



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Eduarda de Souza Hoepfer

**O EFEITO DO TREINO ACROBÁTICO SOBRE A MOTRICIDADE EM
RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO
ENCEFÁLICA CRÔNICA**

Orientador: Prof^o. Dr^o. Carlos Alexandre Netto

Co-orientadora: Ma. Ana Paula Rodrigues Martini

Porto Alegre, 2021

O EFEITO DO TREINO ACROBÁTICO SOBRE A MOTRICIDADE EM RATOS
MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO ENCEFÁLICA
CRÔNICA

Eduarda Hoepfer ^{a,b}, Ana Paula Rodrigues Martini ^{b,c}, Thales Avila ^{b,d}, Andrey Vinicios Soares ^{b,c}, Débora Piassarollo Dos Santos ^e, Tatiana Norman ^e, Carlos Alexandre Netto ^{b,c}

^a Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^d Graduando em Fisioterapia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;

^e Graduada em Fisioterapia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil;

Autor correspondente:

Eduarda Hoepfer

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Rua Ramiro Barcelos, 2600-Prédio Anexo - Floresta, Porto Alegre - RS, 90035-003 - Telefone: + 55-51- 90035-003; e-mail: eh-r@live.com

Financiamento

Este estudo foi financiado pelas agências brasileiras CNPq e CAPES.

Conflito de interesses - Não há conflitos de interesses a declarar.

Modelo referencial bibliográfico: Brain Research.

CIP - Catalogação na Publicação

Hoeper, Eduarda de Souza
O EFEITO DO TREINO ACROBÁTICO SOBRE A MOTRICIDADE
EM RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS A HIPOPERFUSÃO
ENCEFÁLICA CRÔNICA / Eduarda de Souza Hoeper. -- 2021.
37 f.
Orientador: Carlos Alexandre Netto.

Coorientadora: Ana Paula Rodrigues Martini.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Demência Vascular. 2. Dimorfismo Sexual. 3.
Hipoperfusão Encefálica Crônica. 4. Treino Acrobático.
5. Motricidade. I. Netto, Carlos Alexandre, orient.
II. Rodrigues Martini, Ana Paula, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

EDUARDA DE SOUZA HOEPER

**O EFEITO DO TREINO ACROBÁTICO SOBRE A MOTRICIDADE EM
RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO
ENCEFÁLICA CRÔNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Carlos Alexandre Netto

Coorientadora: Ana Paula Rodrigues Martini

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Ma. Felipe Kawa Odorcyk

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dra. Bruna Ferrary Deniz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

RESUMO

A demência vascular é caracterizada por um déficit crescente de funções cognitivas e motoras, sendo uma das causas mais comuns de demência em idosos. A principal característica fisiopatológica da demência vascular é a hipoperfusão encefálica crônica, cuja diminuição prolongada do fluxo sanguíneo resulta em prejuízos progressivos. O exercício acrobático é constituído por tarefas organizadas em circuitos de forma a estimular a capacidade cognitiva através de problemas associados ao controle motor. Estudos têm demonstrado que os hormônios sexuais, como a progesterona e a testosterona, podem estar envolvidos na diminuição dos riscos de acidentes vasculares encefálicos, indicando que as vias envolvidas na resposta a hipoperfusão encefálica crônica podem ser sexualmente dependentes. O presente estudo visou avaliar o exercício acrobático como forma de tratamento da demência vascular experimental, induzida no modelo de hipoperfusão encefálica crônica, considerando as estruturas relacionadas à motricidade e desempenho funcional, levando também em consideração as diferenças sexuais dos animais. Foram utilizados 87 ratos Wistar, sendo 45 machos e 42 fêmeas, com 60 dias de idade. Os animais foram divididos em oito (8) grupos, levando em consideração o sexo dos mesmos: fêmeas SHAM SED, SHAM AC, 2VO SED, 2VO AC e machos SHAM SED, SHAM AC, 2VO SED, 2VO AC. Os animais 2VO foram submetidos a cirurgia de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns. O protocolo de treino acrobático foi aplicado 30 dias após a primeira cirurgia de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns apenas nos grupos SHAM AC e 2VO AC. Após o término do protocolo de treino acrobático, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, para análise da habilidade motora, a avaliação do *beam balance* e da escada horizontal, para verificar a coordenação motora grosseira e fina, respectivamente. A eutanásia ocorreu após as avaliações comportamentais, sendo as amostras coletadas para investigar os efeitos do treino acrobático. A análise do tempo para completar o circuito acrobático evidenciou que as fêmeas 2VO tem um desempenho similar as fêmeas SHAM. No teste do campo aberto os machos sedentários apresentaram mobilidade reduzida em relação as fêmeas sedentárias, efeito que não foi visualizado entre os animais treinados. Da maneira similar, as fêmeas apresentaram uma melhor coordenação motora em comparação aos machos, o que também se verificou entre os animais treinados em comparação aos sedentários na avaliação do *beam balance*. No teste da escada horizontal, no entanto, os animais treinados tiveram um desempenho melhor e um menor número de erros quando comparados aos sedentários. A análise histológica não encontrou diferença nos volumes cortical e estriatal dos animais 2VO em comparação aos SHAM. A hipoperfusão encefálica crônica demonstrou afetar a habilidade motora dos animais. O efeito do treino acrobático se mostrou como potencial tratamento para a melhora da capacidade motora dos animais no modelo de hipoperfusão encefálica crônica, sobretudo entre as fêmeas.

Palavras-chave: demência vascular, dimorfismo sexual, hipoperfusão encefálica crônica, treino acrobático, motricidade.

ABSTRACT

Vascular dementia is characterized by a gradual deficit of cognitive and motor functions and is one of the most common causes of dementia in the elderly. The main pathophysiological feature of vascular dementia is chronic encephalic hypoperfusion that leads to prolonged decrease in blood flow results in progressive impairment. Acrobatic exercise consists of tasks organized into circuits in order to stimulate cognitive capacity through problems associated with motor control. Studies have shown that the sexual hormones are involved in the reduction of the risks of strokes, indicating that pathways involved in the response to the reduction of blood flow in encephalic structures are sexually dependent. The present study aimed to evaluate the acrobatic exercise as a form of treatment of vascular dementia, in a model of chronic encephalic hypoperfusion, considering the structures related to motricity and functional performance, also taking into consideration the sexual differences of the animals. Eighty-seven Wistar rats were used, 45 males and 42 females, with 60 days of age. The animals were divided into eight (8) groups taking into consideration their sex: SHAM SED, SHAM AC, 2VO SED, 2VO AC females and SHAM SED, SHAM AC, 2VO SED, 2VO AC males. The 2VO animals underwent bilateral common carotid artery occlusion surgery. The acrobatic training protocol was applied 30 days after the first bilateral common carotid artery occlusion surgery only in SHAM AC and 2VO AC groups. After the end of the acrobatic training protocol, the animals were submitted to the open field test to analyze motor ability, the beam balance and the ladder-walking tests to evaluate gross and fine motor coordination, respectively. The euthanasia occurred after behavioral evaluations and samples were collected to investigate effects of acrobatic training. The analysis of the time to complete the acrobatic circuit evidenced that 2VO females have a performance similar to SHAM females. In the open field behavior test, sedentary males showed reduced mobility in relation to sedentary females, an effect that was not observed among trained animals. Similarly, females showed better motor coordination in comparison to males, which was also observed among trained animals in comparison to sedentary animals in the beam balance evaluation. In the horizontal ladder test, however, trained animals had a better performance and a lower number of errors when compared to sedentary ones. Histological analyses found no difference in cortical and striatal volume of the 2VO animals compared to SHAM animals. Chronic encephalic hypoperfusion was shown to affect the motor ability of the animals. The effect of acrobatic training was shown as a potential treatment for the improvement of the motor ability of the animals in the model of chronic encephalic hypoperfusion, especially among the females

Key words: vascular dementia, sexual dimorphism, chronic cerebral hypoperfusion, acrobatic exercise, motricity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental.....	14
Figura 2 – Circuito acrobático	15
Figura 3A – Peso dos animais antes da oclusão da carótida comum esquerda	18
Figura 3B – Peso dos animais antes da oclusão da carótida comum direita	19
Figura 3C – Peso dos animais na eutanásia	19
Figura 4 – Desempenho dos animais no treino acrobático: tempo para finalizar o circuito	21
Figura 5A – Campo aberto: distância total percorrida	22
Figura 5B – Campo aberto: tempo no centro	22
Figura 5C – Campo aberto: tempo na periferia	23
Figura 5D – Campo aberto: cruzamentos	23
Figura 6 – <i>Beam balance</i> : pontuação dos animais na avaliação.....	24
Figura 7A – Escada horizontal: qualidade do passo das patas anteriores	25
Figura 7B – Escada horizontal: qualidade do passo das patas posteriores	25
Figura 7C – Escada horizontal: número de erros das patas anteriores	26
Figura 7D – Escada horizontal: número de erros das patas posteriores	26
Figura 8A – Análises histológicas: volume cortical	27
Figura 8B – Análises histológicas: volume estriatal	27
Figura 8C – Cortes histológicos	28

ABREVIACOES

2VO – OCLUSÃO DE DOIS VASOS

AVE – ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

DV- DEMÊNCIA VASCULAR

EA – EXERCÍCIO ACROBÁTICO

HEC – HIPOPERFUSÃO ENCEFÁLICA ENCRNICA

SHAM AC – SHAM ACROBÁTICO

SHAM SED – SHAM SEDENTÁRIO

2VO AC – 2VO ACROBÁTICO

2VO SED – 2VO SEDENTÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Aspectos Éticos	14
3.2. Animais	14
3.3. Grupos e desenho experimental	15
3.4. Procedimento cirúrgico – Hipoperfusão Encefálica Crônica Modificada.....	15
3.5. Treino Acrobático.....	16
3.6. Avaliação Comportamental.....	16
3.6.1. Teste do Campo Aberto.....	16
3.6.2. Bem Balance.....	17
3.6.3. Teste da Escada Horizontal	17
3.7. Análises Histológicas	18
3.7.1. Volume das Estruturas.....	18
3.8. Análises Estatísticas	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Peso	19
4.2. Treino Acrobático.....	21
4.3. Campo Aberto	22
4.4. <i>Beam Balance</i>	25
4.5. Escada Horizontal.....	25
4.6. Volume das Estruturas.....	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A demência é uma síndrome caracterizada pela perda gradativa de funções cognitivas e motoras, sendo uma das maiores causas de incapacidade e dependência em pessoas idosas devido ao prejuízo na realização de atividades cotidianas (McKhann, 2012). Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas vivam com demência no mundo, número que se presume triplicar até 2050 (Organização Mundial da Saúde, 2020). A demência vascular (DV) é uma das causas mais comuns de demência em idosos (Gorelick et al., 2011), acometendo de 1% a 4% das pessoas com mais de 65 anos (McVeigh and Passmore, 2006), cuja prevalência parece dobrar conforme o aumento da idade (O'Brien and Thomas, 2015). A condição progressiva da DV tem impacto na saúde não somente do paciente, mas também para os familiares encarregados de seus cuidados (Alves et al., 2019). Alguns estudos relatam o risco de *burnout* por parte dos cuidadores responsáveis por pacientes com DV (Butcher, 2018; Takai et al., 2009; Truzzi et al., 2012). A fim de melhorar a qualidade de vida de pacientes e cuidadores é necessário a realização de um diagnóstico preciso, assegurando o manejo correto dos sintomas, além da garantia de um suporte psicossocial (O'Brien and Thomas, 2015).

A hipoperfusão encefálica crônica (HEC) é a principal característica fisiopatológica da DV e a diminuição do fluxo sanguíneo encefálico de forma prolongada resulta em prejuízos progressivos (Lee et al., 2019). A HEC é causada pela doença dos pequenos vasos (Arba et al., 2017) ou aterosclerose dos grandes vasos (Safouris et al., 2014). Na pesquisa experimental é possível reproduzir a HEC em animais por meio do modelo de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (do inglês, 2VO – *two vessel occlusion*), e assim estudar a disfunção cognitiva e processos neurodegenerativos relacionados (Farkas et al., 2007)

Sugere-se que a HEC seja a causa da diminuição da substância branca, uma característica importante na demência associada a doenças de pequenos vasos cerebrais (Duncombe et al., 2017). Estudos indicam que os danos observados na substância branca são, em alguma medida, responsáveis pelo déficit de aprendizado em modelo experimental animal (Farkas et al., 2007). Entre outros prejuízos ocasionados pela HEC, observados em modelo experimental animal, estão o déficit de transmissão sináptica, redução no número de neurônios piramidais, neurodegeneração na região CA1 do hipocampo e astrogliose reativa na fase aguda (Cechetti et al., 2012; Farkas et al., 2007), além de déficits cognitivos relacionados à memória, mesmo que não tenha sido observado diminuição do volume tecidual de estruturas encefálicas como hipocampo e estriado (Cechetti et al., 2012; Murakami et al., 2005). A HEC não demonstrou diferença no volume tecidual do cerebelo quando avaliado o volume das camadas molecular,

granular e substância branca, porém foi observada uma perda das células de Purkinje na região do vermis cerebelar em função da hipoperfusão (Kántor et al., 2007). Além de alterações celulares, foi observado no campo aberto que a atividade motora dos animais submetidos ao procedimento de 2VO não sofreu alterações na distância total percorrida pelos animais durante o teste (Cechetti et al., 2010).

Sabe-se que o exercício tem efeitos sobre o bem-estar físico e psicológico (Zubala et al., 2017), sendo também um importante contribuinte para a saúde cardiovascular (Nystoriak and Bhatnagar, 2018), além de influenciar a plasticidade cerebral e exercer efeitos positivos sobre capacidade cognitiva e motora (Steiner et al., 2011). Estudos em animais saudáveis demonstraram que o exercício físico intenso ocasiona aumento na taxa proliferativa de neurônios e de células da glia no hipocampo e neocórtex (Brown et al., 2005; Steiner et al., 2011) como também a indução de angiogênese no neocórtex, hipocampo e cerebelo (Gelfo et al., 2018).

O exercício acrobático (EA) é uma atividade motora complexa, composto por tarefas organizadas em circuitos com obstáculos que tem por objetivo estimular a capacidade cognitiva através da resolução de problemas associados ao controle motor (Garcia et al., 2012). Essa modalidade é capaz de promover neuroplasticidade (Gutierrez et al., 2018), aumentando a expressão de proteínas estruturais e sinápticas no córtex motor e no estriado, estruturas importantes para aprendizagem motora e aquisição de novas habilidades (Jones et al., 1999). Foi observado no período de treino acrobático de quatro semanas que ocorre o aumento de proteínas estruturais e sinápticas como Proteína 2 Associada a Microtúbulos, Sinaptofisina no córtex motor, Proteína 2 Associada a Microtúbulos, Sinaptofisina e Sinapsina no estriado dorso-medial e neurofilamentos na camada granular do cerebelo (Salame et al., 2016). Além disso, no modelo animal de hemorragia intracerebral, o exercício acrobático foi capaz de melhorar as funções sensorio-motoras e recuperar a função motora grosseira na fase inicial da lesão, bem como a coordenação na fase tardia através dos testes de *beam balance* e escada horizontal, respectivamente (Tamakoshi et al., 2014). Jones et al. (1999), demonstraram que tarefas acrobáticas melhoraram a função motora do membro anterior após lesão unilateral de córtex sensorial e motor primários, aumentando também o número de sinapses por neurônio da camada V do córtex oposto à lesão.

A diferenciação entre machos e fêmeas, além de se apresentar nos órgãos gonadais, definem as características morfológicas entre os sexos, mas essa distinção biológica não fica aí limitada. As diferenças fisiológicas entre os sexos culminam em diferentes aspectos de susceptibilidade

às mais diversas patologias como também podem influenciar no tratamento sobre as mesmas (Bainham, 2002). Evidências sugerem que os hormônios sexuais possam modular os riscos de acidentes vasculares encefálicos (AVE) através de sua ação sobre estruturas cerebrovasculares (Krause et al., 2011) da mesma forma que possuem um importante papel na mediação de processos inflamatórios nessas regiões (Park et al., 2006). Uma revisão recente sobre estudos em humanos apontou que as diferenças existentes nas reações fisiopatológicas pós AVE não são facilmente traduzíveis para a clínica pois as respostas pró e anti-inflamatórias ocorrem por vias de morte celular sexualmente dimórficas (Kerr et al., 2019). Em animais submetidos a hipóxia-isquemia neonatal foi possível visualizar que nas fêmeas a morte celular ocorre principalmente pela ativação da via dependente das caspases, enquanto nos machos ocorre por aumento do estresse oxidativo. Ainda, as fêmeas apresentaram maior prejuízo cognitivo relacionados à memória e ao aprendizado, enquanto os machos demonstraram um maior déficit motor (Netto et al., 2017). O melhor conhecimento a respeito dessas diferenças pode auxiliar futuros tratamentos com maior adequação às necessidades dos pacientes. Nossa hipótese é de que o exercício acrobático diminua os efeitos deletérios da HEC. Ainda esperamos observar diferenças por influência do dimorfismo sexual sobre os parâmetros analisados.

JUSTIFICATIVA

Os estudos sobre DV têm produzido avanços na busca pela qualidade de vida dos pacientes que sofrem com esta enfermidade. O exercício acrobático tem se mostrado promissor como modelo de tratamento de danos cognitivos e motores. No entanto, pouco se sabe sobre sua efetividade considerando as diferenças sexuais dos animais submetidos à DV experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo avaliou o exercício acrobático como forma de tratamento da DV experimental, induzida no modelo de HEC, considerando as estruturas relacionadas à motricidade e desempenho funcional, e levando em consideração as diferenças entre os sexos dos animais.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar o efeito do treino acrobático no modelo de HEC através da aplicação de um protocolo de exercício acrobático em ratos machos e fêmeas.
- 2) Analisar o efeito do treino acrobático sobre a habilidade motora dos animais pelo teste do campo aberto.
- 3) Avaliar se a coordenação motora e a qualidade do passo dos animais foram afetadas pela HEC e pelo treino acrobático nos testes do *beam balance* e da escada horizontal.
- 4) Analisar se houve efeito do treino acrobático após a HEC sobre o volume de estruturas cerebrais, córtex e estriado.
- 5) Analisar as diferenças na resposta ao exercício acrobático ocasionadas pelo dimorfismo sexual com base nos resultados obtidos nas demais análises.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Este experimento foi executado seguindo as diretrizes do Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (INS) e do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) como regulamentado pela Lei Brasileira de nº 11.794/2008 sobre o manejo científico de animais. Os procedimentos foram realizados visando a minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados neste trabalho. O Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS) aprovou este estudo sob o protocolo de número #34309.

3.2 Animais

Foram utilizados 87 ratos Wistar (45 machos e 42 fêmeas) com 60 dias. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos em caixas-moradia em ambiente climatizado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclos de claro e escuro de 12h com comida *ad libitum* no Biotério Setorial do mesmo departamento.

3.3 Grupos e Desenho Experimental

Machos e fêmeas foram divididos em oito (8) grupos, levando em consideração o sexo dos animais: fêmeas - SHAM SED (n=11), SHAM AC (n=11), 2VO SED (n=10), 2VO AC (n=10) e machos - SHAM SED (n=12), SHAM AC (n=12), 2VO SED (n=10), 2VO AC (n=11).

Os animais SHAM SED foram submetidos à cirurgia sham e não realizaram o treino acrobático; SHAM AC foram submetidos à cirurgia sham e realizaram o treino acrobático; 2VO SED foram submetidos à cirurgia de oclusão das carótidas comuns e não realizaram o treino acrobático; 2VO AC foram submetidos à cirurgia de oclusão das carótidas comuns e realizaram o treino acrobático.

O início do treinamento acrobático ocorreu 45 após a última cirurgia de 2VO, como apresentado no desenho experimental (Figura 1). Os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas para de investigar os efeitos do tratamento em dois períodos: após o treino acrobático (75 dias após a cirurgia de 2VO) e após as avaliações comportamentais (100 dias após a cirurgia de 2VO).

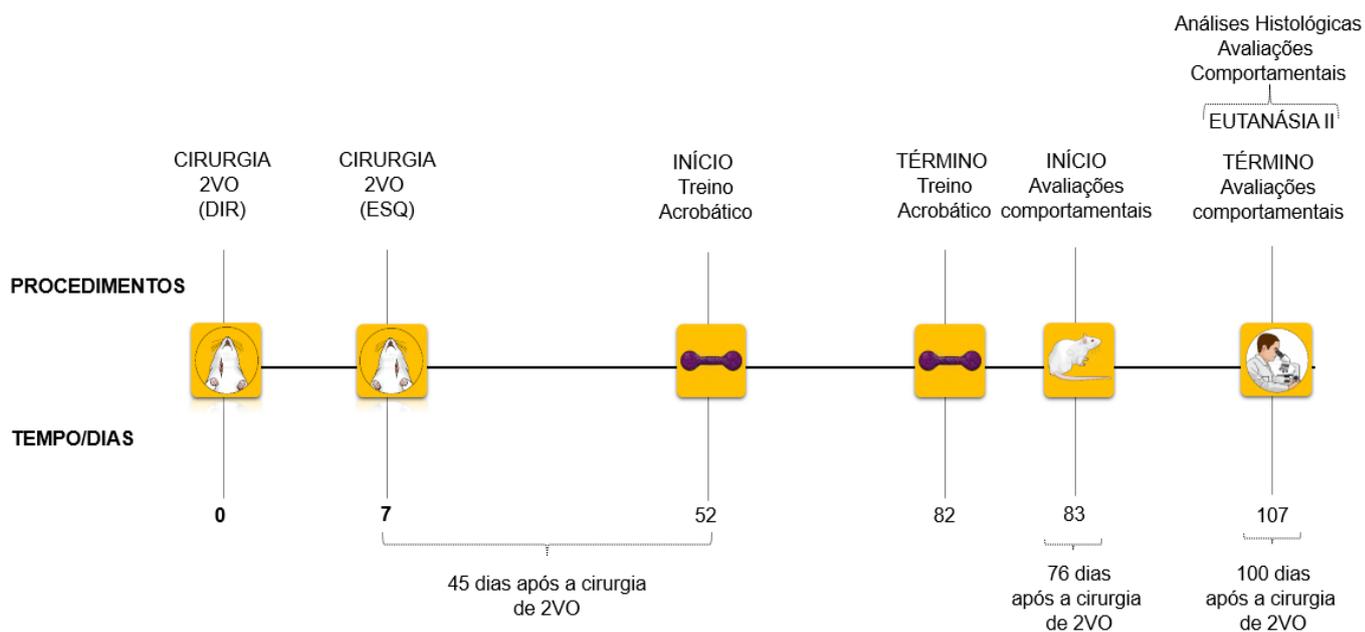


Figura 1. Linha cronológica dos procedimentos realizados durante o experimento.

3.4 Procedimento cirúrgico - Hipoperfusão Encefálica Crônica Modificada

Os animais foram previamente anestesiados com uma mistura gasosa de isoflurano e oxigênio (4% para indução e 2% para manutenção) e colocados em decúbito dorsal. O procedimento foi iniciado por uma incisão mediana no pescoço do animal, sendo então a artéria carótida comum direita identificada, cuidadosamente separada de estruturas adjacentes e então ocluída permanentemente com fios de sutura cirúrgica. Uma semana após a oclusão da artéria carótida comum direita, foi realizada a oclusão da artéria carótida comum esquerda, seguindo o protocolo modificado da HEC (Cechetti et al., 2010), que demonstrou reduzir a mortalidade dos animais quando as cirurgias de oclusão das artérias carótidas comuns direita e esquerda são realizadas com o intervalo de uma semana. Os animais do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, mas sem que houvesse a oclusão com o fio de sutura. Ao final da cirurgia, os animais receberam uma aplicação tópica de 10% de lidocaína na incisão além de medicação analgésica oral e alocados numa sala pós-operatória onde todos os cuidados posteriores foram providenciados diariamente. Os animais submetidos a cirurgia 2VO permaneceram 45 dias desenvolvendo as condições encefálicas de neurodegeneração e déficit cognitivo esperados na DV conforme Anastacio et al., 2014.

3.5 *Treino Acrobático*

O treino acrobático teve início 45 dias após a cirurgia de 2VO com os grupos experimentais acima especificados. O aparato consiste em 5 tarefas: ponte de corda grossa ou fina, pista com obstáculos baixos ou elevados, ponte de cordas paralelas e grade com buracos grandes ou pequenos (Black et al., 1990; Confortim et al., 2019; Jones et al., 1999; Tamakoshi et al., 2017). O circuito ficou elevado a 1.50 m da superfície do chão e os animais realizaram 5 passadas por dia, três vezes por semana, em dias alternados. Todos os treinos foram executados em sequência, sem intervalos entre os mesmos (Salame et al., 2016). A cada semana os obstáculos foram modificados a fim de intensificar o nível de dificuldade dos animais. Cada passagem pelo circuito completo foi cronometrada para cada animal. Ao final dos 5 treinos de cada animal, os obstáculos foram limpos com etanol 70%. Os animais sedentários foram mantidos em caixas distintas das habituais durante o período de treino dos demais animais (Pereira et al., 2007). Os machos e as fêmeas foram manipulados separadamente durante as sessões de treino.



FIGURA 2. Circuito acrobático utilizado para o treino dos animais.

3.6 *Avaliação Comportamental*

3.6.1 *Teste do Campo Aberto*

O teste do campo aberto é empregado a fim de avaliar o comportamento exploratório bem como a quantidade e qualidade da habilidade motora em ratos (Gould et al., 2009). Foi utilizada uma caixa de madeira com medidas de 60 × 45 × 30 cm em uma sala adequada para testes. Fatores como iluminação, temperatura e som foram previamente verificados e mantidos sob controle durante o experimento. O software ANY-Maze foi usado para gravar a atividade exploratória do animal no aparato durante um período de 5 minutos. Através do protocolo

criado usando o ANY-Maze foi feita a avaliação do número de cruzamentos, o tempo percorrido no centro da caixa, o tempo percorrido na periferia da caixa e a distância total percorrida por cada animal durante o teste. Os dados foram expressos em média \pm SEM.

3.6.2 *Beam Balance*

O teste de *Beam Balance* foi realizado 83 dias após a cirurgia de 2VO utilizando uma viga estreita de madeira (1 cm de largura x 50 cm de comprimento). Os animais foram submetidos a um treino de 3 tentativas previamente à realização do teste em si. O teste foi filmado com uma câmera Digital Sony Cyber-Shot DSC-W630 16.1Mp 2.7 para avaliação posterior. A avaliação do desempenho foi feita através de uma pontuação de 0 a 4, onde 0 = caminhada normal em cima da viga até a caixa moradia; 1 = passadas alongadas ou caminhada desequilibrada; 2 = deslizamento de qualquer membro da viga ao longo do trajeto; 3 = incapacidade de andar na viga; 4 = queda da viga em 10 segundos. Os dados são expressos em média \pm SEM.

3.6.3 *Teste da Escada Horizontal*

O teste da escada horizontal foi inicialmente descrito a fim de analisar a função motora após lesões no sistema nervoso central, avaliando fatores como coordenação e habilidade de execução da marcha através da observação dos erros de colocação dos membros anteriores e posteriores como também pela qualidade do passo (Metz and Whishaw, 2009). Nesse teste, duas paredes de acrílico transparente (1 m de comprimento por 20 cm de altura) são paralelamente posicionadas e, entre elas, inseridas traves de metal (3 mm de diâmetro cada) com uma distância mínima de 1 cm. O aparato fica elevado 30 cm da superfície e com um refúgio escuro para o animal ao final de sua extensão. A largura entre as paredes é ajustada para que o animal não caminhe no sentido contrário ao teste (Metz and Whishaw, 2009). Dois padrões de traves foram utilizados: um regular (espaçamento de 2 cm) e outro irregular (espaçamento de 1 a 5 cm). O padrão regular foi aplicado durante as sessões de treino para habituação ao aparato. Durante as sessões de avaliação foi utilizado o padrão irregular a fim de evitar que os animais compensassem algum dano motor através do aprendizado adquirido durante as sessões de treino. Todas as sessões de avaliação foram filmadas e a análise do desempenho foi feita pelo número de erros e expressa em percentual de erros (MacLellan et al., 2006; Metz and Whishaw, 2009).

3.7 *Análise Histológica*

3.7.1 *Volume das Estruturas*

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (0.9% NaCl), seguido por uma solução de paraformaldeído a 4%. Os encéfalos foram cuidadosamente retirados e crioprottegidos, inicialmente, com uma solução de sacarose a 15% e, posteriormente, a 30%, sendo então congelados e armazenados a -80°C (Anastácio et al., 2014).

As amostras foram cortadas a 30µm em criostato (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e montadas em lâminas previamente preparadas com gelatina, com 5 cortes por lâmina. Após a fixação dos cortes, as lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Foi feita a captura das imagens e a área total dos hemisférios e estruturas específicas como córtex, estriado e ventrículos foi medida usando o software ImageJ do NIH. A análise volumétrica foi realizada pelo método de Cavalieri, que consiste de delinear as áreas de interesse em todos os cortes (Paxinos e Watson, 1986) e calcular o volume das estruturas de interesse através da soma das áreas multiplicado pelo intervalo da secção dos cortes (Arteni et al., 2010). Os resultados foram expressos como volume médio \pm SEM (mm³).

3.8 *Análise Estatística*

O cálculo do tamanho amostral foi baseado em estudos anteriores de nosso laboratório (Cechetti et al., 2012, 2010) para o uso do número necessário de animais nas avaliações comportamentais (n=9-10) e histológicas (n=6-7). O cálculo do número de animais considerou o teste bicaudal de distribuição normal com α de 0.05 e potência de 80% (PEPI-for-Windows 4.0 Software).

O software utilizado para análise de dados foi o SPSS 21.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo então avaliados com o Modelo Linear Generalizado (MLG) quando necessário, seguido de teste Post-Hoc apropriado e ANOVA de medidas repetidas. Para as análises, foram considerados os seguintes fatores: sexo, condição e tratamento. O nível de significância foi $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm SEM. A representação gráfica dos resultados foi obtida pelo software GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS

4.1 Os machos apresentaram peso maior em comparação às fêmeas ao longo das três pesagens.

Os animais foram pesados previamente a oclusão da artéria carótida direita, a oclusão da artéria carótida esquerda e no momento da eutanásia. A análise por MLG não detectou interação entre os fatores CONDIÇÃO*SEXO*TRATAMENTO no peso dos animais (1, 87) (3593,80), $p=0,109$). Entretanto, foi detectado efeito do fator SEXO antes da oclusão da artéria carótida direita (1, 87) 114.992, $p<0,001$), demonstrando que os machos ($339,63\pm 3,90$) pesavam mais que as fêmeas ($231,57\pm 4,03$). Esse efeito também foi observado antes da oclusão da artéria carótida esquerda (1, 87) 366.959, $p<0,001$) e se manteve até o momento da eutanásia (1, 87) 173.917, $p<0,001$) (**FIGURA 3A, B e C**). Não se constatou efeito da CONDIÇÃO, indicando que não houve diferença de peso entre os animais SHAM e os que passaram pela cirurgia de 2VO.

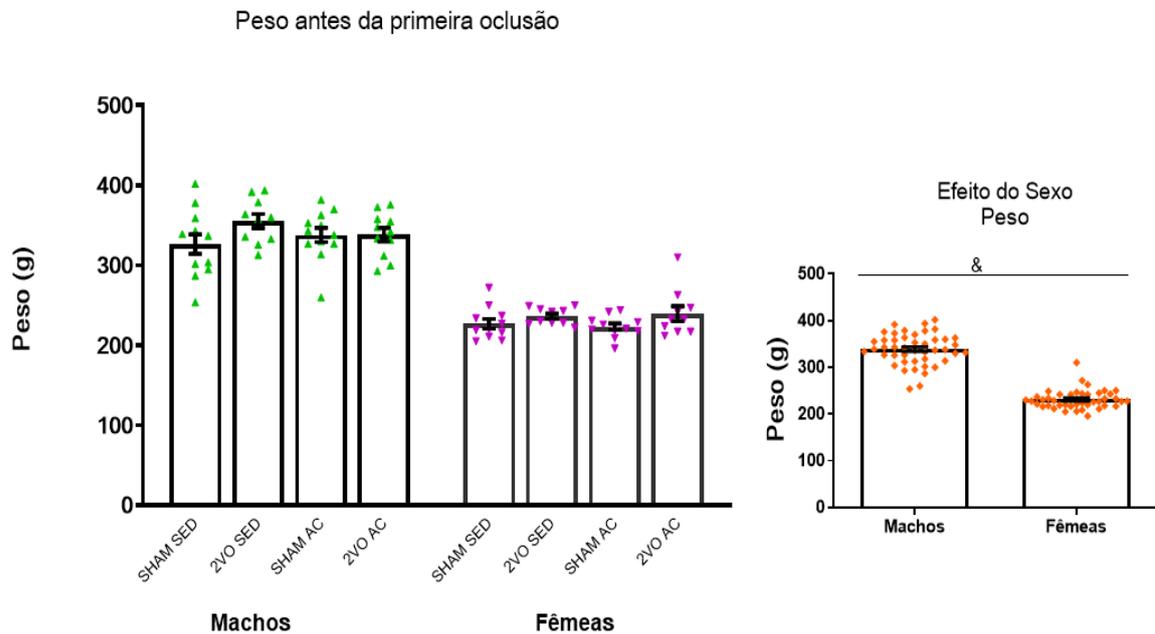


FIGURA 3A. Média dos pesos dos animais antes da oclusão da carótida comum esquerda. GzLM; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p<0.005$; Efeito do sexo = &, indicando que os machos pesam mais que as fêmeas. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

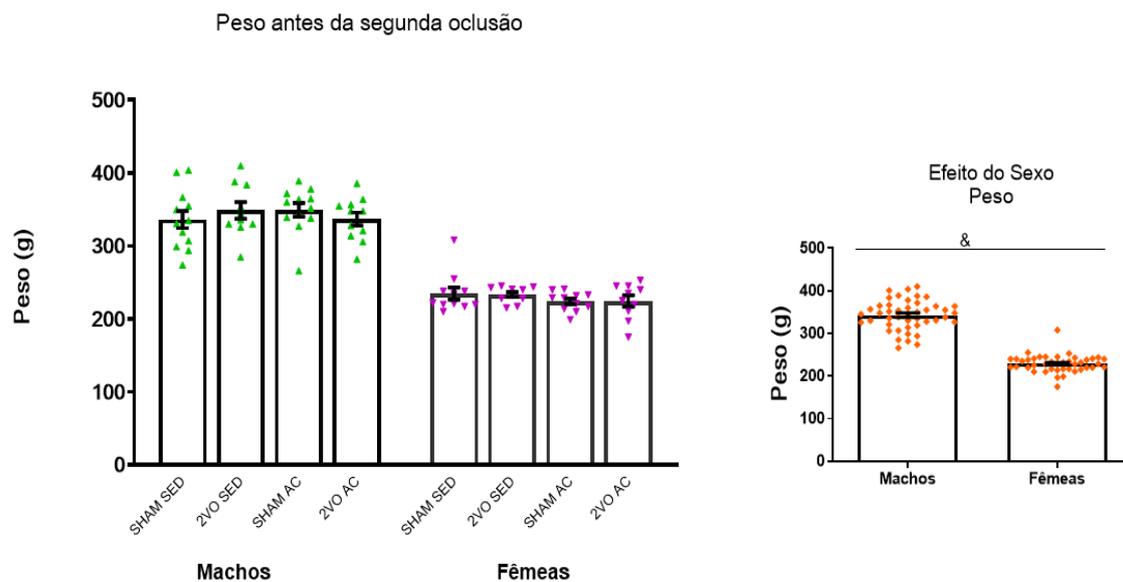


FIGURA 3B. Média dos pesos dos animais antes da oclusão da carótida comum direita. GzLM; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p < 0.005$ Efeito do sexo = &, indicando que os machos pesam mais que as fêmeas. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

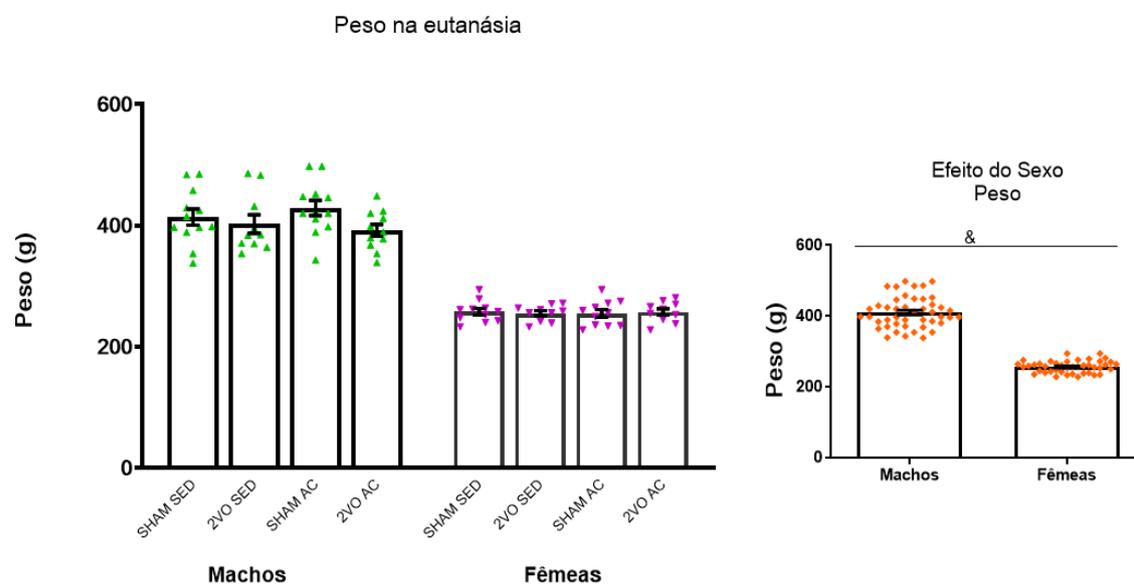
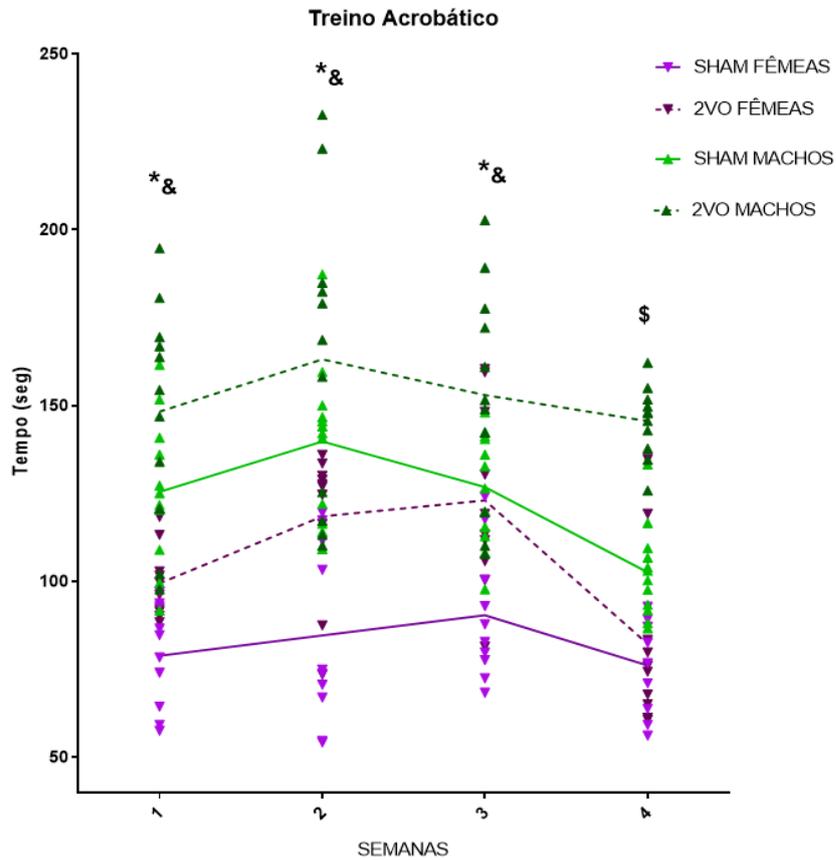


FIGURA 3C. Média dos pesos dos animais na eutanásia. Efeito do sexo = &, indicando que os machos pesam mais que as fêmeas. GzLM; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p < 0.005$ Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

4.2 Ao final do treino acrobático, as fêmeas submetidas a cirurgia 2VO desempenham o circuito com a mesma destreza que as fêmeas SHAM.

Na ANOVA de medidas repetidas detectou diferença significativa para efeito do tempo ($F(1.751,70) = 13.747$; $p < 0.001$) sugerindo que os resultados variaram ao longo das semanas de treino acrobático. Além disso, foi observado diferença significativa na interação dos fatores SEMANA*SEXO*CONDIÇÃO ($F(1.751, 70) = 3.662$; $p < 0.036$) indicando que na quarta semana do treino acrobático os machos 2VO demoraram mais tempo para completar o circuito, quando comparados aos machos SHAM, as fêmeas 2VO e as fêmeas SHAM. Curiosamente, esse efeito não ocorreu entre as fêmeas, indicando que as fêmeas 2VO percorrem o circuito com a mesma destreza que as fêmeas SHAM ao final do treinamento (**FIGURA 4**).



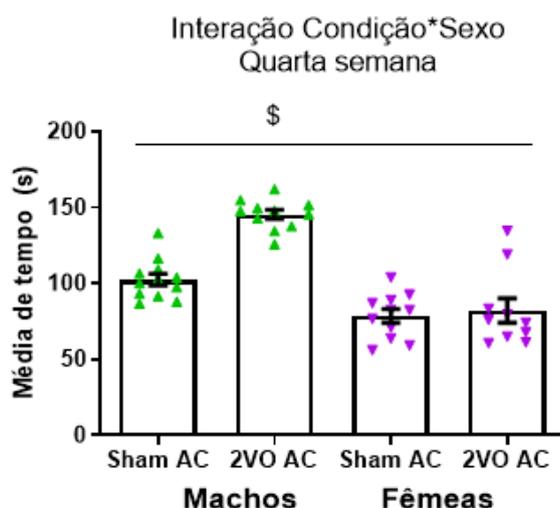


FIGURA 4. Desempenho dos animais no circuito acrobático ao longo de quatro semanas. ANOVA de medidas repetidas; Anova de 3 vias; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p < 0.005$. Interação da condição e sexo = \$, indicando que os machos 2VO AC demoram mais que todos os outros grupos. Efeito do sexo = &, efeito da lesão: *Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

4.3 Os machos sedentários têm a mobilidade reduzida e se expõem mais quando comparados às fêmeas sedentárias, efeito não observado entre os animais treinados no campo aberto.

Foi observada interação entre os fatores SEXO*TRATAMENTO (1, 87) -3.899 , $p=0.021$) na distância total percorrida pelos animais no teste do campo aberto em análise do MLG, demonstrando que os machos sedentários percorreram uma distância total menor (13.40 ± 0.75) quando comparado às fêmeas sedentárias (19.13 ± 0.76) (**FIGURA 5A**). Houve uma interação entre os fatores SEXO*TRATAMENTO (1, 87) 5.622 , $p=0.034$) foi detectada no tempo em que os animais permaneceram no centro do aparato, demonstrando que os machos sedentários passaram mais tempo no centro do campo aberto (47.73 ± 3.87) quando comparado às fêmeas sedentárias (17.89 ± 3.95) (**FIGURA 5B**). Além disso, como esperado, foi constatada uma interação entre os fatores SEXO*TRATAMENTO (1, 87) -5.622 , $p=0.034$) no tempo em que os animais permaneceram na periferia do aparato, mostrando que os machos sedentários passaram menos tempo na periferia do campo aberto (252.27 ± 3.87) quando comparado às fêmeas sedentárias (282.10 ± 3.95) (**FIGURA 5C**). Em relação ao número de cruzamentos no campo aberto, o MLG não detectou interação entre os fatores Condição*Sexo*Tratamento (1, 87) 6.500 , $p=0.884$), mas houve efeito do Sexo (1, 99) -21.273 , $p=0.001$), indicando que as fêmeas (183.85 ± 8.04) realizam um número maior de cruzamentos que os machos (146.07 ± 7.78) (**FIGURA 5D**).

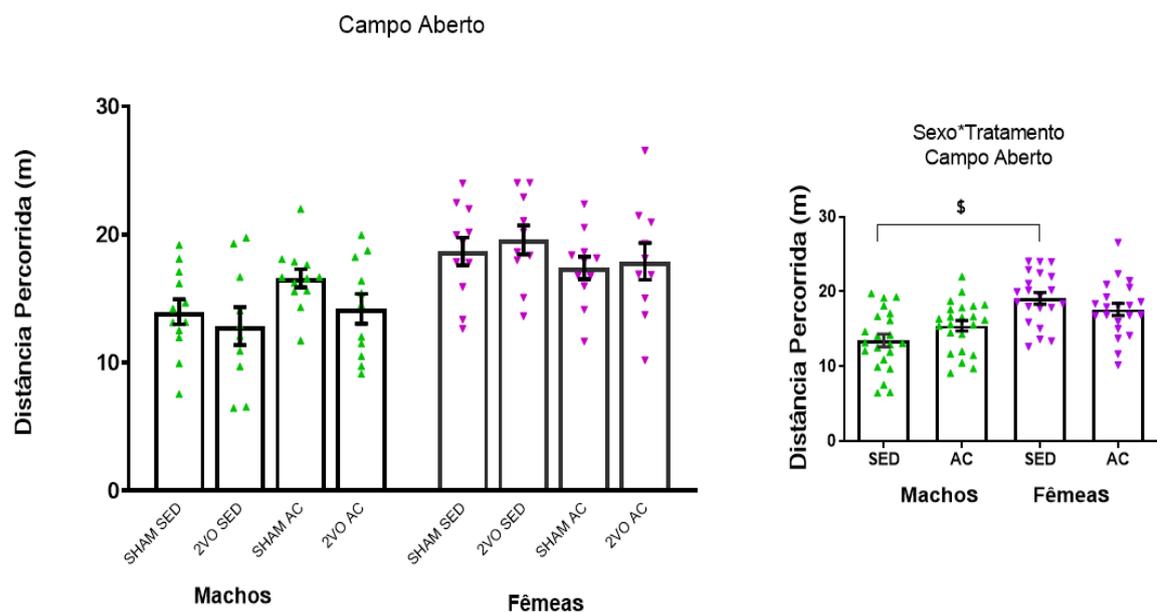


FIGURA 5A. Média da distância total percorrida pelos animais no teste do campo aberto. GzLM; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p < 0.005$. Interação do sexo e tratamento = \$, indicando que os machos SED percorreram uma distância menor que as fêmeas SED. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

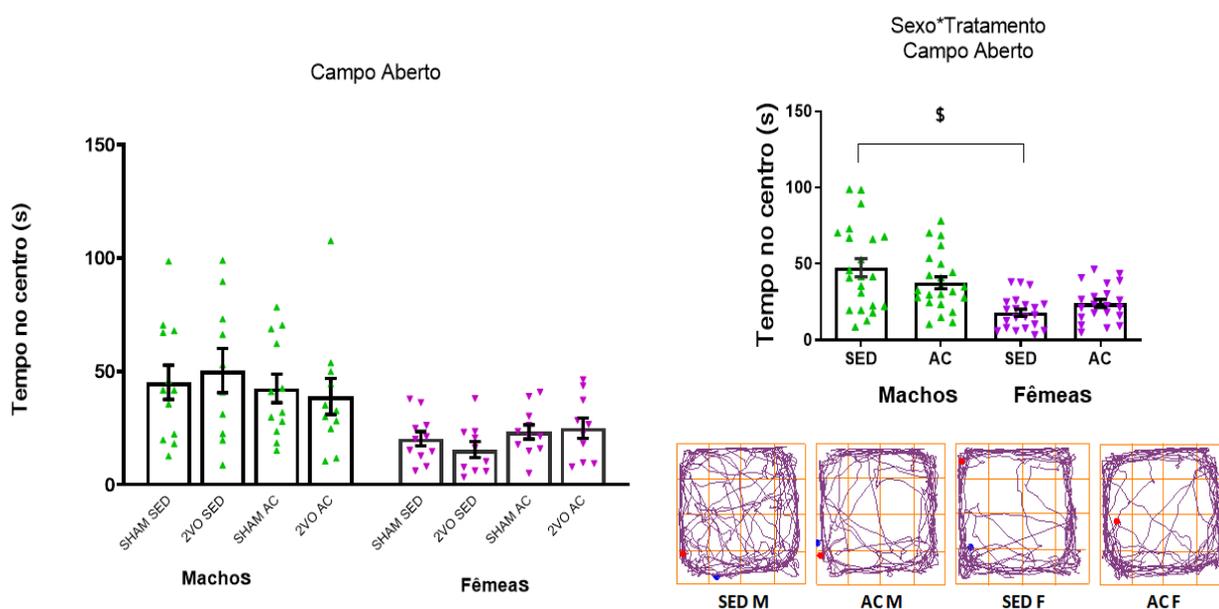


FIGURA 5B. Média do tempo em que os animais permaneceram no centro do campo aberto. GzLM; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p < 0.005$. Interação do sexo e tratamento = \$, indicando que os machos SED passaram mais tempo no centro do que as fêmeas SED. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

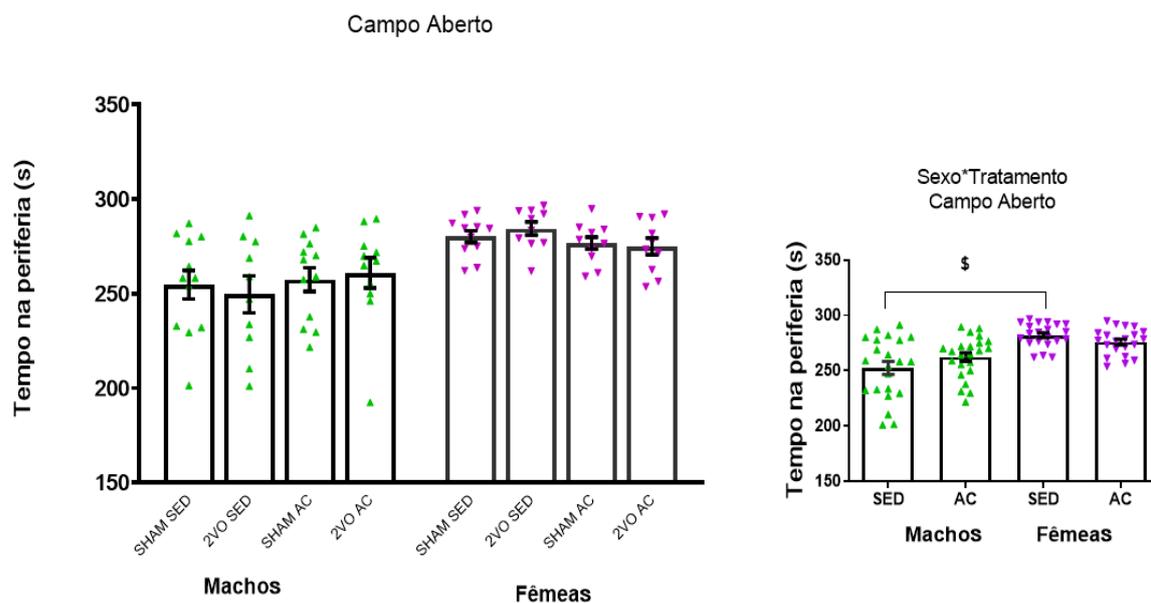


FIGURA 5C. Média do tempo em que os animais permaneceram na periferia do campo aberto. GzLM; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p < 0.005$. Interação do sexo e tratamento = \$, indicando que os machos SED passaram menos tempo no centro do que as fêmeas SED. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

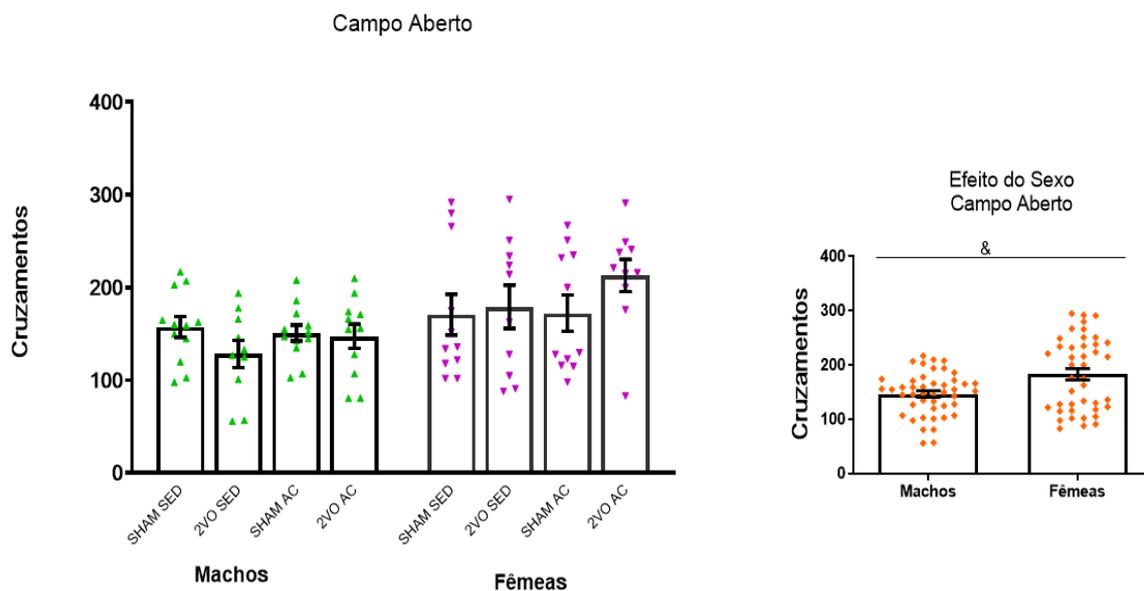


FIGURA 5D. Média do número de cruzamentos realizados pelos animais no campo aberto. GzLM; seguido de *post hoc* Bonferroni: $p < 0.005$. Efeito do sexo = &, indicando que as fêmeas realizaram mais cruzamentos que os machos. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

4.4 As fêmeas demonstram melhor coordenação e equilíbrio que os machos, bem como os animais treinados desempenham melhor que os sedentários na avaliação do Beam Balance.

Na avaliação do *Beam Balance*, o MLG não detectou interação entre os fatores Condição*Sexo*Tratamento (1, 96) 1.161, $p=0.052$), mas houve efeito do TRATAMENTO (1, 77) 0.245, $p=0.008$), indicando que os animais sedentários pontuaram mais (1.04 ± 0.11) que os animais treinados (0.63 ± 0.10) como também se constatou efeito do SEXO (1, 77) 0.545, $p=0.003$) demonstrando que as fêmeas ($0,56\pm 0,11$) pontuaram melhor que os machos (1.03 ± 0.11) (**FIGURA 6A**).

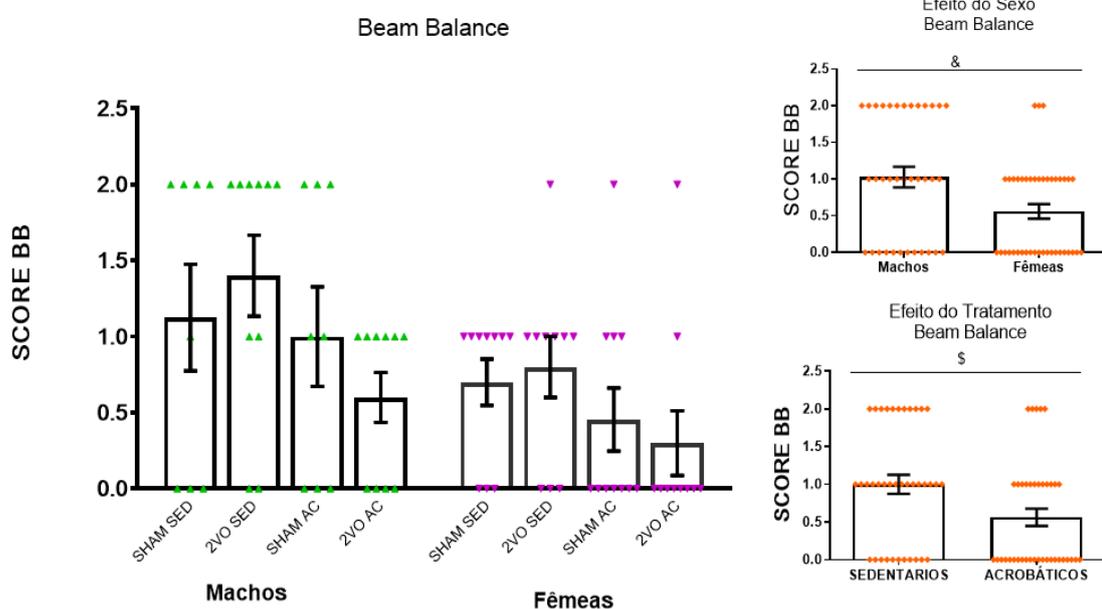


FIGURA 6 - Média da pontuação dos animais na avaliação do *beam balance*. GzLM; seguido de post hoc Bonferroni; $p<0.005$. Efeito do sexo = &, indicando que as fêmeas pontuaram melhor do que os machos. Efeito do tratamento = §, indicando que os animais AC pontuaram melhor que os animais SED. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

4.5 Animais treinados possuem melhor desempenho e menor número de erros quando comparados aos sedentários na escada horizontal.

A avaliação da qualidade do passo das patas anteriores realizada pelo teste da escada horizontal detectou efeito do fator CONDIÇÃO (1, 79) -0.417, $p=0.000$), sugerindo que a qualidade do passo das patas anteriores dos animais 2VO ($4,73\pm 0,78$) foi inferior ao dos animais SHAM (5.17 ± 0.84) (**FIGURA 7A**). No entanto, para a qualidade do passo das patas posteriores, foi constatado o efeito do fator TRATAMENTO (1, 79) -0.541, $p=0.05$), indicando que os animais que realizaram o treino acrobático (3.66 ± 0.14) apresentaram melhor qualidade

do passo que os animais sedentários (3.26 ± 0.14) (**FIGURA 7B**). Também foi observado efeito do fator TRATAMENTO ($1,79$) 0.889 , $p=0.039$) no número de erros das patas posteriores indicando que os animais treinados (3.45 ± 0.27) erram menos que os sedentários (4.26 ± 0.27) (**FIGURA 7D**). Não houve diferença quanto ao número de erros nas patas anteriores (**FIGURA 7C**).

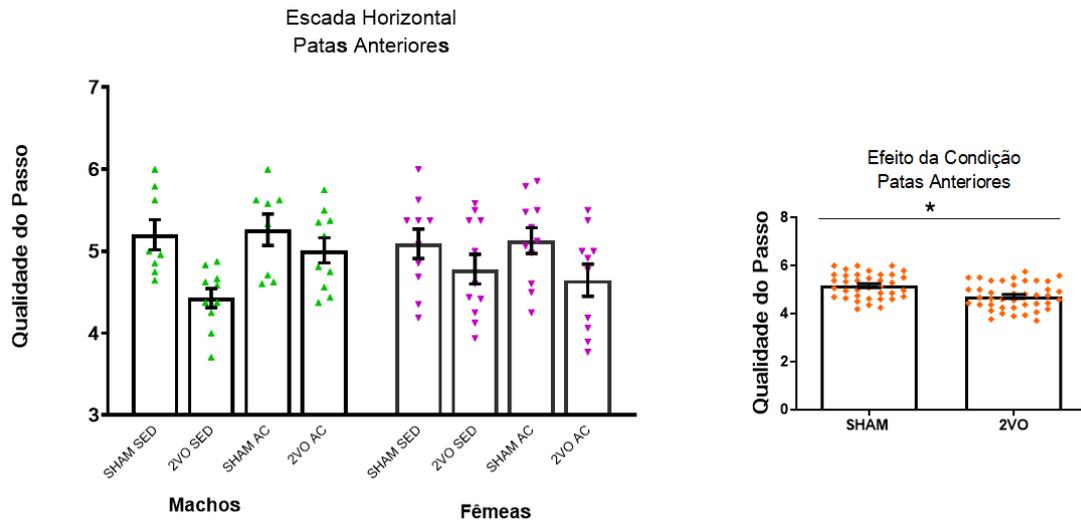


FIGURA 7A. Média da qualidade do passo das patas anteriores. GzLM; seguido de post hoc Bonferroni: $p < 0.005$. Efeito da condição = *, indicando que os animais 2VO apresentaram uma qualidade do passo nas patas anteriores inferior aos SHAM. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

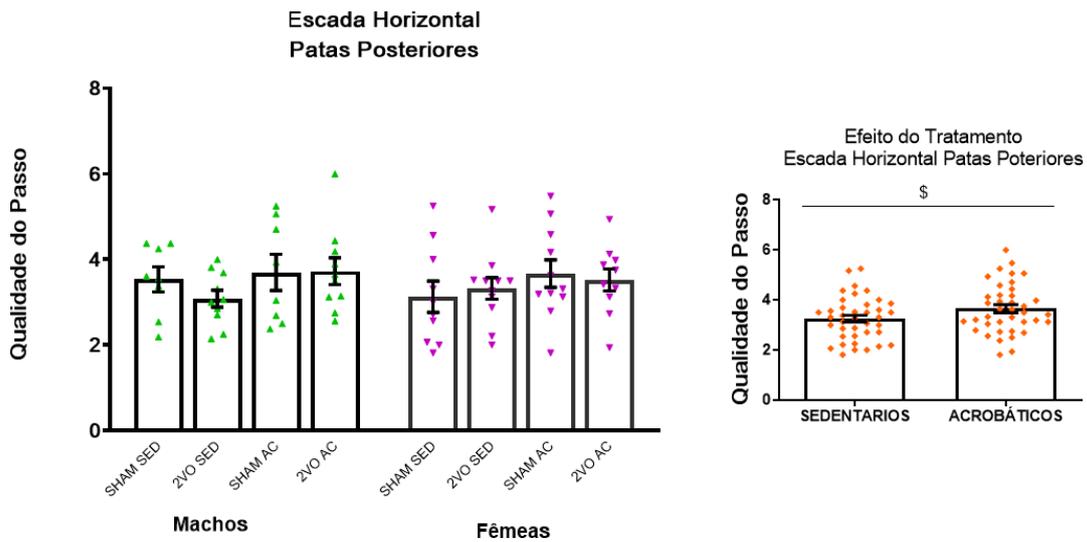


FIGURA 7B. Média da qualidade do passo das patas posteriores. GzLM; seguido de post hoc Bonferroni: $p < 0.005$. Efeito do tratamento = \$, indicando que os animais SED apresentaram uma qualidade do passo das patas posteriores inferior ao dos AC. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário,

2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

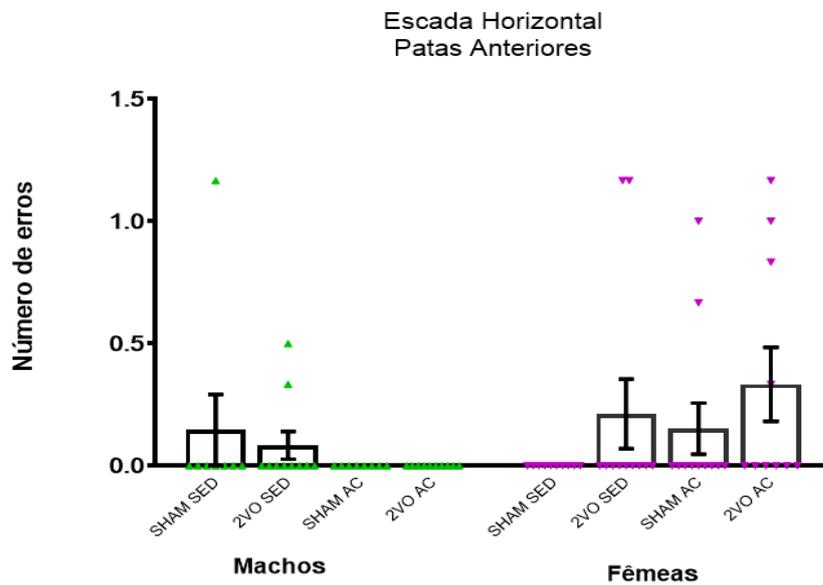


FIGURA 7C. Média do número de erros das patas anteriores. GzLM; seguido de post hoc Bonferroni: $p < 0.005$. Não houve diferença entre os grupos. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM; $p < 0.005$.

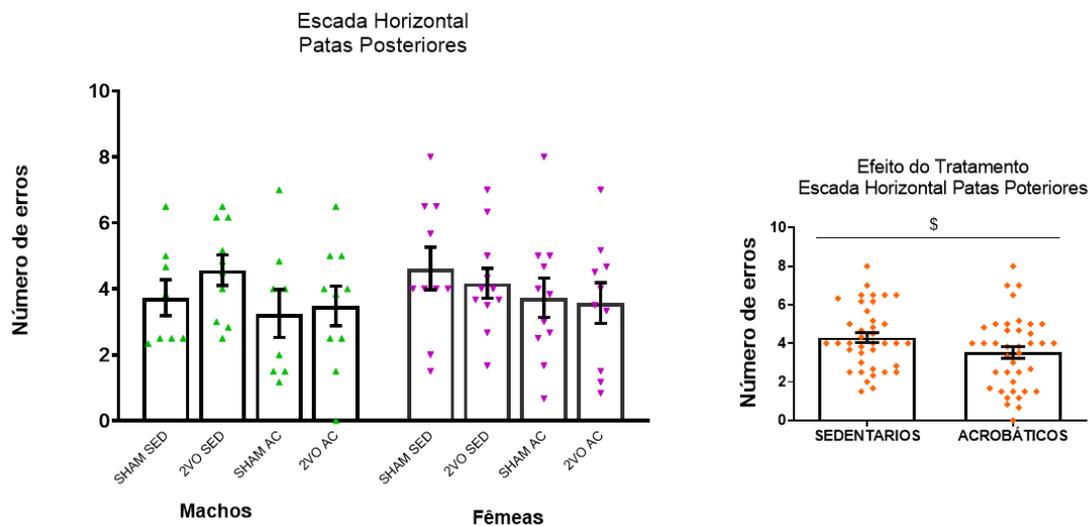


FIGURA 7D. Média do número de erros das patas posteriores. GzLM; seguido de post hoc Bonferroni: $p < 0.005$. Efeito do tratamento = \$, indicando que os animais acrobáticos erram menos que os sedentários. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

4.6 As fêmeas apresentam menor volume cortical e estriatal que os machos, diferença que não foi encontrada nos animais 2VO quando comparados aos SHAM.

Foi constatado efeito do fator SEXO (1, 56) 43290.29, $p=0.000$) no volume do córtex de machos (379360.14 ± 2684.53) e fêmeas (337077.89 ± 2684.53) (**FIGURA 8A**). O mesmo efeito no estriado (1, 56) 10949.29, $p=0.000$) foi observado em machos (81077.93 ± 550.52) e fêmeas (51733.96 ± 550.52) (**FIGURA 8B**). Para ambas as análises, os machos apresentaram volume tecidual das estruturas maior que o das fêmeas.

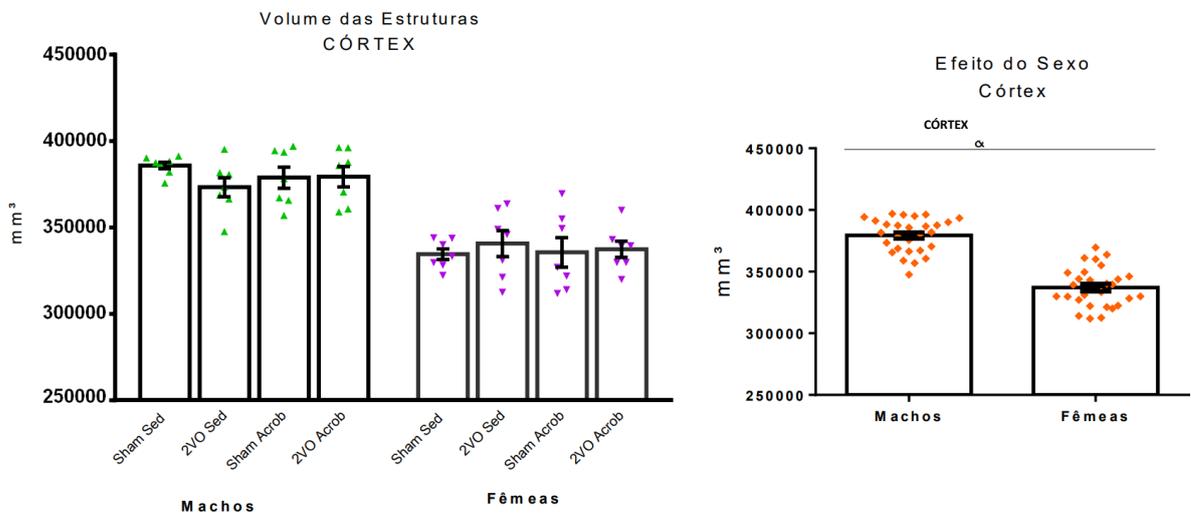


FIGURA 8A. Média do volume cortical dos animais. GzLM; seguido de post hoc Bonferroni: $p < 0.005$. Efeito do tratamento = &, indicando que os machos possuem maior volume cortical que as fêmeas. Triângulo verde: machos; triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

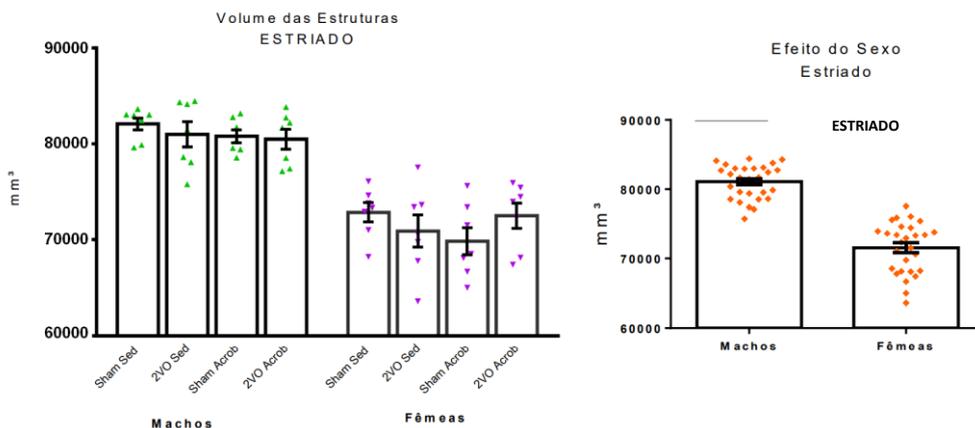


FIGURA 8B. Média do volume estriatal dos animais. GzLM; seguido de post hoc Bonferroni: $p < 0.005$. Efeito do sexo = &, indicando que os machos possuem maior volume estriatal que as fêmeas. Triângulo verde: machos;

triângulo rosa: fêmeas. SHAM SED: sham sedentário, 2VO SED: 2VO sedentários, SHAM AC: sham acrobático, 2VO AC: 2VO acrobático. As barras representam a média \pm SEM.

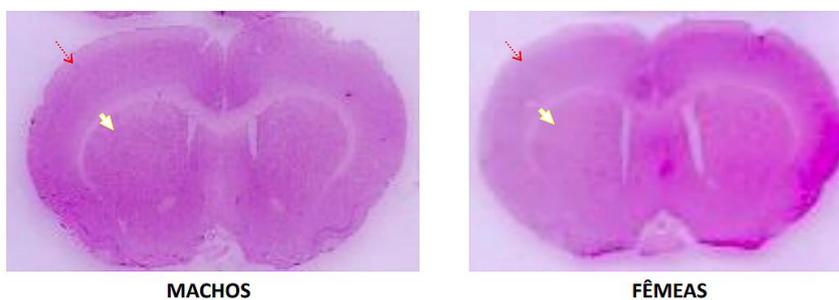


Figura 8C. Imagens representativas de cortes histológicos de machos e fêmeas corados com hematoxilina-eosina. Seta branca: estriado. Seta vermelha: córtex.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o exercício acrobático como tratamento da DV experimental, induzida no modelo de HEC em ratos Wistar machos e fêmeas, considerando as estruturas relacionadas à motricidade e desempenho funcional e levando em consideração as diferenças sexuais dos animais. Nossos resultados indicam que a cirurgia de 2VO não influenciou no peso dos animais até o momento da eutanásia. Os achados indicam que o treino acrobático melhorou a condição motora das fêmeas 2VO no decorrer das semanas de treinamento. Ainda, foi visualizado, na distância total percorrida no teste do campo aberto, a redução na mobilidade dos machos sedentários quando comparados às fêmeas sedentárias; tal efeito foi abolido pelo treino acrobático, o que sugere um efeito ansiolítico do treinamento. Além disso, as demais análises comportamentais apontam para uma melhora da função motora grosseira das fêmeas, na avaliação do *beam balance*, como da função motora fina dos animais treinados, no teste da escada horizontal. Apesar dos animais 2VO apresentarem menor destreza ao desempenhar o treino acrobático ao longo das semanas, as análises histológicas não apresentaram diferenças no volume cortical e estriatal entre os grupos 2VO e SHAM.

Durante as primeiras três semanas do treino acrobático, se constatou que os animais 2VO levaram um tempo maior para completar o circuito em comparação aos animais SHAM. No entanto, na quarta semana do treino, os machos 2VO apresentaram uma latência maior para completar o circuito quando comparados aos machos SHAM, enquanto que tal efeito não foi visualizado entre as fêmeas 2VO e as fêmeas SHAM. Um estudo utilizando o modelo de hemorragia intracerebral em machos, constatou uma redução no número de deslizamentos das patas dianteiras dos animais ao longo dos períodos de treino (Tamakoshi et al., 2016), sugerindo que o treino acrobático tenha provocado uma melhora na condição motora dos animais. Além disso, Salame et al., (2016) aplicaram um protocolo de treino acrobático com diferentes períodos de tempo em machos saudáveis e encontrou uma redução progressiva do tempo para finalizar o circuito, apontando para um efeito do exercício acrobático beneficiando a habilidade motora destes animais. Apesar de ambos estudos não corroborarem com nossos achados nas primeiras três semanas, foi constatado um efeito positivo para o condicionamento dos animais ao longo das sessões de treino, o que também foi observado em nosso estudo na quarta semana de treino acrobático, sugerindo que as fêmeas 2VO sejam mais beneficiadas por esse tipo de exercício do que os machos.

A fim de avaliar se tanto a lesão pelo modelo de HEC como o treino acrobático poderiam ter efeito sobre a mobilidade dos animais, realizou-se o teste do campo aberto, uma ferramenta

comumente utilizada para avaliar atividade locomotora geral e comportamentos do tipo ansioso (Prut and Belzung, 2003). Nossas análises verificaram uma redução na distância total percorrida e distância percorrida na zona periférica, bem como um aumento da distância percorrida na zona central pelos machos sedentários em comparação com as fêmeas sedentárias, efeito que não apareceu entre os animais treinados, sugerindo que o treino acrobático preveniu um comportamento de risco pela exposição ao centro nos machos. Nosso estudo também sugere que o modelo de 2VO utilizado não ocasionou danos motores aparentes, uma vez que não foram encontradas diferenças na mobilidade dos grupos 2VO e SHAM verificado pela distância total percorrida no campo aberto. Há evidências sobre o efeito do exercício acrobático em prevenir o aumento da hiperatividade bem como de comportamentos do tipo ansioso em animais submetidos ao procedimento de hipóxia-isquemia neonatal (Confortim et al., 2019), porém o modelo de 2VO parece não reproduzir tais comportamentos. No entanto, os machos sedentários apresentam mobilidade reduzida quando comparados às fêmeas; esse efeito não foi encontrado entre os animais treinados. Corroborando com nosso estudo, já foi constatado que no campo aberto os animais machos acabam percorrendo uma distância menor que as fêmeas (Domonkos et al., 2017; Knight et al., 2021), o que sugere que, apesar da prevenção do comportamento de risco, o treino acrobático não influenciou na capacidade locomotora de machos e fêmeas.

Para avaliar os déficits na coordenação motora grosseira e no equilíbrio, foi utilizado a avaliação do *beam balance*, um teste sensível a danos causados no cerebelo e áreas relacionadas ao controle motor (Hausser et al., 2018). Nossa análise constatou que as fêmeas apresentam melhor coordenação e equilíbrio que os machos, ocorrendo o mesmo efeito com os animais treinados em comparação aos sedentários. Tamakoshi et al. (2014) demonstraram que animais submetidos ao procedimento de hemorragia intracerebral e ao treino acrobático tiveram melhores resultados na avaliação do *beam balance* em comparação aos não treinados, indicando que o exercício acrobático possa diminuir os danos motores ocasionados pela lesão hemorrágica. De maneira similar ao ocorrido na avaliação do treino acrobático, as fêmeas parecem ter sido favorecidas pelo exercício acrobático, uma vez que sua coordenação e equilíbrio se sobressaíram em relação aos machos na avaliação do *beam balance*.

Uma avaliação motora mais minuciosa requer um teste de alta sensibilidade, como é o caso do teste da escada horizontal, desenvolvido para captar aspectos mais distintos da função motora e até mesmo perdas sutis da capacidade movimento (Metz and Whishaw, 2009). Nossos resultados apontam um efeito do fator condição, indicando que a capacidade motora das patas dianteiras dos animais 2VO está reduzida em comparação aos animais SHAM. Este teste ainda

verificou um efeito do fator tratamento, o que sugere um aumento da qualidade motora dos passos das patas posteriores dos animais treinados em relação aos sedentários. Um estudo envolvendo machos submetidos à hemorragia intracerebral e treino acrobático avaliou a taxa de passos corretos em diferentes períodos após a hemorragia e constatou que os animais lesionados que passaram pelo treino acrobático tiveram uma melhora na qualidade do passo em relação ao seu controle no dia 21 pós-cirúrgico (Tamakoshi et al., 2014). A nossa análise ocorreu num período de 83 dias após a cirurgia de oclusão das carótidas comuns e os mecanismos de resposta ao treino acrobático podem ter sido influenciados pela idade dos animais. Essa hipótese é fortalecida pelo trabalho de Gutierrez et al., (2018), que avaliou um grupo de machos adultos com 7 meses de idade e outro grupo de machos envelhecidos, com 24 meses. Esses animais passaram por um protocolo de exercício acrobático e verificou que a idade dos animais tem forte influência na melhora motora durante a performance do treino acrobático.

Nossas análises não detectaram diferença nos volumes cortical e estriatal entre os grupos 2VO e SHAM, sugerindo que a lesão ocasionada pelo procedimento de oclusão das artérias carótidas comuns não induziu danos visíveis a nível tecidual; portanto é possível que os resultados encontrados nas análises comportamentais sejam decorrentes de alterações ao nível celular. Stanojlović et al. (2014) avaliaram o córtex de machos e fêmeas submetidos ao procedimento de HEC e constatou um aumento no número de neurônios em degeneração no sétimo dia após a 2VO, por meio da técnica de imunofluorescência para fluoro jade B, o que salienta a hipótese de que os danos ocasionados pela 2VO ocorrem a nível celular. Tamakoshi et al. (2014) usaram a marcação da proteína FosB para verificar a ativação neuronal e identificaram a diminuição dessa proteína no córtex motor dos animais submetidos ao modelo de hemorragia intracerebral, sendo essa diminuição atenuada pelo treino acrobático, um indicativo de que o exercício acrobático é capaz de promover uma reorganização cortical que induz o aprendizado motor pela plasticidade. Outros estudos reportaram danos na substância branca de animais submetidos ao procedimento da HEC em estruturas como corpo caloso e o nervo óptico, com alterações neurodegenerativas ocorrendo na região CA1 do hipocampo uma semana após a realização do procedimento cirúrgico de oclusão de carótidas e se estendendo para o córtex após quatro semanas (Farkas et al., 2004; Shibata et al., 2004; Tomimoto et al., 2003; Washida et al., 2019). Além disso, estudos com a proteína poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1), envolvida na indução de processos inflamatórios bem como a reparação do DNA, constataram que a deleção dessa enzima reduz os efeitos isquêmicos e pró-inflamatórios em machos, mas promovem o aumento das lesões nas fêmeas pela ativação das vias dependentes

de caspases (Liu et al., 2011; Mabley et al., 2005; McCullough et al., 2005; Yuan et al., 2009), efeitos estes que podem ser revertidos com ovariectomia (Mabley et al., 2005) e com inibição das caspases (Liu et al., 2011). Dessa forma, supõe-se que as vias de sinalização hormonais de machos e fêmeas têm grande importância na atuação da PARP-1 e consequentes respostas ao processo isquêmico (Jog and Caricchio, 2013; Vagnerova et al., 2010). Uma revisão com ratos submetidos a hipóxia-isquemia neonatal, realizada por Netto et al. (2017), demonstrou que os processos inflamatórios decorrentes, as vias de morte celular e as consequentes alterações comportamentais apresentam dimorfismo sexual, o que ressalta a importância de estudos comparativos dos efeitos do sexo em modelos de DV e seu potenciais tratamento.

Entre as limitações deste estudo destacamos a carência de literatura na área e que considerem o dimorfismo sexual como parâmetro avaliativo nas análises propostas. Além disso, não foi possível realizar análises morfológicas em estruturas como o cerebelo para avaliação do volume das camadas cerebelares, além de análises de imunofluorescência para quantificação de células neuronais no córtex e estriado, em função das limitações institucionais resultantes das medidas de combate à pandemia de SARS-COV-2.

6. CONCLUSÃO

A HEC demonstrou afetar a habilidade motora dos animais, mesmo sem induzir alterações visíveis nas análises histológicas realizadas. O treino acrobático revelou potencial terapêutico experimental para a melhora da capacidade motora dos animais no modelo de HEC, sobretudo entre as fêmeas. Ainda que os mecanismos que levem às diferentes respostas ao treino em machos e fêmeas não estejam elucidados, os dados deste trabalho proporcionam a possibilidade de investigar com maior profundidade as vias biológicas envolvidas nas respostas ocasionadas pelo treino acrobático no modelo de HEC em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- Alves, L.C.D.S., Monteiro, D.Q., Bento, S.R., Hayashi, V.D., Pelegrini, L.N.D.C., Vale, F.A.C., 2019. Burnout syndrome in informal caregivers of older adults with dementia: A systematic review. *Dement. e Neuropsychol.* 13, 415–421. <https://doi.org/10.1590/1980-57642018dn13-040008>
- Anastácio, J.R., Netto, C.A., Castro, C.C., Sanches, E.F., Ferreira, D.C., Noschang, C., Krolow, R., Dalmaz, C., Pagnussat, A., 2014. Resveratrol treatment has neuroprotective effects and prevents cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion. *Neurol. Res.* 36, 627–633. <https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000293>
- Arba, F., Mair, G., Carpenter, T., Sakka, E., Sandercock, P.A.G., Lindley, R.I., Inzitari, D., Wardlaw, J.M., 2017. Cerebral White Matter Hypoperfusion Increases with Small-Vessel Disease Burden. Data From the Third International Stroke Trial. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 26, 1506–1513. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.03.002>
- Arteni, N.S., Pereira, L.O., Rodrigues, A.L., Lavinsky, D., Achaval, M.E., Netto, C.A., 2010. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav. Brain Res.* 210, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.015>
- Bainham, A., 2002. Does sex matter?, *Cambridge Law Journal*. <https://doi.org/10.1017/S0008197302361506>
- Black, J.E., Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A., Greenough, W.T., 1990. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats (paramedian lobule/neural plasticity/exercise). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 87, 5568–5572.
- Brown, D.A., Chicco, A.J., Jew, K.N., Johnson, M.S., Lynch, J.M., Watson, P.A., Moore, R.L., 2005. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J. Physiol.* 569, 913–924. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095729>
- Butcher, L., 2018. Caring for patients with dementia in the acute care setting. *Br. J. Nurs.* 27, 358–362. <https://doi.org/10.12968/bjon.2018.27.7.358>
- Cechetti, F., Pagnussat, A.S., Worm, P. V., Elsner, V.R., Ben, J., da Costa, M.S., Mestriner, R., Weis, S.N., Netto, C.A., 2012. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res. Bull.* 87, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.006>
- Cechetti, F., Worm, P. V., Pereira, L.O., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2010. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 43, 1178–1183. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500124>
- Confortim, H.D., Deniz, B.F., de Almeida, W., Miguel, P.M., Bronauth, L., Vieira, M.C., de Oliveira, B.C., Pereira, L.O., 2019. Neonatal hypoxia-ischemia caused mild motor dysfunction, recovered by acrobatic training, without affecting morphological structures

- involved in motor control in rats. *Brain Res.* 1707, 27–44.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.021>
- Domonkos, E., Borbélyová, V., Csongová, M., Bosy, M., Kačmárová, M., Ostatníková, D., Hodosy, J., Celec, P., 2017. Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. *Horm. Behav.* 93, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.05.019>
- Duncombe, J., Kitamura, A., Hase, Y., Ihara, M., Kalaria, R.N., Horsburgh, K., 2017. Chronic cerebral hypoperfusion: A key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clin. Sci.* 131, 2451–2468.
<https://doi.org/10.1042/CS20160727>
- Farkas, E., Donka, G., de Vos, R.A.I., Mihály, A., Bari, F., Luiten, P.G.M., 2004. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol.* 108, 57–64.
<https://doi.org/10.1007/s00401-004-0864-9>
- Farkas, E., Luiten, P.G.M., Bari, F., 2007. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 54, 162–180.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.003>
- Garcia, P.C., Real, C.C., Ferreira, A.F.B., Alouche, S.R., Britto, L.R.G., Pires, R.S., 2012. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Res.* 1456, 36–48.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.059>
- Gelfo, F., Mandolesi, L., Serra, L., Sorrentino, G., Caltagirone, C., 2018. The Neuroprotective Effects of Experience on Cognitive Functions: Evidence from Animal Studies on the Neurobiological Bases of Brain Reserve. *Neuroscience* 370, 218–235.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.065>
- Gorelick, P.B., Scuteri, A., Black, S.E., DeCarli, C., Greenberg, S.M., Iadecola, C., Launer, L.J., Laurent, S., Lopez, O.L., Nyenhuis, D., Petersen, R.C., Schneider, J.A., Tzourio, C., Arnett, D.K., Bennett, D.A., Chui, H.C., Higashida, R.T., Lindquist, R., Nilsson, P.M., Roman, G.C., Sellke, F.W., Seshadri, S., 2011. Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Stroke* 42, 2672–2713.
<https://doi.org/10.1161/str.0b013e3182299496>
- Gould, T.D., Dao, D.T., Kovacsics, C.E., 2009. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods* 42, 1–20. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9>
- Gutierrez, R.M.S., Ricci, N.A., Gomes, Q.R.S., Oliveira, D.L., Pires, R.S., 2018. The effects of acrobatic exercise on brain plasticity: a systematic review of animal studies. *Brain Struct. Funct.* 223, 2055–2071. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1631-3>
- Hausser, N., Johnson, K., Parsley, M.A., Guptarak, J., Spratt, H., Sell, S.L., 2018. Detecting behavioral deficits in rats after traumatic brain injury. *J. Vis. Exp.* 2018, 1–11.
<https://doi.org/10.3791/56044>
- Jog, N.R., Caricchio, R., 2013. Differential regulation of cell death programs in males and females by Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 and 17 β estradiol. *Cell Death Dis.* 4, 1–9.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.251>

- Jones, T.A., Chu, C.J., Grande, L.A., Gregory, A.D., 1999. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *J. Neurosci.* 19, 10153–10163. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-22-10153.1999>
- Kántor, O., Schmitz, C., Feiser, J., Brasnjevic, I., Korr, H., Busto, R., Ginsberg, M.D., Schmidt-Kastner, R., 2007. Moderate loss of cerebellar Purkinje cells after chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Acta Neuropathol.* 113, 549–558. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0204-y>
- Kerr, N., Dietrich, D.W., Bramlett, H.M., Raval, A.P., 2019. Sexually dimorphic microglia and ischemic stroke. *CNS Neurosci. Ther.* 25, 1308–1317. <https://doi.org/10.1111/cns.13267>
- Knight, P., Chellian, R., Wilson, R., Behnood-Rod, A., Panunzio, S., Bruijnzeel, A.W., 2021. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 204, 173168. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173168>
- Krause, D.N., Duckles, S.P., Gonzales, R.J., 2011. Local oestrogenic/androgenic balance in the cerebral vasculature. *Acta Physiol.* 203, 181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02323.x>
- Lee, J.M., Baek, S.S., Kim, T.W., Park, H.S., Park, S.S., Park, J.M., Kim, Y.J., Lee, H.S., Shin, M.S., 2019. Preischemic treadmill exercise improves short-term memory by inhibiting hypoperfusion-induced disruption of blood-brain barrier after bilateral common carotid arteries occlusion. *J. Exerc. Rehabil.* 15, 370–376. <https://doi.org/10.12965/jer.1938274.137>
- Liu, F., Lang, J., Li, J., Benashski, S.E., Siegel, M., Xu, Y., McCullough, L.D., 2011. Sex differences in the response to poly(ADP-ribose) polymerase-1 deletion and caspase inhibition after stroke. *Stroke* 42, 1090–1096. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.594861>
- Mabley, J.G., Horváth, E.M., Murthy, K.G.K., Zsengellér, Z., Vaslin, A., Benko, R., Kollai, M., Szabó, C., 2005. Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: Potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 812–820. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.090480>
- MacLellan, C.L., Davies, L.M., Fingas, M.S., Colbourne, F., 2006. The influence of hypothermia on outcome after intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 37, 1266–1270. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217268.81963.78>
- McCullough, L.D., Zeng, Z., Blizzard, K.K., Debchoudhury, I., Hurn, P.D., 2005. Ischemic nitric oxide and poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: Male toxicity, female protection. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 502–512. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600059>
- McKhann, G., 2012. the diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* 7, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- McVeigh, C., Passmore, P., 2006. Vascular dementia: prevention and treatment. *Clin. Interv. Aging* 1, 229–235. <https://doi.org/10.2147/ciia.2006.1.3.229>
- Metz, G.A., Whishaw, I.Q., 2009. The ladder rung walking task: A scoring system and its practical application. *J. Vis. Exp.* 2–5. <https://doi.org/10.3791/1204>

- Murakami, Y., Zhao, Q., Harada, K., Tohda, M., Watanabe, H., Matsumoto, K., 2005. Chotosan, a Kampo formula, improves chronic cerebral hypoperfusion-induced spatial learning deficit via stimulation of muscarinic M1 receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 616–625. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.05.004>
- Netto, C.A., Sanches, E., Odorczyk, F.K., Duran-Carabali, L.E., Weis, S.N., 2017. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *J. Neurosci. Res.* 95, 409–421. <https://doi.org/10.1002/jnr.23828>
- Nystoriak, M.A., Bhatnagar, A., 2018. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Front. Cardiovasc. Med.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00135>
- O'Brien, J.T., Thomas, A., 2015. Vascular dementia. *Lancet* 386, 1698–1706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00463-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00463-8)
- Park, E.M., Cho, S., Frys, K.A., Glickstein, S.B., Zhou, P., Anrather, J., Ross, M.E., Iadecola, C., 2006. Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 392–401. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600194>
- Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M., Netto, C.A., 2007. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.07.003>
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Safouris, A., Hambye, A.S., Sculier, C., Papageorgiou, S.G., Vasdekis, S.N., Gazagnes, M.D., Tsivgoulis, G., 2014. Chronic brain hypoperfusion due to multi-vessel extracranial atherosclerotic disease: A potentially reversible cause of cognitive impairment. *J. Alzheimer's Dis.* 43, 23–27. <https://doi.org/10.3233/JAD-141203>
- Salame, S., Garcia, P.C., Real, C.C., Borborema, J., Mota-Ortiz, S.R., Britto, L.R.G., Pires, R.S., 2016. Distinct neuroplasticity processes are induced by different periods of acrobatic exercise training. *Behav. Brain Res.* 308, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.04.029>
- Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M., Tomimoto, H., 2004. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 35, 2598–2603. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143725.19053.60>
- Stanojlović, M., Horvat, A., Guševac, I., Grković, I., Mitrović, N., Buzadžić, I., Drakulić, D., 2014. Time course of cerebral hypoperfusion-induced neurodegenerative changes in the cortex of male and female rats. *Folia Biol. (Czech Republic)* 60, 123–132.
- Steiner, J.L., Murphy, E.A., McClellan, J.L., Carmichael, M.D., Davis, J.M., 2011. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J. Appl. Physiol.* 111, 1066–1071. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00343.2011>
- Takai, M., Takahashi, M., Iwamitsu, Y., Ando, N., Okazaki, S., Nakajima, K., Oishi, S., Miyaoka, H., 2009. The experience of burnout among home caregivers of patients with dementia: Relations to depression and quality of life. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 49, e1. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2008.07.002>

- Tamakoshi, K., Ishida, A., Takamatsu, Y., Hamakawa, M., Nakashima, H., Shimada, H., Ishida, K., 2014. Motor skills training promotes motor functional recovery and induces synaptogenesis in the motor cortex and striatum after intracerebral hemorrhage in rats. *Behav. Brain Res.* 260, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.11.034>
- Tamakoshi, K., Ishida, K., Kawanaka, K., Takamatsu, Y., Tamaki, H., 2017. Motor Skills Training Enhances α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor Subunit mRNA Expression in the Ipsilateral Sensorimotor Cortex and Striatum of Rats Following Intracerebral Hemorrhage. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 26, 2232–2239. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.05.005>
- Tamakoshi, K., Kawanaka, K., Onishi, H., Takamatsu, Y., Ishida, K., 2016. Motor Skills Training Improves Sensorimotor Dysfunction and Increases Microtubule-Associated Protein 2 mRNA Expression in Rats with Intracerebral Hemorrhage. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 25, 2071–2077. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.05.007>
- Tomimoto, H., Ihara, M., Wakita, H., Ohtani, R., Lin, J.X., Akiguchi, I., Kinoshita, M., Shibasaki, H., 2003. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat. *Acta Neuropathol.* 106, 527–534. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0749-3>
- Truzzi, A., Valente, L., Ulstein, I., Engelhardt, E., Laks, J., Engedal, K., 2012. Burnout em cuidadores familiares de pacientes com demência. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 34, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.rbp.2012.02.006>
- Vagnerova, K., Liu, K., Ardeshiri, A., Cheng, J., Murphy, S.J., Hurn, P.D., Herson, P.S., 2010. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 initiated neuronal cell death pathway-do androgens matter? *Neuroscience* 166, 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.041>
- Washida, K., Hattori, Y., Ihara, M., 2019. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: From mouse to primate. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20246176>
- Yuan, M., Siegel, C., Zeng, Z., Li, J., Liu, F., McCullough, L.D., 2009. Sex differences in the response to activation of the poly (ADP-ribose) polymerase pathway after experimental stroke. *Exp. Neurol.* 217, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.02.012>
- Zubala, A., MacGillivray, S., Frost, H., Kroll, T., Skelton, D.A., Gavine, A., Gray, N.M., Toma, M., Morris, J., 2017. Promotion of physical activity interventions for community dwelling older adults: A systematic review of reviews, *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180902>