos. Trabalhos experimentais sustentam essa hipótese não só pelo efeito do exercício no aumento da densidade capilar (91, 92) como também um possível mecanismo entre VEGF e aumento da expressão da enzima e-NOS (93). Sendo assim o treinamento físico apresenta um efeito angiogênico, antioxidante e anti-inflamatório podendo ser utilizado como uma ferramenta terapêutica para atenuar os efeitos degenerativos associados à idade e a inflamação sistêmica.

1 JUSTIFICATIVA

O conceito de que a progressão do dano neuronal está associada ao tempo de hipoperfusão cerebral tem sido sugerido pela literatura e, portanto, a prescrição do início precoce do exercício físico pode auxiliar na recuperação de pacientes que apresentam a hipoperfusão cerebral (2).

Conhecer os efeitos da hipoperfusão cerebral crônica na microcirculação cerebral e os efeitos da intervenção com o exercício físico nestas alterações é determinante para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas para estes casos, formando assim uma possível área de atuação, para prevenir as alterações cognitivas e a sua evolução para demência. Além disso, é de grande importância verificar o efeito da intervenção com o exercício físico de início precoce e compará-lo com a intervenção de início tardio nos animais submetidos à hipoperfusão cerebral, sobre os parâmetros microcirculatórios e inflamatórios cerebrais, levando em consideração o papel crucial destes parâmetros no desenvolvimento da demência e disfunção cognitiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da intervenção precoce com o exercício físico sobre as alterações microcirculatórias e inflamatórias cerebrais de animais submetidos a um modelo de hipoperfusão cerebral crônica.

2.2 Objetivos específicos

- a) Padronizar o modelo de hipoperfusão cerebral seguida de exercício físico em ratos Wistar Kyoto;
- b) Investigar os efeitos da hipoperfusão cerebral na densidade capilar funcional e estrutural da microcirculação cerebral do córtex, no fluxo sanguíneo do córtex e no perfil inflamatório cerebral de ratos Wistar Kyoto;
- c) Comparar os efeitos da intervenção do exercício físico precoce ou tardio sobre as alterações funcionais e estruturais cerebrais induzidas pela hipoperfusão em ratos Wistar Kyoto.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados 87 ratos machos Wistar Kyoto (WKY) com idade de 12 semanas e peso aproximado de 300g, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^\circ$ C), luz (ciclos de 12h claro/escuro) e com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo número LW 14/14).

3.2 Medidas Hemodinâmicas

Os procedimentos para as medidas da pressão arterial e frequência cardíaca foram realizadas por meio do método de aferição indireta de plestimografia caudal, não oferecendo riscos para os animais (BP-2000, Visitech, USA - Figura 2). É um procedimento rápido com duração em torno de 20 minutos, e não invasivo realizado com os animais conscientes em um ambiente escuro e silencioso. Os animais foram colocados dentro de baias de contenção fornecidas pelo próprio fabricante do equipamento.

O aparelho foi ajustado para aferir 15 medidas individuais por animal, que são registradas em um computador acoplado ao aparelho, gerando médias da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). Os animais foram adaptados ao aparelho por três dias consecutivos antes da medida basal. Essa análise foi feita antes da cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns -2VO (medida basal), 48 horas após a 2VO e após os sete dias de exercício físico.

Figura 2 - Pletismógrafo Caudal



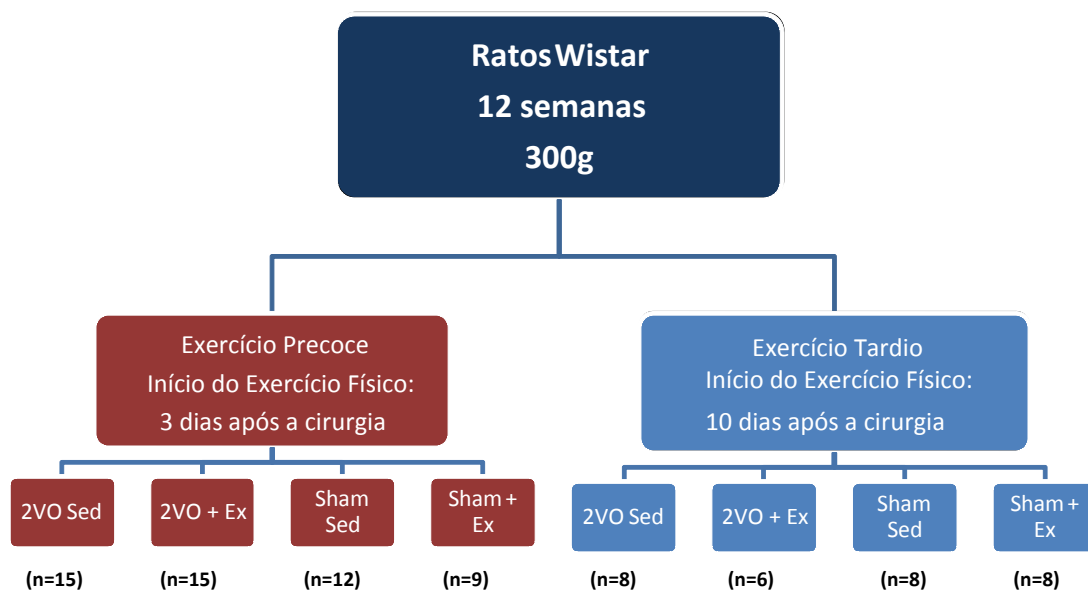
3.3 Modelo de hipoperfusão cerebral: procedimento cirúrgico de Oclusão bilateral das carótidas comuns (two vessel occlusion, 2VO)

Os animais foram anestesiados com associação de ketamina (90 mg/kg, ip) e xylazina (10 mg/kg, ip), e após a verificação da anestesia pela perda do reflexo podal através do pinçamento da pata traseira, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, submetidos à tricotomia no pescoço e, com o auxílio de um bisturi, foi realizada uma pequena incisão para o acesso das artérias carótidas comuns esquerda e direita. Em seguida, com auxílio de duas pinças, ambas as artérias foram delicadamente separadas do nervo vago e ocluídas com fio de seda 6-0 não absorvível. A sutura foi feita com fio de sutura Categute absorvível estéril 3.0. O grupo Sham também foi submetido à cirurgia, porém sem a oclusão. Logo após o procedimento, na região do dorso do animal, foram feitas as administrações subcutâneas do antibiótico meropenem (10mg/kg – dose única) e do anti inflamatório cetoprofeno (1mg/kg/dia por três dias). Após os procedimentos cirúrgicos e até o fim do protocolo experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais para amenizar o possível estresse entre eles.

3.4 Protocolo experimental de exercício físico

Os animais foram divididos de forma randomizada em dois grupos: Sham e 2VO. A partir de então, os animais foram divididos nos grupos de intervenção: (1) Grupo de Intervenção Precoce, iniciando o protocolo de exercício físico três dias após a cirurgia e (2) Grupo de intervenção Tardia, iniciando o protocolo de exercício físico dez dias após a cirurgia. E cada grupo de intervenção foi dividido em quatro subgrupos: (1) grupo Sham sedentário (Sham Sed); (2) grupo 2VO sedentário (2VO Sed); (3) grupo 2VO + exercício (2VO+Ex) e (4) grupo Sham + exercício (Sham+Ex). A divisão dos animais entre os grupos pode ser exemplificada na figura abaixo (Fig. 3). Neste trabalho, o grupo controle selecionado (Sham Sedentário) foi o Sham Sedentário Intervenção Precoce, já que não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 3- Divisão dos grupos experimentais



3.5 Teste Incremental Máximo e Protocolo de Treinamento Físico

Todos os animais foram adaptados durante três dias consecutivos na esteira ergométrica para ratos em uma velocidade de 10m/min durante 10 minutos (Modelo HT 2.0, Hectron Fitness Equipment, Rio de Janeiro, RJ - Figura 4). A fim de prescrever a intensidade

do exercício físico correta para cada animal, após a adaptação, foi realizado o teste incremental máximo (TIM). O teste foi iniciado com velocidade de 10 m/min e incrementos de 3 m/min a cada três minutos. O TIM era encerrado quando o animal chegava à exaustão e mantinha-se por mais de 5 segundos na grade de choque. Já foi demonstrado que o resultado entre o TIM e o teste de consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx) são similares garantindo assim, que a intensidade do exercício foi equivalente a 60% do consumo máximo de oxigênio (94).

O grupo de Intervenção precoce com o exercício físico realizou o TIM três dias após a cirurgia, enquanto que o grupo de Intervenção tardia com o exercício físico o realizou no décimo dia após a cirurgia. Ambos os grupos iniciaram o treinamento 24 horas após o TIM. O protocolo consistiu em um treinamento durante 7 dias, 30 minutos por dia à intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no TIM. Os animais dos grupos sedentários também foram colocados nas esteiras, mas sem estímulo para correr.

Após os sete dias de treinamento físico ou sedentarismo, os animais foram avaliados em relação aos parâmetros microcirculatórios e inflamatórios; fluxo sanguíneo cerebral e análises histológica e molecular.

Figura 4 - Esteira de treinamento adaptada para ratos



3.6 Microscopia Intravital Cerebral por Epi-Iluminação e Fluorescência

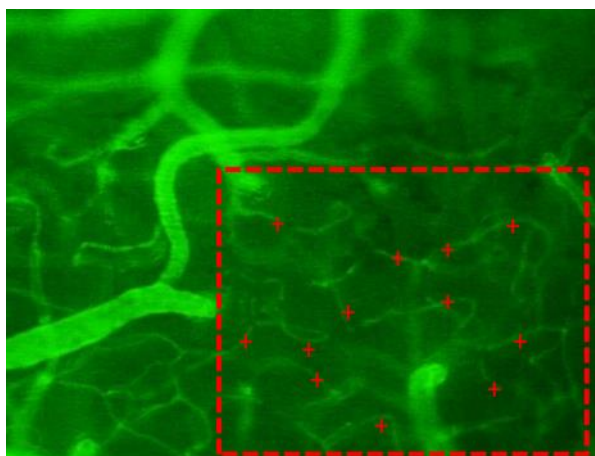
Para a visualização da microcirculação cerebral os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg), via intra peritoneal e colocados em decúbito

ventral em um aparelho estereotáxico. Com o auxílio de uma broca de alta frequência, foi feita uma janela craniana (0,5 cm² e 0,1 mm de profundidade) no osso parietal esquerdo do animal para visualização da microcirculação da superfície cerebral e observação desta no microscópio por epi-iluminação (95). Não são necessários procedimentos de hemostasia, mas caso ocorresse sangramento, utilizar-se-ia uma esponja hemostática (Hemospoon) própria para este procedimento.

3.6.1 Análise da Densidade Capilar Funcional (DCF)

Para que os vasos sanguíneos cerebrais da superfície cerebral fossem visualizados, foi administrado fluoresceína acoplada ao dextran de alto peso molecular (FITC-dextran 150) via intravenosa (veia peniana). As imagens da microcirculação foram adquiridas por meio do software Archimed 3.7.0 (Microvision, France). A contagem dos capilares foi feita com o auxílio do software Saisam 5.1.3 (Microvision, France), sendo feitas imagens seriadas com oculares de 10 x e objetivas de 10x (Olympus BX150WI, NY, U.S.A.), em quatro campos. Para cada campo, era destinado um minuto para a contagem dos capilares, obtendo ao final o número de capilares por mm². Foram quantificados os capilares que estavam continuamente perfundidos por hemácias e expressos em densidade capilar funcional média (96). A representação da DCF pode ser vista na figura 5.

Figura 5 - Fotomicrografia representativa da microcirculação cerebral de rato Wistar Kyoto

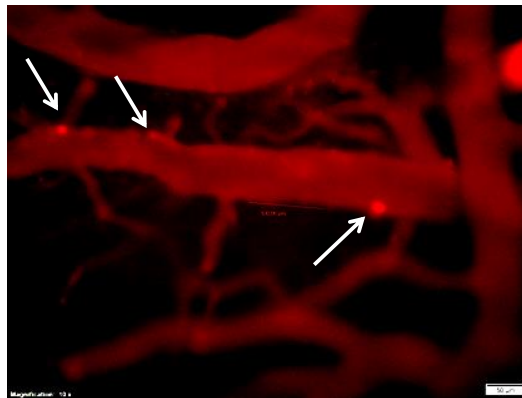


Legenda: Campo pontilhado representa a área de análise da densidade capilar funcional e cruces vermelhas marcam os capilares perfundidos. Animal controle exercitado.

3.6.2 Avaliação da Interação Leucócito-endotélio

Para marcação dos leucócitos circulantes, foi feita a administração intravenosa (veia peniana) de 0,3 mg/kg de rodamina 6G e os leucócitos com a fluorescência associada serão visualizados através da microscopia descrita acima. A interação leucócito-endotélio foi avaliada determinando o número de leucócitos aderidos à parede venular por um período de 30 segundos e o rolamento de leucócitos quando as células brancas se moveram dentro do vaso em velocidade inferior aos eritrócitos circulantes e expressos em células/min. Foram analisados vasos da superfície cerebral com diâmetros variando de 50 a 100 μm e a adesão leucocitária sendo expressa em número de células/min/100 μm . O tempo do procedimento cirúrgico total durou em média 40 minutos (95). A figura 6 representa a interação leucócito-endotélio à parede venular.

Figura 6 - Imagem representativa da interação leucócito-endotélio



Legenda: Leucócitos marcados com rodamina 6G, aderidos e/ou rolando em vênulas pós-capilares de ratos 2VO exercitados. Barra: 50 μm .

3.7 **Avaliação do Fluxo Sanguíneo Cerebral por Fluxometria à Laser**

A partir da janela craniana descrita acima, a avaliação do fluxo sanguíneo cerebral foi feita por meio da metodologia de laser speckle com contraste de imagem – LSCI (Perimed, Estocolmo, Suécia). Essa técnica permite a análise do fluxo sanguíneo em superfícies extensas sem a necessidade de administrar marcadores sistêmicos. Com o comprimento de

onda de 785 nm, o LSCI mede a velocidade média das hemácias sendo assim, consegue medir em tempo real o comportamento e a perfusão do tecido desejado (97, 98).

Com o animal ainda anestesiado e no aparelho estereotáxico, o mesmo foi colocado debaixo do feixe de raios laser a uma distância de 10 cm (recomendada pelo fabricante) entre a superfície cerebral e o emissor de luz laser. A partir disso, três áreas cerebrais foram selecionadas (ROI): (1) janela craniana com a exposição da superfície cerebral; (2) o lado oposto à janela, com o osso parietal direito intacto e (3) a pele. As imagens foram analisadas utilizando o software do mesmo fabricante (PIMSsoft, Perimed, Estocolmo, Suécia) sendo ajustadas para gravar 16 imagens por segundo.

Após a morte do animal por overdose de pentobarbital (150 mg/kg de, i.p.), imediatamente o cérebro foi retirado e dissecado. Um dos hemisférios foi fixado em solução de formalina em tampão de Millonig para análises histológicas e a outra metade foi armazenada no freezer a -80°C para análises moleculares.

3.8 Análise Histológica

Posteriormente à fixação do tecido e a lavagem das amostras em água corrente por 40 minutos, as mesmas sofreram o processamento para a inclusão de parafina a fim de tornar os fragmentos teciduais rígidos para mais tarde serem seccionados em fatias finas para coloração e análise no microscópio. Esse processamento passa por três etapas: desidratação, clarificação e impregnação.

A primeira etapa baseia-se na remoção da água dos tecidos, pois as substâncias utilizadas para inclusão em parafina não se combinam de forma homogênea com a água. O agente desidratante usado foi o álcool etílico por apresentar bons resultados e custo baixo. Nessa etapa foram utilizadas séries graduadas de etanol (70, 80, 90, 95 e 100%), para que a parafina se penetre de forma homogênea no tecido. A clarificação ou diafanização consiste em retirar completamente o álcool da etapa anterior, utilizando o Xilol (Xilol I e II) que penetra no tecido, tornando o material mais claro. Enquanto as etapas anteriores ocorreram em processadores automáticos (carrossel), a última etapa, impregnação, foi feita de forma manual com dois banhos (aproximadamente quarenta minutos cada) de parafina (parafina I e II) em estufa a 60°C (99). Após o processamento e os banhos de parafina o material foi incluído em

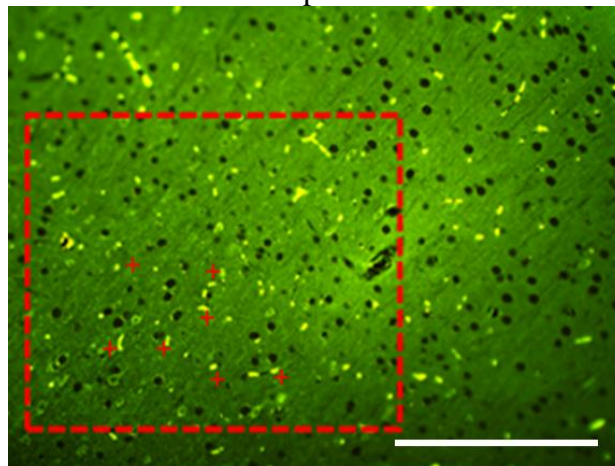
parafina líquida para, mais tarde, serem cortados em seções sagitais de 5 μm com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2125, Germany).

Para que o processo de coloração das lâminas fosse iniciado, as lâminas passaram por duas etapas: (1) desparafinização utilizando o Xilol (Xilol I e II) e a hidratação com as sequências alcoólicas decrescentes (100, 65, 90, 80 e 70%). Após esses dois processos, em uma ambiente escuro, as lâminas foram coradas com a lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada a FITC (diluição de 1:20) a qual permite a marcação de células endoteliais e portanto, vasos sanguíneos.

3.8.1 Análise da Densidade Capilar Estrutural (DCE)

A densidade capilar estrutural expressa em número de capilares por mm^2 , foi determinada e analisada usando o programa saism (100, 101) e o microscópio com epi-iluminação e fluorescência (Olympus BX150WI, NY, U.S.A) com uma objetiva 20x e um aumento total de 200x no monitor (Figura 7). A densidade capilar estrutural do cérebro foi analisada utilizando cinco campos aleatórios do córtex cerebral. Foram considerados capilares apenas os pontos fluorescentes com até 10 μm de diâmetro presentes no córtex cerebral em 1 mm^2 . Para evitar qualquer tipo de viés na análise das lâminas, a contagem dos capilares foi feita com duplo mascaramento, no qual primeiramente um avaliador fotografava as lâminas e as salvava em dois arquivos, um contendo o nome dos respectivos grupos e outro de forma alfabetada para que um segundo avaliador fizesse a contagem de forma imparcial. Após a contagem eram então reveladas as pastas alfabetadas e seus respectivos grupos.

Figura 7 - Imagem representativa da densidade capilar estrutural



Legenda: Cortes histológicos do córtex de rato WKY. Endotélio marcado com lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada a FITC. Barra: 100 μm .

3.9 Análise Molecular: avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

A avaliação da expressão gênica foi feita por meio da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). O RNA total foi isolado do hemisfério direito do cérebro dos animais utilizando o Kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit high capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems) a partir de 1 µg de RNA, em um volume final de 20 µl. Os primers para a amplificação de NADPH oxidases subunidade p47, eNOS e IL-6 estão descritos na tabela 1. A RT-PCR foi realizada com o power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as indicações do fabricante e foram realizadas na plataforma do 7500 fast (Applied Biosystems). A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada através do método de $\Delta\Delta C_t$ e normalizada pela expressão de beta-actina.

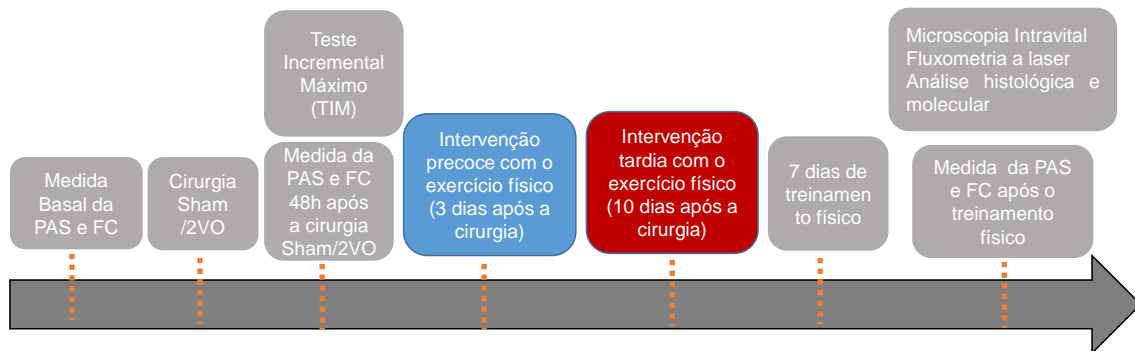
Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados

Alvo	Sequência	
NADPH oxidase p47	5' GTG AAG CCA TCG AGG TCA TTC 3'	3' CCC GCG GCT TCT AAT CTG T 5'
eNOS	5' GTA TTT GAT GCT CGG GAC TG 3'	3' AGA TTG CCT CGG TTT GTT G 5'
IL-6	5' AAT CTG CTC TGG TCT TCT TGG AG 3'	3' GTT GGA TGG TCT TGG TCC TTA G 5'
Beta-actina	5' CCACCCGCGAGTACAACCTTCTT 3'	3' GAAGCCGGCCTTGACATGCC 5'

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo. A análise do modelo (Sham vs 2VO Sedentário) foi utilizado o teste *t-Student* não pareado com pós teste Mann-Whitney e para as demais análises, com mais de 2 grupos foi feita a análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Bonferroni como pós-teste. Diferenças com valores de p menores que 0,05 foram consideradas significativas. Todos os cálculos foram realizados por análises informatizadas através do programa estatístico comercialmente disponível (Graphpad InStat e Graphpad Prism, Graphpad Software, California, USA). A seguir um resumo ilustrativo sobre a metodologia do estudo:

Figura 8 - Protocolo experimental



4 RESULTADOS

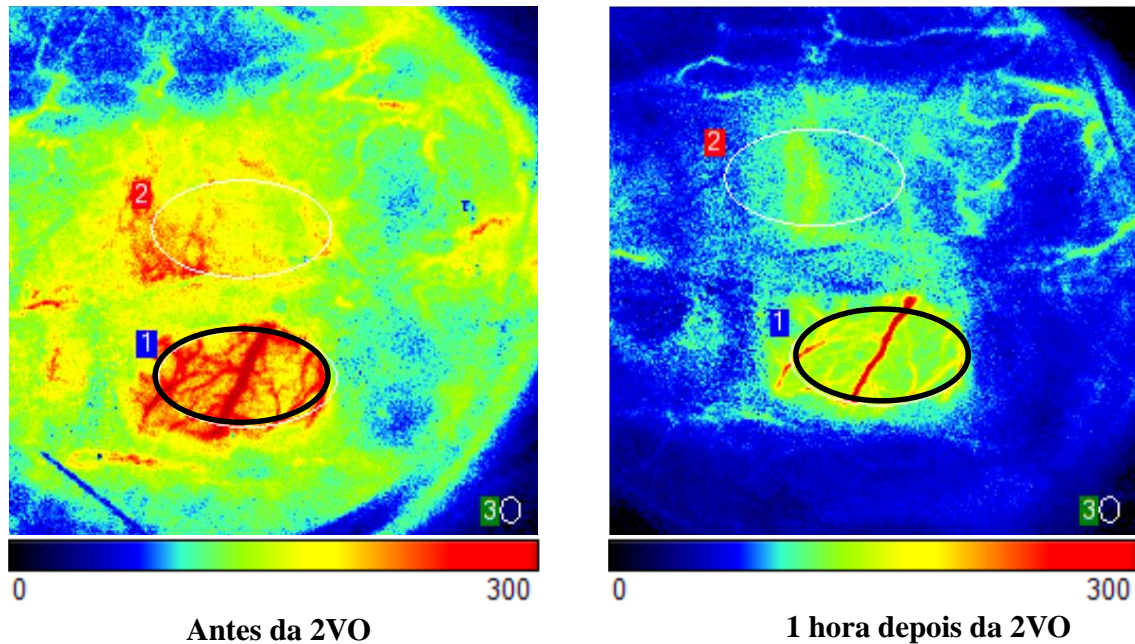
4.1 Modelo de Hipoperfusão Cerebral (2VO)

4.1.1 Confirmação do modelo de hipoperfusão cerebral

Com o objetivo de verificar a eficácia do procedimento de oclusão das carótidas comuns e se seu efeito no fluxo sanguíneo cerebral se mantinha antes dos animais serem submetidos aos treinamentos, seis animais foram selecionados de forma aleatória, para medir o impacto agudo da hipoperfusão cerebral induzida pela oclusão bilateral das carótidas comuns utilizando o LSCI.

Após os procedimentos cirúrgicos da 2VO descritos anteriormente, os animais foram submetidos à medida de fluxo sanguíneo cerebral pela técnica de LSCI com contraste de imagem. Após dez minutos foi feita a medida do fluxo sanguíneo cerebral basal (antes da 2VO), em seguida foi realizada a oclusão bilateral das carótidas comuns e a queda do fluxo foi acompanhada em tempo real. A hipoperfusão foi mensurada durante uma hora de experimento. Os três minutos finais do tempo basal e do procedimento da 2VO foram utilizados como média. Utilizando o teste pareado, observamos uma queda significativa entre os valores basais e aqueles após 1 hora da 2VO (Basal: 213 ± 10 vs. 2VO: 179 ± 14 , unidades arbitrárias de perfusão – APU, $p < 0,01$). A figura 9 ilustra a redução do fluxo sanguíneo cerebral após 1 hora de oclusão bilateral das carótidas comuns através da técnica LSCI por contraste de imagem.

Figura 9 - Efeito agudo da 2VO no fluxo sanguíneo cerebral



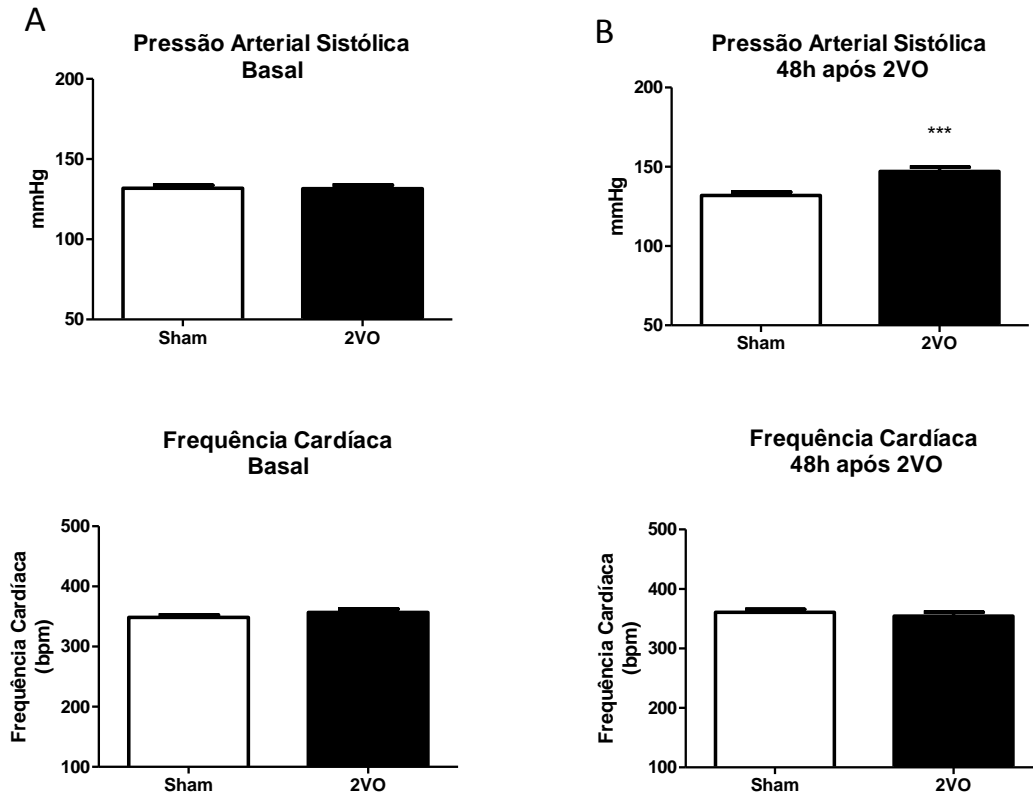
Legenda: Imagem representativa do fluxo sanguíneo cerebral medido por LSCI de rato WKY submetido a 2VO.

4.2 Efeito da hipoperfusão cerebral (2VO) sobre a Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC)

O gráfico 1A representa os valores basais de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca dos grupos Sham e 2VO. As medidas hemodinâmicas foram feitas antes da intervenção cirúrgica. Os grupos não apresentaram diferenças estatísticas tanto na PAS (Sham: 132 ± 1.8 mmHg vs 2VO: 132 ± 2.1 mmHg,) como na FC (Sham: 348 ± 4 bpm vs 2VO: 357 ± 5.7 bpm).

Os animais do grupo 2VO apresentaram aumento significativo na PAS (147 ± 2.8 mmHg, $p < 0,001$) quando comparados com o grupo Sham (132 ± 2 mmHg), porém não houve diferença significativa em relação à FC como mostra o gráfico 1B (Sham: 361 ± 5 bpm vs. 2VO 355 ± 7.0 bpm; $p < 0,05$).

Gráfico 1 - Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca antes (A) e 48 horas após (B) o procedimento de hipoperfusão cerebral (2VO) ou cirurgia fictícia (Sham) em animais WKY



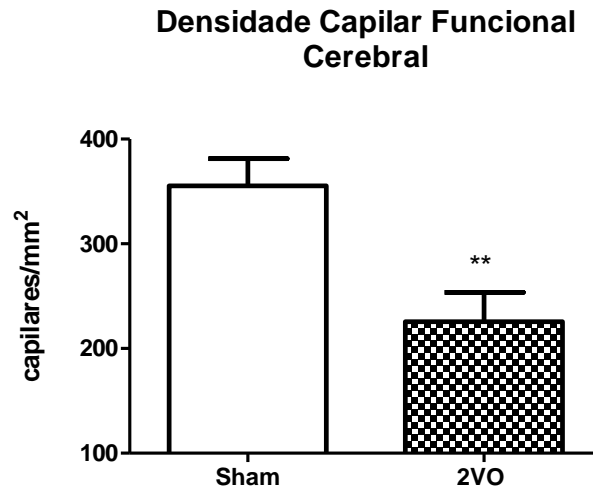
Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. de 29 animais no grupo Sham e 35 no grupo 2VO para A e 33 animais no grupo Sham e 36 animais no grupo 2VO para B. *** $p < 0,001$ teste *t-Student*. Sham: cirurgia fictícia; 2VO: animais com hipoperfusão cerebral.

4.3 Efeito da hipoperfusão cerebral (2VO) após 10 dias sobre a microcirculação cerebral e inflamação

4.3.1 Análise da densidade capilar funcional cerebral (DCF)

Através da microscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência foi possível visualizar a microcirculação cerebral, para a contagem da DCF, expressa em capilares por mm^2 . O grupo 2VO quando comparado com o grupo controle Sham (355 ± 26 capilares/ mm^2), apresentou rarefação capilar (2VO: 226 ± 28 capilares/ mm^2 , $p < 0,01$, gráfico 2).

Gráfico 2 - Densidade capilar funcional cerebral após 10 dias de 2VO em ratos Sham ou 2VO

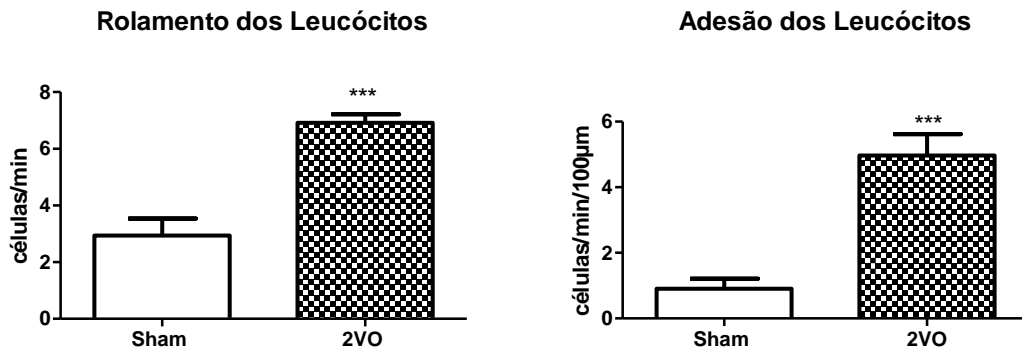


Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. de 7 animais no grupo Sham e 8 animais no grupo 2VO.
** $p < 0,01$ teste *t-Student* Sham: cirurgia fictícia; 2VO: animais com hipoperfusão cerebral.

4.3.2 Avaliação da interação leucócito-endotélio na parede vascular cerebral

O perfil inflamatório dos vasos cerebrais foi avaliado pela interação leucócito-endotélio através da microscopia intravital. Os resultados demonstram um aumento significativo no rolamento de leucócitos à parede venular no grupo 2VO (7 ± 0.3 , 2VO cel/min) quando comparado com grupo Sham (3.0 ± 0.6 cel/min, $p < 0,001$) assim como na adesão de leucócitos à parede venular (2VO: 5.0 ± 0.64 vs Sham: 0.9 ± 0.3 cel/min/100 μm , $p < 0.001$, gráfico 3).

Gráfico 3 - Densidade capilar funcional cerebral após 10 dias de 2VO em ratos Sham ou 2VO

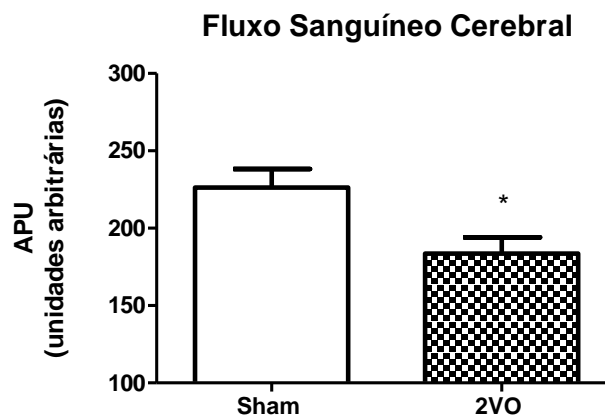


Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. de 9 animais no grupo Sham e 6 animais no grupo 2VO. *** $p < 0,001$, teste *t*-Student Sham: cirurgia fictícia; 2VO: animais com hipoperfusão cerebral.

4.4 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Cerebral

Utilizando a mesma janela craniana da microscopia intravital, o fluxo sanguíneo cerebral foi medido por meio da técnica de LSCI com contraste de imagem. O grupo 2VO apresentou diminuição significativa no fluxo sanguíneo cerebral quando comparado com o grupo controle (Sham: 226 ± 12 vs. 2VO: 184 ± 11 APU, $p < 0,05$ teste *t*-Student, gráfico 4).

Gráfico 4 - Fluxo sanguíneo cerebral após 10 dias da 2VO em ratos Sham ou 2VO

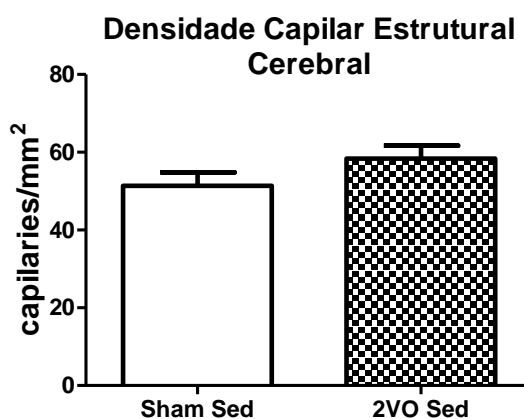


Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. de 12 animais no grupo Sham e 15 animais no grupo 2VO. * $p < 0,05$ vs. Sham teste *t*-Student. Sham: cirurgia fictícia; 2VO: animais com hipoperfusão cerebral.

4.5 Análise da densidade capilar estrutural cerebral (DCE)

A DCE foi avaliada a partir de cortes histológicos do córtex cerebral, marcados com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada ao FITC. No gráfico 5, observamos que não há diferença significativa entre os grupos Sham (51 ± 3.0 capilares/mm²) e 2VO (58 ± 3.0 capilares/mm²).

Gráfico 5 - Densidade capilar estrutural de amostras de cérebro após 10 dias da 2VO em ratos Sham ou 2VO

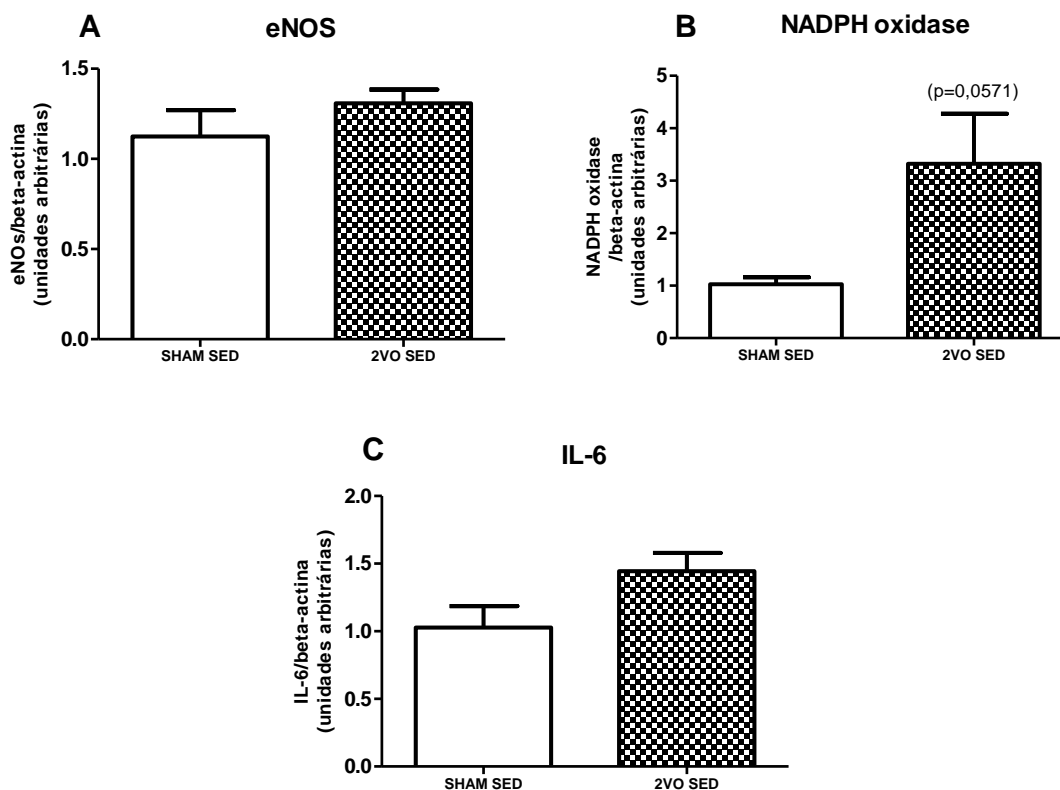


Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. de 10 animais no grupo Sham e 11 animais no grupo 2VO. $p > 0,05$ Teste *t-Student*. Sham: cirurgia fictícia; 2VO: animais com hipoperfusão cerebral.

4.6 Análises da expressão gênica de parâmetros inflamatórios no cérebro de animais submetidos à 2VO

A análise da expressão gênica das enzimas eNOS e NADPH-oxidase e de IL-6 foram avaliadas em amostras de cérebro dos ratos do grupo SHAM e 2VO através de RT-PCR. Foi observado um aumento, porém não significativo estatisticamente da expressão da NADPH-oxidase (gráfico 6 B). Por outro lado, a expressão gênica de IL-6 e eNOS não foram alteradas nos grupos estudados (gráfico 6 A e C, respectivamente).

Gráfico 6 - Análises de RT-PCR após 10 dias de 2VO. Expressão gênica de e-NOS (A), NADPHoxidase e (B) e de IL-6 (C) de amostras de cérebro após 10 dias da 2VO em ratos WKY



Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. de 4 animais no grupo Sham e 3 animais no grupo 2VO. $p > 0,05$; Teste *t-Student*. Sham: cirurgia fictícia; 2VO: animais com hipoperfusão cerebral.

4.7 Parâmetros do Exercício Físico

4.7.1 Resultado do Teste Incremental Máximo (TIM) e Velocidade Média dos Treinamentos

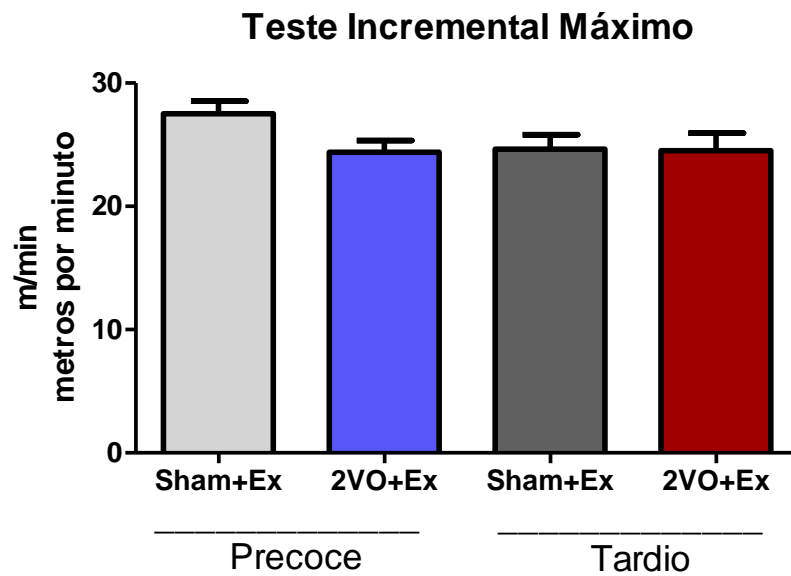
Antes de iniciar o programa de treinamento físico, os animais dos grupos exercício foram submetidos ao TIM a fim de prescrever a intensidade de treinamento correta para cada animal. O resultado do teste não demonstrou diferença significativa entre os grupos (tabela 2 e gráfico 7) e consequentemente na velocidade média dos treinamentos (tabela 3 e gráfico 8).

Tabela 2 - Média da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo

Intervenção	Grupos	n	TIM (m/min)
Precoce	Sham+Ex	12	28 ± 1,0
	2VO+Ex	15	24 ± 0,9
Tardia	Sham+Ex	8	25 ± 1,2
	2VO+Ex	6	25 ± 1,4

Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. $p < 0,05$. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou cirurgia Sham. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou cirurgia Sham.

Gráfico 7 - Teste incremental máximo realizado para os grupos de intervenção com o exercício físico Precoce ou Tardio



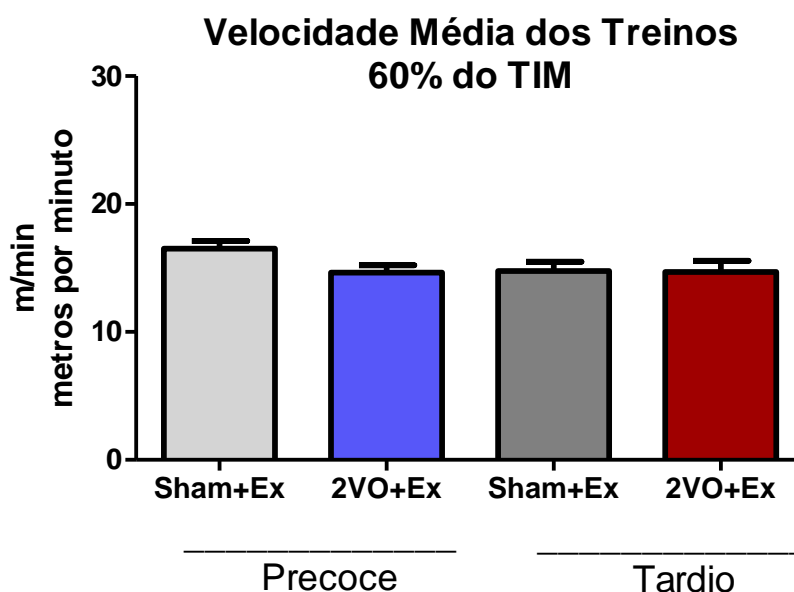
Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. referente ao número de animais por cada grupo. $p < 0,05$. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou cirurgia Sham. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou cirurgia Sham.

Tabela 3 - Velocidade média do treinamento físico para cada grupo

Intervenção	Grupos	n	60% da Veloc. Máx. (m/min)
Precoce	Sham+Ex	12	17 ± 0,6
	2VO+Ex	15	15 ± 0,6
Tardia	Sham+Ex	8	15 ± 0,7
	2VO+Ex	6	15 ± 0,7

Legenda: Prescrição da intensidade (60%) em relação à velocidade máxima atingida no teste incremental máximo. Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. $p < 0,05$. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou cirurgia Sham. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou cirurgia Sham.

Gráfico 8 - Média da intensidade do treino (60%) com base no TIM



Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. referente ao número de animais por cada grupo.
* $p < 0,05$. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou cirurgia Sham. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou cirurgia Sham.

Com o objetivo de verificar se a intervenção precoce do treinamento físico teria impacto diferenciado daqueles produzidos pelo exercício físico tardio à 2VO, foram avaliados os parâmetros hemodinâmicos, microcirculatórios e inflamatórios cerebrais 24 horas após a última sessão de exercício físico ou sedentarismo após 10 dias (precoce) ou 17 dias (tardio) da 2VO.

4.8 Efeito do treinamento físico iniciado de forma precoce ou tardia sobre os parâmetros hemodinâmicos de animais submetidos à 2VO

4.8.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC)

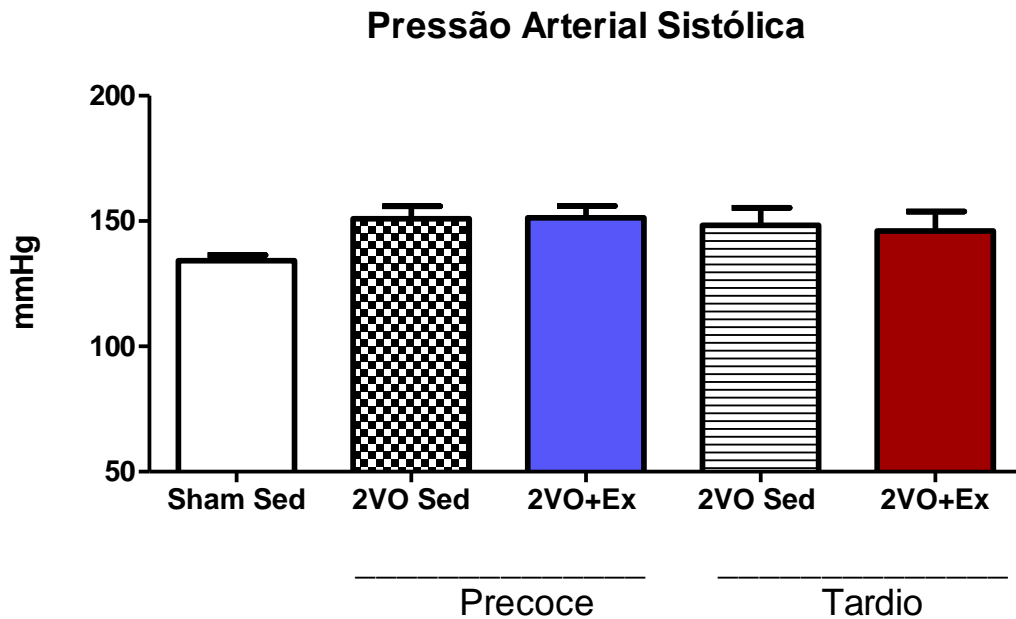
O treinamento físico durante 7 dias a uma intensidade moderada (60%) não induziu alteração significativa na pressão arterial sistólica, no entanto foi observado um discreto aumento, porém não significativo, na pressão arterial sistólica dos grupos 2VO, e este efeito se manteve durante todo o período de experimento (tabela 4 e gráfico 9).

Tabela 4 - Média da Pressão Arterial Sistólica após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo

Intervenção	Grupos	n	PAS (mmHg)
Controle	Sham Sed	9	134±2,0
Precoce	2VO Sed	9	151±5,0
	2VO+Ex	9	151±4,6
Tardia	2VO Sed	8	148±7,0
	2VO+Ex	4	146±7,7

Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais por grupo. $p < 0,05$. ANOVA.
 Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou cirurgia Sham. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou cirurgia Sham.

Gráfico 9 - Pressão arterial sistólica após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo



Legenda: Os valores representam a média \pm EPM do número de animais por grupo. * $p < 0,05$. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

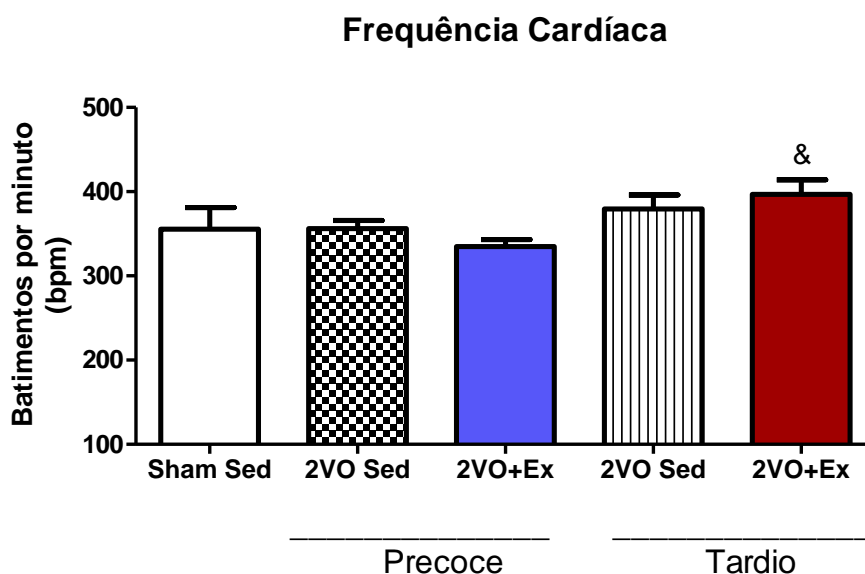
Em relação à frequência cardíaca o grupo 2VO+EX Precoce apresentou uma diferença significativa quando comparado com o grupo 2VO+Ex Tardio como mostra a tabela 5 e o gráfico 10 ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Média da Frequência cardíaca após o treinamento físico por 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo

Intervenção	Grupos	n	FC (bpm)
Controle	Sham Sed	9	374 \pm 9
Precoce	2VO Sed	9	356 \pm 10
	2VO+Ex	9	335 \pm 8
Tardia	2VO Sed	8	380 \pm 17
	2VO+Ex	4	397 \pm 18 &

Legenda: Os valores representam a média \pm EPM do número de animais por grupo. & $p < 0,05$ vs. 2VO+Ex Precoce. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou cirurgia Sham. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou cirurgia Sham.

Gráfico 10 - Frequência cardíaca após o treinamento físico após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo



Legenda: Os valores representam a média \pm EPM do número de animais por grupo. & $p < 0,05$ vs. 2VO+Ex Precoce ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

4.9 Efeitos do treinamento físico iniciado de forma precoce ou tardia sobre a microcirculação cerebral de animais submetidos à hipoperfusão cerebral

4.9.1 Densidade Capilar Funcional

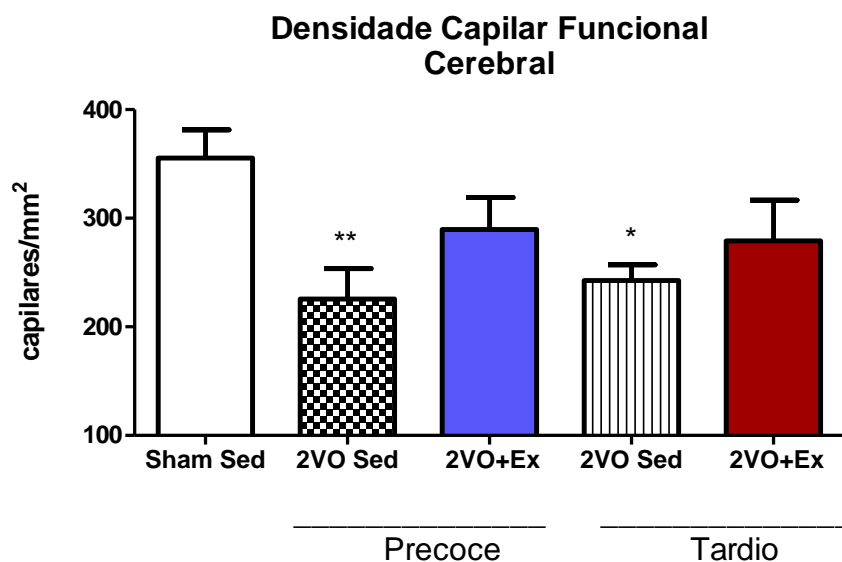
A medida da densidade capilar funcional (DCF) foi feita como anteriormente, sendo que nos grupos exercitados tanto na intervenção precoce quanto na intervenção tardia a análise foi feita 24 horas após a última sessão de exercício para que fosse visto o impacto dos 7 sete dias de treinamento físico e não o efeito agudo da última sessão de exercício físico. Os animais submetidos à 2VO e sedentários apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo controle Sham. No entanto, os animais exercitados de ambas as intervenções (precoce e tardia) foram capazes de reverter a rarefação capilar não havendo diferença estatística entre os grupos 2VO+Ex e o grupo Sham (Tabela 6 e gráfico 11).

Tabela 6 - Densidade capilar funcional cerebral após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo

Intervenção	Grupos	n	DCF (capilares/mm²)
Controle	Sham Sed	7	355 ± 26
Precoce	2VO Sed	8	226 ± 28**
	2VO+Ex	7	290 ± 29
Tardia	2VO Sed	9	243 ± 14*
	2VO+Ex	4	279 ± 38

Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. ** $p < 0,01$ 2VO Sed Precoce vs. Sham Sed. ANOVA. * $p < 0,05$ 2VO Sed Tardio vs. Sham Sed. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Gráfico 11 - Valores da densidade capilar funcional após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo



Legenda: Os valores representam a média ± EPM do número de animais por grupo. ** $p < 0,01$ 2VO Sed Precoce vs. Sham Sed. ANOVA* $p < 0,05$ 2VO Sed Tardio vs. Sham Sed. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

4.9.2 Interação Leucócito-Endotélio: Rolamento e Adesão

Através da microscopia intravital e da administração de rodamina-6G para marcação de leucócitos circulantes, foi possível avaliar o efeito do treinamento físico no perfil inflamatório dos animais em ambas as intervenções. Os animais analisados 10 dias após da oclusão bilateral das carótidas comuns apresentavam aumento significativo no rolamento de leucócitos quando comparados com o grupo controle Sham Sed (Tabela 7).

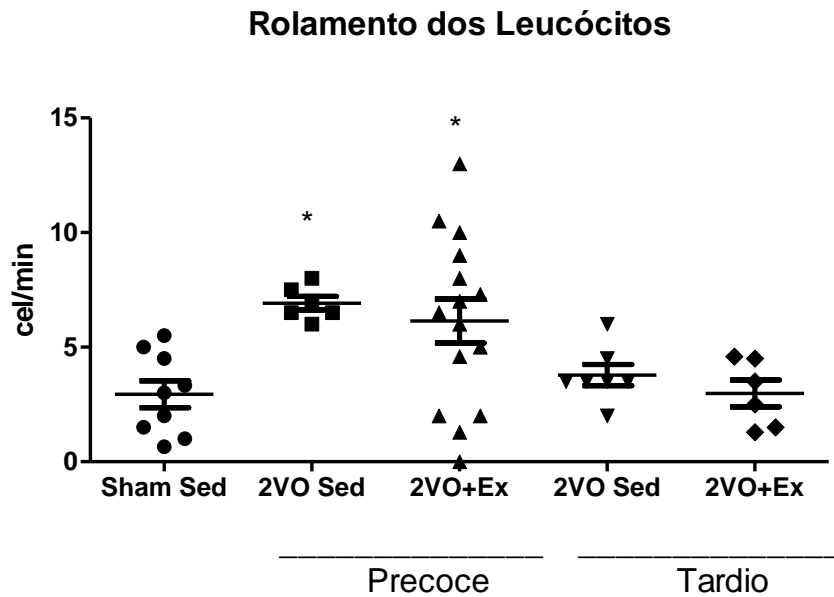
O grupo de animais que recebeu o exercício físico iniciado de forma precoce apresentou resultado heterogêneo na análise no rolamento de leucócitos na parede vascular cerebral. Portanto, a melhor maneira de apresentar esses resultados foi utilizando o gráfico de dispersão, para que pudesse ser visto a distribuição dos resultados (gráfico 12).

Tabela 7 - Rolamento de leucócitos após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo

Intervenção	Grupos	n	Rolling (células/min)
Controle	Sham Sedentário	9	3,0 ± 0,6
Precoce	2VO Sed	6	7,0 ± 0,3 *
	2VO+Ex	15	6,0 ± 1,0 *
Tardia	2VO Sed	7	3,8 ± 0,4
	2VO+Ex	6	3,0 ± 0,6

Legenda: Os valores representam a média ± EPM do número de animais por grupo. *p<0,05 vs. Sham Sed. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Gráfico 12 - Rolamento de leucócitos após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo



Legenda: Os valores representam a média \pm EPM do número de animais por grupo.* $p < 0,05$ vs. Sham Sed ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

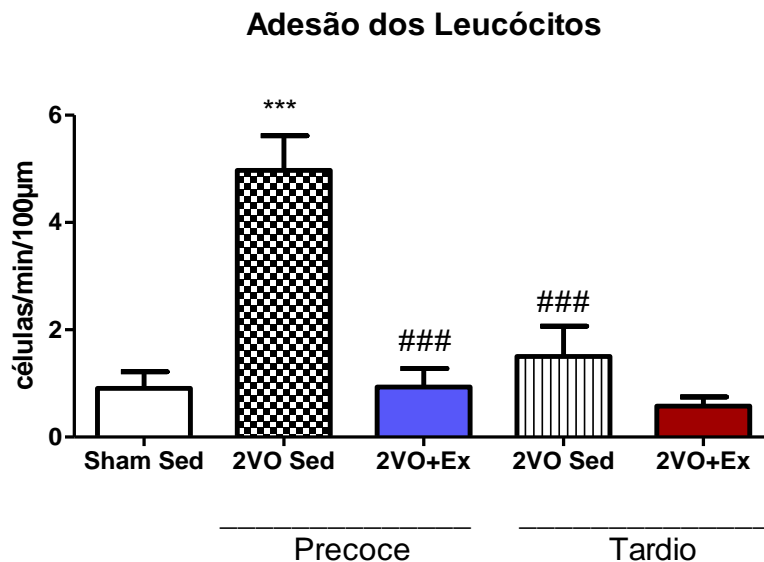
No grupo 2VO Sed Precoce foi observado aumento da adesão de leucócitos ao endotélio vascular cerebral quando comparado com o controle Sham Sed. Assim como, no rolamento dos leucócitos, houve uma melhora espontânea após 17 dias de 2VO, o mesmo ocorreu na adesão dos leucócitos demonstrando que mesmo sedentário os animais apresentavam uma melhora significativa quando comparado com o seu respectivo grupo controle (2VO Sed Precoce vs. 2VO Sed Tardio). Este resultado pode ser visto na tabela 8 e gráfico 13.

Tabela 8 - Efeito de 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo sobre a adesão de leucócitos na parede das vênulas cerebrais

Intervenção	Grupos	n	Adesão (células/mm ² /100µm)
Controle	Sham Sedentário	9	0,9 ± 0,3
Precoce	2VO Sed	6	5,0 ± 0,7***
	2VO+Ex	15	0,9 ± 0,3 ###
Tardia	2VO Sed	7	1,5 ± 0,6 ###
	2VO+Ex	6	0,6 ± 0,2

Legenda: Adesão leucocitária à parede vascular cerebral após 7 dias de exercício físico ou sedentarismo. Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo.*** p< 0,001 vs. Sham Sed. ANOVA ### p< 0,001 vs. 2VO Sed Precoce. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Gráfico 13 - Adesão de leucócitos à parede das vênulas após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo



Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. *** p< 0,001 vs. Sham Sed. ANOVA. ### p< 0,001 vs. 2VO Sed Precoce. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

4.9.3 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Cerebral por LSCI com contraste de imagem após 7 dias de exercício físico

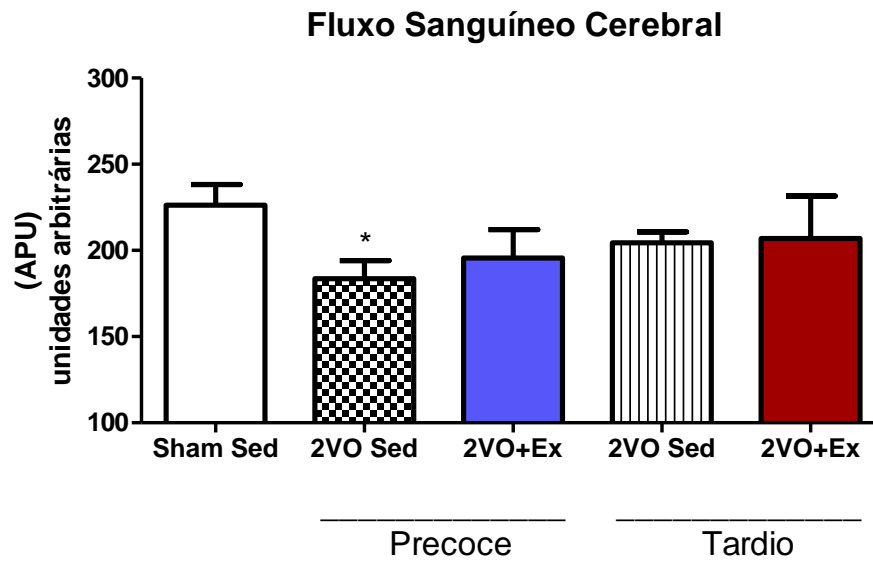
Os efeitos da intervenção precoce ou tardia do treinamento físico em animais submetidos a 2VO, não induziram alterações estatisticamente significativas no fluxo sanguíneo cerebral. No entanto, foi observado que a intervenção precoce do treinamento físico após à 2VO exibiu um discreto aumento da perfusão cerebral. Por outro lado pode-se observar que a intervenção tardia do treinamento físico não foi tão evidente já que os animais sedentários apresentaram uma melhora no fluxo sanguíneo cerebral quando comparados com os sedentários da intervenção precoce (sem diferença estatística) (Tabela 9 e gráfico 14). A figura 10 representa o fluxo sanguíneo cerebral pela técnica LSCI por contraste de imagem dos animais submetidos à oclusão bilateral das carótidas comuns (2VO) ou cirurgia fictícia (Sham) e submetidos ao exercício físico (2VO+Ex Precoce e 2VO+Ex Tardio) ou sedentarismo (2VO Sed Precoce e 2VO Sed Tardio).

Tabela 9 - Efeito do treinamento físico por 7 dias ou sedentarismo sobre o fluxo sanguíneo cerebral de animais submetidos à hipoperfusão cerebral crônica

Intervenção	Grupos	n	Fluxo Sanguíneo Cerebral (APU)
Controle	Sham Sedentário	12	226 ± 12
Precoce	2VO Sed	15	184 ± 11 *
	2VO+Ex	15	196 ± 17
Tardia	2VO Sed	9	204 ± 6,0
	2VO+Ex	6	207 ± 25

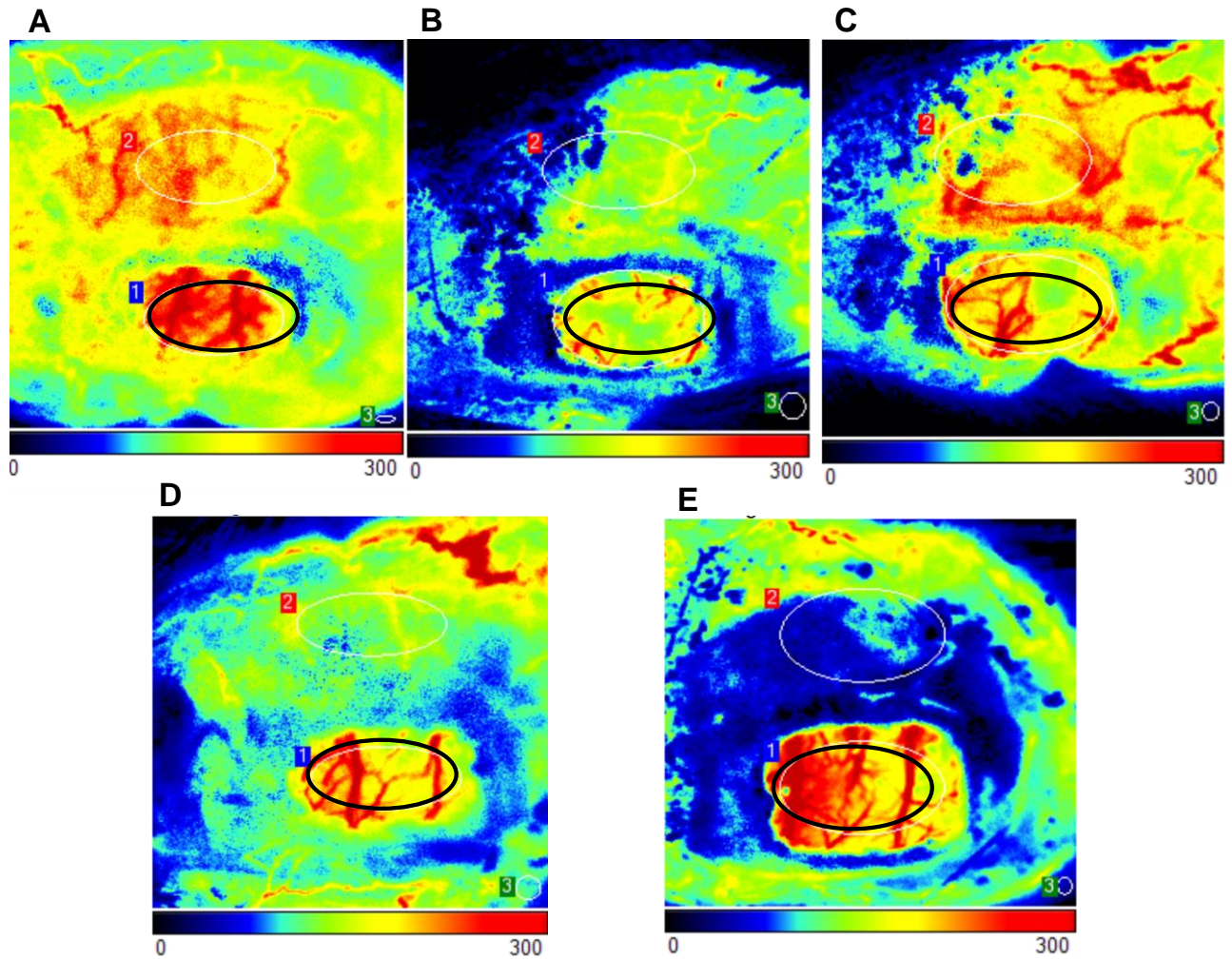
Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. *p<0,05. Sham Sed vs 2VO Sed Teste *t-Student*, pós teste: Mann-Whitney. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Gráfico 14 - Imagens do fluxo sanguíneo cerebral por LSCI de animais dos grupos estudados



Legenda: Os valores representam a média \pm EPM do número de animais por grupo. * $p < 0,05$. Sham Sed vs 2VO Sed Teste *t-Student*, pós teste: Mann-Whitney. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Figura 10 - Imagens do fluxo sanguíneo cerebral por LSCI de animais dos grupos estudados



Legenda: A área circulado representa o ROI mensurado pelo LSCI.

A : Sham Sed; B: 2VO Sed Precoce; C: 2VO+Ex Precoce; D: 2VO Sed Tardio e E: 2VO+Ex Tardio. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

4.9.4 Densidade Capilar Estrutural (DCE)

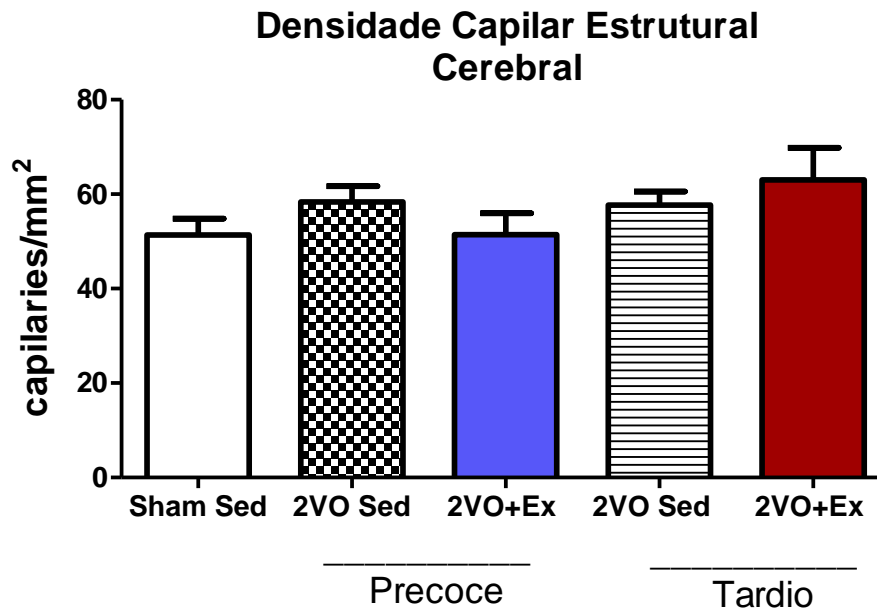
A análise histológica da densidade capilar estrutural foi feita a partir de cortes do córtex cerebral marcado com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada ao FITC. A DCE não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados. A tabela 10 e o gráfico 15 representam esse resultado.

Tabela 10 - Densidade capilar estrutural do cérebro de animais 2VO ou Sham submetidos ao treinamento físico ou sedentarismo

Intervenção	Grupos	n	DCE (capilares/mm²)
Controle	Sham Sed	10	51 ± 3,0
Precoce	2VO Sed	11	58 ± 3,0
	2VO+Ex	9	51 ± 5,0
Tardia	2VO Sed	5	58 ± 3,0
	2VO+Ex	4	63 ± 7,0

Legenda: Valores da DCE após 7 dias de exercício físico ou sedentarismo. Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. $p < 0,05$. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Gráfico 15 – Densidade capilar estrutural após 7 dias de treinamento físico ou sedentarismo

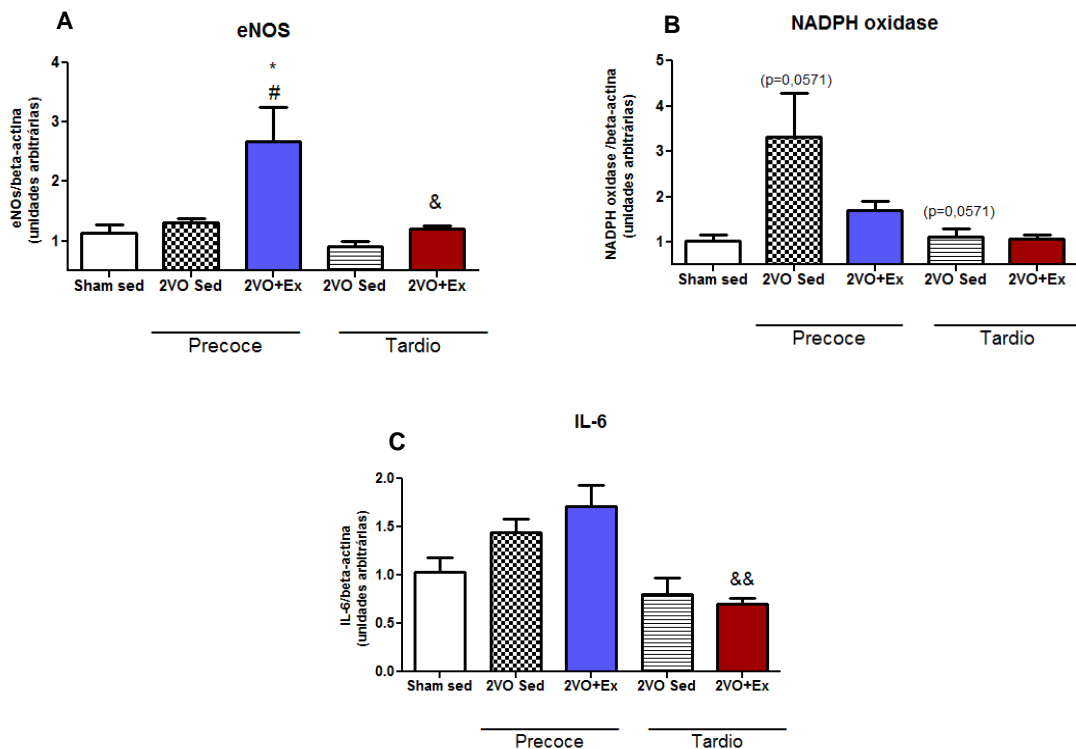


Legenda: Os valores representam a média ± EPM do número de animais por grupo. $p < 0,05$. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

4.10 Efeitos da intervenção do exercício físico precoce ou tardio sobre a expressão gênica de parâmetros inflamatórios no cérebro de animais submetidos à 2VO

A análise da expressão gênica por RT-PCR de NADPH-oxidase, e-NOS e de IL-6 foram avaliadas em amostras de cérebro dos ratos do grupo SHAM e 2VO submetidos aos protocolos de intervenção precoce ou tardia do exercício físico. Foi observado um aumento significativo, da expressão da e-NOS no grupo 2VO+Ex Precoce quando comparado com os grupos Sham Sed, 2VO Sed Precoce e 2VO+Ex Tardio (Gráfico 16 A e Tabela 11, $p < 0,05$). A expressão gênica da NADPH-oxidase (gráfico 16 B e a Tabela 12) mostra uma tendência de aumento no grupo 2VO Sed Precoce quando comparado com o grupo controle (Sham Sed), assim como quando comparado com o grupo 2VO Sed Tardio. Por fim, a expressão gênica da IL-6 foi menor no protocolo de intervenção tardia do exercício físico (2VO+Ex Tardio) quando comparado com o grupo 2VO+Ex Precoce (gráfico 16 C e Tabela 13).

Gráfico 16 - Análises de RT-PCR após 7 dias de exercício físico ou sedentarismo em ratos Sham ou 2VO. Expressão de RNA das enzimas e-NOS e NADPHoxidase (A e B, respectivamente) e da interleucina-6 (C) de amostras de cérebro



Legenda: * $p < 0,05$ vs. Sham Sed. ANOVA; # $p < 0,05$ vs. 2VO Sed Precoce. ANOVA; & $p < 0,05$ vs. 2VO+Ex Precoce. ANOVA; && $p < 0,01$ vs. 2VO+Ex Precoce. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o

exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Tabela 11 - Expressão gênica da enzima e-NOS após o protocolo de treinamento

Intervenção	Grupos	n	e-NOS/Beta-actina (unidades arbitrárias)
Controle	Sham Sedentário	3	1,12 ± 0,14
Precoce	2VO Sed	4	1,3 ± 0,07
	2VO+Ex	3	2,8 ± 0,6 * #
Tardia	2VO Sed	3	0,9 ± 0,1
	2VO+Ex	3	1,2 ± 0,05 &

Legenda: Valores da expressão gênica da e-NOS após 7 dias de exercício físico ou sedentarismo. Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. *p<0,05 vs. Sham Sed. ANOVA; #p<0,05 vs. 2VO Sed Precoce. ANOVA; &p<0,05 vs. 2VO+Ex Precoce. ANOVA; Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Tabela 12 - Expressão gênica da NADPH-oxidase após o protocolo de treinamento

Intervenção	Grupos	n	NADPH oxidase /Beta-actina (unidades arbitrárias)
Controle	Sham Sedentário	3	1,0 ± 0,1
Precoce	2VO Sed	4	3,3 ± 0,9
	2VO+Ex	3	1,7 ± 0,2
Tardia	2VO Sed	3	1,1 ± 0,2
	2VO+Ex	3	1,0 ± 0,08

Legenda: Valores da expressão gênica da NADPH-oxidase após 7 dias de exercício físico ou sedentarismo. Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. * p= 0,0571 vs. Sham Sed. Teste *t-Student* , pós teste: Mann-Whitney. # p=0,0571 vs 2VO Sed Precoce. Teste *t-Student* , pós teste: Mann-Whitney. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

Tabela 13 - Expressão gênica da interleucina-6 após o protocolo de treinamento físico

Intervenção	Grupos	n	IL-6/Beta-actina (unidades arbitrárias)
Controle	Sham Sedentário	3	1,0 ± 0,1
Precoce	2VO Sed	4	1,4 ± 0,1
	2VO+Ex	3	1,7 ± 0,2
Tardia	2VO Sed	3	0,8 ± 0,2
	2VO+Ex	3	0,7 ± 0,05 &&

Legenda: Valores da expressão gênica da IL-6 após 7 dias de exercício físico ou sedentarismo. Os valores representam a média ± E.P.M do número de animais por grupo. &&p<0,01 vs. 2VO+Ex Precoce. ANOVA. Grupo Precoce: intervenção com o exercício iniciada 3 dias após a 2VO ou sedentarismo. Grupo Tardio: intervenção com o exercício iniciada 10 dias após a 2VO ou sedentarismo.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o modelo de hipoperfusão cerebral, 2VO, induziu rarefação capilar cerebral, queda no fluxo sanguíneo cerebral e ativação da resposta inflamatória, primordialmente nos animais analisados na intervenção precoce. A intervenção precoce com o exercício físico (três dias após a 2VO) foi capaz de aumentar a densidade capilar funcional, o fluxo sanguíneo cerebral e reduzir a adesão dos leucócitos à parede venular. No entanto, esses efeitos foram menos expressivos no grupo de intervenção tardia com o exercício físico (10 dias após a 2VO).

Neste trabalho investigamos as consequências da hipoperfusão cerebral sobre os aspectos estruturais e funcionais da microcirculação e o perfil inflamatório do cérebro de ratos Sham e 2VO. E ainda, avaliamos os possíveis efeitos protetores do exercício físico quando iniciado da fase aguda ou crônica da hipoperfusão nos ratos 2VO.

No presente trabalho, primeiramente avaliamos o efeito do modelo de 2VO sobre a densidade capilar funcional, estrutural e o fluxo sanguíneo cerebral. Foi observado que a redução do fluxo sanguíneo cerebral uma hora após a oclusão bilateral das carótidas comuns era mantido por até 10 dias nos animais não exercitados. Observamos que essa redução do fluxo sanguíneo cerebral nos animais sedentários submetidos à hipoperfusão cerebral foi acompanhada por uma queda significativa na densidade capilar funcional cerebral, justificando assim, a escolha da intervenção do exercício físico na fase aguda da hipoperfusão cerebral. A rarefação capilar funcional observada nesse trabalho justifica-se pela queda do fluxo sanguíneo após a oclusão bilateral das carótidas, tendo como consequência um menor recrutamento de capilares cerebrais. A rarefação funcional pode ser decorrente de disfunção endotelial e de processos oxidativos culminando com a perda de capacidade de responder ao aumento de fluxo arteriolar. Este efeito não foi acompanhado de rarefação capilar estrutural, descartando a possibilidade de processos apoptóticos e desaparecimento definitivo dos capilares.

As alterações microvasculares cerebrais precedem e acompanham a disfunção cognitiva relacionada a idade e a neurodegeneração (102). Diversos estudos têm demonstrado que o envelhecimento, assim como, modelos para a doença de Alzheimer apresentam redução na densidade capilar cerebral (103-105). Neste trabalho demonstramos que a hipoperfusão cerebral foi capaz de induzir danos na microcirculação cerebral que poderiam ser protegidos pela intervenção precoce com o exercício físico. No trabalho de Jucker *et al.* (1990) (103) no

qual analisaram o efeito da idade sobre a densidade vascular cerebral de ratos idosos, verificaram que ocorria queda significativa no número e no comprimento dos capilares em algumas regiões do cérebro como o hipocampo e o córtex.

A hipoperfusão cerebral induzida pelo modelo 2VO em ratos é considerada uma isquemia moderada (2, 16). Na literatura, estudos descrevem que a recuperação do fluxo sanguíneo cerebral pode ser iniciado a partir da 1ª semana (13) e o retorno do fluxo sanguíneo cerebral entre 8 semanas e seis meses após a 2VO (13, 27, 106). Já foi documentado o retorno do fluxo sanguíneo aos níveis basais após uma semana de 2VO em áreas que não apresentaram dano neuronal, evidenciando a relação entre a perfusão tecidual e a função neuronal (107).

Nos trabalhos de Otori *et al.* (2003) (13) e Tsuchiya *et al.* (1993) (107) o fluxo sanguíneo cerebral local foi medido pela técnica descrita por Sakurada *et al.* (1978) (108) na qual utilizavam uma técnica auto radiográfica com o [14C] iodo antipirina, já Tomimoto *et al.* (2003) (26) utilizaram a fluxometria por Laser Doppler, um método que permite a avaliação do fluxo microvascular, incluindo capilares arteríolas e vênulas. A técnica de laser speckle com contraste de imagem (LSCI) quantifica o fluxo sanguíneo sobre uma área em tempo real e exibe uma boa reprodutibilidade (98). O LSCI vem sendo utilizada no estudo clínico da microcirculação cerebral como uma avaliação não invasiva que permite o acompanhamento do fluxo sanguíneo cerebral de forma dinâmica durante uma cirurgia neurovascular, por exemplo, otimizando os procedimentos cirúrgicos (109).

A diminuição do fluxo sanguíneo cerebral acarreta a restrição da oferta de nutrientes, como a glicose e o oxigênio. Corroborando com esse conceito, Otori *et al.* (2003) (13) observou que após 1 semana de 2VO a utilização de glicose no córtex cerebral estava reduzida. As alterações da microcirculação cerebral podem estar relacionadas com a restrição de glicose e a diminuição da síntese de ATP, induzindo mudanças deletérias ao microambiente vascular com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio resultando em aumento do estresse oxidativo e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Após a oclusão das carótidas comuns, mecanismos adaptativos ou compensatórios são ativados para que o fluxo sanguíneo cerebral seja mantido ou restaurado, como a angiogênese, a dilatação arteriolar e o aumento da circulação posterior contribuindo para um aumento no fluxo do Polígono de Willis (2, 27, 106). Sendo assim, já era esperado que na fase crônica da hipoperfusão cerebral estes mecanismos estivessem mais pronunciados. No entanto, no presente trabalho, o restabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral na fase tardia, não foi acompanhado da reversão da rarefação capilar.

Estudos anteriores descreveram que a hipoperfusão cerebral induz um quadro inflamatório acompanhado por estresse oxidativo e produção de citocinas pró-inflamatórias. A hipoperfusão cerebral induzida pela 2VO propicia um ambiente isquêmico persistente e suficiente para promover e manter um estado de estresse oxidativo (2, 15, 33, 51, 52).

Os processos de rolamento e adesão de leucócitos observados neste trabalho foram mais pronunciados nos animais sedentários analisados pela microscopia intravital na fase aguda do evento isquêmico do que aqueles realizados na fase tardia. Na fase aguda da isquemia cerebral induzida pelo 2VO, foi observada a ativação da interação leucócito-endotélio venular, acompanhada de rarefação capilar funcional, redução do fluxo sanguíneo cerebral e embora não significativo, um aumento na expressão gênica da IL-6. Os mecanismos envolvidos no recrutamento de leucócitos para o sistema nervoso central durante a inflamação ainda não estão claros, mas já se sabe que a inflamação vascular está envolvida na disfunção endotelial (95) e que a presença de moléculas de adesão é uma característica relacionada à algumas doenças neurológicas que envolvem a inflamação aguda e crônica (110, 111).

Na revisão de Perry *et al.* (2007) (112) os autores apontam que a inflamação sistêmica é em geral um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer e que aumentos de IL-6 detectados cinco anos antes da presença da demência, sugerem que a ativação da resposta inflamatória pode ser um fator preditivo para a evolução de processos neurodegenerativos. Sendo assim, o aumento da interação leucócito-endotélio e da IL-6 no cérebro dos animais submetidos à 2VO, sugerem que a ativação das vias inflamatórias são mais evidentes na fase aguda da hipoperfusão cerebral.

A ativação dos leucócitos pode induzir a liberação de citocinas inflamatórias e produção radicais livres (113, 114). Deste modo, os resultados da interação leucócito-endotélio, da expressão da IL-6 e do aumento, porém não significativo, da expressão gênica da NADPH-oxidase nos animais 2VO analisados na fase aguda sugerem estão de acordo com a literatura e que é neste momento que esse processo inflamatório deve ser tratado. Como foi demonstrado, os animais analisados na fase tardia da 2VO apresentaram ausência de rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular cerebral e menor expressão gênica da NADPH-oxidase e da IL-6, sugerindo que nesta fase os animais não apresentam mais ativação da resposta inflamatória e estresse oxidativo cerebrais.

Em modelos de MCAO com ratos, o exercício físico demonstrou efeitos positivos em até 14 dias de treinamento como a melhora do fluxo sanguíneo cerebral (70) diminuição da apoptose de células neuronais (70, 71) e na redução da área de infarto (71), sendo este último

um resultado após 3 dias de treinamento. Com o intuito de investigar o efeito em curto prazo do treinamento físico no modelo de hipoperfusão cerebral, o presente estudo propôs a utilização do exercício físico de intensidade moderada (60% da velocidade máxima do TIM) durante uma semana. Como a hipótese do estudo era investigar se o início precoce do exercício físico seria capaz de reverter ou amenizar as alterações inflamatórias e microcirculatórias cerebrais nos animais submetidos à hipoperfusão cerebral, foi adicionado um grupo que iniciaria o exercício na fase tardia da hipoperfusão cerebral.

A melhora na densidade capilar induzida pelo treinamento físico já foi vista em áreas corticais, em especial no córtex motor (67, 115). A angiogênese induzida pelo exercício físico no córtex de ratos Sprague–Dawley (fêmeas) pode ser um dos fatores que explicam a melhora induzida pelo exercício na capacidade de aprendizagem espacial desses animais (90). No trabalho conduzido por Wang *et al.* (2015) (116) utilizando ratos de meia idade submetidos ao treinamento físico a longo prazo, foi verificado que o exercício desencadeou efeitos positivos na aprendizagem espacial e memória, assim como aumento da área de superfície total de capilares corticais. O exercício físico também é capaz de melhorar o fluxo sanguíneo cerebral, como foi mostrado no trabalho de Viboolvorakul e Patumraj (2014) e por Gertz *et al.* 2006 (93).

No presente trabalho, os efeitos do exercício físico se mostraram mais evidentes no grupo que iniciou o treinamento mais cedo (precoce). Embora os animais que começaram o exercício tardio tenham melhorado a densidade capilar funcional espontaneamente (efeito compensatório), nota-se que eles partiram de uma rarefação capilar menos evidente do que quando comparados com os animais do grupo precoce, sendo assim o efeito do exercício se mostrou mais evidente naqueles animais que iniciaram o treinamento físico logo após o evento de hipoperfusão cerebral.

Os nossos resultados indicam que a intervenção precoce foi capaz de reverter a rarefação capilar funcional e a redução do fluxo sanguíneo cerebral quando comparados com o seu respectivo controle. No grupo de intervenção tardia, os resultados indicam que o exercício físico também foi capaz de amenizar a queda da densidade capilar funcional quando comparado com o controle sedentário. No entanto, a análise feita através da fluxometria por LSCI, os animais sedentários e submetidos a 2VO não apontou queda significativa no fluxo sanguíneo cerebral e o exercício físico não interferiu nesse parâmetro. A explicação para a diferença entre as referidas técnicas é que apesar de serem complementares, a análise de DCF pela microscopia intravital identifica apenas os capilares perfundidos e a fluxometria por

LSCI abrange uma área maior que representa a resultante do sistema circulatório da região observada na microcirculação.

Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que o exercício moderado é capaz de induzir o aumento da expressão de IL-6 num contexto anti-inflamatório (74, 75), nos animais exercitados em ambas as fases não foram alteradas, indicando que a intensidade ou a duração do exercício físico não foram capazes de modificar esse parâmetro.

O endotélio desempenha um papel importante na regulação da atividade inflamatória e o estresse oxidativo. Vários estudos sugerem que o exercício físico é capaz de reduzir o estresse oxidativo, diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias e melhorar a biodisponibilidade do óxido nítrico (73-77). Neste trabalho, o exercício físico ocasionou reduções na adesão leucócito-endotélio e, embora não significativo uma redução na expressão gênica da NADPH-oxidase e aumento da expressão gênica da eNOS, principalmente nos grupos analisados na intervenção precoce com o exercício físico. No entanto, em relação ao rolamento dos leucócitos, o exercício físico causou uma resposta heterogênea em ambas as intervenções (precoce ou tardia). Apesar de o exercício demonstrar efeitos positivos na interação leucócito-endotélio, futuras análises moleculares da ICAM, VCAM e selectinas são necessárias para o maior entendimento desse mecanismo e de que forma o exercício interfere nesta via. Os resultados sugerem que ambas as intervenções foram capazes de reduzir a adesão leucócito-endotélio, principalmente na intervenção Precoce.

A intervenção precoce do exercício físico nos animais submetidos à 2VO apresentou uma tendência em reduzir a expressão gênica da NADPH-oxidase, e conseqüentemente a diminuição no estresse oxidativo. No entanto, o exercício físico iniciado na fase tardia da 2VO não foi capaz de interferir nesse parâmetro, já que nesta fase a expressão gênica dessa enzima não estava alterada.

Como já era esperado, o exercício físico moderado durante 7 dias, promoveu o aumento na expressão gênica da e-NOS corroborando para os efeitos benéficos do exercício físico, sendo mais expressiva nos animais que iniciaram o exercício físico na fase aguda da 2VO, quando havia uma maior queda no fluxo sanguíneo cerebral e rarefação capilar. No entanto, acreditamos que a melhora no fluxo sanguíneo cerebral e na densidade capilar funcional não seja decorrente de uma resposta angiogênica, já que analisamos o efeito em curto prazo do exercício, mas sim a necessidade de recrutar um número maior de capilares para suprir a demanda energética e conseqüentemente o metabolismo cerebral, auxiliando na melhora inflamatória desses animais.

Por fim, a hipoperfusão cerebral induzida pela oclusão bilateral das carótidas comuns, apresentou como consequência hemodinâmica o aumento na pressão arterial sistólica. A acentuada queda no fluxo sanguíneo cerebral que ocorre após essa oclusão, reduz o estiramento das paredes arteriais resultando em redução da estimulação dos barorreceptores que, sensíveis ao estiramento, respondem à queda da pressão arterial aumentando o tônus simpático e conseqüentemente o aumento da pressão arterial sistêmica (2). Estudos anteriores que analisaram o comportamento da pressão arterial média verificaram aumentos significativos após a 2VO tanto em curto prazo (117) quanto em longo prazo (13). Corroborando com os nossos resultados, Farkas e colaboradores (2007) (2) descreveram um aumento de 10 a 20 mmHg na pressão arterial sistólica a partir de 24 horas após a 2VO, persistindo até 9 semanas.

A intervenção terapêutica com o exercício físico moderado durante 7 dias, não foi capaz de diminuir a pressão arterial sistólica, o que já era esperado pois de acordo com Fagard e Tipton (1994) *apud* Farinatti *et al.* 2005 (118), as mudanças na pressão arterial sistêmica só são vistas a partir da terceira semana de treinamento moderado. No entanto, Seron *et al.* (2014) (119) e Thomas *et al.* (2006) (120) consideram os efeitos crônicos do exercício físico a partir de 8 semanas de treinamento. Logo, esses autores respaldam nossos resultados já que estamos analisando os efeitos do exercício físico em curto prazo.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que o modelo de oclusão bilateral das carótidas comuns em ratos Wistar, foi capaz de induzir uma hipoperfusão cerebral moderada acompanhada por rarefação capilar funcional e redução da perfusão sanguínea cerebral. Em conjunto com os efeitos na microcirculação, foi notado também um aumento da interação leucócito-endotélio nos animais 2VO sedentários, concluindo que o modelo foi capaz de induzir alterações microvasculares e inflamatórias cerebrais.

O exercício físico moderado durante 7 dias iniciado na fase aguda da isquemia foi capaz de reverter a rarefação capilar e a queda da perfusão sanguínea cerebral, assim como a redução da adesão dos leucócitos à parede venular. Contudo, o exercício físico iniciado na fase crônica da isquemia demonstrou efeitos positivos, porém não significativos nesse parâmetro, já que os mecanismos compensatórios estavam mais atuantes e dessa forma os benefícios do exercício não foram tão evidentes.

Concluimos que as alterações microcirculatórias e inflamatórias cerebrais são desencadeadas na fase inicial da hipoperfusão cerebral e que a intervenção precoce com o exercício físico moderado foi capaz de reverter os efeitos inflamatórios decorrentes do processo isquêmico. No presente trabalho não analisamos a cognição desses animais, no entanto acreditamos que os processos neurodegenerativos são iniciados na fase aguda da hipoperfusão cerebral, e que a intervenção terapêutica sendo feita neste período irá amenizar os efeitos cognitivos que são vistos em longo prazo.

REFERÊNCIAS

1. Farkas E, Luiten PG. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2001 Aug;64(6):575-611.
2. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 2007 Apr;54(1):162-80.
3. Rodriguez G, Warkentin S, Risberg J, Rosadini G. Sex differences in regional cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988 Dec;8(6):783-9.
4. Bolduc V, Thorin-Trescases N, Thorin E. Endothelium-dependent control of cerebrovascular functions through age: exercise for healthy cerebrovascular aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(5):21.
5. Kalaria RN. Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia. *Nutr Rev.* 2010 Dec;68 Suppl 2:S74-87.
6. Fleck MP, Chachamovich E, Trentini CM. [WHOQOL-OLD Project: method and focus group results in Brazil]. *Rev Saude Publica.* 2003 Dec;37(6):793-9.
7. Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, Bertoldi K, Sanches E, Ben J, et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 2012 Jan;97(1):90-6.
8. Hasselbalch SG, Knudsen GM, Capaldo B, Postiglione A, Paulson OB. Blood-brain barrier transport and brain metabolism of glucose during acute hyperglycemia in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):1986-90.
9. Paulson OB. Blood-brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002 Dec;12(6):495-501.
10. Shang Y, Cheng J, Qi J, Miao H. Scutellaria flavonoid reduced memory dysfunction and neuronal injury caused by permanent global ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005 Sep;82(1):67-73.
11. Ames A, 3rd. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Nov;34(1-2):42-68.
12. Suzuki M, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A. Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn J Pharmacol.* 2001 Oct;87(2):143-50.
13. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003 Apr;30(4):266-72.

14. Shu Y, Zhang H, Kang T, Zhang JJ, Yang Y, Liu H, et al. PI3K/Akt signal pathway involved in the cognitive impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *PLoS One*. 2013;8(12):e81901.
15. He XL, Wang YH, Bi MG, Du GH. Chrysin improves cognitive deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Eur J Pharmacol*. 2012 Apr 5;680(1-3):41-8.
16. Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul I, Busto R, et al. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 Aug 15;92(1-2):157-66.
17. de la Torre JC. Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:196-215.
18. Matsuda H. Cerebral blood flow and metabolic abnormalities in Alzheimer's disease. *Ann Nucl Med*. 2001 Apr;15(2):85-92.
19. Struijker-Boudier HA, Crijns FR, Stolte J, van Essen H. Assessment of the microcirculation in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 1996 Aug;91(2):131-9.
20. Vicaut E. Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs*. 1999;59 Spec No:1-10.
21. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
22. Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):467-76.
23. Osawa A, Maeshima S, Shimamoto Y, Maeshima E, Sekiguchi E, Kakishita K, et al. Relationship between cognitive function and regional cerebral blood flow in different types of dementia. *Disabil Rehabil*. 2004 Jun 17;26(12):739-45.
24. Schmidt-Kastner R, Aguirre-Chen C, Saul I, Yick L, Hamasaki D, Busto R, et al. Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res*. 2005 Aug 2;1052(1):28-39.
25. Liu F, McCullough LD. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:464701.
26. Tomimoto H, Ihara M, Wakita H, Ohtani R, Lin JX, Akiguchi I, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat. *Acta Neuropathol*. 2003 Dec;106(6):527-34.
27. Ohtaki H, Fujimoto T, Sato T, Kishimoto K, Fujimoto M, Moriya M, et al. Progressive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. *Acta Neurochir Suppl*. 2006;96:283-7.

28. Xi Y, Wang M, Zhang W, Bai M, Du Y, Zhang Z, et al. Neuronal damage, central cholinergic dysfunction and oxidative damage correlate with cognitive deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Neurobiol Learn Mem.* 2014 Mar;109:7-19.
29. Bennett SA, Tenniswood M, Chen JH, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T, et al. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport.* 1998 Jan 5;9(1):161-6.
30. Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, Elsner VR, Ben J, da Costa MS, et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull.* 2012 Jan 4;87(1):109-16.
31. Abraham H, Lazar G. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res.* 2000 Apr 17;862(1-2):63-73.
32. Vandenabeele P, Fiers W. Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1/IL-6-mediated 'acute phase response' in the brain? *Immunol Today.* 1991 Jul;12(7):217-9.
33. Wang J, Zhang HY, Tang XC. Huperzine A improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. *J Neurosci Res.* 2010 Mar;88(4):807-15.
34. Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;966:108-18.
35. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003 Jun;24(6):327-34.
36. Telen MJ. Cellular adhesion and the endothelium: E-selectin, L-selectin, and pan-selectin inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014 Apr;28(2):341-54.
37. McDonald B, Kubes P. Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking. *Front Immunol.* 2015;6:68.
38. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol.* 2013 May 1;190(9):4451-7.
39. Gavins FN, Chatterjee BE. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: focus on the mesentery and cremaster preparations. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004 Jan-Feb;49(1):1-14.
40. Sancesario G, Pietroiusti A, Cestaro B, Fusco FR, Magrini A, Patacchioli FR, et al. Mild brain ischemia increases cerebral lipid peroxidation and activates leukocytes in the peripheral blood of rats. *Funct Neurol.* 1997 Sep-Oct;12(5):283-91.
41. Ishikawa M, Cooper D, Arumugam TV, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions after middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Aug;24(8):907-15.

42. Fregnan F, Muratori L, Simoes AR, Giacobini-Robecchi MG, Raimondo S. Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury. *Neural Regen Res.* 2012 Oct 15;7(29):2259-66.
43. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011 Feb;25(2):181-213.
44. St. Pierre BA MJ, Dopp JM. Effects of Cytokines on CNS Cells: Glia. In: Ransohoff RM, Benveniste EN, editors. *Cytokines and the CNS.* Boca Raton: CRC Press. 1996:151-67.
45. Khojasteh F, Nahavandi A, Mehrpouya S, Homberg JR, Mirzamohammadi S, Raufi S, et al. Cognitive impairment induced by permanent bilateral common carotid occlusion exacerbates depression-related behavioral, biochemical, immunological and neuronal markers. *Brain Res.* 2015 Jan 30;1596:58-68.
46. Mauer J, Denson JL, Bruning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol.* 2015 Feb;36(2):92-101.
47. Matsuda S, Wen TC, Morita F, Otsuka H, Igase K, Yoshimura H, et al. Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. *Neurosci Lett.* 1996 Feb 2;204(1-2):109-12.
48. Yamada M, Hatanaka H. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res.* 1994 Apr 18;643(1-2):173-80.
49. Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, et al. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct;86(19):7606-10.
50. Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I. Cytokine regulation of neuronal survival. *J Neurochem.* 1992 Feb;58(2):454-60.
51. Tarkowski E, Liljeroth AM, Minthon L, Tarkowski A, Wallin A, Blennow K. Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Res Bull.* 2003 Aug 15;61(3):255-60.
52. Aliev G, Smith MA, Obrenovich ME, de la Torre JC, Perry G. Role of vascular hypoperfusion-induced oxidative stress and mitochondria failure in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Neurotox Res.* 2003;5(7):491-504.
53. Choi DH, Lee KH, Kim JH, Seo JH, Kim HY, Shin CY, et al. NADPH oxidase 1, a novel molecular source of ROS in hippocampal neuronal death in vascular dementia. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Aug 1;21(4):533-50.
54. Cairns B, Kim JY, Tang XN, Yenari MA. NOX inhibitors as a therapeutic strategy for stroke and neurodegenerative disease. *Curr Drug Targets.* 2012 Feb;13(2):199-206.
55. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 2:S265-79.

56. Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M. Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF-kB in human aortic smooth muscle cells. *Arch Physiol Biochem.* 2007 Oct-Dec;113(4-5):163-72.
57. Zeng L, Wang Y, Liu J, Wang L, Weng S, Chen K, et al. Pro-inflammatory cytokine network in peripheral inflammation response to cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2013 Aug 26;548:4-9.
58. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvari M, et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int.* 2001 Jan;38(1):17-23.
59. White SM, Wojcicki TR, McAuley E. Social cognitive influences on physical activity behavior in middle-aged and older adults. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 2012 Jan;67(1):18-26.
60. Kraus WE, Slentz CA. Exercise training, lipid regulation, and insulin action: a tangled web of cause and effect. *Obesity (Silver Spring).* 2009 Dec;17 Suppl 3:S21-6.
61. Slentz CA, Houmard JA, Kraus WE. Exercise, abdominal obesity, skeletal muscle, and metabolic risk: evidence for a dose response. *Obesity (Silver Spring).* 2009 Dec;17 Suppl 3:S27-33.
62. Ross R, Janssen I, Dawson J, Kungl AM, Kuk JL, Wong SL, et al. Exercise-induced reduction in obesity and insulin resistance in women: a randomized controlled trial. *Obes Res.* 2004 May;12(5):789-98.
63. Saunders DH, Greig CA, Mead GE. Physical activity and exercise after stroke: review of multiple meaningful benefits. *Stroke.* 2014 Dec;45(12):3742-7.
64. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 9;96(23):13427-31.
65. Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Dec;10(12):861-72.
66. Lee SU, Kim DY, Park SH, Choi DH, Park HW, Han TR. Mild to moderate early exercise promotes recovery from cerebral ischemia in rats. *Can J Neurol Sci.* 2009 Jul;36(4):443-9.
67. Swain RA, Harris AB, Wiener EC, Dutka MV, Morris HD, Theien BE, et al. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience.* 2003;117(4):1037-46.
68. Adamson BC, Ensari I, Motl RW. Effect of Exercise on Depressive Symptoms in Adults With Neurologic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2015 Jan 13.

69. Haykowsky M, Scott J, Esch B, Schopflocher D, Myers J, Paterson I, et al. A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. *Trials*. 2011;12:92.
70. Tian S, Zhang Y, Yang X, Yu K, Shen X, Zhang L, et al. Early exercise training improves ischemic outcome in rats by cerebral hemodynamics. *Brain Res*. 2013 Oct 2;1533:114-21.
71. Zhang P, Zhang Y, Zhang J, Wu Y, Jia J, Wu J, et al. Early Exercise Protects against Cerebral Ischemic Injury through Inhibiting Neuron Apoptosis in Cortex in Rats. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):6074-89.
72. Zhang P, Yu H, Zhou N, Zhang J, Wu Y, Zhang Y, et al. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *J Neuroeng Rehabil*. 2013;10:43.
73. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Sep;11(9):607-15.
74. Hopps E, Canino B, Caimi G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta Diabetol*. 2011 Sep;48(3):183-9.
75. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Apr;98(4):1154-62.
76. Nimmo MA, Leggate M, Viana JL, King JA. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Sep;15 Suppl 3:51-60.
77. Svensson M, Lexell J, Deierborg T. Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, and Behavior: What We Can Learn From Animal Models in Clinical Settings. *Neurorehabil Neural Repair*. 2014 Dec 19.
78. Huang W, Glass CK. Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Aug;30(8):1542-9.
79. de Lemos ET, Oliveira J, Pinheiro JP, Reis F. Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:741545.
80. Corbi G, Conti V, Russomanno G, Rengo G, Vitulli P, Ciccarelli AL, et al. Is physical activity able to modify oxidative damage in cardiovascular aging? *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:728547.
81. Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA, Oliveira J. Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *Int J Cardiol*. 2010 Jun 11;141(3):214-21.

82. Pittaluga M, Sgadari A, Dimauro I, Tavazzi B, Parisi P, Caporossi D. Physical Exercise and Redox Balance in Type 2 Diabetics: Effects of Moderate Training on Biomarkers of Oxidative Stress and DNA Damage Evaluated through Comet Assay. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:981242.
83. Azizbeigi K, Azarbayjani MA, Atashak S, Stannard SR. Effect of moderate and high resistance training intensity on indices of inflammatory and oxidative stress. *Res Sports Med*. 2015;23(1):73-87.
84. Polidori MC, Mecocci P, Cherubini A, Senin U. Physical activity and oxidative stress during aging. *Int J Sports Med*. 2000 Apr;21(3):154-7.
85. Tanaka LY, Bechara LR, Dos Santos AM, Jordao CP, de Sousa LG, Bartholomeu T, et al. Exercise improves endothelial function: A local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Nitric Oxide*. 2015 Feb 15;45:7-14.
86. Quillon A, Fromy B, Debret R. Endothelium microenvironment sensing leading to nitric oxide mediated vasodilation: A review of nervous and biomechanical signals. *Nitric Oxide*. 2015 Feb 15;45:20-6.
87. Nosarev AV, Smaglyi LV, Anfinogenova Y, Popov SV, Kapilevich LV. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:73.
88. Persson MG, Wiklund NP, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Nov;148(5):1210-4.
89. Viboolvorakul S, Patumraj S. Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *Biomed Res Int*. 2014;2014:230791.
90. Huang CX, Qiu X, Wang S, Wu H, Xia L, Li C, et al. Exercise-induced changes of the capillaries in the cortex of middle-aged rats. *Neuroscience*. 2013 Mar 13;233:139-45.
91. Machado MV, Vieira AB, Nascimento AR, Martins RL, Daleprane JB, Lessa MA, et al. Physical exercise restores microvascular function in obese rats with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2014 Nov;12(9):484-92.
92. Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Sep;291(3):H1290-8.
93. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schrock H, et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res*. 2006 Nov 10;99(10):1132-40.
94. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen

- consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.
95. Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res*. 2000 Dec 8;87(12):1141-8.
 96. Araujo CV, Estado V, Tibirica E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res*. 2012 Sep;84(2):218-21.
 97. Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, Bello A, Kohler O, de Moraes R, et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res*. 2012 May;83(3):376-9.
 98. Eriksson S, Nilsson J, Stureson C. Non-invasive imaging of microcirculation: a technology review. *Med Devices (Auckl)*. 2014;7:445-52.
 99. Caputo LFG, Gitirana LB, Manso P. Técnicas Histológicas. In: Molinaro E, Caputo LFG, Amendoeira M, editors. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC; 2010. p. 89-185.
 100. Nascimento AR, Machado M, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, et al. Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Oct;21(10):2046-54.
 101. Manwani B, Friedler B, Verma R, Venna VR, McCullough LD, Liu F. Perfusion of ischemic brain in young and aged animals: a laser speckle flowmetry study. *Stroke*. 2014 Feb;45(2):571-8.
 102. Brown WR, Thore CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011 Feb;37(1):56-74.
 103. Jucker M, Battig K, Meier-Ruge W. Effects of aging and vincamine derivatives on pericapillary microenvironment: stereological characterization of the cerebral capillary network. *Neurobiol Aging*. 1990 Jan-Feb;11(1):39-46.
 104. Shao WH, Li C, Chen L, Qiu X, Zhang W, Huang CX, et al. Stereological investigation of age-related changes of the capillaries in white matter. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010 Aug;293(8):1400-7.
 105. Lee GD, Aruna JH, Barrett PM, Lei DL, Ingram DK, Mouton PR. Stereological analysis of microvascular parameters in a double transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2005 Apr 30;65(4):317-22.
 106. Choy M, Ganesan V, Thomas DL, Thornton JS, Proctor E, King MD, et al. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Aug;26(8):1066-75.

107. Tsuchiya M, Sako K, Yura S, Yonemasu Y. Local cerebral glucose utilisation following acute and chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats: relation to changes in local cerebral blood flow. *Exp Brain Res.* 1993;95(1):1-7.
108. Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, Carbin GL, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14C] antipyrine. *Am J Physiol.* 1978 Jan;234(1):H59-66.
109. Hecht N, Woitzik J, Dreier JP, Vajkoczy P. Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis. *Neurosurg Focus.* 2009 Oct;27(4):E11.
110. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):5-11.
111. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004 Jun;16(1):1-13.
112. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol.* 2007 Feb;7(2):161-7.
113. Ferrante A, Kowanko IC, Bates EJ. Mechanisms of host tissue damage by cytokine-activated neutrophils. *Immunol Ser.* 1992;57:499-521.
114. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Lowery SL, Cipolla MJ. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke.* 2001 Apr;32(4):1000-4.
115. Kleim JA, Cooper NR, VandenBerg PM. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res.* 2002 Apr 26;934(1):1-6.
116. Wang S, Chen L, Zhang L, Huang C, Xiu Y, Wang F, et al. Effects of long-term exercise on spatial learning, memory ability, and cortical capillaries in aged rats. *Med Sci Monit.* 2015;21:945-54.
117. Parra RS, Mendes LA, Fazan R, Jr., Salgado HC. Pressure response to carotid occlusion in diabetic rats: effect of insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 Apr;68(1):12-7.
118. Farinatti Pde T, Oliveira RB, Pinto VL, Monteiro WD, Francischetti E. [Home exercise program: short term effects on physical aptitude and blood pressure in hypertensive individuals]. *Arq Bras Cardiol.* 2005 Jun;84(6):473-9.
119. Seron P, Lanas F, Pardo Hernandez H, Bonfill Cosp X. Exercise for people with high cardiovascular risk. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;8:CD009387.
120. Thomas DE, Elliott EJ, Naughton GA. Exercise for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(3):CD002968.