

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia**



Flávio Afonso Gonçalves Mourão

**MECANISMOS NEUROPROTETORES DO EXERCÍCIO
FÍSICO ENVOLVENDO A LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E A
APOPTOSE CELULAR**

Belo Horizonte

2010

Flávio Afonso Gonçalves Mourão

**MECANISMOS NEUROPROTETORES DO EXERCÍCIO
FÍSICO ENVOLVENDO A LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E A
APOPTOSE CELULAR**

Dissertação desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. André Ricardo Massensini

Belo Horizonte

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 21/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo de mecanismos neuroprotetores de atividade física envolvendo a liberação de Glutamato e a Apoptose celular**", que tem como responsável(is) **André Ricardo Massensini**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/ 04/2009**.

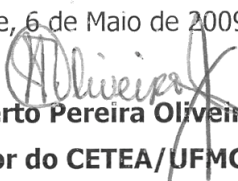
Este certificado expira-se em **1/ 04/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 21/2009**, related to the project entitled "**Evaluation of physical activity mediated neuroprotective molecular mechanisms involving glutamate release and cellular apoptosis**", under the supervisors of **André Ricardo Massensini**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 1, 2009**.

This certificate expires in **April 1, 2014**.

Belo Horizonte, 6 de Maio de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Bloco A4 sala 168/240, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com auxílio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia / Instituto Nacional de Interface Cérebro - Máquina – INCT / INCeMaq

aos meus pais que com amor e muita dificuldade possibilitaram este sonho.

... e a Lídia que com amor, segura meus pés no chão.

“In this world all that you living for ?”

– MOGWAI –

“Never give up trying !”



– POSSUÍDOS –

Belo Horizonte Hardcore

“- Tu és Virgílio? - perguntei, vergonhoso - Ora, tu és meu mestre e meu autor predileto! Foi contigo que aprendi o belo estilo poético que me deu louvor. Eu não subi o monte por causa dessa fera. Ela me faz tremer os pulsos. Ajuda-me, sábio famoso! Ajuda-me a enfrentá-la!

- A ti convém seguir outra viagem - respondeu o poeta, ao me ver lacrimejando - pois essa fera, essa loba, é a mais feroz e insaciável de todas. Ela só partirá quando finalmente vier o Lebreiro que para ela será a dura morte. Ele não se alimentará nem de dinheiro, nem de terras; só a sua sabedoria, amor e virtude poderão nutri-lo. Ele virá para salvar a tua Itália caída. Ele irá caçar essa fera em todas as cidades até encontrá-la, quando então a matará e a conduzirá de volta ao inferno, de onde a Inveja, primeiro a trouxe para este mundo.

Depois, me fez uma proposta:

- Eu acho melhor, para teu bem, que me sigas. Eu serei o teu guia. Te levarei para um lugar eterno onde verás condenados gritando, em vão, por uma segunda chance. Depois verás outros que sofrem contentes no fogo, pois tem esperança de um dia seguir ao encontro daquela gente abençoada. E depois, se quiseres subir ao céu, lá terás alma mais digna do que eu, pois o imperador daquele reino me nega a entrada, pois à sua lei eu fui rebelde.

- Poeta - respondi -, eu te imploro, em nome desse Deus que não conhecestes, que me ajudes a fugir deste mal ou de outro pior. Eu te seguirei a esses lugares que descreveste. Que eu possa ver a porta de São Pedro e os tristes sofredores dos quais falaste!

Ele então moveu-se, e eu o acompanhei.”

Canto I – “A selva escura - As feras - O espírito de Virgílio”
Divina Comédia - Dante Alighieri

RESUMO

A atividade física e seus efeitos positivos sobre a saúde e a reabilitação têm sido estudados nos últimos anos, na busca pelos mecanismos protetores fisiológicos e moleculares, advindos de protocolos controlados e padronizados de exercício físico. Estudos a respeito dos efeitos protetores do exercício físico sobre doenças com alta incidência no sistema nervoso central estão demonstrados. Porém, os mecanismos moleculares adjacentes a estes efeitos ainda apresentam-se contraditórios e pouco explorados. Tendo em vista o grande crescimento de estudos na área, que utilizam principalmente modelos animais controlados e padronizados de exercício físico, teve-se por objetivo analisar os mecanismos neuroprotetores do exercício físico regular, envolvendo a liberação de glutamato e a apoptose celular, após privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), em fatias cerebrais de ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: exercício e sedentário. O grupo exercício foi submetido à natação, durante oito semanas, enquanto o grupo sedentário foi exposto às mesmas condições experimentais, mas sem realizar o programa de natação. No decorrer e no final do período de exercício, foram avaliados tanto as características adaptativas ao esforço, como o estado emocional/estresse e aprendizado/memória dos animais. Ao final das avaliações das características adaptativas fisiológicas, fatias cerebrais destes animais foram submetidas a um protocolo de privação de oxigênio e glicose, para análise do glutamato liberado, a expressão de proteínas apoptóticas como caspase-3, -8, -9 e *apoptosis-inducing factor* além da análise da viabilidade celular. De acordo com os nossos resultados os animais apresentaram uma resposta adaptativa significativa e benéfica ao protocolo proposto. Após o insulto isquêmico a liberação de glutamato e a expressão de proteínas apoptóticas apresentaram-se significativamente menores para o grupo exercício, comparado ao grupo sedentário, além de uma viabilidade celular significativamente mais alta para o primeiro grupo. Em resumo, nossos resultados corroboram com a literatura a respeito dos efeitos benéficos e protetores do exercício físico, apontando possíveis vias intrínsecas a estruturas cerebrais que adaptativamente podem ser moduladas, garantindo neuroproteção a insultos isquêmicos cerebrais.

ABSTRACT

Physical activity and its positive effects on health and rehabilitation have been studied over the last few years, to investigate the molecular and physiological protective mechanisms of the physical exercise, taking advantage of controlled and standardized protocols. Studies concerning the protective effects of the physical exercise over highly incident pathologies on the central nervous system have been evidenced. However, molecular mechanisms underlying these effects are still contradictory and poorly explored. Therefore, owing to the fast growth of studies in this area, which mainly uses controlled and standardized animal models of physical exercise, the aim of this work was to analyze neuroprotective mechanisms, involved in glutamate release and cellular apoptosis, after oxygen and glucose deprivation (*in vitro* ischemia), in cerebral slices of rats submitted to a chronic swimming exercise program. Animals were divided in two groups: exercise and sedentary. The exercise group underwent swimming for eight weeks, while the sedentary group was submitted to the same experimental conditions without having to make swimming exercise program. During and in the end of the exercise period, adaptive characteristics of the animals to effort, stress/emotional state and learning/memory were evaluated. In the end of the evaluations of adaptive physiological characteristics, cerebral slices were submitted to an oxygen and glucose deprivation protocol, in order to analyze the glutamate release, the expression of apoptotic proteins such as caspase-3, -8, -9 and apoptosis-inducing factor, and cellular viability. According to our results animals showed a significant and beneficial adaptive response to the proposed protocol. After the ischemic insult, glutamate release and expression of apoptotic proteins were significantly lower when compared to the sedentary group, while cellular viability was substantially higher in the former. In summary, our results are in accordance with the literature regarding the beneficial and protective effects of exercise, pointing to possible pathways intrinsic to brain structures that adaptively could be modulated, assuring neuroprotection to brain ischemic insults.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: GLUTAMATO COMO UMA CHAVE METABÓLICA.	2
FIGURA 2: SINAPSE HIPOTÉTICA ILUSTRANDO A LOCALIZAÇÃO E A FUNÇÃO GERAL DOS RECEPTORES E TRANSPORTADORES GLUTAMATÉRGICOS.	4
FIGURA 3: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA APOPTOSE	10
FIGURA 4: VIAS APOPTÓTICAS – EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA.	13
FIGURA 5: PARADIGMAS DE EXERCÍCIO FÍSICO.	19
FIGURA 6: CASCATA BIOQUÍMICA QUE OCORRE NOS NEURÔNIOS EM RESPOSTA A ISQUEMIA CEREBRAL.	23
FIGURA 7: SISTEMA DE NATAÇÃO PROPOSTO.	31
FIGURA 8: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
FIGURA 9: PROTOCOLO DE NATAÇÃO.	39
FIGURA 10: PEÇAS DE ESTANHO CONFECCIONADAS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO E O PROTOCOLO DE NATAÇÃO.	40
FIGURA 11: PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO.	41
FIGURA 12: APARATO PARA TAREFA DE RECONHECIMENTO PELA LOCALIZAÇÃO DO OBJETO.	45
FIGURA 13: ESTRUTURA DA PROTEÍNA CASPASE-3	48
FIGURA 14: ESTRUTURA DA PROTEÍNA CASPASE-8	49
FIGURA 15: ESTRUTURA DA PROTEÍNA CASPASE-9	50
FIGURA 16: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA O PROCEDIMENTO DE ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	51
FIGURA 17: ESTRUTURA DA PROTEÍNA AIF	53
FIGURA 18: DELINEAMENTO PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE WESTERN BLOT PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AIF	54
FIGURA 19: SISTEMA DE PERFUSÃO DE TECIDOS.	56
FIGURA 20: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA VIABILIDADE CELULAR	59
FIGURA 21: MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS AO LONGO DE 8 SEMANAS DE EXERCÍCIO FÍSICO.	62
FIGURA 22: TESTES DE ESFORÇO MÁXIMO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO.	63
FIGURA 24: AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO.	67
FIGURA 25: LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO EM FATIAS DE TECIDO CEREBRAL APÓS PROCESSO ISQUEMICO.	68
FIGURA 26: EXPRESSÃO DE CASPASE-3 ATIVA EM FATIAS DE TECIDO CEREBRAL APÓS PROCESSO ISQUEMICO.	70
FIGURA 27: EXPRESSÃO DE CASPASE-8 ATIVA EM FATIAS DE TECIDO CEREBRAL APÓS PROCESSO ISQUEMICO.	71
FIGURA 28: EXPRESSÃO DE CASPASE-9 ATIVA EM FATIAS DE TECIDO CEREBRAL APÓS PROCESSO ISQUEMICO.	72
FIGURA 29: EXPRESSÃO DE <i>APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF)</i> EM FATIAS DE TECIDO CEREBRAL APÓS PROCESSO ISQUEMICO.	73
FIGURA 30: VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE TECIDO CEREBRAL APÓS PROCESSO ISQUEMICO.	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: LISTA DE EQUIPAMENTOS COM DESCRIÇÃO DE MODELO E MARCA	32
TABELA 2: LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS COM DESCRIÇÃO DE FABRICANTE E Nº DE CATÁLOGO.....	33
TABELA 3: LISTA DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS.....	35
TABELA 4: MASSA HIPÓFISE, ADRENAL.....	65
TABELA 5: MASSA DO TECIDO ADIPOSEO, FÍGADO E MÚSCULO GASTROCNEMIO	65
TABELA 6: LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	66
TABELA 7: TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS NO PERÍODO DE TREINO	67

LISTA DE ABREVIATURAS

✓ ACSF	fluido cérebro espinhal artificial
✓ ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
✓ AIF	apoptosis-inducing factor
✓ AKT	serine/threonine protein kinase
✓ AMPA	α -amino-3- hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico
✓ Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1
✓ AVC	acidente vascular cerebral
✓ Bcl-2	b-cell lymphoma 2
✓ BDNF	fator neurotrófico derivado de cérebro
✓ Caspase	cysteine-aspartic-acid-proteases
✓ c-fos	cellular proto-oncogene
✓ CREB	camp response element-binding
✓ DAG	diacilglicerol
✓ DISC	death-inducing signaling complex
✓ EndoG	endonuclease G
✓ EthD-1	etídio homedímero
✓ FADD	fas-associated protein with death domain
✓ FAS-L	fas ligante. proteína de membrana tipo ii
✓ GABA	ácido gama-aminobutírico
✓ GDH	glutamato desidrogenase
✓ GDNF	fator neurotrófico derivado da glia
✓ GH	hormônio de crescimento
✓ HHA	hipotálamo-hipófise adrenal
✓ HSP	proteínas de choque térmico
✓ IAP	binding protein with lowpi
✓ IETD-AFC	ile-glu-thr-asp - 7-amino-4-trifluorometil cumarim
✓ IGF-1	fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
✓ IL-1a	inteuleucina-1a
✓ IL-1b	inteuleucina-1b
✓ IL-6	inteuleucina-6
✓ IP3	inositol 1,4,5-trifosfato

- ✓ **KRH** krebs-ringer- HEPES
- ✓ **LEHD-pNA** leu-glu-his-asp - p-nitroanilide
- ✓ **LTP** long term potentiation
- ✓ **NADP** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- ✓ **NGF** fator de crescimento nervoso
- ✓ **NMDA** n-metil-d-aspartato
- ✓ **NOS** nitrous oxide systems
- ✓ **OMI/HTRA2** high-temperature-requirement protein a2
- ✓ **PB** solução tampão fosfato
- ✓ **PHAP** tumor supressor putative hla-dr- associated protein
- ✓ **PI3K** phosphoinositide 3-kinases
- ✓ **PKC** protein kinase c
- ✓ **Pro-T** oncoproteína pro-timosin-alfa
- ✓ **SMAC/DIABLO** second mitochondria-derived activator of caspases /
direct inhibitor of apoptosis
- ✓ **TNF** fator de necrose tumoral
- ✓ **VO₂max** captação máxima de oxigênio
- ✓ **Z-DEVD-AMC** asp-glu-val-asp - 7-amino-4-metilcumarim,

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA	2
1.2	APOPTOSE CELULAR	5
1.2.1	DEFINIÇÃO	5
1.2.2	FASE INICIADORA	6
1.2.3	MOLÉCULAS CHAVE NA APOPTOSE NEURONAL	7
1.2.4	FAMÍLIA BCL-2	7
1.2.5	APAF-1 E CASPASES	8
1.2.6	VIAS APOPTÓTICAS – EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA	11
1.2.7	VIA INTRÍNSECA INDEPENDENTE DE CASPASE	12
1.3	ATIVIDADE FÍSICA	14
1.3.1	PARADIGMAS DE EXERCÍCIO FÍSICO	18
1.4	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	21
1.4.1	ISQUEMIA CEREBRAL - PROCESSO PATOLÓGICO	21
1.4.2	RESULTADOS FRENTE AO MODELO ANIMAL DE OCLUSÃO DE ARTÉRIAS CEREBRAIS – ISQUEMIA IN VIVO	23
1.4.3	RESULTADOS FRENTE AO MODELO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE – ISQUEMIA IN VITRO	24
1.5	JUSTIFICATIVA	26
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	SUJEITO EXPERIMENTAL	30
3.2	SISTEMA DE NATAÇÃO	30
3.3	EQUIPAMENTOS	32
3.4	REAGENTES	33
3.5	SOLUÇÕES	35
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
3.7	PROTOCOLO DE NATAÇÃO	37
3.7.1	ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO	37
3.7.2	TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO	37
3.7.3	PROTOCOLO DE NATAÇÃO	38
3.7.4	CONFECÇÃO DAS CARGAS	40
3.8	TAREFAS COMPORTAMENTAIS	42
3.8.1	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (PLUS MAZE)	42
3.8.2	TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (OBJECT LOCATION TASK)	44
3.9	SACRÍFICIO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	46
3.10	PROCEDIMENTO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE NAS FATIAS DE TECIDO CEREBRAL (INSULTO ISQUEMICO IN VITRO)	46
3.11	ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DO GLUTAMATO LIBERADO	47
3.12	ENSAIOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASES	48
3.12.1	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASE-3	48
3.12.2	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASE-8	49

3.12.3	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASE-9.....	50
3.12.4.	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF)	52
3.13	VIABILIDADE CELULAR.....	55
3.13.1	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS.....	55
3.13.2	PROCEDIMENTO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (INSULTO ISQUEMICO IN VITRO) NA CAMARA DE PERFUSÃO.....	55
3.13.3	MARCAÇÃO DO TECIDO.....	56
3.13.4	OBTENÇÃO DAS IMAGENS.....	57
3.13.5	QUANTIFICAÇÃO DAS IMAGENS.....	58
	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4	RESULTADOS	61
4.1	ADAPTAÇÕES E MUDANÇAS FISIOLÓGICAS.....	62
4.1.1	MASSA CORPORAL.....	62
4.1.2	TESTES DE ESFORÇO MÁXIMO.....	63
4.1.3	BOLOS FECAIS DEPOSITADOS.....	64
4.1.4	MASSA HIPÓFISE, ADRENAIS, FÍGADO E MÚSCULO GASTROCNEMIO	65
4.2	ANÁLISE COGNITIVA.....	66
4.2.1	TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO:.....	66
4.2.2	RECONHECIMENTO DE OBJETOS, MODALIDADE ESPACIAL.....	66
4.3	GLUTAMATO E PROTEÍNAS APOPTÓTICAS	68
4.3.1	LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO.....	68
4.3.2	EXPRESSÃO DE CASPASE-3 ATIVA	69
4.3.3	EXPRESSÃO DE CASPASE-8 ATIVA	70
4.3.4	EXPRESSÃO DE CASPASE-9 ATIVA	71
4.3.5	EXPRESSÃO DE APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF).....	72
4.4	VIABILIDADE CELULAR	73
5	DISCUSSÃO.....	75
5.1	DISCUSSÃO PARCIAL	76
5.1.1	ADAPTAÇÕES E MUDANÇAS FISIOLÓGICAS GERAIS.....	76
5.1.2	ANÁLISE COGNITIVA.....	81
5.1.3	GLUTAMATO LIBERADO.....	84
5.1.4	APOPTOSE E MORTE CELULAR	88
5.2	DISCUSSÃO GERAL.....	90
6	CONCLUSÕES.....	92
7	REFERENCIAS	94
8	APENDICE.....	119

“Da nossa vida, em meio da jornada,
Achei-me numa selva tenebrosa,
Tendo perdido a verdadeira estrada”

(...)



Ilustração de Gustave Doré (séc XIX).

“Na morte há pouco mais de acerbidade;
Mas para o bem narrar lá deparado
De outras cousas que vi, direi verdade.

Contar não posso como tinha entrado;
Tanto sono os sentidos me tomara,
Quando hei o bom caminho abandonado.”

*Canto I – “A selva escura - As feras - O espírito de Virgílio”
Divina Comédia - Dante Alighieri*

1.1 TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O Glutamato, como o principal neurotransmissor excitatório, foi pela primeira vez identificado por volta de 1960, sendo o mais abundante aminoácido no cérebro, com concentrações de aproximadamente 10mM (Curtis e Watkins, 1961).

Este neurotransmissor é sintetizado no sistema nervoso por dois processos: através do ciclo de Krebs e pela transaminação do α -cetogluturato, ou diretamente a partir da glutamina. A glutamina é sintetizada em células gliais a partir do glutamato recaptado, transportada para o terminal sináptico e convertida novamente em glutamato, pela enzima glutaminase. Outras enzimas também participam deste processo, como a glutamina sintetase e a ornitina. Uma vez no terminal sináptico, o glutamato é armazenado em vesículas ou mantido livre no citoplasma. (Bradford, Ward *et al.*, 1978; Fonnum, 1984; Danbolt, 2001; Nedergaard, Takano *et al.*, 2002)

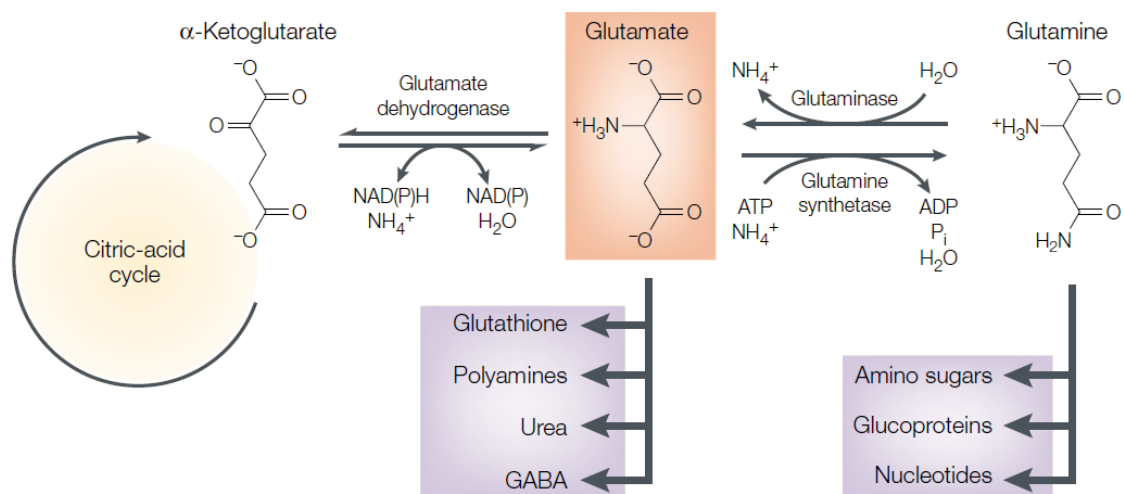


Figura 1: Glutamato como uma chave metabólica.

O glutamato e a glutamina são importantes aminoácidos para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos. A transaminação do α -cetogluturato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico, produz glutamato. A glutamina é sintetizada pela incorporação de um íon amônia em glutamato. Duas importantes enzimas catalisam estas reações, denominadas glutamato desidrogenase e glutamina sintetase. O glutamato e a glutamina contribuem para a produção de diversas moléculas, dentre elas o ácido gama-amino butírico, GABA. (adaptado de: Nedergaard, Takano *et al.*, 2002)

O glutamato é liberado basicamente por dois mecanismos. Mecanismos dependentes de Ca⁺² via exocitose de vesículas sinápticas, e independentes de Ca⁺², com origem não vesicular, via reversão da captação. A reversão da captação pode ocorrer, dentre outros fatores, devido a um aumento nas

concentrações de K^+ extracelulares, que despolariza as células vizinhas e aumenta as concentrações intracelulares de Na^+ (Sanchez-Prieto e Gonzalez, 1988; Siesjo, Ekholm *et al.*, 1990; Danbolt, 2001).

O glutamato, além de ter um importante papel na sinalização excitatória, é importante na sinaptogênese, plasticidade sináptica e na patogênese de doenças neurológicas (Conti e Weinberg, 1999). Está envolvido na síntese de proteínas e oligopeptídeos, na desintoxicação da amônia e na síntese do ácido fólico, além de ser um precursor de outros neurotransmissores como o ácido gama-amino butírico (Bradford, Ward *et al.*, 1978).

Os receptores de glutamato podem ser classificados em dois grupos distintos, os receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são acoplados a canais iônicos e são definidos como: AMPA (α -amino-3- hidroxil-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico), caracterizados por complexos tetraméricos ou pentaméricos de 4 subunidades homólogas, GluR1-GluR4; NMDA (N-metil-D-aspartato), caracterizados por complexos multiméricos de subunidades homólogas, NR1 e NR2A-NR2D, que combinam-se para formar diferentes subtipos de receptores e são altamente permeáveis a íons cálcio; Cainato, formados a partir de um conjunto de genes, como GluR-5-7, KA-1 e KA-2. Os receptores metabotrópicos são produtos de oito genes e tem sido classificados em três grupos (I, II e III), atuando acoplados à proteína G via segundo mensageiros (Hollmann, Boulter *et al.*, 1994; Vignes, Bleakman *et al.*, 1997; O'brien, Lau *et al.*, 1998; Fagni, Chavis *et al.*, 2000; Swanson, Bures *et al.*, 2005).

A quantidade de glutamato liberada na fenda sináptica é substancialmente maior do que a necessária para ativar os receptores pós-sinápticos. Em virtude disso, transportadores de alta afinidade, localizados nos neurônios adjacentes e nas células gliais, rapidamente removem o glutamato prevenindo a morte celular (Kanai, Smith *et al.*, 1993). Os transportadores são farmacologicamente distintos dos receptores mGluRs e iGluRs. L-glutamato, L-aspartato e D-aspartato são substratos para estes transportadores (Brew e Attwell, 1987; Tachibana e Kaneko, 1988; Danbolt, 2001; Swanson, Bures *et al.*, 2005)

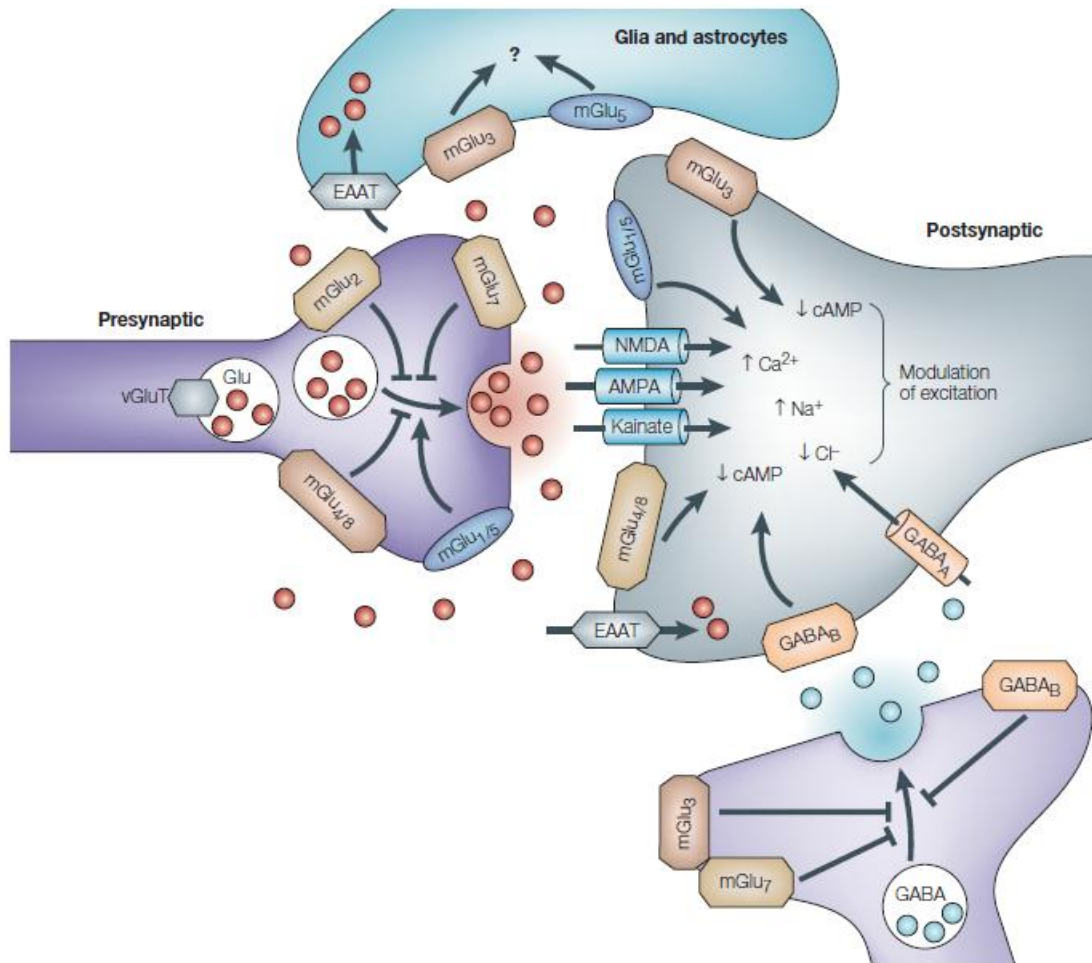


Figura 2: Sinapse hipotética ilustrando a localização e a função geral dos receptores e transportadores glutamatergicos.

Os receptores ionotrópicos (AMPA, NMDA e Cainato), medeiam a transmissão sináptica rápida, além de mediar mudanças na plasticidade sináptica. Os transportadores vesiculares (vGluT₁ e vGluT₂), captam o glutamato para dentro de vesículas pré sinápticas. Células gliais e transportadores glutamatergicos pós sinápticos (EAAT1-5) medeiam a recaptação de glutamato, e portanto o término da transmissão sináptica. Os receptores metabotrópicos apresentam uma localização sináptica diversa e funções modulatórias, pré e pós- sinápticas, da neurotransmissão (adaptado de: Swanson, Bures *et al.*, 2005).

1.2 APOPTOSE CELULAR

1.2.1 DEFINIÇÃO:

Os mecanismos de controle celular desempenham uma função crítica no desenvolvimento do organismo e na manutenção da integridade dos elementos estruturais. O balanço entre a proliferação e a morte celular representa um aspecto central na regulação e na manutenção da homeostase. Neste contexto, a apoptose ou programa de morte celular é um mecanismo de morte programada que depende tanto da preexistência como da síntese de novas proteínas (Williams e Smith, 1993; Steller, 1995; Thompson, 1995).

Alterações na regulação da apoptose podem ser uma proeminente forma de morte celular em doenças crônicas degenerativas como: Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica e na degeneração neuronal após lesão cerebral isquêmica (Mattson, 2000). Na lesão cerebral isquêmica, tem sido sugerida a participação de processos apoptóticos na evolução da zona de penumbra para a necrose tecidual (Castellanos, Sobrino *et al.*, 2006).

O termo apoptose foi inicialmente cunhado por Kerr, Wyllie *et al.*, 1972, para descrever a morte celular que envolve “células dispersas e discretas”, ao invés de confluentes volumes teciduais. Mais tarde, este fenômeno foi estudado em detalhes ao nível molecular, no *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, um nematódeo popularmente conhecido como lombriga). No *C. elegans* a morte celular programada é afetada por uma ação sequencial de proteases denominadas CED-3, CED-4 e CED-9 (codificadas pelos genes CED-3, CED-4 e CED-9) (Love, 2003). Interessante ressaltar que neste nematódeo, 1090 células somáticas são geradas na formação do indivíduo adulto, e, que 131 dessas células sofrem apoptose. Essas 131 células morrem invariavelmente em determinados pontos durante o processo de desenvolvimento, demonstrando uma notável precisão e controle deste sistema. Já nos mamíferos, a cascata de proteases envolvidas no programa de morte celular é multilinear e muito mais elaborada (Love, 2003; Elmore, 2007).

A apoptose ocorre em uma sequência organizada de eventos, sendo iniciada por uma via de sinalização tanto extrínseca, mediada por receptores, quanto intrínseca, mediada pela mitocôndria, estando ambos os processos

associados à atividade proteolítica e/ou nucleolítica (Ankarcrona, Dypbukt *et al.*, 1995; Glazner, Chan *et al.*, 2000). O processo encerra-se com eventos morfológicos distintos, com a condensação nuclear e citoplasmática, seguindo com o rompimento em fragmentos delimitados pela membrana, conhecidos como corpos apoptóticos, que são engolfados rapidamente pelas células vizinhas ou macrófagos (Bursch, Oberhammer *et al.*, 1992; Thompson, 1995; Orrenius, Zhivotovsky *et al.*, 2003).

1.2.2 FASE INICIADORA

Muitos sinais podem iniciar a apoptose. Em neurônios, o sinal iniciador melhor estudado é o ocasionado pela falta do aporte de fatores neurotróficos, que desencadeia a apoptose durante o desenvolvimento do sistema nervoso e, possivelmente, em doenças neurodegenerativas (Oppenheim, 1991; McKay, Purcell *et al.*, 1999). Na maioria dos neurônios do sistema nervoso central de mamíferos, outros iniciadores podem desencadear o processo, como acontece através da excitotoxicidade glutamatérgica. A super ativação de receptores de glutamato pode induzir a apoptose por mecanismos envolvendo excessivo influxo de cálcio (Ankarcrona, Dypbukt *et al.*, 1995; Glazner, Chan *et al.*, 2000). Esta excitotoxicidade pode ocorrer em doenças neurodegenerativas agudas, como na isquemia cerebral, no trauma grave e em crises epiléticas, bem como na doença de Alzheimer e em desordens motoras diversas (Choi, 1992; Wong, Rothstein *et al.*, 1998). Um terceiro iniciador da morte neuronal por apoptose ocorre devido ao um aumento do estresse oxidativo celular, em que radicais livres (como o ânion superóxido e o radical hidroxila) geram dano em lipídeos celulares, proteínas e ácidos nucléicos, atacando as ligações químicas em suas moléculas (Mattson, 1998; Sastry e Rao, 2000).

Outros sinais iniciadores da apoptose, como fatores genéticos e ambientais, podem ser diferentes dentre os diversos cenários fisiológicos e patológicos, mas muitos dos subsequentes eventos bioquímicos que executam o processo de morte celular, são altamente conservados, como por exemplo as alterações mitocondriais. As Mitocôndrias nas células em apoptose demonstram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, abertura de poros nas membranas e liberação de citocromo C, mudanças estas importantes e centrais no processo (Kroemer, Dallaporta *et al.*, 1998)

1.2.3 MOLÉCULAS CHAVE NA APOPTOSE NEURONAL

A apoptose em mamíferos é regulada por proteínas da família *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), pela proteína adaptadora *apoptotic protease-activating factor 1* (Apaf-1) e por proteases cisteínicas da família da caspase. Estas proteínas são homólogas aos produtos dos genes de morte celular do *C. elegans*, CED-9, CED-4 e CED-3, respectivamente. Neurônios apresentam o mesmo programa básico de apoptose quando comparados a outros tipos de células. Entretanto, diferentes tipos de neurônios e neurônios em diferentes estágios de desenvolvimento expressam diferentes combinações de membros da família Bcl-2 e Caspase, o que demonstra uma especificidade na regulação do processo (Yuan e Yankner, 2000).

1.2.4 FAMÍLIA Bcl-2

A família de proteínas Bcl-2 tem uma função crucial na transdução de sinais apoptóticos. Sua família de genes inclui tanto proteínas anti-apoptóticas como proapoptóticas, onde ambas contêm um ou mais domínios Bcl-2 homólogos (BH-1-4). Os maiores membros anti-apoptóticos, Bcl-2 propriamente dito e Bcl-x_L, estão localizados na membrana mitocondrial externa, no retículo endoplasmático e na membrana perinuclear. Outros membros como Bcl-w, Mcl-1 e A1 também impõe a sobrevivência celular. Os membros dessa família apresentam regiões com sequências primárias e estruturais similares (Merry e Korsmeyer, 1997; Cory e Adams, 2002; Czabotar, Colman *et al.*, 2009).

A expressão de Bcl-2 é alta no sistema nervoso central durante o desenvolvimento e sua regulação é diminuída após o nascimento, enquanto que sua expressão no sistema nervoso periférico é mantida no decorrer da vida (Merry e Korsmeyer, 1997). Bcl-x_L é expressa durante o desenvolvimento do cérebro, e ao contrário da Bcl-2, sua expressão continua aumentada na vida adulta (Gonzalez-Garcia, Garcia *et al.*, 1995). Bcl-x_L pode ter uma função crucial para a sobrevivência de neurônios imaturos antes que eles estabeleçam conexões sinápticas em seus trajetos. De forma geral Bcl-2 e Bcl-x_L agem inibindo membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 através do processo de heterodimerização (Merry e Korsmeyer, 1997).

A subclasse de proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas é composta por proteínas *BH3-only*, grupo pró-apoptótico que possui apenas o domínio BH3. Incluem-se nesse grupo as proteínas Bim, Bid, Puma, Noxa e Bad. Outras importantes proteínas também fazem parte dessa subclasse proapoptótica, conhecidas como Bax e Bak, com multidomínios que medeiam o dano mitocondrial, agindo como um importante passo para o início da apoptose (Bouillet, Metcalf *et al.*, 1999; Huang e Strasser, 2000; Lindsten, Ross *et al.*, 2000; Cheng, Wei *et al.*, 2001; Wei, Zong *et al.*, 2001).

Durante a apoptose, Bax e ou Bak reúnem-se em grandes homoligômeros que danificam a membrana mitocondrial externa tornando-a permeável às proteínas normalmente limitadas a seu espaço intermembranar. Dentre elas podemos citar o citocromo c, que liberado inicia a ativação de caspases iniciadoras, que culminam com o processo de destruição da célula (Wang, 2001; Cory e Adams, 2002; Czabotar, Colman *et al.*, 2009).

De forma específica tem sido proposto que as proteínas Bax e Bak podem ser mantidas sob controle das proteínas anti-apoptóticas e quando ocorre o estímulo apoptótico, as proteínas *BH3-only* ativadas, Bad e Noxa, definidas como sensibilizadoras, removem Bax e Bak das restrições impostas, promovendo assim sua ativação e translocação às membranas mitocondriais. Já proteínas como Bim, Bid e Puma, definidas como ativadoras, são capazes de ativar diretamente Bax e Bak, salvo as mantidas sob controle pelas proteínas anti-apoptóticas (Letai, Bassik *et al.*, 2002; Cartron, Gallenne *et al.*, 2004; Kuwana, Bouchier-Hayes *et al.*, 2005; Certo, Del Gaizo Moore *et al.*, 2006; Deng, Carlson *et al.*, 2007).

1.2.5 APAF-1 E CASPASES

A proteína Apaf-1 é um homólogo dos mamíferos ao produto do gene CED-4 do *C.elegans* e transmite sinais apoptóticos a partir do dano mitocondrial. Apaf-1 forma um complexo com o citocromo c, liberado da mitocôndria, juntamente com a caspase 9, mediando a ativação de pro caspase-9 (Zou, Henzel *et al.*, 1997). A ativação de caspase-9 por sua vez cliva e ativa caspase-3 (Yuan e Yankner, 2000).

Caspases (*cysteine-aspartic-acid-proteases*) fazem parte de um grupo de proteases baseadas em cisteína, ou seja, enzimas com um resíduo de

cisteína capazes de clivar outras proteínas, após um resíduo de ácido aspártico. Esta característica garante uma especificidade incomum entre as proteases (Thornberry e Lazebnik, 1998).

A papel das caspases na apoptose veio com a descoberta de que o CED-3, produto do gene requerido para morte celular no *C. Elegans*, está relacionado com a interleucina-1 β , enzima conversora, nos mamíferos (ICE ou caspase-1) (Thornberry, Bull *et al.*, 1992; Yuan, Shaham *et al.*, 1993). Embora a caspase-1 não tenha uma função óbvia na morte celular, ela foi o primeiro membro de uma grande família de proteases, cujos membros possuem funções distintas na inflamação e na apoptose. Na apoptose as caspases apresentam tanto uma função efetora, quanto ativadora. Proteínas ativadoras (por exemplo: caspase-8, caspase-9) clivam pro-formas inativas de caspases efetoras (por exemplo: caspase-3, caspase-7). As caspases compartilham similaridades na sequência de aminoácidos, estrutura e especificidade a substratos (Nicholson e Thornberry, 1997).

As caspases são expressas como pro enzimas (30 a 50 kDa), que contém tres domínios: um domínio amino-terminal, uma subunidade larga (20kDa) e uma subunidade curta (10kDa). Sua ativação envolve o processamento proteolítico entre os domínios, seguido pela associação da larga com a curta subunidade, para a formação de um heterodímero. Estruturas cristalinas de duas caspases ativas têm sido determinadas (caspase-1 e -3) e em ambos os casos, dois heterodímeros associam-se para formar um tetrâmero, com dois sítios catalíticos que parecem funcionar independentemente (Walker, Talanian *et al.*, 1994; Wilson, Black *et al.*, 1994; Rotonda, Nicholson *et al.*, 1996). Dentro de cada domínio catalítico, as subunidades, grande e pequena, estão intimamente associadas, tanto para a ligação a substratos como para a catálise. De forma geral, as características estruturais das caspases permitem que possam ser ativadas tanto auto cataliticamente quanto por uma cascata de enzimas com especificidade semelhante (Thornberry e Lazebnik, 1998).

As Caspases estão entre as proteases mais específicas e eficientes, com uma exigência incomum e absoluta para a clivagem. Sua especificidade é consistente com fato de que a apoptose não é acompanhada por uma digestão

indiscriminada de proteínas, mas sim de forma coordenada (Thornberry e Lazebnik, 1998).

Apesar de algumas características das caspases já estarem descritas pela literatura, tem sido difícil determinar seus papéis específicos, já que os mamíferos apresentam pelo menos 14 tipos diferentes. Assim, como em outros tipos de células, os neurônios podem expressar vários tipos simultaneamente, excluindo o modelo simplista de que a morte neuronal é regulada por caspases neurônio específicas. De forma geral, caspases com o domínio efetor de morte, incluindo caspase-8 e 10, são ativadas pela interação com os domínios intracelulares de seus respectivos receptores, como o receptor CD95 (Apo-1/Fas) e o fator de necrose tumoral (TNF). Caspases com largos domínios complexos de ativação (CARDs), incluindo caspase-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12, são ativadas provavelmente através de um complexo de ativação intracelular, exemplificado pelo complexo citocromo c/Apaf-1/caspase9. Caspases de domínio curto, como a caspase-3, podem ser ativadas pela maioria, senão por todas as vias de caspase (Li, Nijhawan *et al.*, 1997; Cryns e Yuan, 1998).

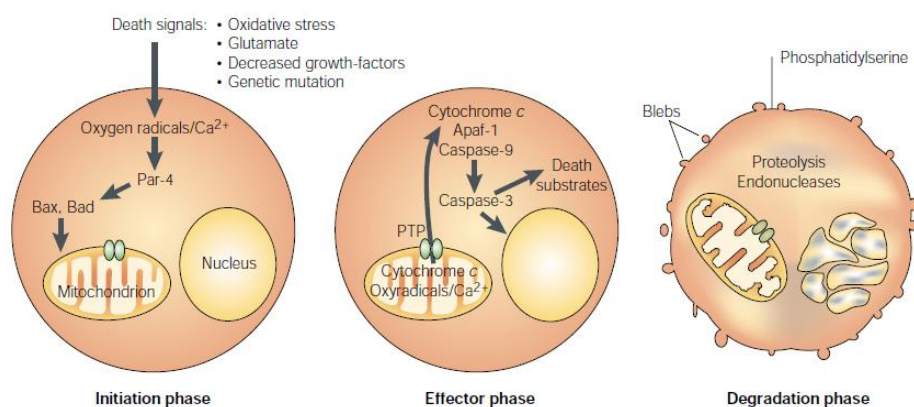


Figura 3: Características morfológicas e bioquímicas da apoptose

Durante a fase inicial, sinais de morte ativam uma cascata de eventos intracelulares que podem envolver aumentos dos níveis de radicais livres de oxigênio, Ca^{2+} , produção de par-4 e translocação de membros pró-apoptóticos (Bax e Bad) para a membrana mitocondrial. A fase efetora da apoptose envolve formação de poros permeáveis na membrana mitocondrial e liberação de citocromo C para o citoplasma. A ativação da caspase-9, ativa caspase-3 que inicia a fase de degradação onde outras enzimas estão envolvidas, resultando em mudanças nas características da membrana plasmática, como a formação de *blebs* e exposição de fosfatidilserina, culminando com a condensação e fragmentação nuclear (adaptado de: Mattson, 2000).

1.2.6 VIAS APOPTÓTICAS – EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA

Em células de mamíferos, a resposta apoptótica pode ser mediada tanto por vias intrínsecas como por vias extrínsecas, dependendo da origem do estímulo de morte (Riedl e Shi, 2004).

A via extrínseca é iniciada pela ligação de um ligante de morte extracelular como, por exemplo, FasL, constitutivamente homotriméricos que ligam-se a seus receptores, Fas (Mattson, 2000; Riedl e Shi, 2004), levando a formação de um complexo ligante-receptor que recruta mais fatores citosólicos, como FADD e caspase-8, formando assim um complexo de sinalização/indução de morte oligomérico (DISC) (Riedl e Shi, 2004). A formação do DISC leva ao recrutamento e ativação de uma caspase ativadora, caspase-8 (Boldin, Goncharov *et al.*, 1996; Muzio, Chinnaiyan *et al.*, 1996), que então cliva e recruta a caspase efetora pró-caspase-3, que ativa a caspase-3. A caspase-3 cliva proteínas em seu trajeto, levando a apoptose. A via extrínseca pode interagir com a via intrínseca através da mediação da caspase-8 na clivagem da BID, uma *BH3-only* pró-apoptótica, membro da família Bcl-2 (Li, Zhu *et al.*, 1998; Luo, Budihardjo *et al.*, 1998); que por sua vez, induz a translocação, oligomerização e inserção do Bax e ou Bak na membrana mitocondrial externa. Tudo isto é seguido pela liberação de diversas proteínas do espaço intermembranoso mitocondrial (Wang, 2001; Cory e Adams, 2002; Czabotar, Colman *et al.*, 2009).

A via intrínseca, de forma geral, é mediada por sinais de morte, como: estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica e diminuição de fatores neurotróficos, que atuam diretamente ou indiretamente na mitocôndria. Esta em resposta aos estímulos apoptóticos, como citados anteriormente, libera diversas proteínas de seu espaço intermembranoso para o citoplasma (Mattson, 2000; Wang, 2001; Riedl e Shi, 2004). Dentre elas, o citocromo C liberado associa-se com Apaf-1 e pro-caspase-9, na presença de ATP ou dATP, formando um largo complexo protéico denominado apoptossoma, que resulta no recrutamento da pro-caspase-9, seguida da ativação da caspase-9 que leva a ativação da pro-caspase-3 (Li, Nijhawan *et al.*, 1997).

A via intrínseca pode ser controlada por: proteínas da família Bcl-2, que promovem a regulação da liberação do citocromo C (Wang, 2001; Cory e Adams, 2002; Czabotar, Colman *et al.*, 2009); por proteínas inibidoras de

apoptose (IAP's), que podem potencialmente inibir a atividade enzimática das caspases ativas (Deveraux e Reed, 1999; Salvesen e Duckett, 2002; Shi, 2002); por proteínas como *second mitochondria-derived activator of caspases/directinhibitor of apoptosis* (SMAC/DIABLO), *binding protein with lowpl* (IAP) e *high-temperature-requirement protein A2* (OMI/HTRA2), que durante a apoptose são liberadas do espaço intramembranoso da mitocôndria para dentro do citosol, onde interagem com diversas IAP's promovendo uma regulação negativa e aumento da atividade apoptótica (Chai, Du et al., 2000; Verhagen, Ekert et al., 2000; Suzuki, Imai et al., 2001; Hegde, Srinivasula et al., 2002; Martins, Iaccarino et al., 2002; Van Loo, Van Gurp et al., 2002). A função do apoptossoma pode também ser regulada pela *oncoproteína pro-timosin-alfa* (Pro-T) e o *tumor supressor putative* (HLA-DR)- *associated protein* (PHAP)(Jiang, Kim et al., 2003).

1.2.7 VIA INTRÍNSECA INDEPENDENTE DE CASPASE

A via apoptótica intrínseca pode operar através de mecanismos independentes de caspase. Nesta via, a partir de estímulos apoptóticos, pelo menos duas proteínas são liberadas da mitocôndria: *Apoptosis-inducing factor* (AIF) e *Endonuclease G* (EndoG). Ambas, a partir de sua liberação, translocam-se diretamente para o núcleo (Orrenius, Zhivotovsky et al., 2003).

O AIF é uma flavoproteína mitocondrial conservada filogeneticamente e codificada por um gene, em humanos, que contém 16 exons situados nas regiões Xq25-26. Em ratos é codificado pelo gene A6 do cromossomo X (Susin, Lorenzo et al., 1999). Esta flavoproteína é sintetizada a partir de um precursor de 67kDa, importado para dentro da mitocôndria, através do seu prodomínio N-terminal. Ela contém duas sequências de localização mitocondrial (MLS), onde processa-se um precursor de 62kDa já maduro (Susin, Lorenzo et al., 1999; Otera, Ohsakaya et al., 2005).

Em condições fisiológicas o AIF permanece confinado à membrana mitocondrial interna, com a sua região N-terminal orientada para a matriz e os C-terminal para o espaço inter-membranar (Otera, Ohsakaya et al., 2005). Através de insultos e consequente permeabilização patológica da membrana mitocondrial externa, o AIF maduro é então processado para uma forma de 57 kDa. Após este processamento, é ativado, por exemplo, por calpaínas ativadas

e ou catepsinas (Otera, Ohsakaya *et al.*, 2005; Polster, Basanez *et al.*, 2005; Yuste, Moubarak *et al.*, 2005), translocando-se para o núcleo, gerando uma fragmentação do DNA em larga escala (Susin, Lorenzo *et al.*, 1999; Otera, Ohsakaya *et al.*, 2005).

Durante a apoptose, EndoG também transloca-se para o núcleo, catalizando tanto a clivagem de DNA de alto peso molecular, quanto a quebra do DNA oligonucleosomal de forma sequencial (Li, Luo *et al.*, 2001).

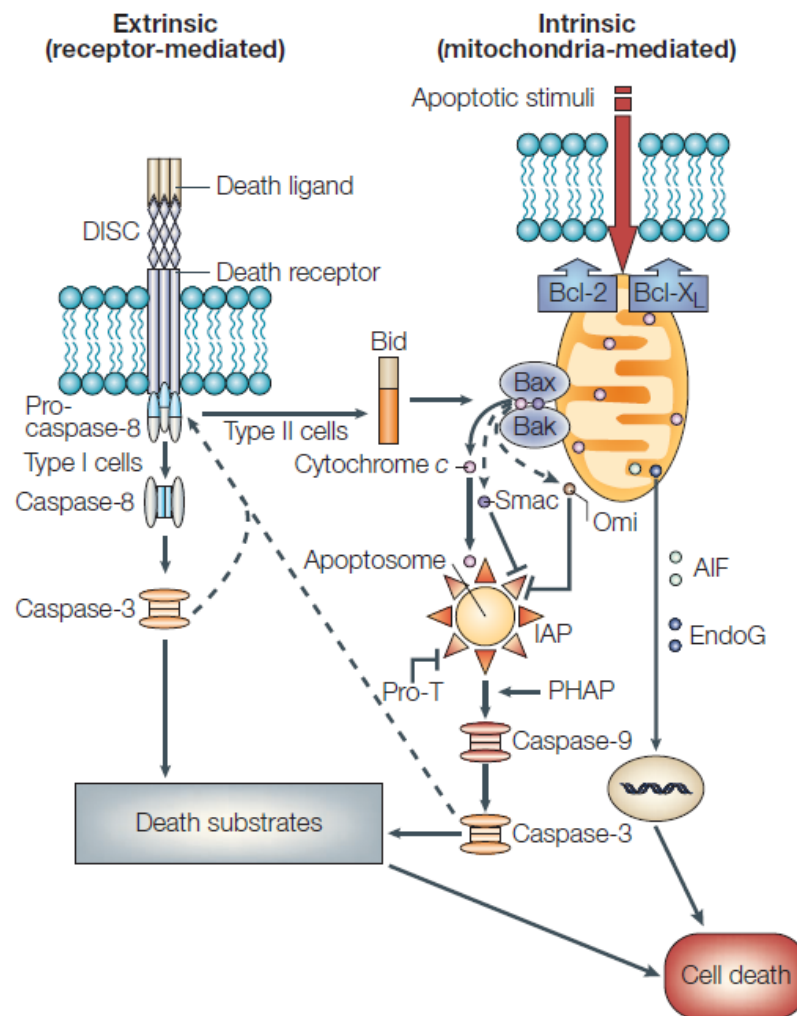


Figura 4: Vias apoptóticas – Extrínseca e Intrínseca.

A via extrínseca é modulada a partir da ligação de um ligante de morte ao seu respectivo receptor, com formação do complexo de ativação e consequente ativação de caspase-8, que posteriormente ativa caspase-3. A via intrínseca é modulada por estímulos apoptóticos que culminam com a ativação de proteínas da família Bcl-2 e consequente abertura dos poros mitocondriais. Segue-se a liberação do citocromo C e formação do complexo de ativação apoptossoma, juntamente a ligação com pró-caspase-9 e apaf-1, com posterior ativação de caspase-9 e consequente ativação de caspase-3. AIF e EndoG são liberados a partir dos poros mitocondriais, translocando-se diretamente para o núcleo (adaptado de: Orrenius, Zhivotovsky *et al.*, 2003).

1.3 ATIVIDADE FÍSICA

“A adaptação é um dos princípios fundamentais da fisiologia, operando não apenas ao nível de espécies, como Charles Darwin propôs, mas também ao nível de tecidos, células, moléculas e genes. Esta adaptação pode ser proporcionada através de um estímulo estressante, que não cause dano às células, tecidos ou organismos, mas que promova uma resposta transitória de adaptação, onde o prejuízo resultante da exposição subsequente a um estímulo nocivo possa ser reduzido”

(Gidday, 2006).

"Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance."

A Atividade física é definida como o movimento do corpo produzido pelo sistema muscular esquelético, que resulta em quantidades variadas de taxas de gasto energético. O gasto energético está positivamente relacionado com o condicionamento físico, dependendo dos estímulos característicos da atividade, como: tipo, intensidade, regularidade e tempo despendido. A atividade física pode ocorrer em pequenos pulsos de baixa para alta intensidade, ou longos, sustentando períodos de baixa intensidade, dependendo do tipo de atividade e do condicionamento do organismo. O exercício, por sua vez, é uma forma específica de atividade física, estruturada e repetitiva, que possui o objetivo de melhorar ou manter o condicionamento físico e a saúde (Dishman, Berthoud *et al.*, 2006).

O exercício físico crônico produz diversas adaptações fisiológicas que permitem ao organismo executar uma quantidade maior de trabalho, com uma maior eficácia. Estas adaptações são muitas vezes referidas como adaptações ao treinamento (Brooks e Mercier, 1994) e variam de acordo com a intensidade e a duração do exercício (Silveira, Rafael *et al.*, 2007).

Diversas são as adaptações fisiológicas impostas pelo exercício, que visam à otimização das funções sistêmicas frente à sobrecarga imposta. Dentre as adaptações mais conhecidas temos as ocorridas no sistema cardiovascular, como a bradicardia no repouso (Negrao, Moreira *et al.*, 1992) e a melhora do controle da pressão arterial em indivíduos hipertensos (Schaible, Malhotra *et al.*, 1986; Dengel, Hagberg *et al.*, 1998; Song, Sawamura *et al.*, 1998).

Além das influências sobre o sistema cardiovascular, alterações importantes sobre o metabolismo corporal, também estão bem estabelecidas na literatura. O exercício é capaz de promover alterações na composição corporal, agindo como indutor de melhoras no perfil lipídico e de promover a manutenção da homeostase glicêmica, aumentando a sensibilidade periférica à insulina e a captação de glicose (Dengel, Hagberg *et al.*, 1998; Boule, Haddad *et al.*, 2001). O organismo se adapta para utilizar outros substratos energéticos para realização do trabalho (Silveira, Rafael *et al.*, 2007).

De forma geral, estudos demonstram os benefícios do exercício em diversas situações, como: redução no desenvolvimento de tumores (Almeida, Gomes-Filho *et al.*, 2009), diminuição da incidência de câncer de cólon (Latikka, Pukkala *et al.*, 1998) e adaptações do sistema imunológico com maior resistência a infecções (Shephard, Rhind *et al.*, 1994; 1995; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen e Toft, 2000; Sugiura, Nishida *et al.*, 2000).

Os benefícios do exercício sobre o cérebro têm sido reconhecidos há séculos, mas apenas nas últimas duas décadas a pesquisa científica tem sido rigorosamente fundamentada sobre o seu efeito no sistema nervoso central (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005).

De acordo com a literatura, os efeitos do exercício sobre o cérebro vão além de um simples aumento regional do suprimento de sangue (Cotman, Berchtold *et al.*, 2007), podendo aumentar a demanda energética em diversas regiões, como hipocampo, córtex motor e estriado (Vissing, Andersen *et al.*, 1996), ativando circuitos neurais específicos e desta forma modificando vias de sinalização e o impacto da ação de moléculas especializadas (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005).

Em um contexto adaptativo, a plasticidade consequente ao exercício, permite que o sistema nervoso central adquira novas funções, modificando elementos constitutivos de seu meio interno e a conectividade em resposta ao ambiente (Paillard, Jacques 1976). Mais precisamente, estudos clínicos (Pajonk, Wobrock *et al.*; Rolland, Van Kan *et al.*; Kramer, Hahn *et al.*, 1999; Abbott, White *et al.*, 2004; Winter, Breitenstein *et al.*, 2007; Gobbi, Oliveira-Ferreira *et al.*, 2009) e em modelos animais (Stummer, Weber *et al.*, 1994; Smith e Zigmond, 2003; Sim, Kim *et al.*, 2004; Albeck, Sano *et al.*, 2006; O'callaghan, Ohle *et al.*, 2007; Chang, Yang *et al.*, 2009) demonstram os

benefícios do exercício sobre a função neuronal, tanto na melhora da aprendizagem e memória, quanto na prevenção e na facilitação da recuperação funcional em lesões no sistema nervoso central.

Hoje, o principal foco das pesquisas tem sido a tentativa de delinear a capacidade terapêutica do exercício físico frente às lesões do sistema nervoso central, sendo que, o grande revés de sua implementação em terapêuticas de reabilitação é o desconhecimento dos mecanismos moleculares e das vias de sinalização através dos quais ocorrem seus efeitos (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005).

Estudos demonstram que o exercício físico pode aumentar a expressão de genes associados à plasticidade sináptica, estrutura neuronal e transdução de sinal (Tong, Shen *et al.*, 2001). Mais especificamente, o exercício é capaz de aumentar a expressão de fatores de crescimento, como fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) (Seifert, Brassard *et al.*; Oliff, Berchtold *et al.*, 1998; Widenfalk, Olson *et al.*, 1999; Tong, Shen *et al.*, 2001; Cotman e Berchtold, 2002; O'callaghan, Ohle *et al.*, 2007; Soya, Nakamura *et al.*, 2007), fator de crescimento nervoso (NGF) (Neeper, Gomez-Pinilla *et al.*, 1996; Ang, Wong *et al.*, 2003; Albeck, Sano *et al.*, 2006; Chae e Kim, 2009) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Smith e Zigmond, 2003). O aumento destes fatores de crescimento apresenta uma influencia positiva e neuroprotetora sobre o sistema nervoso, tanto pela estimulação do crescimento e desenvolvimento de novas células (Van Praag, Kempermann *et al.*, 1999; Wu, Chang *et al.*, 2008), quanto pela modulação de vias apoptóticas, inibindo a morte celular consequente à falta de fatores energéticos (Chae e Kim, 2009).

Sobre o sistema imune, o exercício físico tem sido largamente reconhecido pelo seu efeito modulatório sobre os níveis de citocinas endógenas (Shephard, Rhind *et al.*, 1994; 1995; Gleeson, 2000; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen e Toft, 2000; Sugiura, Nishida *et al.*, 2000; Chennaoui, Drogou *et al.*, 2008). No sistema nervoso central, as citocinas são um dos fatores chave de ativação da micróglia (Hanisch, 2002). O exercício físico pode apresentar efeitos modulatórios variando de acordo com o tipo de paradigma imposto. De acordo com a literatura, o exercício voluntário pode aumentar o número de células microgliais bromo-5-2'-deoxiuridina (BrdU) positivas, em diversas regiões corticais (Ehninger e Kempermann, 2003) e no

hipocampo (Steiner, Kronenberg *et al.*, 2004), ao passo que o exercício forçado diminui sua expressão na faixa horizontal diagonal de Broca (Ang, Wong *et al.*, 2004).

É reconhecido que a super expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro resulta na patogênese de desordens neurotóxicas e neurodegenerativas (Chennaoui *et al.*, 2008; Szelenyi, 2001), apresentando grande impacto na funcionalidade normal do cérebro (Shytle *et al.*, 2004).

Apesar da literatura apontar contradições entre os paradigmas de exercício e alguns trabalhos demonstrarem uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1a (IL-1a), interleucina-1b (IL-1b) e interleucina-6 (IL-6), modulados pelo aumento de fatores neutróficos, como NGF, o papel das citocinas em relação ao processo inflamatório é bastante complexo e não deve ser considerado de forma isolada. A função das citocinas pró-inflamatórias faz parte de uma rede de interação de mediadores, não existindo assim uma explicação simples e direta frente às influências do exercício (Ang e Gomez-Pinilla, 2007; Chennaoui, Drogou *et al.*, 2008).

Outros potentes mecanismos neuroprotetores, consequentes à realização de protocolos de exercício físico, envolvem a modulação do estado oxidativo, embora exista um paradoxo em relação aos efeitos do exercício físico e à formação de radicais livres, prejudiciais à função celular (Cechetti, Fochesatto *et al.*, 2008). De acordo com a literatura, sugere-se que o exercício físico possa causar uma adaptação do sistema antioxidante, com aumento da atividade das enzimas de regulação, proporcionando um aumento da resistência contra o estresse e consequentemente redução do dano oxidativo (Powers, Criswell *et al.*, 1994; Leeuwenburgh, Hollander *et al.*, 1997; Servais, Couturier *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que o exercício físico voluntário pode aumentar a peroxidação lipídica no cérebro de ratos (Suzuki, Katamine *et al.*, 1983), ao passo que outros paradigmas de exercício podem atenuar o dano oxidativo pelo aumento da expressão de enzimas de regulação do estresse em diferentes regiões cerebrais de animais (Salo, Donovan *et al.*, 1991; Viguie, Frei *et al.*, 1993; Somani, Ravi *et al.*, 1995; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Radak, Kaneko *et al.*, 2001; Aksu, Topcu *et al.*, 2009).

Evidências demonstram que diferentes resultados encontrados podem ocorrer devido aos diferentes protocolos, tipos e intensidades impostos (Risedal, Zeng *et al.*, 1999; Ramsden, Berchtold *et al.*, 2003; Cechetti, Fochesatto *et al.*, 2008).

1.3.1 PARADIGMAS DE EXERCÍCIO FÍSICO

De forma geral, estudos em fisiologia do exercício tem usado, ao longo dos anos, modelos animais na tentativa de simular condições de estresse físico observado em humanos, visando o melhor acompanhamento das alterações sistêmicas, celulares e moleculares decorrentes do exercício (Gobatto, De Mello *et al.*, 2001). Dentre os paradigmas de exercício utilizados temos o voluntário e o forçado. O paradigma voluntário consta de uma pequena roda de corrida (*running wheel*) acrescentada ao ambiente do animal experimental, no caso o roedor, onde ele pode livremente se “exercitar” (Gomez-Pinilla, Ying *et al.*, 2002). Sua vantagem, defendida por alguns estudos, está no fato de que seus resultados podem ser aplicados a condições humanas em que o indivíduo escolhe quando e quanto correr. Em contraposição, não pode ser facilmente quantificado e padronizado, quanto à velocidade, frequência, duração e intensidade, como ocorre no paradigma forçado (Ang e Gomez-Pinilla, 2007).

Entre os tipos de paradigmas forçados mais utilizados, estão a corrida em esteira rolante e a natação, e os animais mais usados, sem dúvida, os ratos, que são de fácil manipulação e de boa resposta ao exercício (Gobatto, De Mello *et al.*, 2001). Paradigmas de exercício forçado apresentam dentre outras vantagens, além da medição e padronização de suas variáveis, a proximidade aos protocolos utilizados em terapias de reabilitação (Ang e Gomez-Pinilla, 2007).

Embora a literatura coloque que o exercício forçado possa melhor simular alguns regimes de exercício em humanos, tem sido sugerido que o estresse gerado por essa modalidade possa mascarar os possíveis efeitos observados. Estudos de corrida em esteira ou natação, tem constantemente confundido o estresse normal imposto pelo exercício, com o estresse emocional da repressão, tornando assim difícil a distinção entre os efeitos de estresse geral, dos efeitos isolados do exercício. Cuidados, dependendo da modalidade, devem ser tomados para evitar fatores estressantes, como por

exemplo, a intensidade de estímulos de choque na esteira rolante, e o período de treinamento, como treinos durante o ciclo de luz (sono) dos roedores (Dishman, Berthoud *et al.*, 2006).

Apesar do estresse de repressão citado, investigações demonstram, dentre outros fatores, uma melhora na função cognitiva com a utilização do paradigma forçado, com aumento da plasticidade hipocampal, melhora do aprendizado espacial e não espacial (O'callaghan, Ohle *et al.*, 2007). Assim, alguns estudos defendem que a adaptação imposta pelo exercício em modalidades crônicas pode superar os efeitos do estresse. O aumento da expressão de fatores neurotróficos pode ser independente do estresse de imobilização imposto (Adlard e Cotman, 2004).

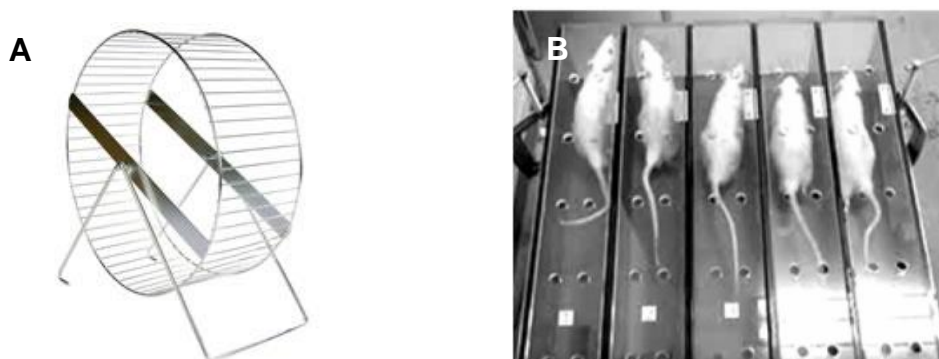


Figura 5: Paradigmas de exercício físico.

A: Modelo voluntário representado pela roda de corrida (*Running Wheel*); **B:** modelo forçado representado pela esteira (*Treadmill*)

O uso da natação como modelo tem sido utilizado prioritariamente em estudos sobre: adaptabilidade metabólica, hepática, do sistema músculo-esquelético (Lancha, Recco *et al.*, 1995; Gobatto, De Mello *et al.*, 2001; Gomes, De Mello *et al.*, 2006; Silveira, Rafael *et al.*, 2007; Leme, Silveira *et al.*, 2009), do sistema imunológico (Crespilho, De Almeida Leme *et al.*) e do sistema cardiovascular (Scheuer, Malhotra *et al.*, 1982; Schaible, Malhotra *et al.*, 1986; Song, Sawamura *et al.*, 1998; Gomes-Filho, Ferreira *et al.*, 2008).

Os efeitos desta modalidade sobre o sistema nervoso central estão concentrados em poucos trabalhos como o de Radak, Kaneko *et al.*, (2001), onde os animais submetidos a um programa crônico de exercício de natação, uma hora por dia, cinco vezes por semana, durante nove semanas, apresentaram uma modulação positiva sobre marcadores de stress oxidativo,

além de uma melhora da função cognitiva. Outro trabalho, como o de Gomes, De Oliveira *et al.*, (2009), utilizando um modelo de diabetes, demonstrou que os animais submetidos ao um protocolo crônico de natação, uma hora por dia, cinco vezes por semana, durante oito semanas, com alta intensidade, induziu importantes alterações metabólicas e hormonais associadas com a melhora da homeostase glicêmica e com o aumento da atividade sistêmica e hipocampal do peptídeo Fator de Crescimento semelhante a Insulina Tipo 1 (IGF-1 ou somatomedina C).

Diversos estudos têm sugerido que o IGF-1 tem uma capacidade direta na modulação da eficiência sináptica, via regulação de sua formação, liberação de neurotransmissores e excitabilidade neural (Araujo, Lapchak *et al.*, 1989; Kar, Seto *et al.*, 1997).

1.4 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

A organização mundial de saúde define o acidente vascular cerebral (AVC) como uma disfunção de desenvolvimento rápido, focal ou global, de origem vascular, com duração superior a 24 horas (Brown, Markus *et al.*, 2006). Suas causas e, em consequência, seus subtipos patológicos são: anóxico-isquêmico e hemorrágico. O subtipo anóxico-isquêmico é classificado em três categorias, de acordo com os supostos mecanismos de lesão cerebral (lacunar, aterosclerótico e embólico). De forma geral é resultado da falência vasogênica para suprir adequadamente o tecido cerebral de oxigênio e substratos. O subtipo hemorrágico, por sua vez, é resultado do extravasamento de sangue para dentro ou para o entorno das estruturas do sistema nervoso central (intraparenquimatoso ou subaracnóide) (Sacco, Adams *et al.*, 2006).

O AVC corresponde a uma das principais causas de morte e a principal causa de incapacidade no mundo, sendo que dois terços destas ocorrem nos países menos desenvolvidos, com profundas consequências para a sociedade (Feigin, Lawes *et al.*, 2003; Bonita, Mendis *et al.*, 2004; Lopez, Mathers *et al.*, 2006). Importante ressaltar que o AVC isquêmico é o tipo mais comum de AVC, constituindo cerca de 80% de todos os acometimentos (Feigin, Lawes *et al.*, 2003), dos quais 60% são atribuíveis a artérias de grande calibre (Moustafa e Baron, 2008).

1.4.1 ISQUEMIA CEREBRAL - PROCESSO PATOLÓGICO

A alta demanda energética do cérebro se faz necessária para a manutenção dos gradientes iônicos e dos potenciais de repouso de membrana (Siesjo, 1992a; b; Milusheva, Doda *et al.*, 1996).

Esta alta demanda energética, juntamente à baixa reserva disponível, rendem ao sistema nervoso central susceptibilidade única frente às alterações de suprimento, apesar da rede de circulação colateral ser muito desenvolvida (Dias, Luiz *et al.*, 2000). Quando a homeostase energética encontra-se alterada, as taxas de glicólise e fosforilação oxidativa diminuem com consequente redução do nível de ATP intracelular, gerando deterioração da função da membrana e da homeostase iônica. Quando a concentração de ATP

intracelular reduz, a bomba Na^+/K^+ -ATPase é a mais vulnerável e sua inibição interrompe a regulação do potencial de membrana, do volume celular e do gradiente de Na^+ da célula, inibindo a repolarização do axônio e da membrana sináptica após a despolarização (Lipton, 1999). Neste contexto, despolarizações neuronais sucessivas são geradas e uma grande concentração de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, é liberada (Siesjo, 1992a; b; Milusheva, Doda *et al.*, 1996; Nishizawa, 2001; Fujimoto, Katsuki *et al.*, 2004). A consequente hiperexcitabilidade glutamatérgica reduz o bloqueio do Mg^{2+} , em receptores voltagem dependente como NMDA, aumentando a despolarização e o influxo de Ca^{+2} (Zeevalk e Nicklas, 1992). Os receptores AMPA e cainato também são ativados, levando ao influxo de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- e obrigatoriamente de água, através do gradiente osmótico, o que leva ao edema e à lise celular (Lipton, 1999). O processo é potencializado pela abertura sustentada e concomitante de canais de Ca^{2+} , inibindo o metabolismo oxidativo mitocondrial, criando um ciclo vicioso (De Flora, Franco *et al.*, 1998; Verkhratsky, Orkand *et al.*, 1998; Lipton, 1999; Mattson, 2000). Este ciclo culmina com a ativação de proteases, nucleases, fosfolipases, óxido nítrico sintase e outras enzimas degradativas, levando ao aumento da produção de radicais livres (Siesjo, 1992a; b).

Os radicais livres de oxigênio e os moduladores inflamatórios participam da evolução da lesão isquêmica, como mediadores da lesão pós reperfusão. Moléculas inflamatórias, como fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucina-6 (IL-6), promovem a expressão de moléculas de adesão, facilitando a aderência leucocitária e a migração para os capilares cerebrais. A contínua migração e aderência leucocitária por sua vez, promovem a oclusão de novos vasos, com progressiva redução do fluxo sanguíneo (Vila, Castillo *et al.*, 2000; Castillo e Leira, 2001; Castellanos, Castillo *et al.*, 2002)

Assim, insultos isquêmicos cerebrais podem ser compreendidos como um processo dinâmico, que resulta em excitotoxicidade, produção de radicais livres, acidose tecidual, inflamação, apoptose e progressiva morte celular, com subsequente aumento do volume de infarto imediatamente ao iniciar o evento (Ginsberg, 2003; Castellanos, Sobrino *et al.*, 2006; Thomazi, Boff *et al.*, 2008).

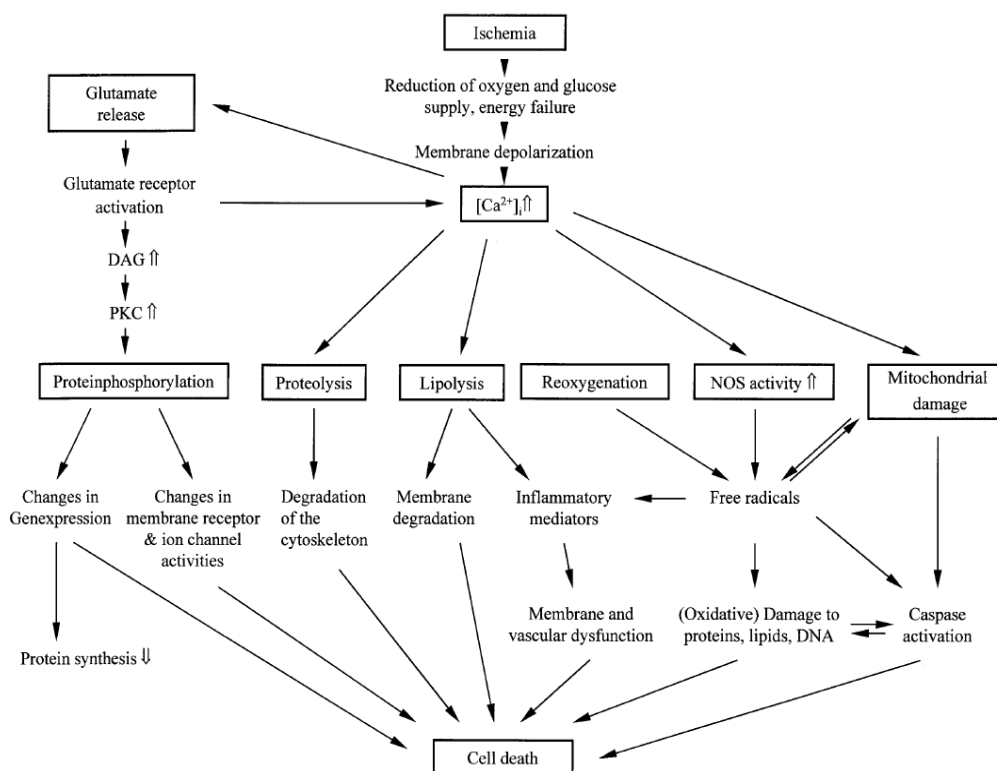


Figura 6: Cascata bioquímica que ocorre nos neurônios em resposta a isquemia cerebral.

Diacilglicerol (DAG), proteína quinase C (PKC), óxido nítrico sintase (NOS). (Adaptado de: Mattson, Culmsee *et al.*, 2000).

1.4.2 RESULTADOS FRENTE AO MODELO ANIMAL DE OCLUSÃO DE ARTÉRIAS CEREBRAIS – ISQUEMIA *IN VIVO*

Os diferentes resultados apresentados pela literatura, advindos da realização do exercício físico, frente aos modelos animais de oclusão de artérias cerebrais, são apresentados como consequência dos diferentes paradigmas e protocolos experimentais. Os paradigmas e protocolos variam desde a atividade voluntária ou forçada, até parâmetros como tempo e intensidade, diferentemente impostos. Tanto a atividade física realizada previamente, como após o insulto isquêmico, demonstra mecanismos neuroprotetores, como: diminuição da incidência, aumento da sobrevivência neuronal e limitação da área de infarto (Stummer, Weber *et al.*, 1994; Wang, Yang *et al.*, 2001; Li, Luan *et al.*, 2004), diminuição da formação de edema com aumento da espessura da lâmina basal e consequente aumento da integridade do cérebro (Ding, Ding *et al.*, 2006; Davis, Mahale *et al.*, 2007), aumento da liberação de fatores neurotróficos como BDNF e NGF, juntamente ao aumento

da expressão de receptores trkB (Ding, Li *et al.*, 2004; Kim, Bang *et al.*, 2005), aumento da angiogênese local (Ding, Li *et al.*, 2004) e liberação de proteínas protetoras de stress, como HSP-27, HSP-70 (Liebelt, Papapetrou *et al.*; Chen, Chen *et al.*, 2007; Hayes, Sprague *et al.*, 2008)

1.4.3 RESULTADOS FRENTE AO MODELO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE – ISQUEMIA *IN VITRO*

Uma alternativa válida para a investigação dos mecanismos celulares envolvidos na isquemia cerebral, com uma resposta muito similar ao demonstrado por modelos animais de isquemia cerebral transitória, são as culturas organotípicas de cortes hipocâmpais. A formação hipocâmpal é uma das regiões mais sensíveis do cérebro aos efeitos da privação de oxigênio e glicose (OGD) (Schmidt-Kastner e Freund, 1991; Strasser e Fischer, 1995; Cimarosti, Zamin *et al.*, 2005; Horn, Gerhardt *et al.*, 2005).

O modelo de cultura organotípica foi desenvolvido no início da década de 80 por Gahwiler, (1981) e mais tarde modificado por Stoppini, Buchs *et al.*, (1991). Este método mantém as fatias teciduais numa interface entre o ar e o meio de cultura, podendo permanecer viável por diversas semanas (Gahwiler, 1981; Stoppini, Buchs *et al.*, 1991).

Para a investigação da lesão causada pelo OGD, diferentes parâmetros de viabilidade celular são comumente empregados (Strasser e Fischer, 1995; Taylor, Burke *et al.*, 1995; Monette, Small *et al.*, 1998; Norberg, 2004). Especificamente, uma das técnicas empregadas para quantificação das células mortas é o exame por imunohistoquímica direta, através da utilização do *kit live/dead assay* (6 mmol/L etídiohomodímero e 4 mmol/L calceína-AM), onde células viáveis, marcadas calceína-AM, apresentam uma “fluorescência verde” e células mortas, marcadas com etídio-homodímero, apresentam uma “fluorescência vermelha” (Monette, Small *et al.*, 1998).

A técnica de isquemia *in vitro* é uma ferramenta útil para o estudo fisiológico e farmacológico das propriedades dos circuitos neuronais, apresentando vantagens como: preservação da organização tecidual, manutenção das funções celulares, manutenção das composições neuronais específicas e preservação da liberação de fatores locais. Essa técnica exclui parâmetros sistêmicos complexos, como os apresentados em modelos animais

de isquemia *in vivo* (Newman, Hospod *et al.*, 1989; Stoppini, Buchs *et al.*, 1991; Strasser e Fischer, 1995; Taylor, Burke *et al.*, 1995; Noraberg, 2004).

De forma geral, o modelo *in vitro* possibilita à avaliação de mecanismos intrínsecos a estrutura estudada, mas poucos trabalhos que utilizaram protocolos de exercício físico se dispuseram a elucidá-los (Scopel, Fochesatto *et al.*, 2006; Cechetti, Rhod *et al.*, 2007; Cechetti, Fochesatto *et al.*, 2008).

Scopel, Fochesatto *et al.*, (2006) demonstraram em seu estudo que células hipocâmpais, de animais submetidos a dois diferentes protocolos de exercício físico, de moderada intensidade e alta intensidade, com durações respectivas de vinte minutos por dia e sessenta minutos por dia, cinco vezes por semana, durante duas semanas, respondem diferentemente a suscetibilidade ao dano hipocâmpal, avaliado pela liberação de lactato desidrogenase. De acordo com seus resultados, o exercício de alta intensidade exacerba o dano das células hipocâmpais, enquanto o exercício de moderada intensidade promove uma redução, quando comparado ao controle sedentário. Cechetti, Rhod *et al.*, (2007), utilizando da mesma metodologia, experimentou um programa crônico de exercício físico em esteira, três vezes por semana, por doze semanas, com intensidade moderada, encontrando resultados similares.

Em outro trabalho, os mesmos autores, Cechetti, Fochesatto *et al.*, (2008), utilizando um protocolo agudo de exercício físico em esteira, por duas semanas, vinte minutos por dia, encontraram resultados conflituosos ao demonstrado pela literatura, uma vez que o exercício físico prévio não foi capaz de alterar significativamente as expressões de BDNF e de marcadores de estresse oxidativo, em fatias hipocâmpais, submetidas ao modelo de isquemia/reperfusão *in vitro*. Segundo os autores, seus resultados conflituosos não excluem a participação do BDNF como um importante componente molecular influenciado pelo exercício. Em sua discussão, outros importantes trabalhos são citados, uma vez que o exercício físico é capaz de afetar diversas proteínas relacionadas à plasticidade sináptica em modelos de isquemia (Ding, Ding *et al.*, 2006), além de regular positivamente proteínas envolvidas com o catabolismo da glicose, síntese de ATP e a renovação do glutamato (Gomez-Pinilla, Ying *et al.*, 2002), promovendo assim neuroproteção.

1.5 JUSTIFICATIVA

Apesar do crescimento no estudo das desordens neurodegenerativas, com mecanismos genéticos e moleculares avançando rapidamente no entendimento da patogênese das doenças, não há um tratamento efetivo, necessitando, portanto do desenvolvimento de métodos de prevenção ou redução dos riscos (Mattson, 2000).

A falta do exercício físico, aparentemente sustenta epidemias de obesidade, mortes por doenças coronarianas e diabetes tipo II (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005), dentre outros fatores de risco responsáveis pelas doenças cerebrovasculares. A importância da atividade física advém do nosso estilo de vida sedentário que tem criado uma autêntica condição para deterioração das condições de saúde em nossa sociedade (Dishman, Berthoud *et al.*, 2006).

Embora existam evidências acumulativas dos benefícios neurais e comportamentais da atividade física, a modalidade, a duração e a intensidade ideal do exercício, não foram estabelecidos. Modelos animais de laboratório são altamente variados, com muitos estudos utilizando diferentes paradigmas e protocolos experimentais, tais como: acesso constante a rodas de exercício voluntário ou curtos períodos de exercício forçado sobre uma esteira. Assim não é surpreendente que os estudos encontrem resultados diferentes, dependendo do delineamento utilizado (Leasure e Jones, 2008). Além disso, é cada vez mais reconhecido que um único paradigma de exercício não pode satisfazer todas as necessidades terapêuticas (Ang e Gomez-Pinilla, 2007; Cotman, Berchtold *et al.*, 2007).

Levando-se em consideração a existência de diversas vias metabólicas e neuroquímicas, entre o sistema músculo-esquelético, a medula espinhal e o cérebro, sugere-se que a atividade física imposta pelo exercício possa influenciar o sistema nervoso central (Dishman, Berthoud *et al.*, 2006), e tomando por base seus benefícios, torna-se necessário estudos que possam demonstrar os possíveis mecanismos protetores, dentre eles neurofisiológicos, sobre patologias altamente incidentes.

“- Não tenhas medo - respondeu Virgílio, experiente - mas não sejas fraco! Aqui chegamos ao lugar, do qual antes te falei, onde encontraríamos as almas sofredoras que já perderam seu livre poder de arbítrio. Não temas, pois tu não és uma delas, tu ainda vives”

(...)

“Pela mão me travando diligente,
Com ledo gesto e coração me erguia,
E aos mistérios guiou-me incontinenti,”

(...)

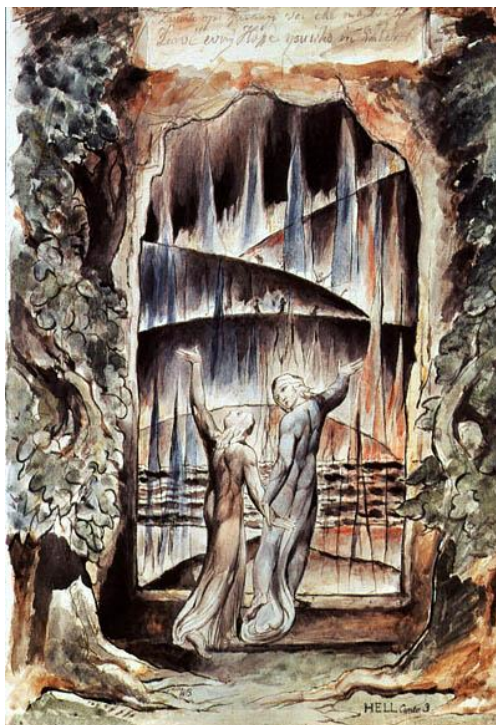


Ilustração de William Blake (século XVIII).

“ ‘Que turba é essa – eu disse – ‘e qual costume
Tanto a passar a torna pressurosa,
Se bem discirno ao duvidoso lume?’

Tornou-me: - ‘Explicação minuciosa
Darei, quando tivermos atingido
Do Aqueronte a ribeira temerosa”.

*Canto III – “A porta do Inferno – Vestíbulo / Rio Aqueronte - Caronte”
Divina Comédia - Dante Alighieri*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os mecanismos neuroprotetores do exercício físico regular, envolvendo a liberação de glutamato e a apoptose celular, após privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), em fatias cerebrais de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar as influencias adaptativas e as mudanças fisiológicas consequentes de um protocolo crônico de natação, através da análise da massa: corporal, tecido adiposo reto peritoneal e epididimal, da hipófise, adrenais, fígado e músculo gastrocnêmico;
- ✓ Caracterizar os níveis gerais de emocionalidade e estresse dos animais através da quantificação do número de bolos fecais depositados durante um protocolo crônico de natação;
- ✓ Caracterizar os níveis de ansiedade e estresse através do teste do labirinto em cruz elevado (*plus maze*), de animais submetidos a um protocolo crônico de natação;
- ✓ Analisar o estado cognitivo (aprendizado/memória) através da tarefa de reconhecimento de objetos na modalidade espacial, de animais submetidos a um protocolo crônico de natação;
- ✓ Quantificar o glutamato liberado de fatias de hipocampo e córtex, após a privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), de animais submetidos a um protocolo crônico de natação;
- ✓ Quantificar a expressão das Caspases -3, -8 e -9, em fatias de hipocampo e córtex, após a privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), de animais submetidos a um protocolo crônico de natação,;
- ✓ Quantificar a expressão de AIF (*apoptosis-inducing factor*) em fatias de hipocampo, após a privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), de animais submetidos a um protocolo crônico de natação;
- ✓ Analisar a viabilidade celular hipocampal em fatias de hipocampo, após a privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), de animais submetidos a um protocolo crônico de natação.

“ ‘Vamos: longa a jornada exige pressa’
Entrou, e eu logo, o círculo primeiro
Em que o abismo a estreitar-se já começa,

(...)

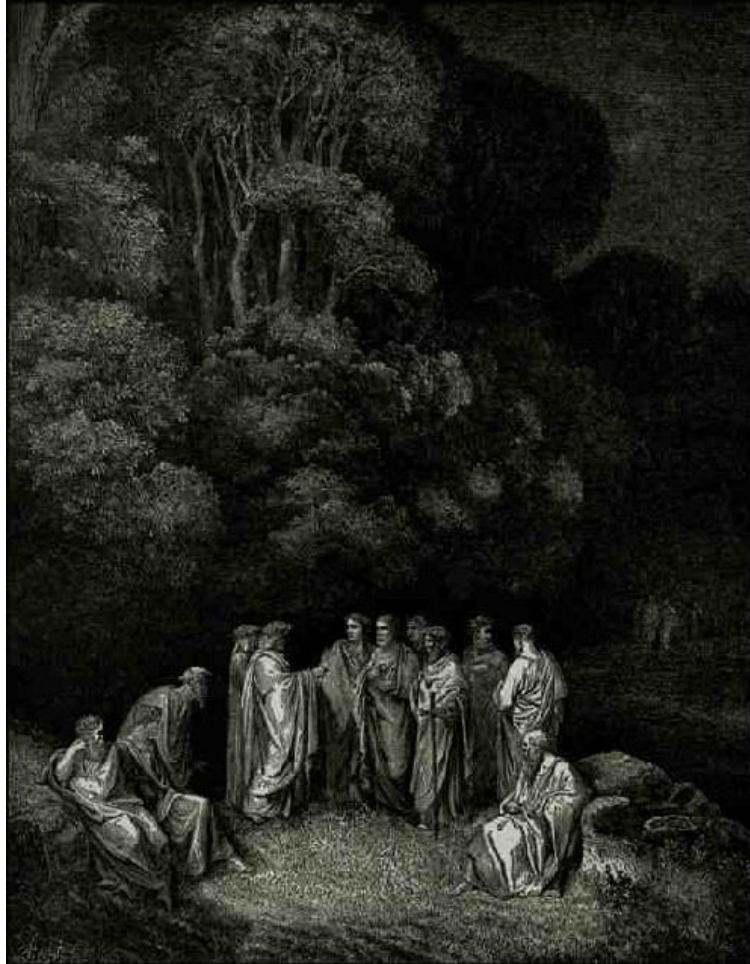


Ilustração de Gustave Doré (séc. XIX)

(...)

“ E da entrada não longe estando,
Eis um clarão brilhante divisamos
Das trevas o hemisfério alumando”

*Canto IV – “Limbo(Círculo 1) – Castelo dos iluminados”
Divina Comédia - Dante Alighieri*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUJEITO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos, machos, adultos, da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus albinus Wistar*), pesando 150-200g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos no Biotério do Núcleo de Neurociências do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde foram alimentados com ração balanceada padrão (Purina®) e água *ad libitum*, permanecendo alocados em gaiolas com temperatura ambiente controlada de ± 25 °C e foto período de 12h claro/escuro.

3.2 SISTEMA DE NATAÇÃO

O sistema de natação foi construído com base no sistema proposto por Vieira, Roberto *et al.*(1988), tendo em vista a necessidade de um instrumento que viabilize o treinamento físico de animais em nosso laboratório. Objetivamos um instrumento barato, de fácil manuseio e que busque melhor visualização e acompanhamento dos animais durante o treinamento, além de um sistema de aquecimento automático da água a temperaturas fisiológicas.

O sistema de natação constitui-se de quatro tanques individuais, ou baias, um número menor ao referenciado por Vieira, Roberto *et al.*(1988), mas que apesar da perda de produção em número de animais, viabiliza um maior controle durante o treinamento. O tanques foram confeccionados com vidros transparentes de 8 mm de espessura lateralmente e 6 mm de espessura em suas divisórias e não com tubos de PVC (cloreto de polivinil). Cada tanque apresenta dimensões de 20cm X 20cm X 70cm, correspondendo cada um a um volume de 28 litros, totalizando assim 112 litros. Ambos os quatro tanques são interconectados por espaçamentos inferiores entre suas divisórias, permitindo assim completa homogeneidade no meio. Cada tanque apresenta uma entrada posterior, e uma saída anterior para água, conectados ao sistema de distribuição. Estes encontram-se sob um suporte de madeira compensada, com acabamento em fórmica branca. A água é bombeada diretamente para um aquecedor, que mantém a temperatura em torno de 32°C, considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do animal (Crespilho *et*

al., 2006). A água bombeada parte para os tanques de exercício, distribuindo e atenuando a pressão, através das 4 conexões (entradas) posteriores, retornando diretamente para um filtro através das 4 conexões (saídas) anteriores, sendo assim filtrada (macropartículas), retornando e mantendo o ciclo de distribuição (FIGURA 7).

O processo de construção do equipamento encontra-se no APENDICE1.

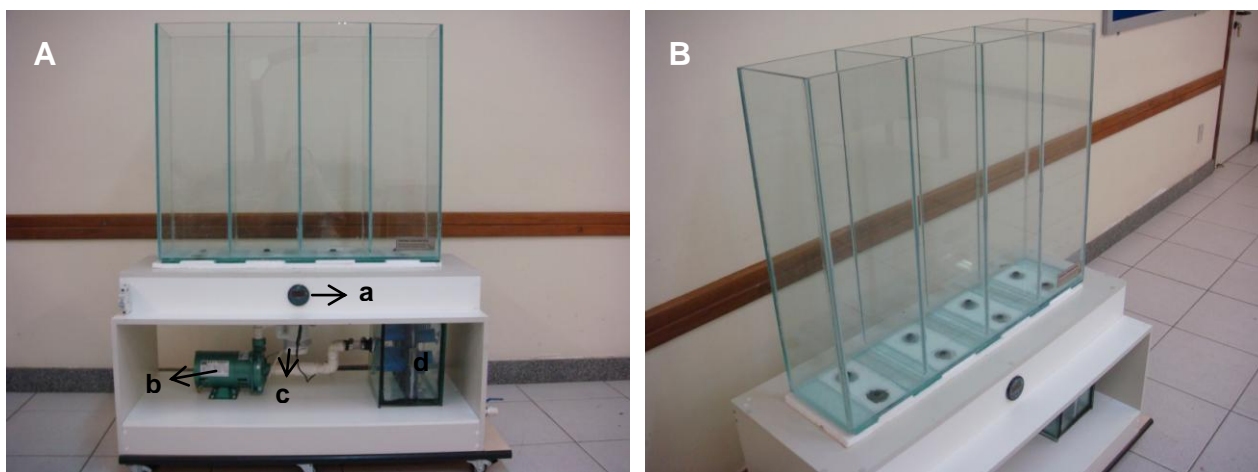


Figura 7: Sistema de natação proposto.

A: Vista anterior - termostato (a), bomba (b), central de aquecimento (c), filtro (d). **B:** Vista lateral-superior com visão para o sistema de entrada (posteriores) e saída (anteriores) de água.

3.3 EQUIPAMENTOS:

Tabela 1: lista de equipamentos com descrição de modelo e marca

NOME	MODELO / MARCA
Balança eletrônica de precisão decimal	Marte [®]
Balança eletrônica de precisão milesimal	BG440 / Gehara ^{LTDA}
Agitador magnético	TE-0851 / Tecnal
pHmetro digital	PG1800 / Gehara ^{LTDA}
Fatiador de tecidos	Tissue Chopper / Mcllwain TM Brinkmann Instruments, England
Fatiador de tecidos	1000 plus / Vibratome TM
Homogeneizador de tecido	Z359971 / Sigma-Aldrich [®]
Centrífuga	5415R / Eppendorf
Agitador de tubos mecânico (VDRL <i>Shaker</i>)	TS-2000A / Tradelab
Banho maria	TE-054 MAG / Tecnal
Banho maria com agitação	BT-25 / Yamato Scientific CO, Japão
Espectrofluorímetro	RF-551 / Shimadzu. Kyoto, Japão
Espectrofluorímetro	Cary Eclipse / Varian Inc.
Leitor de elisa	Anthos 2010 / Biochrom
Pentes Gel 1.5mm	BIO-RAD [®]
Cuba Vertical para eletroforese	Mini Protein [®] Tetra Cell / BIO-RAD [®]
Cuba de transferência (úmida)	Mini Protein [®] II Cell / BIO-RAD [®]
Membrana de polivinilideno (PVDF)	Millipore TM
Fonte de energia	Power Pac 300 / BIO-RAD [®]
K7 para revelação	American Biosciences Inc.
Filme para revelação	GE Healthcare/ Amersham Hyperfilm TM ECL
Câmara de perfusão de tecido	Fine Science Tools Inc, Canadá

Unidade de controle de temperatura	TR-100 / Fine Science Tools Inc, Canadá
Microscópio de fluorescência	Axio Imager.M2 / Carl Zeiss
Lâminas (26x76mm)	Bioslide
Lamínulas	Bioslide
Caixa de acrílico (60cmX60cmX60cm)	Acrildam®

3.4 REAGENTES

Tabela 2: Lista de reagentes utilizados nos experimentos com descrição de fabricante e nº de catálogo

DESCRIÇÃO	FABRICANTE / Nº.Cat.
EnzChek® Caspase-3 assay Kit #1/ *Z-DEVD-AMC Substrate*	Molecular Probes Inc. / E-13183
Caspase-8 – Fluorimetric Protease Assay	Molecular Probes Inc. / KHZ0052
Caspase-9 – Colorimetric Protease Assay	Molecular Probes Inc. / KHZ0102
Live/Dead – Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*	Molecular Probes Inc. / L-3224
Anti-AIF (Ab-2) Rabbit pAb	Calbiochem® / PC536
Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated	Chemicon International Inc / AP132P
Anti-β-Actin - Mouse	Sigma-Aldrich® / A1978
Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugated	Sigma-Aldrich® / A4416
Albumina Bovina (BSA)	Sigma-Aldrich® / A9418
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich® / B6916
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific / 21059
Prestained Protein Marker (7-175 kDa)	Biolabs UK Ltd./ P7708
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich® / P7170
Revelador	Kodak
Fixador	Kodak
ECL Western Blotting Detection	Millipore™ / WBAVDCH01

L-Glutamic acid	Sigma-Aldrich® / 49449
L-Glutamic Dehydrogenase	Sigma-Aldrich® / G2626
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatte (NADP)	Sigma-Aldrich® / N0505
Ácido <i>bis</i> -(aminoetil)glicoléter- <i>N,N,N',N'</i> -tetracético (EGTA)	Sigma-Aldrich® / E3889
Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA)	Sigma-Aldrich® / 431788
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	Sigma-Aldrich® / 252859
Acrilamida	Sigma-Aldrich® / A8887
Bis-acrilamida	Sigma-Aldrich® / 146072
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Sigma-Aldrich® / L3771
Persulfato de amônia (APS)	Sigma-Aldrich® / A3678
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich® / T9281
Glicina	Sigma-Aldrich® / G8898
B-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich® / M7154
Bromofenol blue	Sigma-Aldrich® / B5525
Glicerol	Sigma-Aldrich® / G5516
Leite em pó	Molico 0% gordura Nestle®
Tween 20	Sigma-Aldrich® / P9416
Metanol	Synth / A1085
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich® / P8340
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma-Aldrich® / 54457
Azida de Sódio (NaN ₃)	Sigma-Aldrich® / S8032
NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , NaHCO ₃ , KH ₂ PO ₄ , Glicose, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄	Merck & Co., Inc
Paraformaldeído 95%	Sigma-Aldrich® / 158127

3.5 SOLUÇÕES

Tabela 3: Lista das soluções utilizadas nos experimentos

NOME	COMPONENTES (mM)
ACSF (Fluido Cérebro-espinhal artificial) sem glicose	H ₂ O Cloreto de Sódio (NaCl) (127) Cloreto de Potássio (KCl) (2,0) Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (2,0) Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (2,0) Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) (26,0) Fosfato ácido de potássio (KH ₂ PO ₄) (1,2) HEPES (13,0) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
ACSF (Fluido Cérebro-espinhal artificial) com Glicose	Glicose (10) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
Tampão de Lise	H ₂ O Cloreto de Sódio (NaCl) (125) TRIS-HCl (20) pH=7,6 EGTA (10) EDTA (5) Cocktail de inibidor de protease 40µL/mL
KREBS-RINGER-HEPES (KRH)	H ₂ O Cloreto de Sódio (NaCl) (124) Cloreto de potássio (4) Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (1,2) HEPES (25) Glicose (10) pH=7,4 ajustado com NaOH 5M
Paraformaldeído 4% Buffer 0,1M	H ₂ O NaOH (100) Tampão fosfato (200) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
Tampão fosfato (PB - 0,2M)	H ₂ O Na ₂ HPO ₄ (400) NaH ₂ PO ₄ (200) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
Solução NADP ⁺	H ₂ O NADP ⁺ (400)
Glutamato Desidrogenase (GDH) L-Glutamic Dehydrogenase	50 UI
Solução Padrão de Glutamato Padrão	H ₂ O

	L-Glutamic acid (1)
Gel eletroforese	Acrilamida Mix 30% Acrilamida 29% (p/v) Bis-acrilamida 1% (p/v) H ₂ Od TRIS 1,5M pH= 8,8 SDS 10% (p/v) APS 10% (p/v) TEMED
Tampão de Amostra 5x	Solução TRIS-HCl 1M pH= 6,8 SDS (4) Glicerol 15,38% (v/v) B-mercaptoetanol 2,56% (v/v) Bromofenol Blue (0,007) H ₂ Od
Tampão de Corrida 10x	Solução TRIS-HCl 0,25M pH= 8,3 Glicina (1910) SDS 1% (p/v) H ₂ Od
Tampão de Transferência 10x	TRIS (120) Glicina (950) Metanol 20% (acrescentado apenas na solução final 1x) (v/v) H ₂ Od
Solução TBS 10x	Tris-Base (190) NaCl (490) H ₂ Od pH=7,5 ajustado com HCl 1N
Solução TBS-T	TBS 1x Tween 20 10% (v/v)
Solução de Bloqueio	Leite em pó 3% (p/v) TBST 1x
Solução anticorpo primário	Anticorpo Leite em pó 3% (p/v) TBST 1x
Solução anticorpo secundário	Anticorpo Leite em pó 3% (p/v) TBST 1x

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

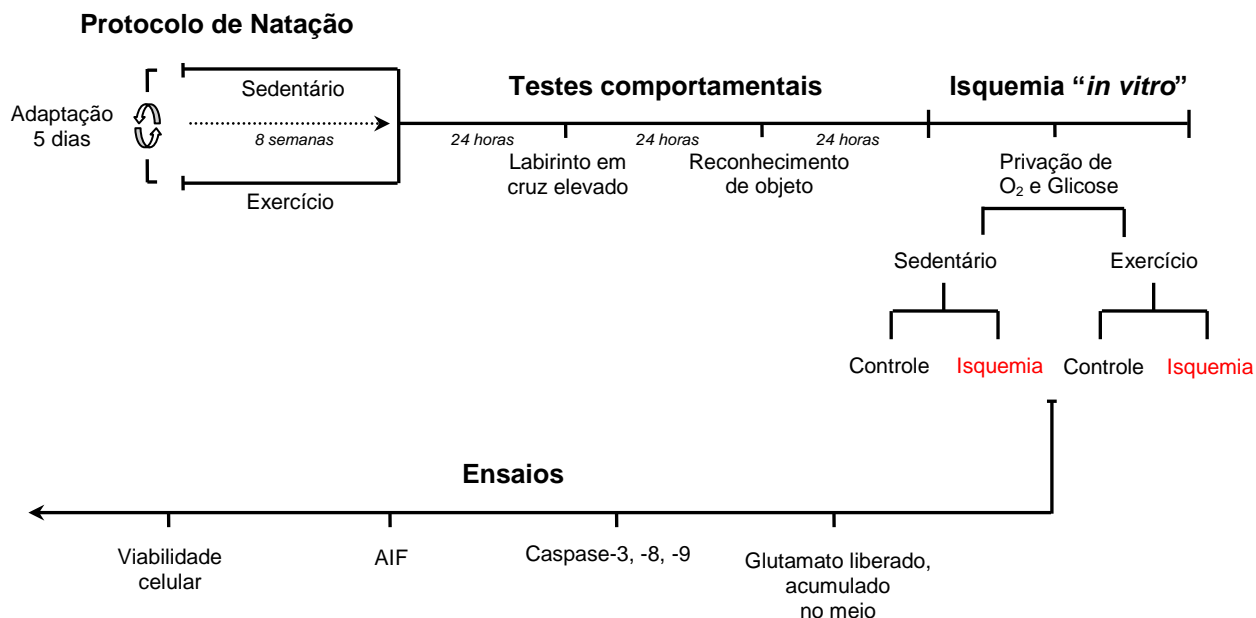


Figura 8: Delineamento experimental

3.7 PROTOCOLO DE NATAÇÃO

3.7.1 ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO

Inicialmente todos os animais foram pesados e adaptados ao meio líquido. A adaptação constou de períodos crescentes de natação durante 5 dias, iniciando com 5 minutos no primeiro dia e terminando com 25 minutos no último dia. Este processo foi realizado na mesma piscina onde os animais foram treinados, mas sem sobrecarga, com a temperatura da água de aproximadamente 32°.

3.7.2 TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO

Terminado o período de adaptação, todos os animais foram novamente pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos, grupo exercício e grupo sedentário.

Com o objetivo de identificar indiretamente a capacidade física individual de cada animal, realizou-se um teste de esforço, que consistiu em um período

de natação com incrementos de 1% da massa corporal a cada 3 minutos, atado junto à cauda do animal, até o momento da exaustão (Adaptado de: Osorio, Silveira *et al.*, 2003; Almeida, Gomes-Filho *et al.*, 2009)

A exaustão era identificada quando o animal permanecia abaixo da superfície por mais de 10 segundos (Baker e Horvath, 1964).

3.7.3 PROTOCOLO DE NATAÇÃO

De acordo com as novas recomendações do *American College of Sports Medicine* e *American Heart Association* (ACSM e AHA) para atividade física e saúde pública de adultos, sugere-se que para manutenção e promoção da saúde, indivíduos saudáveis, sedentários, de 18 a 25 anos, pratiquem atividades aeróbias regularmente. Preconiza-se a realização de atividades de intensidade moderada (60% da captação máxima de oxigênio (VO_2max)), por no mínimo 30 minutos por dia, 5 vezes por semana ou atividades intensas (> 60% da captação máxima de oxigênio (VO_2max)), pelo menos 20 minutos por dia, 3 vezes por semana. Esta é a mínima quantidade recomendada para a aquisição de benefícios a saúde, além dos esforços leves do dia-a-dia. (Haskell, Lee *et al.*, 2007).

Assim, seguindo a recomendação para humanos adultos, um dia após o teste de esforço máximo e identificação da carga máxima tolerada, os animais do grupo exercício foram submetidos a um protocolo de natação, 5 vezes por semana, durante 30 minutos por dia, com intensidade moderada (Haskell, Lee *et al.*, 2007). A intensidade moderada foi imposta pelo cálculo de 60% da carga máxima suportada durante o teste de esforço máximo, atada da mesma maneira à cauda do animal, durante as sessões de exercício (Osorio, Silveira *et al.*, 2003; Almeida, Gomes-Filho *et al.*, 2009). Os ratos foram exercitados no decorrer de 8 semanas, a partir de 19 horas, respeitando o ciclo claro/escuro.

Ambos os grupos, exercício e sedentário, foram pesados semanalmente, sempre no primeiro dia do reinício da nova semana de exercícios, para acompanhamento do peso corporal e correção das cargas de trabalho impostas.

O grupo sedentário no decorrer do período de exercício foi colocado dentro da piscina sobre uma plataforma de acrílico, com água, permitindo que

este grupo presenciasse o mesmo ambiente do grupo exercício, mas sem realizar esforço algum.

Ao final da quarta e da oitava semana, um novo teste de esforço máximo foi realizado com ambos os grupos, proporcionando uma correção à sobrecarga imposta ao grupo exercício e uma comparação entre os grupos quanto à adaptação subsequente ao exercício físico. Após 24 horas do último dia de exercício, os animais foram submetidos aos subsequentes testes e ensaios experimentais.

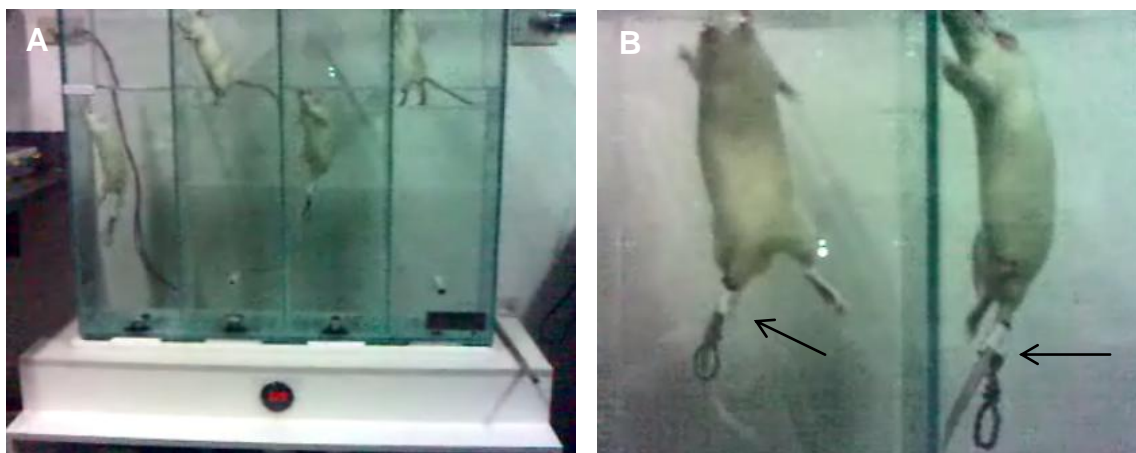


Figura 9: Protocolo de natação.

A: distribuição dos animais na piscina; **B:** imposição das cargas junto à cauda do animal.

Os níveis gerais de emocionalidade em roedores correlacionam-se com o número de respostas autonômicas apresentadas. Uma forma de mensuração bastante comum destas respostas tem sido a observação da defecação durante o tempo do experimento (Hall, 1934; Lebo, 1953; Lieblich e Guttman, 1968). Desta forma, foi contabilizado o número de bolos fecais depositados por cada grupo, exercício e sedentário, durante as 8 semanas no decorrer do período de 30 minutos de natação.

3.7.4 CONFECÇÃO DAS CARGAS

As cargas de treinamento foram confeccionadas utilizando estanho (fios de solda), de acordo com a figura 10, como explicitado acima, baseado na massa corporal do animal. Foram construídas peças equivalentes a 1% da massa corporal para o teste de esforço máximo e peças equivalentes a 60% da massa corporal para o protocolo de natação.

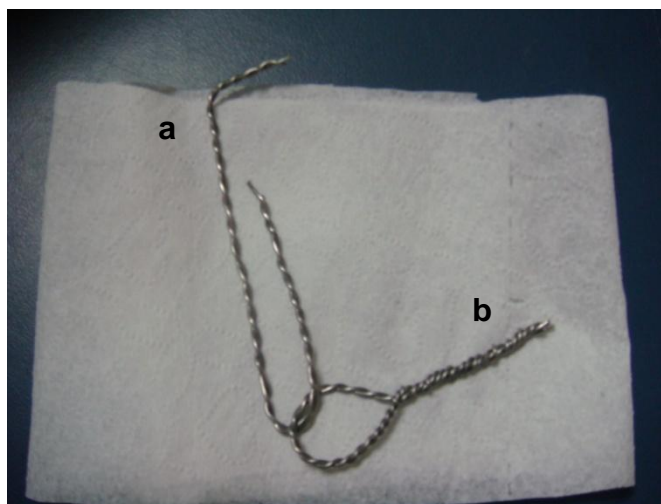


Figura 10: Peças de estanho confeccionadas para a realização do teste de esforço máximo e o protocolo de natação.

a: peça em formato de gancho atada junto à cauda do animal. **b:** peça acrescentada junto à “a” para imposição da carga.

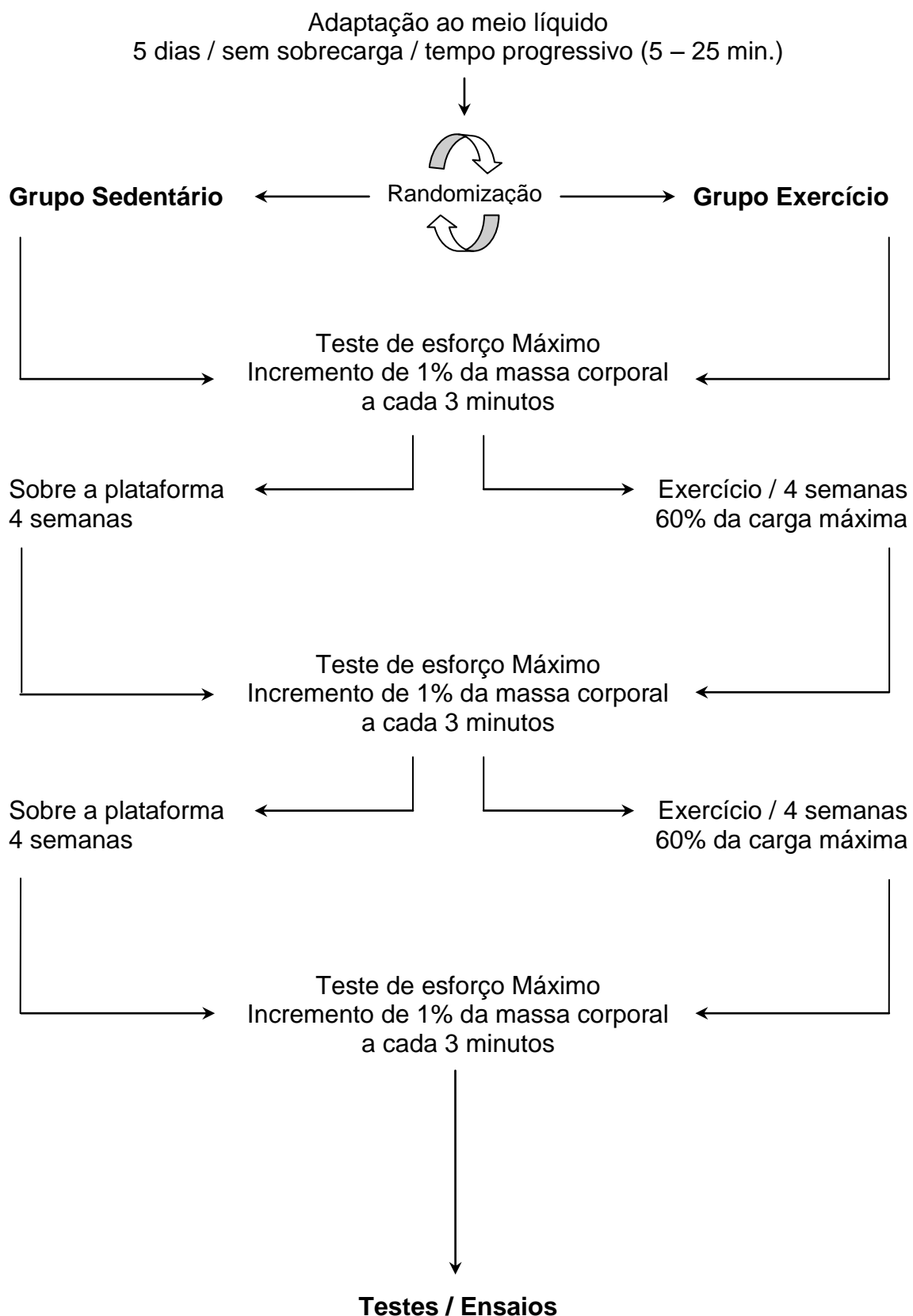


Figura 11: Protocolo de exercício físico

3.8 TAREFAS COMPORTAMENTAIS

Dentre os diversos testes comportamentais empregados pela literatura, tanto para avaliação da ansiedade e estresse, quanto para a avaliação do aprendizado/memória, optou-se respectivamente pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*plus maze*) e pela Tarefa de Reconhecimento de Objetos, especificamente reconhecimento pela localização do objeto (*object location task*).

3.8.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (*PLUS MAZE*)

O labirinto em cruz elevado foi descrito por Pellow, Chopin *et al.*, (1985), como um método simples para avaliação da resposta de ansiedade de roedores. A tarefa, primeiramente descrita por Montgomery (1958), utilizava-se de um aparato em forma de “Y”. Este aparato consistia de uma plataforma elevada aberta e uma plataforma elevada fechada, produzindo um forte conflito de aproximação na região aberta.

A tarefa descrita por Montgomery (1958), foi modificada mais tarde por Handley e Mithani (1984), em um labirinto elevado, com quatro braços dispostos, dois abertos e dois fechados, criando uma forma adicional ao que foi inicialmente proposto. Estes autores descreveram a avaliação do comportamento de ansiedade de roedores utilizando a relação de tempo gasto nos braços abertos pelo tempo gasto nos braços fechados. Esta nova tarefa, ao contrário de outros testes comportamentais utilizados, não depende da apresentação de estímulos aversivos de resposta condicionada, como: choque elétrico, alimentos, ruídos altos e privação de água (Walf e Frye, 2007).

O labirinto em cruz elevado baseia-se na preferência natural dos roedores a ambientes escuros e espaços fechados, juntamente a um medo incondicional a espaços abertos e a altura (Barnett, 1975).

Respostas comportamentais no labirinto em cruz elevado são facilmente avaliadas e quantificadas por um observador. O roedor é colocado na intersecção dos braços e seu comportamento é avaliado por 5 minutos, tempo em que as respostas comportamentais apresentam-se mais significativas (Montgomery, 1958).

Especificamente, baseado nas preferências naturais do roedor, quantifica-se o tempo total de permanência e/ou número de entradas realizadas em cada um dos braços. Estes parâmetros refletem o conflito entre a preferência para as áreas protegidas (braços fechados) e sua motivação inata para explorar ambientes novos. Aumentos no tempo de exploração e/ou número de entradas nos braços abertos indicam um estado de redução do comportamento de ansiedade. Simultaneamente, apesar de não ser uma evidencia direta, o número de entradas nos braços pode ser utilizado como uma medida da atividade motora espontânea do animal. Outros comportamentos que podem ser observados em roedores no labirinto são: o número de *rearings* (quando o animal se dispõe apenas nas patas traseiras), *grooming* (comportamento de limpeza), número de bolos fecais, *freezing* (congelamento), etc (Walf e Frye, 2007).

O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado a partir de 19 horas, respeitando o ciclo claro/escuro do animal, 24 horas após o protocolo de natalção. Os animais de ambos os grupos foram escolhidos aleatoriamente, posicionados no centro (na intersecção entre os braços) e durante 5 minutos um examinador “cego” quantificou: o tempo total gasto em cada um dos braços, como critério para avaliação do estado de ansiedade pós exercício, o número total de entradas nos braços, como critério de avaliação da capacidade motora exploratória e o número de bolos fecais depositados, como critério para avaliação da ansiedade, estresse frente à tarefa. A entrada no braço é classificada quando todas as quatro patas estão dentro do braço. O aparato foi limpo criteriosamente com álcool 70% entre um animal e outro.

3.8.2 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (*OBJECT LOCATION TASK*).

Roedores naturalmente tendem a se aproximar e explorar fisicamente novos objetos, principalmente através do olfato e do contato com as vibrissas, além de se posicionar sobre as patas posteriores e tentar manipulá-lo com as patas anteriores, apresentando uma preferência inata ao objeto novo comparado a outro objeto familiar (Aggleton, 1985). Este comportamento pode ser facilmente quantificado e utilizado para o estudo da memória de reconhecimento, assim como a memória espacial, temporal, e episódica (Dere, Huston *et al.*, 2007). O paradigma de “preferência pelo novo”, em comparação a outros paradigmas de aprendizado e memória, exclui o uso do eletrochoque, não necessitando de longos períodos de treinamento e não induzindo níveis elevados de alerta e estresse (Ennaceur e Delacour, 1988).

O protocolo de reconhecimento quanto à localização foi realizado 24 horas após o teste do labirinto em cruz elevado. Uma caixa de acrílico preta com medidas 60cm X 60cm X 60cm foi utilizada para a avaliação. Os animais foram habituados ao novo ambiente por 5 minutos e no dia seguinte, objetos de forma e textura similares foram posicionados a 15 cm das extremidades da caixa, de forma a permitir a passagem pelos cantos e a exploração dos animais em todas as suas extremidades. Os animais de ambos os grupos (sedentário e exercício) foram inicialmente posicionados sempre no mesmo quadrante e o tempo de exploração total de cada objeto foi avaliado por um examinador “cego” por 5 minutos através de um cronômetro. Cada animal foi submetido a duas baterias de reconhecimento, denominadas “treino - aquisição” e “teste - memória de curto prazo”. Os testes foram realizados após 1 hora do período de treino (Figura 5) e ao final, os resultados das sessões de treino e de teste foram expressos como Índice de Reconhecimento (IR) calculado através da fórmula:

$$IR = \frac{\text{Tempo de exploração do objeto na localização espacial nova (s)}}{\text{Tempo total de exploração dos dois objetos (s)}}$$

O IR pode alcançar valores no intervalo de 0 até 1.0. Um IR igual a 0.5 indica que o tempo de exploração aos dois objetos foi o mesmo e um IR significativamente maior que 0.5 indica que houve uma maior exploração do objeto na localização espacial nova, ou seja, exploraram este objeto mais do que 50% do tempo total de exploração (Capettini, 2009).

O comportamento de exploração foi definido quando o animal aproximou o focinho a uma distância de aproximadamente 2 cm do objeto. Qualquer outro comportamento não foi considerado exploratório. O aparato foi limpo criteriosamente com álcool 70% entre uma sessão e outra.

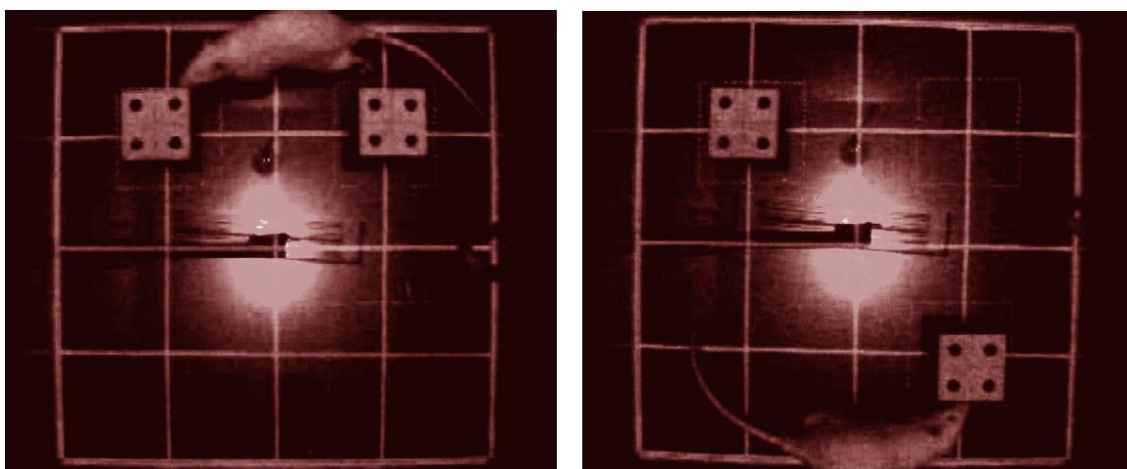


Figura 12: Aparato para tarefa de reconhecimento pela localização do objeto.

Caixa de acrílico preto de medidas 60cm X 60cm X 60cm. Os animais de ambos os grupos (sedentário e exercício) foram posicionados sempre no primeiro quadrante à esquerda e observados, por 5 minutos em cada bateria. A: treino-aquisição. B: Teste-memória de curto prazo (1 hora).

3.9 SACRÍFICIO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Os animais de ambos os grupos (exercício e sedentário) foram aleatoriamente sacrificados por decapitação, o cérebro removido rapidamente, separado do tronco cerebral e do cerebelo e mergulhado em solução gelada (4°C) de ACSF com glicose, oxigenada previamente (mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5 % CO₂). A seguir os hemisférios corticais e os hipocampos foram dissecados sobre um papel filtro, posicionados sequencialmente sobre uma placa de Petri invertida no gelo.

Os hemisférios corticais e os hipocampos dissecados foram fatiados (*Tissue Chopper/McIlwain*TM) a 400µm de espessura, em cortes frontais. As tres primeiras fatias de cada extremidade do tecido foram descartadas.

Para simples mensuração das influencias adaptativas e mudanças fisiológicas consequentes do estresse imposto pelo exercício, órgãos e tecidos, como: hipófise, adrenal (Lambert, Buckelew *et al.*, 1998; Droste, Chandramohan *et al.*, 2007), fígado (Sene-Fiorese, Duarte *et al.*, 2008) e músculo gastrocnêmico (Rodnick, Reaven *et al.*, 1989), foram dissecados e pesados. O peso de ambos os órgãos foram normalizados por 100 g do peso corporal total do dia do sacrifício.

3.10 PROCEDIMENTO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE NAS FATIAS DE TECIDO CEREBRAL (INSULTO ISQUEMICO *IN VITRO*)

As fatias de córtex e hipocampo dos grupos sedentário e exercício foram então separadas em dois subgrupos, controle e isquemia, onde cada animal foi controle dele mesmo. As fatias foram incubadas em frascos contendo ACSF com glicose aerado com carbogênio, em um volume de 2 ml para as fatias de córtex e 1 ml para as fatias de hipocampo. Os frascos foram então colocados em um banho com agitação e temperatura controlada ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) por um período de 1h e 30 minutos, para recuperação do trauma mecânico causado pela dissecação. Após este período, o sobrenadante foi retirado, descartado e as fatias do grupo isquemia foram incubadas em solução isquêmica durante 20 minutos (sem glicose, aerada previamente com uma mistura gasosa contendo

95% N₂ e 5% CO₂). O grupo controle foi incubado com solução de ACSF com glicose e aerado com carbogênio pelo mesmo período.

Após o período de isquemia, o sobrenadante foi retirado e guardado (-80°C) para ensaio posterior da quantificação do glutamato liberado no meio (Nicholls, David *et al.*, 1987). Seguiu-se assim para o período de reperfusão, com 4 horas de duração, onde as fatias de ambos os grupos, controle e isquemia, foram novamente incubadas em solução de ACSF com glicose e aerada com carbogênio (Monette, Small *et al.*, 1998).

Após o período de reperfusão, as fatias de hipocampo e córtex foram homogeneizadas respectivamente em 300µl e 600µl de solução tampão de lise, somado a um coquetel inibidor de proteases. O tecido lisado foi centrifugado a 2000g, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado (-80°C), para quantificação da expressão de Caspase-3, -8, -9 e AIF.

A normalização dos dados foi realizada através da dosagem de proteínas totais, de acordo com o método de Bradford (1976). Em cada dosagem protéica foi utilizada uma curva padrão de calibração (1 a 10 µg) com albumina de soro bovino (BSA).

3.11 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DO GLUTAMATO LIBERADO

A mensuração do glutamato liberado no sobrenadante das fatias (200µl) foi determinada através de uma reação enzimática de aumento de fluorescência. Este aumento de fluorescência ocorre devido à produção de NADPH, na presença de glutamato desidrogenase (GDH) e NADP⁺. O ensaio consiste na adição de NADP⁺ (1.0mM), GDH (50 UI) e amostra em uma solução tampão (KRH) a 37°C. Esta solução ao ser excitada por luz em um comprimento de onda de 360nm emite uma fluorescência que pode ser detectada e quantificada em comprimento de onda de 450nm, em um espectrofluorímetro (Nicholls, David *et al.*, 1987). O experimento foi realizado em triplicata e o background de fluorescência foi determinado e subtraído dos valores encontrados, através da leitura do NADP⁺ e do GDH junto ao tampão. Para quantificação final utilizou-se um padrão interno de glutamato (1nmol/µl) como referencia, acrescentado a solução ao final da reação.

3.12 ENSAIOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASES

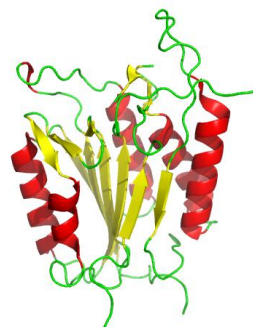
3.12.1 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASE-3

Para a quantificação da expressão de caspase-3, utilizou-se um Kit (*EnzChek[®] Caspase-3 Assay Kit #1* – MOLECULAR PROBES), cujo ensaio consiste da utilização do substrato Z-DEVD-AMC, composto por 7-amino-4-metilcumarim, AMC e um peptídeo sintético, Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), que corresponde a um dos sítios de clivagem da caspase-3. Na presença da protease, o substrato é clivado liberando o radical AMC, que pode ser quantificado fluorimetricamente em comprimentos de onda de 340-350nm de excitação e 440-460nm de emissão.

Conforme a descrição do fabricante, alíquotas de 50µL do sobrenadante foram adicionadas a 50 µL da solução de reação, composta pelo substrato Z-DEVD-AMC (10mM) e pela solução tampão 2x (50mM PIPES pH=7,4, 10mM EDTA, 0,5% CHAPS, 1M DTT e dH₂O). A reação foi mantida protegida da luz, a temperatura ambiente e após 30 minutos foi levada ao espectrofluorímetro (modelo: *Cary Eclipse / Varian Inc.*) para a realização da leitura em uma placa de 96 poços (excitação/emissão ~342/441 nm). O experimento foi realizado em duplicata e o background de fluorescência determinado e subtraído dos valores encontrados através da leitura de 50 µL de tampão de lise somado a 50 µL de solução tampão 2x com o substrato.

Para a quantificação do AMC liberado, uma curva padrão foi preparada através de uma diluição seriada, de concentrações entre 0 a 100µM de AMC, em solução tampão 1x (50mM PIPES pH=7,4, 10mM EDTA, 0,5% CHAPS, 1M DTT e dH₂O). A normalização final foi realizada através da dosagem de proteínas totais das amostras (Bradford, 1976).

Figura 13: Estrutura da proteína caspase-3
(<http://www.rcsb.org>)



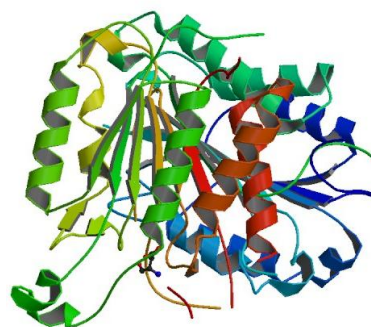
3.12.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASE-8

Para a quantificação da expressão de caspase-8 utilizou-se um Kit (*Caspase-8 Fluorimetric Protease Assay* – MOLECULAR PROBES), cujo ensaio consiste da utilização do substrato IETD-AFC, composto por 7-amino-4-trifluorometil cumarim, AFC e um tetrapeptídeo sintético, Ile-Glu-Thr-Asp (IETD), que corresponde a um dos sítios de clivagem da caspase-8. Na presença da protease o substrato é clivado, liberando o radical AFC, que pode ser quantificado fluorimetricamente em comprimentos de onda de 400nm de excitação e 505nm de emissão.

Conforme a descrição do fabricante, alíquotas contendo volumes com concentrações de 100µg de proteína, determinados pelo método de Bradford, (1976), foram adicionadas a 50 µL de solução tampão 2x (tampão salina, glicerol e detergente; 10mM DTT adicionado na hora). Ao final, acrescentou-se 5µL do substrato IETD-AFC (1mM) e a reação foi mantida protegida da luz, a 37°C. Após 2 horas foi levada ao espectrofluorímetro (modelo: *Cary Eclipse / Varian Inc.*) para a realização da leitura em uma placa de 96 poços (excitação/emissão ~400/505 nm). O experimento foi realizado em duplicata e o background de fluorescência determinado e subtraído dos valores encontrados, através da leitura de 50 µL de tampão de lise, somado 50 µL de solução tampão 2x e 5µL substrato.

Os valores brutos de fluorescência relativa foram utilizados para comparação entre os grupos experimentais.

Figura 14: Estrutura da proteína caspase-8
(<http://www.rcsb.org>)



3.12.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASE-9

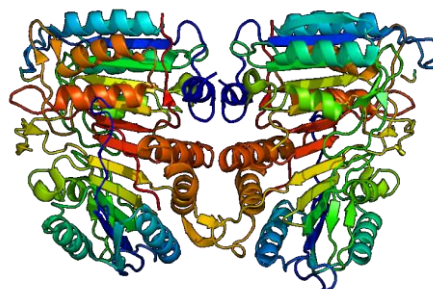
Para a quantificação da expressão de caspase-9 utilizou-se um Kit (*Caspase-9 Colorimetric Protease Assay – MOLECULAR PROBES*), cujo ensaio consiste da utilização do substrato LEHD-*p*NA, composto por um cromóforo, *p*-nitroanilide (*p*-NA) e um tetrapeptídeo sintético, Leu-Glu-His-Asp (IETD), que corresponde a um dos sítios de clivagem da caspase-9. Na presença da protease o substrato é clivado liberando o radical *p*-NA. A absorção de luz pelo *p*-NA pode ser quantificada por espectrofotometria em comprimentos de onda de 400-405nm.

Conforme a descrição do fabricante, alíquotas contendo volumes com concentrações de 100µg de proteína, determinados pelo método de Bradford (1976), foram adicionadas a 50 µL de solução tampão 2x (tampão salina, glicerol e detergente; 10 mM DTT adicionado na hora). Ao final acrescentou-se 5µL do substrato LEHD-*p*NA (4mM). A reação foi mantida protegida da luz, a 37°C e após 2 horas foi levada a um leitor de elisa (modelo: *Anthos 2010*) para a realização da leitura (Abs.: 400 nm). O experimento foi realizado em triplicata e o background foi determinado e subtraído dos valores encontrados, através da leitura de 50 µL de tampão de lise, somados de 50 µL de solução tampão 2x e 5µL substrato.

Os valores brutos de absorbância relativa foram utilizados para comparação entre os grupos experimentais.

Figura 15: Estrutura da proteína caspase-9

(<http://www.rcsb.org>)



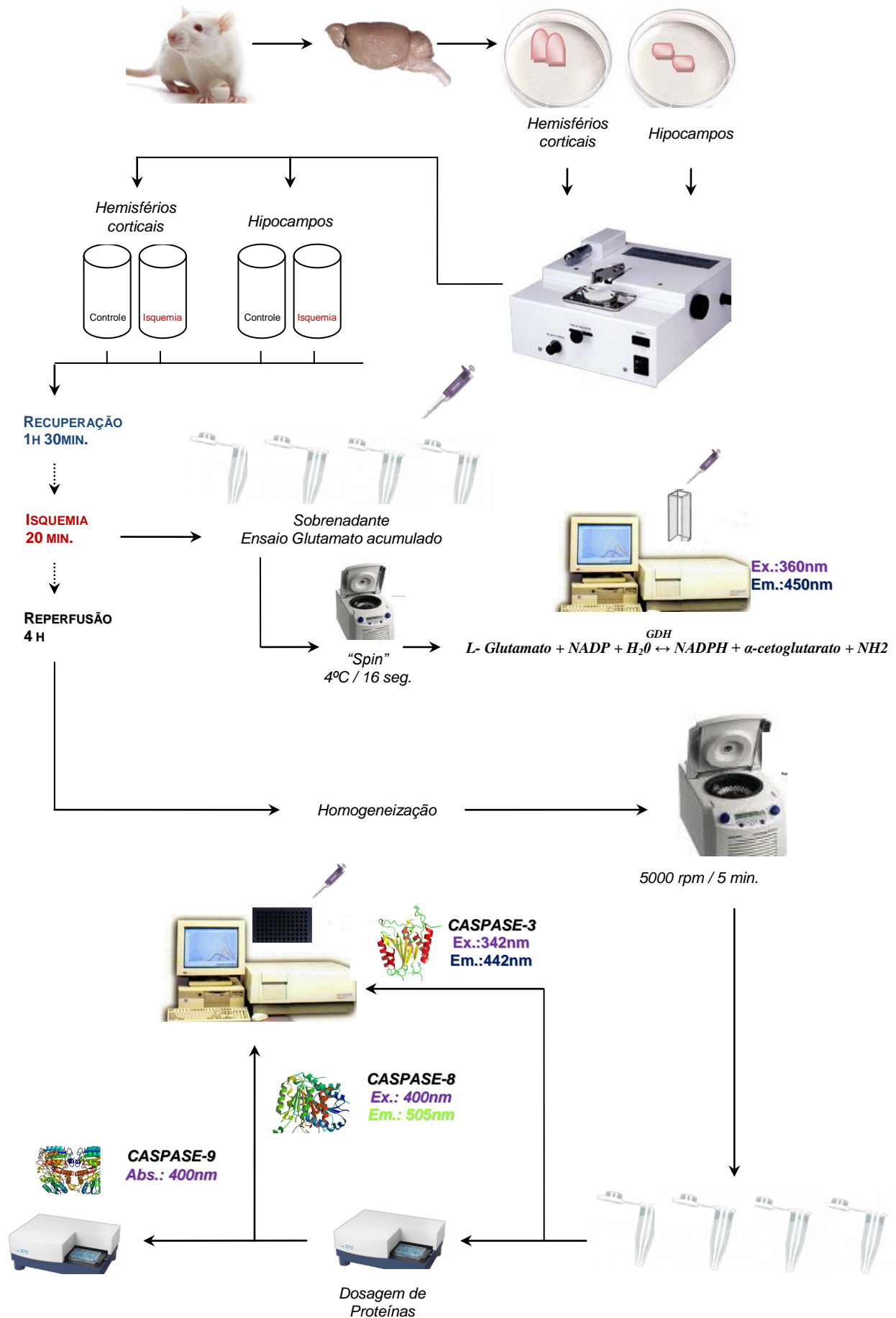


Figura 16: Delineamento experimental para o procedimento de isquemia *in vitro*. Quantificação do glutamato liberado após período de isquemia e expressão de Caspase-3, -8, -9 após período de isquemia/reperfusão.

3.12.4. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF)

Volumes de amostra contendo 50µg de proteínas, determinadas pelo método de Bradford (1976), e um marcador padrão de pesos moleculares de proteína, foram descongeladas e inicialmente aquecidas por 5 minutos, a 95°C. Ao final do período de aquecimento, as amostras e o marcador foram rapidamente transferidos para um recipiente com gelo por 10 minutos.

As amostras foram misturadas a um tampão de amostra 5x (volume de 25% do volume da amostra), centrifugadas (*spin* de 16 seg., 4°C) e aplicadas em um gel de poliacrilamida 4-12%. O marcador padrão de pesos moleculares de proteína foi aplicado (8µl) na primeira canaleta à esquerda do gel.

O processo de eletroforese ocorreu a uma voltagem de 100v fixa, mantida até o término da corrida por todo o comprimento do gel. Ao final do processo, o gel foi lavado em tampão de transferência e posicionado entre papéis de filtro e uma membrana de PVDF previamente preparada (mergulhada em metanol, durante 5 minutos sob agitação).

A transferência foi realizada a uma voltagem de 80v fixa, por um período de 3 horas. Ao final a membrana foi retirada, mergulhada em solução de *Ponceau* para confirmação da transferência por 5 minutos, seguindo período de lavagem por 5 minutos em solução de TBS 1x. Ao final da lavagem a membrana foi mergulhada em solução de bloqueio por 1 hora, sob agitação.

Ao final do período de bloqueio a membrana foi cortada e as regiões de interesse com os referidos pesos moleculares foram isolados. A partir desse ponto foram lavadas rapidamente em solução de TBS-T 1x.

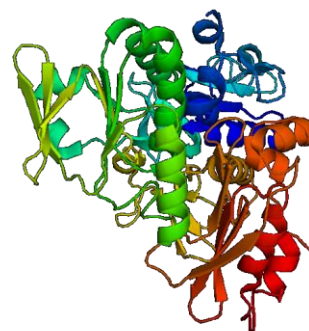
A primeira membrana foi então incubada "*overnight*" a 4°C, sob agitação, com anticorpo primário anti-AIF (57 kDa; rabbit), diluído em TBS-T 1x e leite (3%) (1:1000). Após incubação procedeu-se protocolo de lavagem, 3 vezes por 10 minutos cada lavagem. Após, seguiu-se a incubação por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-rabbit) diluído em TBS-T 1x e leite (3%) (1:20.000). Após incubação a membrana foi lavada em solução de TBS-T 1x, 2 vezes por 20 minutos cada lavagem e encaminhadas para revelação.

A segunda membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação, com anticorpo primário anti- β actina (42kDa; mouse), diluído em TBS-T e leite (3%) (1:500). Após incubação procedeu-se protocolo de lavagem, 3 vezes por 10 minutos cada lavagem em TBS-T 1x, seguido de incubação por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-mouse), diluído em TBS-T 1x e leite (3%) (1:7000). Após incubação, a membrana foi lavada em solução de TBS-T, 2 vezes por 20 minutos cada lavagem e encaminhada para revelação.

Em uma sala protegida da luz, cada membrana foi posicionada em um cassete entre duas folhas plásticas transparentes. A detecção foi realizada pelo processo de quimiluminescência, utilizando kit luminol:peroxidase (relação 1:1)(Millipore). Um pequeno pedaço de filme (KODAK) foi posicionado sobre a região da membrana de interesse, o cassete foi fechado e após um determinado tempo o filme foi retirado, mergulhado em uma solução reveladora até o aparecimento da marcação, seguindo para uma solução fixadora. Posteriormente o filme foi lavado com água destilada.

Os filmes revelados foram digitalizados (300 dpi) e as imagens salvas no formato *.tif. As imagens foram processadas e quantificadas por densitometria óptica, através do software livre *ImageJ – Image Processing and Analysis in Java* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Figura 17: Estrutura da proteína AIF
(<http://www.rcsb.org>)



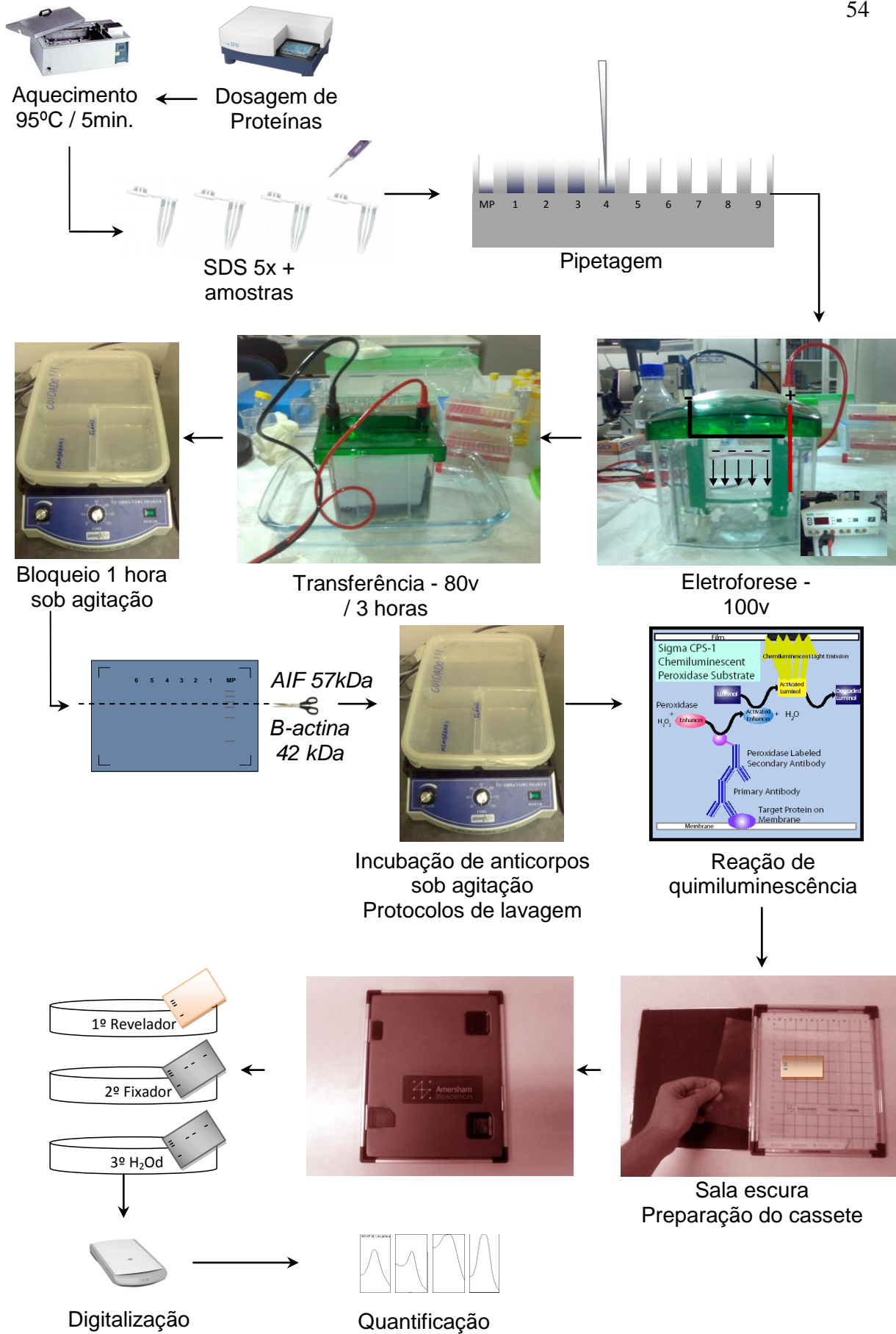


Figura 18: Delineamento para realização da técnica de *western blot* para quantificação da expressão de AIF

3.13 VIABILIDADE CELULAR

3.13.1 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Os animais de ambos os grupos, exercício e sedentário, foram aleatoriamente sacrificados por decapitação, o cérebro removido rapidamente, separado do tronco cerebral e do cerebelo e mergulhado em solução gelada (4°C) de ACSF com glicose, oxigenada (mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5 % CO₂). Com a utilização de um fatiador de tecidos (modelo: *VibratomeTM*), o cérebro foi fatiado a 400µm de espessura, em cortes frontais, nas coordenadas -4,20mm a -5,20mm a partir do Bregma (Paxinos e Watson, 2009). Assim como no protocolo anterior o restante do corpo dos animais foi encaminhado para dissecação e pesagem dos órgão descritos.

3.13.2 PROCEDIMENTO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (INSULTO ISQUEMICO *IN VITRO*) NA CAMARA DE PERFUSÃO

A fim de garantir a integridade das fatias para posterior análise da viabilidade celular, o ensaio foi baseado no modelo de culturas organotípicas em uma câmara de perfusão para o procedimento de privação de oxigênio e glicose (Gähwiler *et al.*, 1981; Stoppini *et al.*, 1991; Monette *et al.*, 1998).

A câmara de perfusão permite o tratamento de até 8 animais, em 8 poços distintos. Nesta câmara, as fatias eram continuamente perfundidas com uma solução de escolha, posicionada acima do sistema, permitindo assim a perfusão com auxílio da gravidade. O processo era mantido por um sistema de vácuo, que retirava o excesso de solução, mantendo um volume de 2 a 3 ml constantes em cada poço. A temperatura podia ser facilmente mantida constante por um sistema automático de controle.

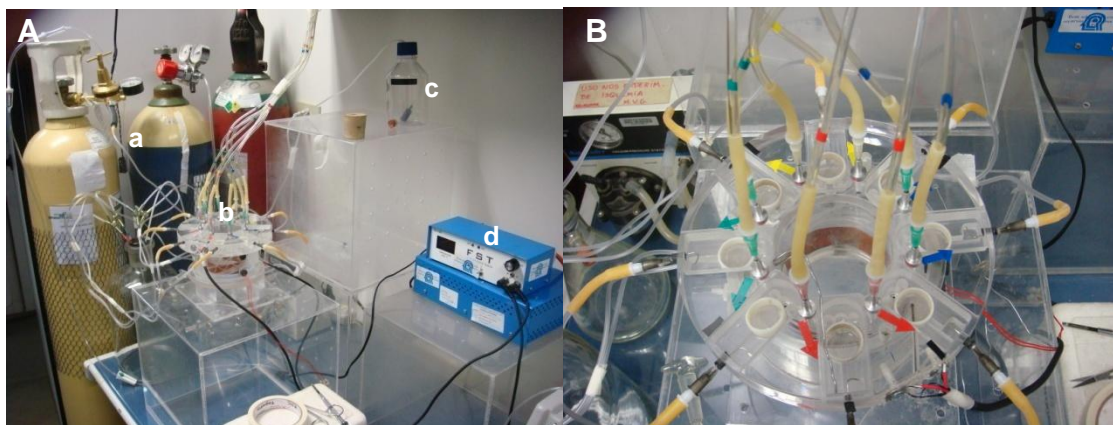


Figura 19: Sistema de perfusão de tecidos.

A: esquema geral apresentando as balas (a), câmara de perfusão e conexões (b), solução (c), sistema de controle de temperatura (d). **B:** Câmara de perfusão - conexões e respectivos poços para tratamento.

Para o procedimento de isquemia *in vitro*, mantiveram-se as mesmas características do protocolo de privação descrito anteriormente, onde as fatias de cérebro dos grupos, sedentário e exercício, foram separadas em dois subgrupos, controle e isquemia, onde o animal foi controle dele mesmo.

Após perfusão com solução de ACSF com glicose, oxigenada, por 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico da dissecação, iniciou-se o período de privação de oxigênio e glicose por 20min, onde as fatias foram perfundidas com solução isquêmica (sem glicose, aerada previamente com uma mistura 95% N₂ / 5% CO₂, para retirar todo o O₂ da solução). O grupo controle manteve-se perfundido com solução de ACSF com glicose, oxigenada. Após o período de isquemia iniciou-se período de reperfusão, durante 4 horas, onde as fatias de ambos os grupos, controle e isquemia, foram novamente perfundidas em solução de ACSF com glicose, oxigenada.

Após o procedimento as fatias foram cuidadosamente separadas e encaminhadas para marcação.

3.13.3 MARCAÇÃO DO TECIDO

Para quantificação da morte celular utilizou-se o marcador etídio homedímero (EthD-1) (2mM) (*Live/Dead – Viability/Cytotoxicity Kit – Molecular Probes Inc.*) que permite a constatação de alterações físicas e químicas em células com membranas danificadas.

Após o processo de isquemia e conseqüente perda da integridade e aumento da permeabilidade da membrana, ocorre uma diminuição e ou

cessação da atividade esterásica, permitindo assim a entrada do marcador, que reage e eleva sua fluorescência em até 40 vezes à medida que se associa com ácidos nucleicos (Monette, Small *et al.*, 1998).

Ao final do período de perfusão, cada fatia de ambos os grupos experimentais, foi incubada em pequenas placas de Petri, em solução contendo 6µl de EthD-1 (2mM), dissolvido em 2 ml de solução de ACSF com glicose, oxigenada previamente. Manteve-se a incubação protegida da luz por um período de 30 minutos, a temperatura ambiente. Após incubação a solução de marcação foi retirada e as fatias foram lavadas com 2ml de solução de ACSF com glicose, oxigenada previamente, 2 vezes, por 15 minutos cada lavagem (Monette, Small *et al.*, 1998).

Após lavagem as fatias foram fixadas em 2 ml de paraformaldeído 4% por 15 minutos, lavadas com 2ml de solução tampão fosfato (PB) por 5 minutos e 2 ml de ACSF com glicose, oxigenada previamente por 5 minutos. Assim, após fixação e lavagem, as fatias foram montadas em lâminas com glicerol, sobrepostas com lamínulas e encaminhadas ao microscópio de fluorescência (*Axio Imager.M2 - Zeiss*).

3.13.4 OBTENÇÃO DAS IMAGENS

As imagens no microscópio de fluorescência foram adquiridas através do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*, com aumentos de 20x. A região CA1 dos hipocampos, a partir do giro denteado, foi selecionada e o tempo de exposição da amostra para captura da imagem foi calculado automaticamente. O campo selecionado foi processado através de um filtro de ajuste dos pixels pela mediana, de forma que uma pequena proporção de pixels irrelevantes fosse descartada e a escala de cinza pudesse ser exibida adaptada a um histograma.

A captação da fluorescência resultante da marcação com EthD-1 foi realizada através de um filtro óptico correspondente a seu comprimento de onda (Filtro: *Rodamina*). As imagens adquiridas foram salvas em alta resolução (1024x768) e gravadas em arquivos no formato **.tif* para posterior quantificação.

3.13.5 QUANTIFICAÇÃO DAS IMAGENS

A análise quantitativa das imagens foi realizada no software livre *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). As imagens foram inicialmente convertidas para 8-bits e processadas igualmente para diminuição do background. Posteriormente, através dos respectivos histogramas, foi determinado um valor para o limiar basal de fluorescência. Através desse limiar, fixo para todas as imagens, a porcentagem de células mortas marcadas foi quantificada, equivalente a intensidade dos pixels por região selecionada. Quanto maior o número de células marcadas, maior a intensidade.

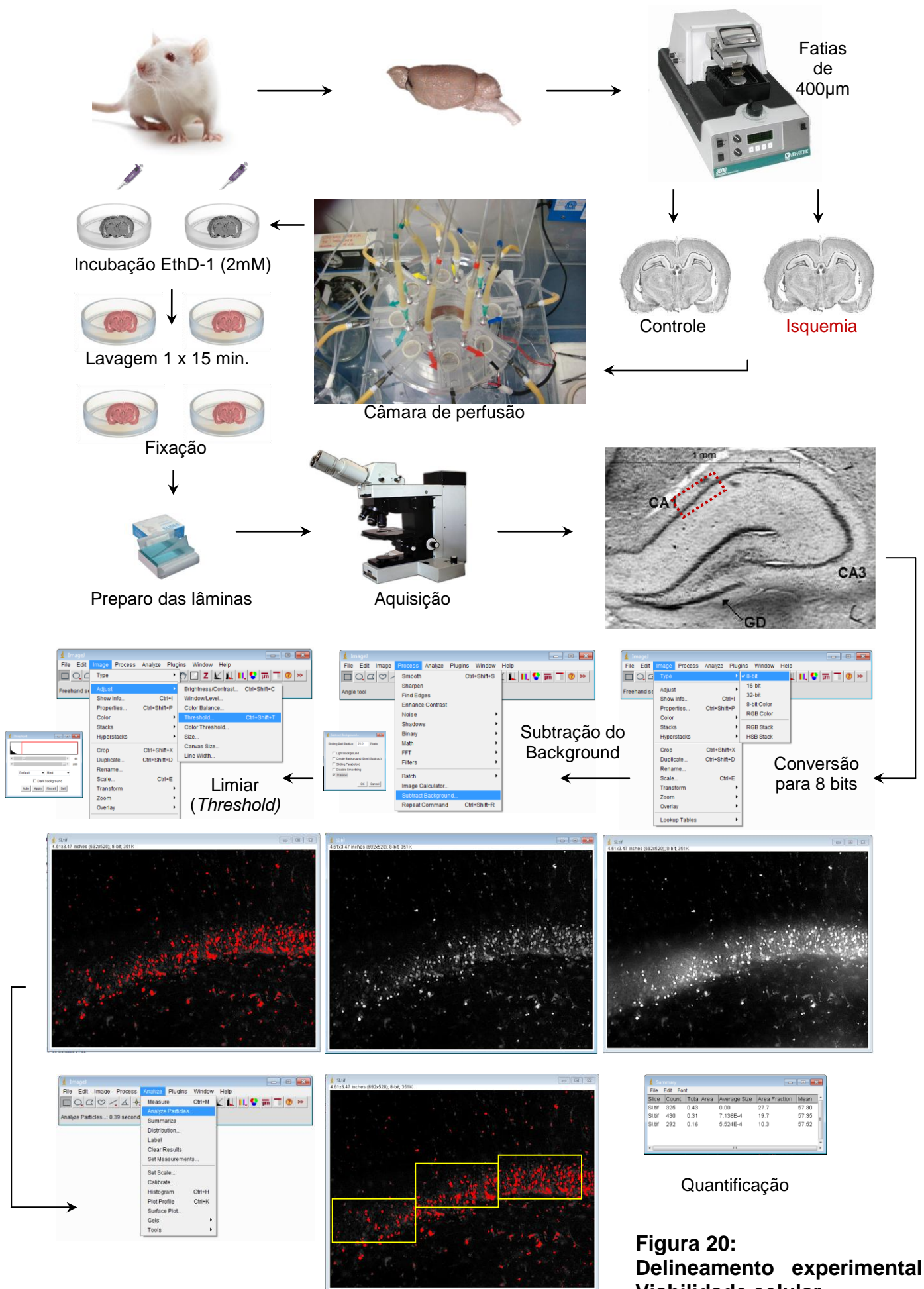


Figura 20:
Delineamento experimental para Viabilidade celular

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das amostras foi verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e/ou *Shapiro-Wilk*. Testes estatísticos específicos foram utilizados para análise dos resultados, de acordo tanto com o delineamento experimental apresentado, como de acordo com o coeficiente de variação e o número de tratamentos.

Adaptações e mudanças fisiológicas

- ✓ Massa corporal: *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Tukey
- ✓ Teste de esforço máximo: *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Student-Newman Keuls (SNK)
- ✓ Bolos fecais depositados: *Two-way* ANOVA, *post-hoc* SNK
- ✓ Massa Hipófise e adrenal: teste Mann-whitney
- ✓ Massa fígado, músculo : Teste-*t* não-pareado

Análise Cognitiva

- ✓ Teste do labirinto em cruz elevado: teste Mann-whitney ou Teste-*t* não-pareado
- ✓ Reconhecimento de objetos, modalidade espacial: *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Tukey
- ✓ Reconhecimento de objetos, modalidade espacial, tempo total de exploração: teste *t* não-pareado

Glutamato e Proteínas apoptóticas

- ✓ Glutamato liberado: *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Tukey ou SNK
- ✓ Caspases -3, -8, -9: *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Tukey ou SNK
- ✓ Apoptosis inducing factor (AIF): *Two-way* ANOVA, *post-hoc* SNK

Viabilidade celular

- ✓ Ensaio *Live/Dead* : *Two-way* ANOVA, *post-hoc* SNK

Os resultados foram expressos como mediana e intervalo interquartil para os dados de distribuição não normal e média \pm EPM para as variáveis de distribuição normal. Os resultados foram considerados significativos quando alcançaram nível $p < 0,05$.

(...)

“ Olhando-me dizia: - ‘Transformado
Em pedra seja por Medusa; o assalto
Do ímpio Teseu não foi assaz vingado’

- ‘Volta a face; de luz o rosto falto
Conserva; que, se a Górgona encarar-te,
Tu não mais tornarás da terra ao alto’.-“



Ilustração de Gustave Doré (séc XIX).

Canto IX – “Círculo da heresia (6) – Túmulos”
Canto X – “Espírito de Farinata - Espírito de Cavalcanti”
Divina Comédia - Dante Alighieri

4 RESULTADOS

4.1 ADAPTAÇÕES E MUDANÇAS FISIOLÓGICAS

4.1.1 MASSA CORPORAL

Um efeito significativo do protocolo de exercício e das mensurações ao longo do tempo foi observado sobre a massa corporal (*Protocolo de exercício*: $F[1,48]=6,48$, $p<0,05$; *Mensurações da massa*: $F[9,\infty]=936,26$; $p<0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[9, \infty]=6,09$, $p<0,05$). Comparando de forma subsequente as médias individuais, observa-se que, ambos os grupos ganharam massa significativamente até a quinta semana (sedentário= $336,80\pm 5,15g$; exercício= $297,50\pm 8,49g$) ($q_{(10,432)}=15,60$, $p<0,01$), apresentando variações a partir desta data. O grupo exercício apresentou ganhos significativos na sétima ($322,90\pm 8,29g$) e oitava semana ($338,70\pm 8,50g$) ($q_{(10,\infty)}=13,51$, $p<0,05$), e o grupo sedentário apresentou ganhos significativos, na sexta ($352,50\pm 6,34g$), oitava ($380,10\pm 6,32g$) e nona semana ($392,50\pm 7,55g$) ($q_{(10,\infty)}=13,51$, $p<0,05$). Observa-se uma diferença significativa entre a massa do grupo exercício, comparado a massa do grupo sedentário, a partir da quinta semana ($q_{(2,48)(10,\infty)} = 18,42$, $p<0,05$) e esta diferença mantém-se até a última semana, com o fim do protocolo de exercício.

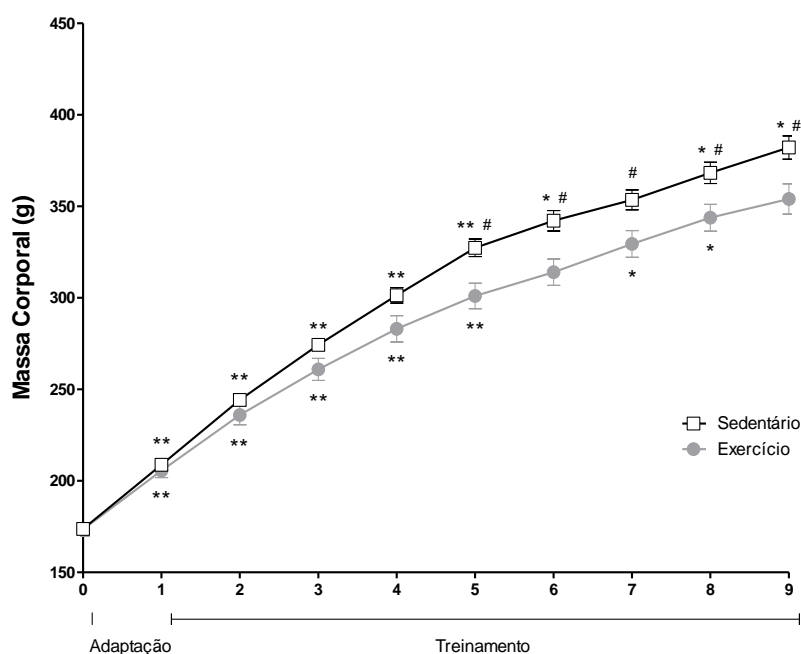


Figura 21: Massa corporal dos animais ao longo de 8 semanas de exercício físico.

Os animais de ambos os grupos, sedentário e exercício, tiveram sua massa avaliada no início de cada semana, no decorrer de 8 semanas de natação. Resultados expressos como média \pm EPM. Número de animais por grupo = 25. *Two-way ANOVA*, *post-hoc Tukey*. *Comparação intragrupos*: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *Comparação intergrupos*: # $p<0,05$.

4.1.2 TESTES DE ESFORÇO MÁXIMO

Um efeito significativo do protocolo de exercício e da realização dos testes ao longo do tempo foi observado sobre a carga suportada nos testes de esforço máximo (*Protocolo de exercício*: $F[1,48]=5,50$, $p<0,05$; *Testes de esforço máximo*: $F[2,96]=30,61$; $p<0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[2,96]=3,93$, $p<0,05$). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que o grupo exercício apresentou um aumento significativo quanto a carga máxima suportada tanto no segundo ($19,83\pm 0,89g$) comparado ao primeiro teste ($17,46\pm 0,71g$) ($q_{i(2,96)}=2,05$, $p<0,05$), quanto no terceiro ($24,99\pm 1,48g$) comparado ao segundo e ao primeiro teste ($q_{i(2,96)}=2,72$, $p<0,01$). O grupo sedentário apresentou uma diferença significativa apenas quando o terceiro teste ($20,41\pm 0,68g$) foi comparado ao primeiro ($16,62\pm 0,63g$) ($q_{i(2,96)}=2,72$, $p<0,01$). Uma diferença significativa, entre o grupo exercício e o grupo sedentário ocorre na comparação do terceiro teste realizado ($q_{i(2,48)(2,96)} = 3,38$, $p<0,01$).

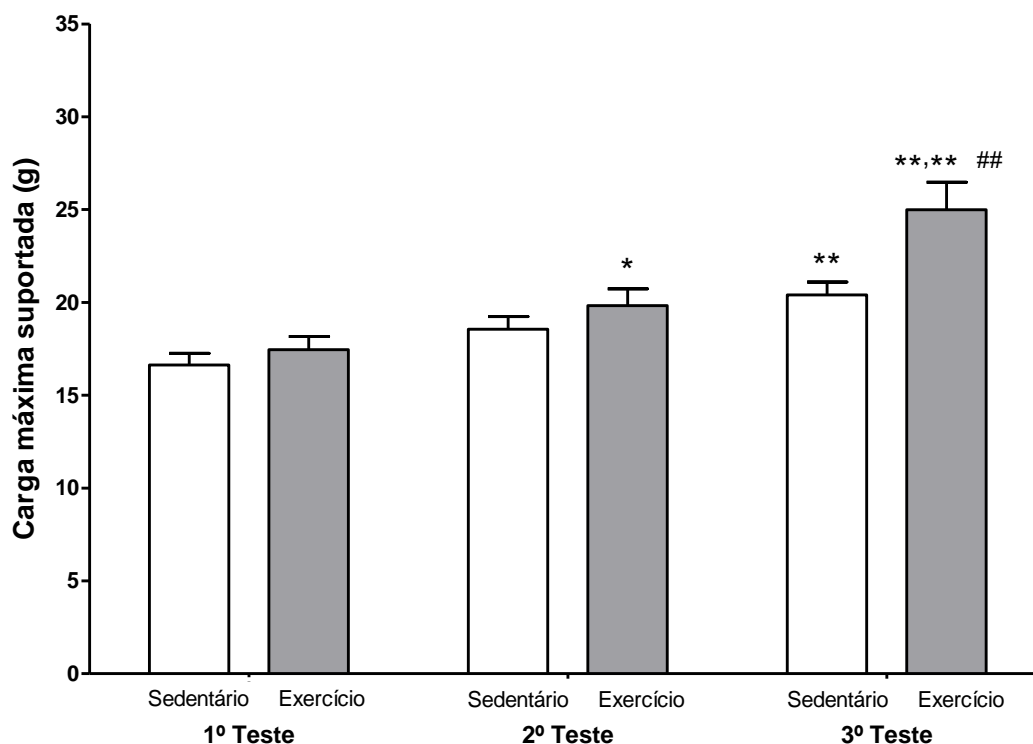


Figura 22: Testes de esforço máximo dos animais submetidos ao exercício físico.

Os animais de ambos os grupos, sedentário e exercício, foram submetidos a um teste de esforço máximo para iniciar o protocolo de exercício de natação, ao final do período de 4 semanas e ao final do período de 8 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM. Número de animais por grupo = 25. *Two-way ANOVA*, *post-hoc Student-Newman-Keuls (SNK)*. *Comparação intragrupos*: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *Comparação intergrupos*: ## $p<0,01$.

4.1.3 BOLOS FECAIS DEPOSITADOS

Um efeito significativo do protocolo de exercício e das mensurações ao longo do tempo foi observado sobre o número de eventos (bolos fecais depositados) (*Protocolo de exercício*: $F[1,8]=46,16$, $p<0,05$; *mensurações*: $F[8,64]=53,80$, $p<0,0001$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[8,64]=2,14$, $p<0,05$). Comparando as médias individuais de forma subsequente, observa-se que, o grupo exercício diminuiu o números de eventos de forma significativa na terceira ($21,40\pm 0,74$), quinta ($16,40\pm 1,03$) e sétima semana ($7,60\pm 1,50$) ($q_{i(2,64)}=4,56$, $p<0,05$), ao passo que o grupo sedentário diminuiu o números de eventos de forma significativa apenas na 1ª semana ($17,60\pm 0,67$) ($q_{i(2,64)}=6,03$, $p<0,01$). Observa-se uma diferença significativa entre o número de eventos depositados, entre o grupo exercício e o grupo sedentário, da primeira a quinta semana ($q_{i(2,8)(2,64)} = 6,55$, $p<0,01$) e na sexta e sétima semana ($q_{i(2,8)(2,64)} = 4,85$, $p<0,05$). Esta diferença não apresenta significância a partir da oitava semana (sedentário= $1\pm 0,63$; exercício= $5,20\pm 1,28$) ($q_{i(2,8)(2,64)} = 4,85$, $p>0,05$).

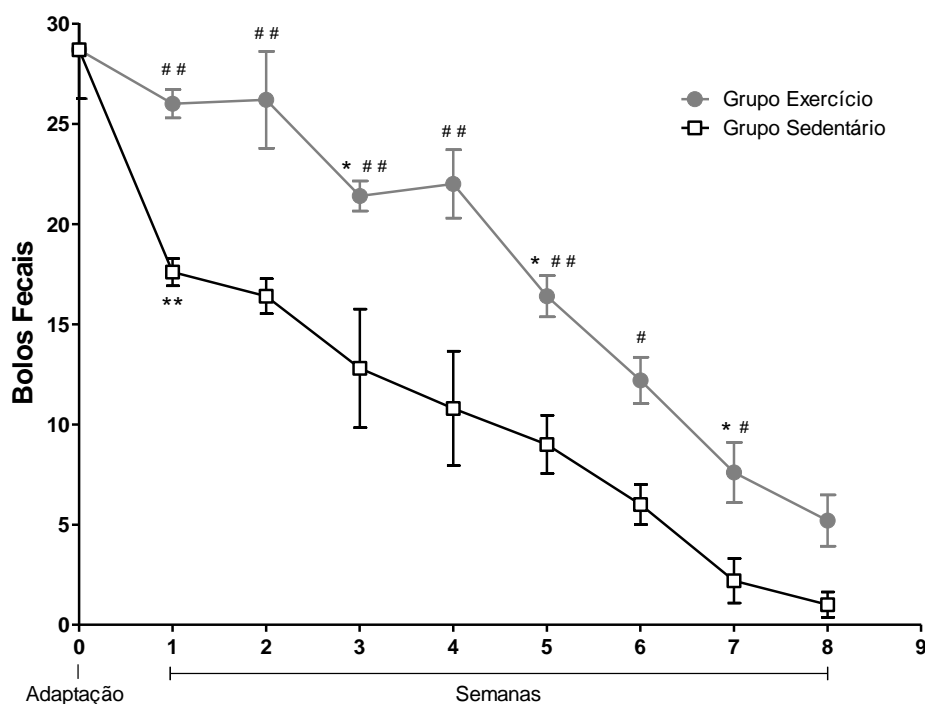


Figura 23: Bolos fecais depositados no decorrer de 8 semanas de exercício físico.

Resultados expressos como média \pm EPM do total eventos, (bolos fecais) depositados semanalmente, entre os grupos experimentais. Número de animais por grupo = 5. *Two-way ANOVA*, *post-hoc SNK*. Comparação intragrupos: * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Comparação intergrupos: # $p<0,05$; ## $p<0,01$.

4.1.4 MASSA HIPÓFISE, ADRENAIS, FÍGADO E MÚSCULO GASTROCNEMIO

A tabela 4 mostra que não existe diferença significativa entre os grupos exercício e sedentário quanto a massa da hipófise ($p=0,389$) e adrenais ($p=0,448$).

Tabela 4: Massa hipófise, adrenal

		Média ± EPM	DP	Máximo	Mínimo	Mediana	P
Hipófise	<i>Exercício</i>	3,263 ± 0,330	1,363	7,200	1,508	2,948^a	0,389
	<i>Sedentário</i>	3,292 ± 0,200	0,824	4,926	1,719	3,288^a	
Adrenais	<i>Exercício</i>	13,83 ± 1,718	7,084	36,28	8,483	11,25^a	0,448
	<i>Sedentário</i>	11,18 ± 0,946	3,902	17,49	3,398	10,91^a	

*Letras minúsculas referem-se à comparação em linha, diferenças referentes ao peso do órgão (μg) entre os grupos sedentário e exercício, de acordo com as medianas pelo teste de *Mann Whitney*, ao nível de $p < 0,05$. Número de animais por grupo = 17.

De acordo com os resultados mostrados na tabela 5, não existe diferença significativa entre os grupos exercício e sedentário quanto a massa do fígado ($t_{(34)}=1,663$, $p=0,105$) ao passo que o grupo exercício apresentou um aumento significativo ($t_{(34)}= 2,645$, $p=0,012$) quanto a massa do músculo gastrocnemio quando comparado ao grupo sedentário.

Tabela 5: Massa do tecido adiposo, fígado e músculo gastrocnemio

		Média ± EPM	DP	Máximo	Mínimo	Mediana	P
Tecido adiposo retroperitoneal	<i>Exercício</i>	0,686 ± 0,052	0,129	0,870	0,490	0,685^a	0,015
	<i>Sedentário</i>	1,113 ± 0,2161	0,529	2,160	0,720	0,915^b	
Tecido adiposo epididimal	<i>Exercício</i>	0,958 ± 0,051^a	0,125	1,140	0,840	0,920	0,397
	<i>Sedentário</i>	1,057 ± 0,098^a	0,241	1,410	0,730	1,070	
Fígado	<i>Exercício</i>	3,283 ± 0,037^a	0,158	3,592	3,055	3,211	0,105
	<i>Sedentário</i>	3,355 ± 0,059^a	0,251	3,861	2,948	3,111	
Músculo gastrocnemio	<i>Exercício</i>	0,567 ± 0,007^a	0,032	0,653	0,534	0,554	0,012
	<i>Sedentário</i>	0,533 ± 0,010^b	0,043	0,596	0,451	0,530	

*Letras minúsculas referem-se à comparação em linha, diferenças referentes ao peso do tecido adiposo retroperitoneal (g), epididimal (g) e dos referidos órgãos (g) entre os grupos sedentário e exercício. Número de animais por grupo = 6 para medidas referentes ao tecido adiposo e 18 para as medidas referentes aos órgãos. Médias e medianas seguidas de letras distintas diferem estatisticamente ao nível de $p < 0,05$, respectivamente pelo teste *t não-pareado* e pelo teste de *Mann Whitney*.

4.2 ANÁLISE COGNITIVA

4.2.1 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO:

De acordo com a análise do labirinto em cruz elevado, não há diferenças significativas quanto as variáveis analisadas, porcentagem de tempo no braço aberto ($p=0,834$), porcentagem de tempo no braço fechado ($p=0,155$), travessias totais entre os braços ($t_{(26)}=0,516$, $p=0,609$), número de *grooming* ($p=0,842$) e bolos fecais depositados ($t_{(26)}=0,2731$, $p=0,786$).

Tabela 6: Labirinto em cruz elevado

		Média ± EPM	DP	Máximo	Mínimo	Mediana	P
Tempo no braço aberto	<i>Exercício</i>	16,51 ± 7,88	30,53	100	0	0^a	0,834
	<i>Sedentário</i>	9,85 ± 5,48	19,79	65,67	0	0^a	
Tempo no braço fechado	<i>Exercício</i>	66,31 ± 9,45	36,63	99,33	0	84^a	0,155
	<i>Sedentário</i>	83,79 ± 6,76	24,37	100	27,33	96,67^a	
Travessias totais entre os braços	<i>Exercício</i>	2,26 ± 0,52^a	2,05	6	0	3	0,609
	<i>Sedentário</i>	2,76 ± 0,84^a	3,05	11	0	2	
Grooming	<i>Exercício</i>	1,06 ± 0,33	1,28	4	0	1	0,842
	<i>Sedentário</i>	1,38 ± 0,69	2,50	9	0	0	
Bolos Fecais	<i>Exercício</i>	2,26 ± 0,47^a	1,83	6	0	2	0,786
	<i>Sedentário</i>	2,46 ± 0,53^a	1,94	5	0	3	

*Letras minúsculas referem-se a comparação em linha, diferenças referentes às variáveis analisadas entre os grupos sedentário e exercício, de acordo com as medianas ou médias ± EPM pelo teste de *Mann Whitney* e teste *t não pareado* respectivamente, ao nível de $p<0,05$. Tempo no braço aberto/fechado (%), travessias totais entre os braços (n° de eventos), bolos fecais depositados (n° de eventos). Número de animais = 15 grupo exercício e 13 grupo sedentário.

4.2.2 RECONHECIMENTO DE OBJETOS, MODALIDADE ESPACIAL

Um efeito significativo do protocolo de exercício e da realização da tarefa de reconhecimento de objetos, avaliando a memória espacial, foi observado sobre o índice de reconhecimento, (*Protocolo de exercício*: $F[1,30]=4,17$, $p<0,05$; *tarefa de reconhecimento de objetos*: $F[1,30]=80,07$, $p<0,05$) além de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[1,30]=4,17$, $p<0,05$).

Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário ($0,63 \pm 0,02$) ($q_{(2,12)}=7,87$, $p < 0,01$) e exercício ($0,73 \pm 0,01$) ($q_{(2,12)}=7,87$, $p < 0,01$) apresentaram um aumento significativo quanto ao índice de reconhecimento de objeto na fase de teste, em relação a fase de treino (sedentário: $0,51 \pm 0,01$; exercício: $0,49 \pm 0,02$). Este aumento foi significativamente maior para o grupo exercício quando comparado ao grupo sedentário no período de teste ($q_{(2,12)(2,12)}=7,81$, $p < 0,01$).

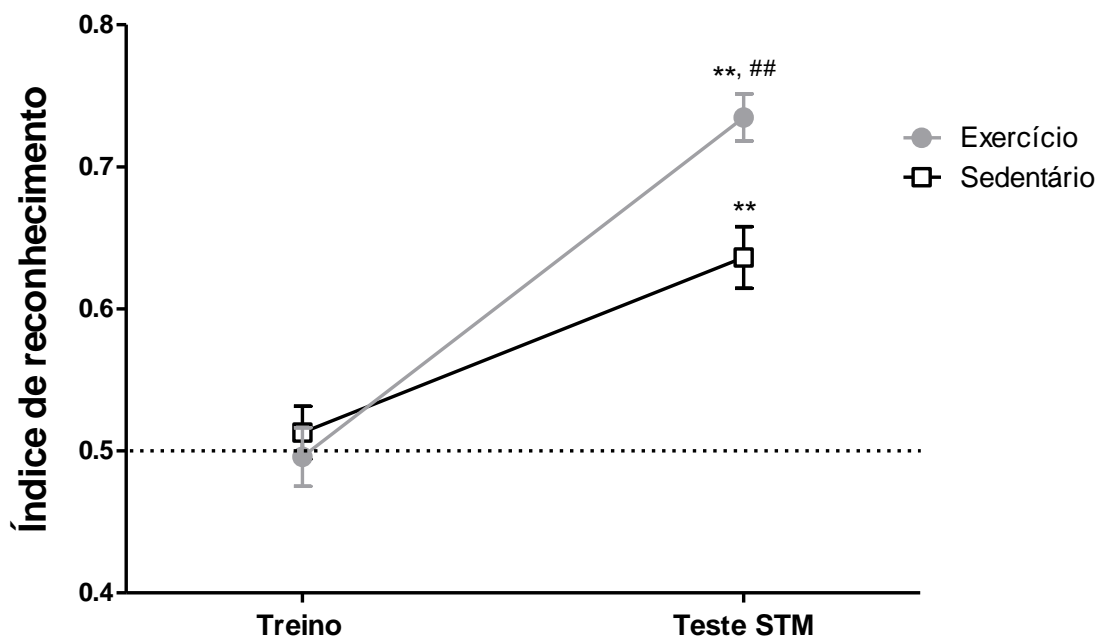


Figura 24 – Avaliação da memória espacial dos animais submetidos ao exercício físico.

Resultados expressos como média \pm EPM do índice de reconhecimento, entre o período de treino e o período de teste (STM), entre os grupos experimentais. Número de animais por grupo = 16. *Two-way* ANOVA, *post-hoc* TUKEY. Comparação intragrupos: ** $p < 0,01$. Comparação intergrupos: ## $p < 0,01$.

Os dados da tabela 7 demonstram que não foram encontradas diferenças significativas quanto ao tempo total de exploração dos objetos no período de treino entre os respectivos grupos ($t_{(28)}=1,550$, $p=0,1323$).

Tabela 7: Tempo total de exploração dos objetos no período de treino

Grupos	Média \pm EPM	DP
Sedentário	11,59 \pm 1,93 ^a	7,48
Exercício	16,63 \pm 2,61 ^a	10,12

*Letras minúsculas referem-se à comparação em linha, diferenças referentes às variáveis analisadas entre os grupos sedentário e exercício, de acordo com a médias \pm EPM pelo teste *t* não pareado, ao nível de $p < 0,05$.

4.3 GLUTAMATO E PROTEÍNAS APOPTÓTICAS

4.3.1 LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO

Um efeito significativo do protocolo de exercício e do protocolo de privação de 20 minutos de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*) foi observado sobre as concentrações de glutamato liberado das fatias de córtex (*Protocolo de exercício*: $F[1,8]=7,12$, $p<0,05$; *Protocolo de privação de oxigênio e glicose*: $F[1,8]=273,34$; $p<0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[1,8]=44,71$, $p<0,05$) (FIGURA 25-A). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário isquemia ($41,37\pm 3,35$ nmol/mg) ($q_{(2,8)}=5,87$, $p<0,01$) e exercício isquemia ($24,54\pm 2,71$ nmol/mg) ($q_{(2,8)}=5,87$, $p<0,01$) apresentaram um aumento significativo quanto a concentração de glutamato liberado, após isquemia *in vitro*, comparado aos seus respectivos controles (sedentário controle= $12,67\pm 1,57$ nmol/mg, exercício controle= $12,37\pm 1,59$ nmol/mg). Este aumento foi significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia ($q_{(2,8)(2,8)}=11,54$, $p<0,01$).

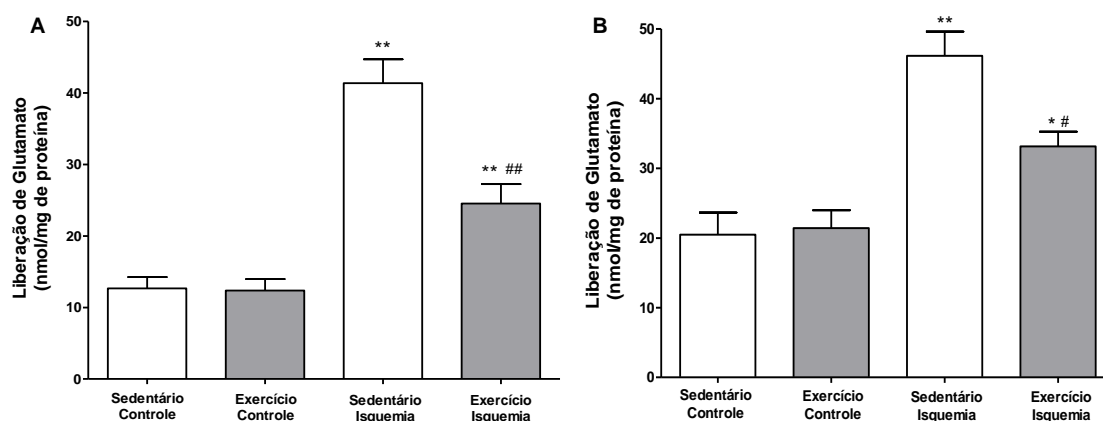


Figura 25: Liberação de glutamato em fatias de tecido cerebral após processo isquêmico.

Resultados expressos como média \pm EPM da concentração de glutamato acumulado (nmol/mg de proteína) no sobrenadante das fatias de córtex (A) e hipocampo (B) após 20 minutos de privação de oxigênio e glicose. Número de animais por grupo = 5. *Two-way ANOVA*, *post-hoc Tukey*, para as mensurações nas fatias de córtex, *SNK* para as mensurações nas fatias de hipocampo. Comparação intragrupos: * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Comparação intergrupos: # $p<0,05$; ## $p<0,01$.

Quanto as mensurações realizadas nas fatias de hipocampo (FIGURA 25-B) observa-se que não há um efeito significativo do protocolo de exercício

sobre as concentrações de glutamato liberado e acumulado no meio ($F[1,8]=3,59$, $p>0,05$), ao passo que existe um efeito significativo do protocolo de isquemia *in vitro* ($F[1,8]=53,78$, $p<0,05$) e uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[1,8]=7,50$, $p<0,05$). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário isquemia ($46,16\pm 3,46\text{nmol/mg}$) ($q_{(2,8)}=12,11$, $p<0,01$) e exercício isquemia ($33,15\pm 2,13\text{nmol/mg}$) ($q_{(2,8)}=8,31$, $p<0,05$) apresentaram um aumento significativo na concentração de glutamato liberado no meio, após isquemia *in vitro*, em relação aos seus respectivos controles (sedentário controle= $20,48\pm 3,18\text{nmol/mg}$; exercício controle= $21,43\pm 2,55\text{nmol/mg}$). Este aumento foi significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia ($q_{(2,8)(2,8)}=9,39$, $p<0,05$).

4.3.2 EXPRESSÃO DE CASPASE-3 ATIVA

Um efeito significativo do protocolo de exercício e do protocolo de isquemia *in vitro* foi observado sobre a expressão de caspase-3 ativa tanto nas fatias de córtex como nas fatias de hipocampo (*Protocolo de exercício córtex*: $F[1,8]=8,64$, $p<0,05$; *Protocolo de exercício hipocampo*: $F[1,8]=19,05$, $p<0,05$; *Isquemia in vitro córtex*: $F[1,8]=120,29$; $p<0,05$ *Isquemia in vitro hipocampo*: $F[1,8]=206,53$; $p<0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores (*Interação córtex*: $F[1,8]=11,06$, $p<0,05$; *Interação hipocampo*: $F[1,8]=44,83$, $p<0,05$). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário isquemia e exercício isquemia, apresentaram um aumento significativo quanto a expressão de caspase-3 ativa após isquemia *in vitro*, tanto para as fatias de córtex (sedentário isquemia= $206,6\pm 11,79\text{nmol/mg}$; exercício isquemia= $148,7\pm 9,55\text{nmol/mg}$) (*sedentário isquemia*: $q_{(2,8)}=61,20$, $p<0,01$; *exercício isquemia*: $q_{(2,8)}=61,20$, $p<0,01$) quanto para as fatias de hipocampo (sedentário isquemia= $229,39\pm 11,65\text{nmol/mg}$, exercício isquemia= $135,61\pm 11,46\text{nmol/mg}$) (*sedentário isquemia*: $q_{(2,8)}=37,85$, $p<0,01$; *exercício isquemia*: $q_{(2,8)}=37,85$, $p<0,01$), em relação aos seus respectivos controles (Córtex - sedentário controle= $46,75\pm 5,12\text{nmol/mg}$, exercício controle= $57,51\pm 3,52\text{nmol/mg}$; Hipocampo - sedentário controle= $61,50\pm 2,80\text{nmol/mg}$, exercício controle= $74,45\pm 4,84\text{nmol/mg}$). Este aumento foi

significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia em ambos os tecidos (*Fatias de córtex*: $q_{(2,8)(2,8)}=56,71$, $p<0,01$; *Fatias de hipocampo*: $q_{(2,8)(2,8)}=41,03$, $p<0,01$).

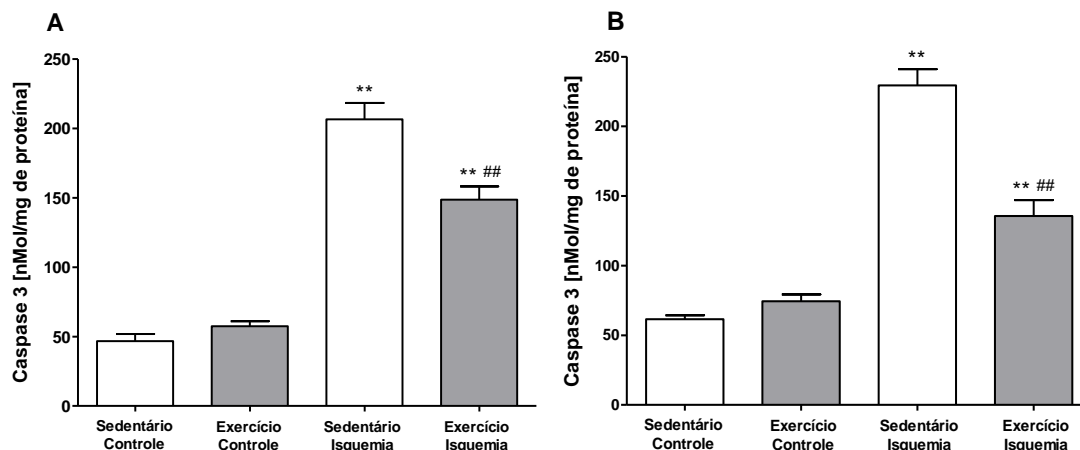


Figura 26: Expressão de Caspase-3 ativa em fatias de tecido cerebral após processo isquêmico.

Resultados expressos como média \pm EPM da expressão de caspase-3 ativa (nmol/mg de proteína) em fatias de córtex (A) e hipocampo (B) após 20 minutos de privação de oxigênio e glicose e 4 horas de reperfusão. Número de animais por grupo = 5. *Two-way ANOVA*, *post-hoc* SNK. Comparação intragrupos: ** $p<0,01$. Comparação intergrupos: ### $p<0,01$.

4.3.3 EXPRESSÃO DE CASPASE-8 ATIVA

Um efeito significativo do protocolo de exercício e do protocolo de isquemia *in vitro* foi observado sobre a expressão de caspase-8 ativa tanto nas fatias de córtex como nas fatias de hipocampo (*Protocolo de exercício córtex*: $F[1,8]=18,26$, $p<0,05$; *Protocolo de exercício hipocampo*: $F[1,8]=14,86$, $p<0,05$; *Isquemia in vitro córtex*: $F[1,8]=551,60$; $p<0,05$ *Isquemia "in vitro" hipocampo*: $F[1,8]=172,46$; $p<0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores (*Interação córtex*: $F[1,8]=39,57$, $p<0,05$; *Interação hipocampo*: $F[1,8]=44,39$, $p<0,05$). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário isquemia e exercício isquemia apresentaram um aumento significativo quanto à expressão de caspase-8 ativa após isquemia *in vitro*, tanto para as fatias de córtex (sedentário isquemia= $190,25 \pm 7,80$, exercício isquemia= $134,93 \pm 3,55$) (sedentário isquemia: $q_{(2,8)}=24,81$, $p<0,01$; exercício isquemia: $q_{(2,8)}=24,81$, $p<0,01$) quanto para as fatias de hipocampo (sedentário isquemia= $304,9 \pm 26,61$, exercício isquemia= $211,9 \pm 35,07$) (sedentário isquemia:

$q_{(2,8)}=66,51$, $p<0,01$; *exercício isquemia* ($q_{(2,8)}=66,51$, $p<0,01$) em relação aos seus respectivos controles (Córtex - sedentário controle= $34,69\pm 1,31$, exercício controle= $45,09\pm 5,87$; Hipocampo - sedentário controle= $54,22\pm 8,60$, exercício controle= $93,62\pm 13,13$). Este aumento foi significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia em ambos os tecidos (*Fatias de córtex*: $q_{(2,8)(2,8)}=24,89$, $p<0,01$; *Fatias de hipocampo*: $q_{(2,8)(2,8)}=66,45$, $p<0,01$).

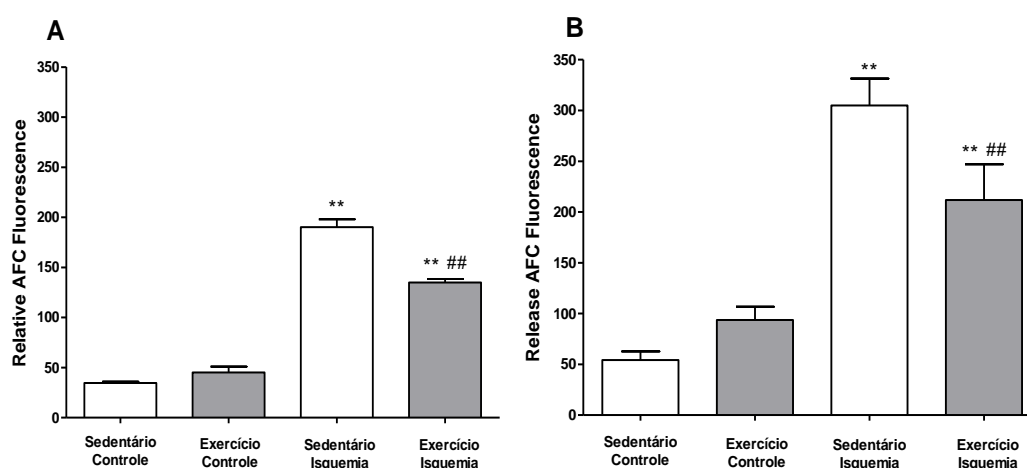


Figura 27: Expressão de Caspase-8 ativa em fatias de tecido cerebral após processo isquêmico.

Resultados expressos como média \pm EPM da expressão de caspase-8 ativa (AFC - fluorescência relativa) em fatias de córtex (A) e hipocampo (B) após 20 minutos de privação de oxigênio e glicose e 4 horas de reperusão. Número de animais por grupo = 5. *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Tukey, para as mensurações nas fatias de córtex, SNK nas fatias de hipocampo. Comparação intragrupos: ** $p<0,01$. Comparação intergrupos: ### $p<0,01$.

4.3.4 EXPRESSÃO DE CASPASE-9 ATIVA

Um efeito significativo do protocolo de exercício e do protocolo de isquemia *in vitro* foi observado sobre a expressão de caspase-9 ativa tanto nas fatias de córtex como nas fatias de hipocampo (*Protocolo de exercício córtex*: $F[1,8]=9,54$, $p<0,05$; *Protocolo de exercício hipocampo*: $F[1,8]=8,08$, $p<0,05$; *Isquemia in vitro córtex*: $F[1,8]=102,68$; $p<0,05$ *Isquemia "in vitro" hipocampo*: $F[1,8]=54,76$; $p<0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores (*Interação córtex*: $F[1,8]=15,45$, $p<0,05$; *Interação hipocampo*: $F[1,8]=8,98$, $p<0,05$). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário isquemia e exercício isquemia, apresentaram um aumento significativo quanto à expressão de caspase-9 ativa

após isquemia *in vitro*, tanto para as fatias de córtex (sedentário isquemia= $0,139 \pm 0,003$, exercício isquemia= $0,112 \pm 0,004$) (sedentário isquemia: $q_{(2,8)}=0,018$, $p < 0,01$; exercício isquemia: $q_{(2,8)}=0,018$, $p < 0,01$) quanto para as fatias de hipocampo (sedentário isquemia= $0,162 \pm 0,007$, exercício isquemia= $0,128 \pm 0,006$) (sedentário isquemia: $q_{(2,8)}=0,030$, $p < 0,01$; exercício isquemia ($q_{(2,8)}=0,020$, $p < 0,05$) em relação aos seus respectivos controles (Córtex - sedentário controle= $0,085 \pm 0,002$, exercício controle= $0,088 \pm 0,004$; Hipocampo - sedentário controle= $0,085 \pm 0,003$, exercício controle= $0,088 \pm 0,004$). Este aumento foi significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia em ambos os tecidos (Fatias de córtex: $q_{(2,8)(2,8)}=0,018$, $p < 0,01$; Fatias de hipocampo: $q_{(2,8)(2,8)}=0,027$, $p < 0,01$).

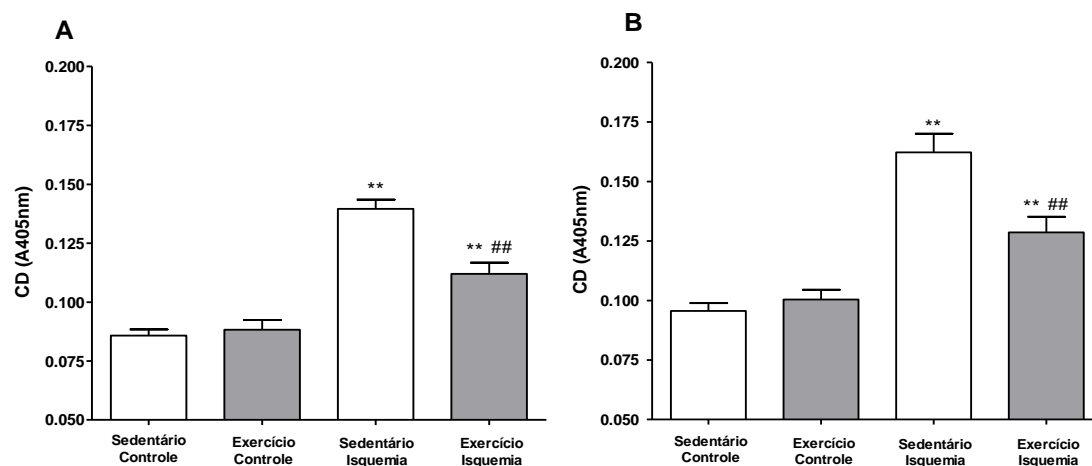


Figura 28: Expressão de Caspase-9 ativa em fatias de tecido cerebral após processo isquêmico.

Resultados expressos como média \pm EPM da expressão de caspase-9 ativa (Absorbância relativa – 405nm) em fatias de córtex (A) e hipocampo (B) após 20 minutos de privação de oxigênio e glicose e 4 horas de reperusão. Número de animais por grupo = 5. *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Tukey, Comparação intragrupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Comparação intergrupos: ## $p < 0,01$.

4.3.5 EXPRESSÃO DE APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF)

Um efeito significativo do protocolo de exercício e do protocolo de isquemia *in vitro* foi observado sobre a expressão de AIF nas fatias de hipocampo (*Protocolo de exercício*: $F[1,10]=16,79$, $p < 0,05$; *Protocolo isquemia in vitro*: $F[1,10]=34,62$; $p < 0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[1,10]=5,33$, $p < 0,05$). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário isquemia

($3,69 \pm 0,51$) ($q_{i(2,10)}=1,83$, $p<0,01$) e exercício isquemia ($2,01 \pm 0,16$) ($q_{i(2,10)}=1,28$, $p<0,05$) apresentaram um aumento significativo quanto a expressão de AIF, após isquemia *in vitro*, em relação aos seus respectivos controles (sedentário= $0,63 \pm 0,16$; exercício= $0,67 \pm 0,19$). Este aumento foi significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia ($q_{i(2,8)(2,8)}=1,83$, $p<0,01$).

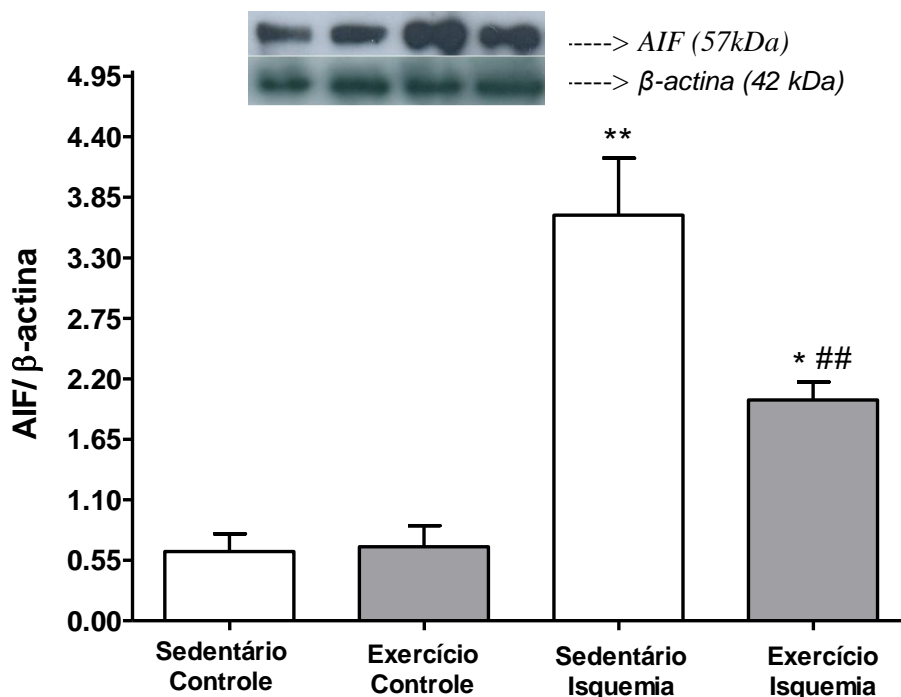


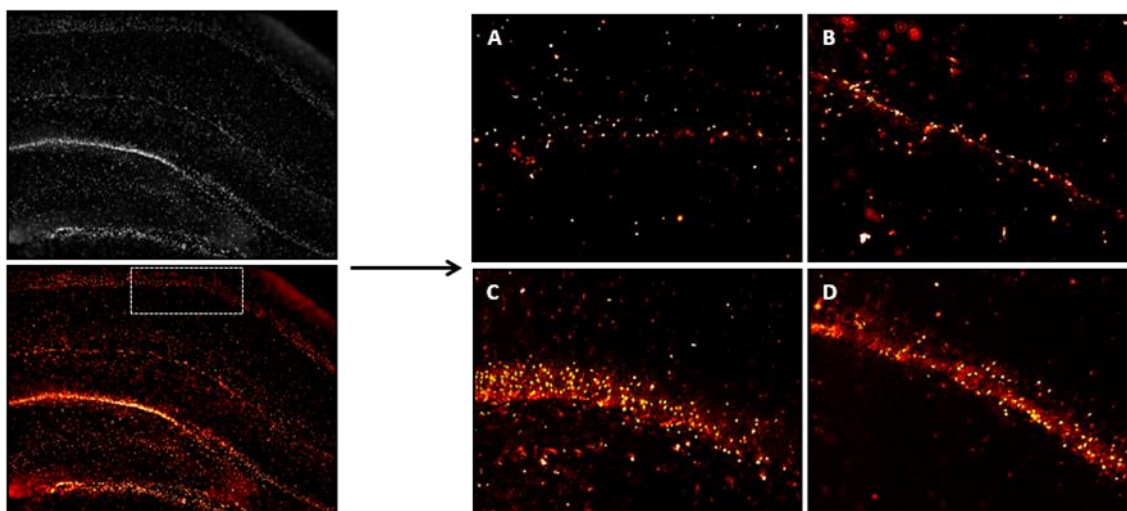
Figura 29: Expressão de Apoptosis-inducing factor (AIF) em fatias de tecido cerebral após processo isquêmico.

Resultados expressos como média \pm EPM da expressão de AIF (densitometria óptica – AIF/ β -actina) em fatias de hipocampo, após 20 minutos de privação de oxigênio e glicose e 4 horas de reperfusão. Número de animais por grupo = 6. Two-way ANOVA, post-hoc SNK. Comparação intragrupos: * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Comparação intergrupos: ## $p<0,01$.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

Um efeito significativo do protocolo de exercício e do protocolo de isquemia *in vitro* foi observado sobre a porcentagem de morte celular nas fatias de hipocampo (Protocolo de exercício: $F[1,8]=7,08$, $p<0,05$; Protocolo isquemia *in vitro* : $F[1,8]=170,40$; $p<0,05$), além de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[1,8]=12,22$, $p<0,05$). Realizando uma comparação entre as médias individuais, observa-se que ambos os grupos, sedentário isquemia ($25,22 \pm 1,41\%$) ($q_{i(2,8)}=5,69$, $p<0,01$) e exercício isquemia ($17,82 \pm 1,63\%$) ($q_{i(2,8)}=5,69$, $p<0,01$) apresentaram um aumento significativo quanto a

porcentagem de morte celular, após isquemia *in vitro*, em relação aos seus respectivos controles (sedentário= $5,38 \pm 0,72\%$, exercício= $6,36 \pm 0,77\%$). Este aumento foi significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia ($q_{(2,8)(2,8)}=5,71$, $p < 0,01$).



Imagens de fatias de hipocampo obtidas por microscopia de Fluorescência (Obj. 5X). Marcação com EthD-1 (2mM).

Microscópio Fluorescência
(Zeiss IMAGE M.2)

Imagens de fatias de hipocampo submetidas a 20 min de privação de oxigênio e glicose e 4 horas de reperusão, obtidas por microscopia de Fluorescência (Obj. 20X). Marcação com EthD-1 (2mM). Sedentário controle (A), Exercício controle (B); Sedentário Isquemia (C); Exercício Isquemia (D).

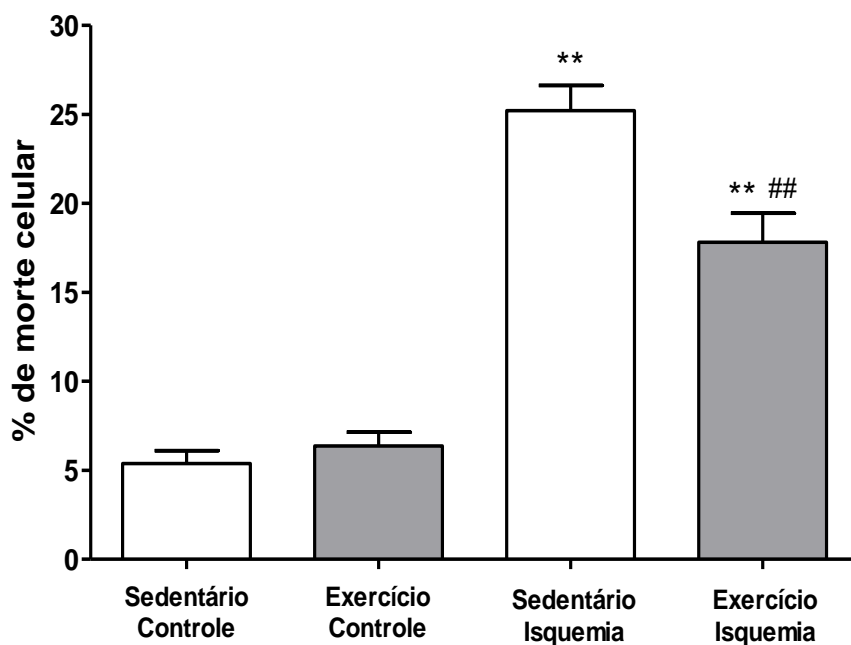


Figura 30: Viabilidade celular em fatias de tecido cerebral após processo isquêmico.

Resultados expressos como média \pm EPM da porcentagem de morte celular (intensidade-pixels) em fatias de hipocampo após 20 minutos de privação de oxigênio e glicose e 4 horas de reperusão. Número de animais por grupo = 5. *Two-way ANOVA*, *post-hoc SNK*. Comparação intragrupos: ** $p < 0,01$. Comparação intergrupos: ## $p < 0,01$.

(...)

“ - Que temes tu? ” – Virgílio diz – ‘Repara:
É farinata em seu sepulcro alçado,
Do busto em toda a altura, se depara’ . –

Na sombra os olhos tinha eu já fitado:
Altiva levantava a fronte e o peito,
Como em desprezo do infernal estado.



Ilustração de Gustave Doré (séc XIX).

Por entre as tumbas me levou direito
Ao vulto o mestre com seu braço preste,
Dizendo-me - ‘ Se claro em teu conceito!’ –“

*Canto X – “Espírito de Farinata - Espírito de Cavalcanti”
Divina Comédia - Dante Alighieri*

5.1 DISCUSSÃO PARCIAL

5.1.1 ADAPTAÇÕES E MUDANÇAS FISIOLÓGICAS GERAIS

De acordo com os resultados, algumas adaptações fisiológicas gerais avaliadas, consequentes do protocolo de exercício proposto, apresentaram diferenças significativas para o grupo exercício quando este foi comparado ao grupo sedentário.

Embora ambos os grupos experimentais tenham sido mantidos com uma dieta balanceada *ad libitum*, a massa da gordura abdominal, ao final de oito semanas, e o aumento da massa corporal em função do tempo, apresentaram-se significativamente menores, para o grupo exercício quando este foi comparado ao grupo sedentário.

O acompanhamento da ingestão alimentar e a análise bioquímica quanto aos estoques energéticos ou as concentrações dos hormônios circulantes, não fizeram parte de nosso principal objetivo. Mesmo assim, tendo em vista a mais marcante característica da fisiologia, quanto aos dependentes mecanismos entre os diversos sistemas fisiológicos, algumas hipóteses podem ser inferidas de acordo com resultados prévios na literatura. A primeira hipótese levantada é relação à ingestão de alimentos e a segunda em relação às adaptações metabólicas subsequentes a atividade. Não descartando uma terceira, tendo em vista que tanto a ingestão quanto o metabolismo podem estar associados.

De acordo com a literatura, o ganho de massa significativamente menor do grupo exercício em relação ao grupo sedentário pode ser devido simplesmente a uma menor ingestão de alimentos, no período inicial da atividade, sendo que após a normalização da ingestão, as curvas de massa corporal dos grupos sedentário e exercício desenvolvem-se em paralelo (Looy e Eikelboom, 1989; Afonso e Eikelboom, 2003). Apesar desta possibilidade, uma importante diferença existe entre os trabalhos citados e o trabalho realizado. Enquanto empregamos uma atividade forçada, com um tempo e intensidade bem determinados, estes estudos utilizaram o paradigma voluntário e discutem que a roda de correr colocada no ambiente apresenta-se como uma grande novidade para os animais, que passam grande parte do tempo inicial explorando-a, se exercitando e não se alimentando. No nosso caso, a diminuição da ingestão nos períodos iniciais poderia ser justificada pelo

estresse inicial sofrido pelos animais. A diminuição da ingestão de alimentos apesar de não quantificada não foi observada durante o cuidado das caixas onde residiam os animais.

Adaptações metabólicas, alterações na massa corporal ou na gordura abdominal, em função de protocolos crônicos de exercício físico, têm sido evidenciadas tanto em humanos (Coggan, Swanson *et al.*, 1995; Macdougall, Hicks *et al.*, 1998) quanto em animais (Moraska, Deak *et al.*, 2000; Droste, Chandramohan *et al.*, 2007; Sene-Fiorese, Duarte *et al.*, 2008).

Na literatura, estas mudanças são caracteristicamente descritas como consequências do aumento da taxa metabólica, gasto energético e aumento da biogênese mitocondrial muscular, permitindo ao organismo a realização eficaz de uma maior quantidade de trabalho (Moraska, Deak *et al.*, 2000).

Sabe-se que durante protocolos de atividade física, com intensidade moderada a intensa, o principal substrato energético envolvido é o carboidrato, estocado sob a forma de glicogênio no músculo. Este estoque é limitado e rapidamente diminuído durante o exercício (Mcardle, Katch *et al.*, 2010).

O controle da disponibilidade dos substratos energéticos, em consequência ao exercício, é determinado em grande parte por ajustes hormonais, principalmente quanto à diminuição das concentrações de insulina e o aumento do glucagon e das catecolaminas. As diminuições das concentrações de insulina, além de contribuírem para evitar um estado hiperglicêmico, contribuem para aumentar o efeito dos hormônios contra reguladores sobre o fígado, aumentando a mobilização do glicogênio muscular e hepático e dos ácidos graxos livres do tecido adiposo, favorecendo a produção de glicose e sua disponibilidade aos tecidos (Wasserman e Vranic, 1986; Marliss, Kreisman *et al.*, 2000). Os ácidos graxos livres são utilizados principalmente em exercícios físicos mais prolongados, sendo sua participação dependente do estado nutricional, intensidade, duração do exercício e estado de treinamento (Martin, 1996; Horowitz e Klein, 2000).

Assim, de forma geral, durante o exercício, o glicogênio hepático e muscular proporciona parte da demanda energética e à medida que esta fonte vai sendo esgotada, aumenta-se a utilização dos lipídios, que passa a ser o principal substrato para a realização do exercício de resistência aeróbia, incluindo ainda, uma pequena contribuição das proteínas (Aoki e Seelander,

1999). Durante o restabelecimento do organismo frente ao exercício, a participação da via aeróbia torna-se cada vez mais significativa, utilizando componentes lipídicos em maior quantidade (Horowitz e Klein, 2000).

Assim, como no estudo realizado por Osorio, Silveira *et al.*, (2003) e Almeida, Gomes-Filho *et al.*, (2009), o aumento da capacidade de sustentar cargas pode ser confirmado através dos subsequentes testes de esforço máximo. O grupo exercício que realizou a atividade física diária, com cargas progressivas semanais, definidas em função da massa corporal e do teste de esforço prévio, apresentou significativos aumentos na capacidade de sustentação das cargas impostas pelo teste, em relação ao grupo sedentário. O grupo sedentário por sua vez, manteve seu desempenho relativamente constante durante os respectivos testes, apresentando uma melhora significativa apenas do terceiro teste em relação ao primeiro. Essa melhora pode ser explicada possivelmente pela cronicidade do experimento, onde, com o passar do tempo, os animais apresentam um desenvolvimento muscular normal em função da idade.

Quanto a massa do fígado, não foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos experimentais, uma vez que, apesar do aumento da taxa metabólica durante o exercício físico, o órgão aumenta a síntese de substratos, preparando-se para um novo insulto, contrabalanceando seus estoques em virtude da elevada mobilização (Galbo, Saugmann *et al.*, 1979; James e Kraegen, 1984). Além disso, as alterações metabólicas e fisiológicas proporcionadas pelo exercício aeróbico retardam a depleção dos estoques de glicogênio, priorizando como discutido anteriormente o metabolismo lipídico, permitindo a manutenção da atividade por longos períodos (Coggan, Swanson *et al.*, 1995).

Durante a natação, o principal grupo muscular utilizado é o conjunto gastrocnêmico-sóleo, em movimentos contínuos de impulsão. De acordo com os resultados, o grupo exercício apresentou um aumento significativo na massa do músculo gastrocnêmico quando comparado ao grupo sedentário. Aumentos na atividade muscular, tais como as que ocorrem em exercícios de resistência, estão associadas com adaptações rápidas e dramáticas dos sistemas cardiovascular e músculo-esquelético (Salmons e Henriksson, 1981; Moore, 1998). Essas adaptações fisiológicas resultam em uma disponibilidade,

captação e utilização mais eficiente de substratos energéticos para a produção sustentada de trabalho físico (Allen, Harrison *et al.*, 2001). Estudos utilizando tanto paradigmas de exercício voluntário quanto forçado, em ratos, tem consistentemente demonstrado adaptações do exercício de resistência, caracterizadas tanto por um aumento na massa relativo do coração (Tibbits, Koziol *et al.*, 1978; Hickson, Galassi *et al.*, 1983; Kingwell, Arnold *et al.*, 1998), quanto por mudanças metabólicas (Baldwin, Klinkerfuss *et al.*, 1972; Dudley, Abraham *et al.*, 1982; Ivy, Young *et al.*, 1983; Powers, Grinton *et al.*, 1992; Gulve, Rodnick *et al.*, 1993), além de alterações na expressão de proteínas contrateis de perfil mais oxidativo (Fitzsimons, Diffie *et al.*, 1990; Ishihara, Inoue *et al.*, 1991; Seburn e Gardiner, 1995; Sullivan, Powers *et al.*, 1995; Demirel, Powers *et al.*, 1999). No sistema músculo-esquelético, o aumento da expressão dessas proteínas, torna-o mais adequado e preparado para uma ativação muscular lenta e prolongada.

O exercício físico é conhecido como um estímulo estressor, tanto em seres humanos como em animais (Contarteze, Ricardo *et al.*, 2007), que como descrito anteriormente, conduz a inúmeras alterações fisiológicas visando suprir o aumento da demanda energética e a busca de uma nova situação de homeostase (Moraska, Deak *et al.*, 2000). Sabe-se que exercícios de intensidade mais alta resultam em maiores incrementos na atividade de biomarcadores hormonais de estresse, que respondem ao esforço. O aumento da atividade desses hormônios não somente influencia o metabolismo, mas também os sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo, renal e nervoso (Lambert, Buckelew *et al.*, 1998; Smilios, Pilianidis *et al.*, 2003).

Quanto ao metabolismo, é reconhecido que a secreção de hormônios glicocorticóides estimulada durante o exercício, tem sua liberação dependente da quantidade do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), liberada pela hipófise anterior. No exercício físico, o cortisol estimula a produção de glicose pelo fígado ativando a gliconeogênese e diminuindo a sua utilização, acentuando a liberação de glucagon pelas ilhotas pancreáticas (Afonso e Eikelboom, 2003).

O esforço físico promove ainda a liberação do hormônio de crescimento (GH) que inibe o consumo de glicose circulante e estimula a liberação de ácidos graxos livres pelo fígado, além de atuar na secreção das catecolaminas,

cuja função é de promover a glicogenólise hepática, elevando os níveis glicêmicos (Powers e Howley, 2000).

Por outro lado, períodos prolongados de atividade elevada de glicocorticóides (no homem, fundamentalmente, o cortisol e, na maioria dos roedores, a corticosterona) podem desencadear respostas indesejáveis ao organismo, como: resistência à insulina, supressão do sistema imunológico e do eixo hipotálamo-hipófise adrenal (HHA) (Dallman, 1993; Andersen, Bignotto *et al.*, 2004). A hiperatividade do eixo HHA também pode estar relacionada a sintomas ligados a transtornos de humor como ansiedade e ou depressão (Droste, Chandramohan *et al.*, 2007; Mello, Benetti *et al.*, 2008), contribuindo para doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e obesidade (De Kloet, Vreugdenhil *et al.*, 1998; Reul, Gesing *et al.*, 2000; Sapolsky, Romero *et al.*, 2000).

Após a descoberta de receptores para glicocorticóides no hipocampo (Mcewen, Weiss *et al.*, 1968), estudos tem investigado os efeitos do estresse sobre estruturas límbicas, demonstrando que a exposição prolongada a glicocorticóides pode levar a atrofia apical dendrítica (Lambert, Buckelew *et al.*, 1998) e morte celular hipocampal em ratos, gerando estruturas semelhantes ao encontrado em animais velhos (Sapolsky, Krey *et al.*, 1985).

Tendo em vista que protocolos crônicos de exercício podem resultar em níveis prolongados de estresse e a hiperexcitabilidade, como sinal morfológico, pode gerar hipertrofia das glândulas adrenais (Moraska, Deak *et al.*, 2000), estas estruturas foram dissecadas e sua massa avaliada, ao final do período de exercício. Apesar da grande variabilidade do valores, não foram encontradas diferenças significativas quanto a massa entre os grupos experimentais, sendo que também não foram encontradas diferenças significativas quanto ao peso da hipófise.

Leasure e Jones (2008), comparando dois paradigmas de atividade física, um voluntário e um forçado (este criado em seu laboratório), realizou mensurações quanto a massa das adrenais, o número de bolos fecais depositados ao final de oito semanas, além de medidas dos níveis de corticosterona presente nestas amostras de fezes. Os níveis de corticosterona nos bolos fecais estão fortemente correlacionados com níveis séricos de corticosterona (Thanos, Cavigelli *et al.*, 2009). Nos seus resultados, não houve

diferenças significativas nestas comparações, salvo o número de bolos fecais depositados no quadragésimo e último dia de exercício.

De acordo com o autor, outros trabalhos, como o de Fediuc, Campbell *et al.*, (2006), sugerem que o eixo HHA, adapta-se a imposição de protocolos crônicos de exercício, e consistindo com esta idéia ele não encontrou diferenças significativas na massa das estruturas após as oito semanas de exercício. Assim como Leasure e Jones, (2008), em nosso trabalho não foram encontradas diferenças significativas quanto a massa das adrenais, sugerindo que a exposição a longo prazo, ao protocolo natação proposto, não resultou em um aumento das respostas de estresse.

Ainda como sugerido por Leasure e Jones (2008), foi realizado a contagem do número de bolos fecais depositados. Diferente do que foi encontrado e proposto por esse trabalho, contabilizou-se o número de eventos ao longo de todo o período de natação. Essa mensuração proporcionou um possível acompanhamento da adaptabilidade emocional dos animais frente à atividade. De acordo com os resultados, o número de bolos fecais depositados pelo grupo exercício foi diminuindo gradativamente em função do tempo, deixando de apresentar diferenças significativas em comparação ao grupo sedentário na oitava e última semana. Durante as oito semanas de exercício, o grupo sedentário apresentou valores relativamente constantes.

Assim, apesar de não ter sido realizado mensurações bioquímicas quanto aos marcadores de estresse, a massa das estruturas e o acompanhamento do número de bolos fecais depositados, sugerem uma possível similaridade entre os grupos experimentais, além de uma boa adaptabilidade frente ao protocolo de exercício proposto.

5.1.2 ANÁLISE COGNITIVA

Diversos são os trabalhos apontados pela literatura a respeito dos benefícios do exercício sobre a cognição, tanto em humanos (Pajonk, Wobrock *et al.*; Rolland, Van Kan *et al.*; Kramer, Hahn *et al.*, 1999; Abbott, White *et al.*, 2004; Winter, Breitenstein *et al.*, 2007) como em animais (Rolland, Van Kan *et al.*; Van Praag, Kempermann *et al.*, 1999; Radak, Kaneko *et al.*, 2001; Sim, Kim *et al.*, 2004; Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005; Albeck, Sano *et al.*, 2006; O'callaghan, Ohle *et al.*, 2007). Ambos os trabalhos abrangem inúmeros

protocolos, paradigmas de exercício físico e avaliação, além de apontarem diversos e possíveis mecanismos.

A escolha do método de avaliação condiz especialmente com a função e as características do substrato neural envolvido em uma determinada tarefa (Dere, Huston *et al.*, 2007). Artigos que muitas vezes avaliam os efeitos do exercício sobre a memória e o aprendizado, associado à neurogênese hipocampal e a recuperação funcional, utilizam especialmente tarefas de reconhecimento espacial, e dentre as mais importantes destaca-se o “Labirinto Aquático de Morris” (*Water Maze*). Nesta tarefa, o animal desloca-se através de natação, em um grande tanque de água, na tentativa de localizar uma plataforma para se proteger (Van Praag, Kempermann *et al.*, 1999; Albeck, Sano *et al.*, 2006; Ang, Dawe *et al.*, 2006; O'callaghan, Ohle *et al.*, 2007).

De acordo com Ang, Dawe *et al.*, (2006), existem consideráveis evidências quanto aos benefícios do exercício, seja ele voluntário ou forçado, na melhora da aprendizagem espacial e memória. Neste contexto, tem sido demonstrado que o exercício pode promover a potenciação a longo prazo (LTP) em células hipocampais (Van Praag, Kempermann *et al.*, 1999; O'callaghan, Ohle *et al.*, 2007), fato importante, uma vez que é amplamente aceito que a LTP pode beneficiar alguns eventos celulares subjacentes a memória (Abraham, 2003), incluindo a formação de espinhas dendríticas (Toni, Buchs *et al.*, 1999). É importante ressaltar que o aumento da LTP pode estar associado ao aumento endógeno de fatores neurotróficos, em função do exercício, que podem melhorar a referência espacial e a memória recente, de curto prazo (Markowska, Price *et al.*, 1996; Frick, Price *et al.*, 1997). O LTP, por sua vez, também pode ser modulado por alterações em citocinas endógenas, tais como TNF- α e IL-1 β , conhecidas por inibir o fenômeno (Cunningham, Murray *et al.*, 1996; Butler, O'connor *et al.*, 2004). Como consequência direta do exercício, estas citocinas podem diminuir sua expressão, favorecendo assim a potenciação das células (Ang, Wong *et al.*, 2004).

No presente trabalho, tendo em vista que o hipocampo foi um dos principais alvos de avaliação, optamos por avaliar as repercussões funcionais do protocolo de exercício proposto, sobre a memória e o aprendizado através de uma tarefa de reconhecimento espacial diferente do *Water Maze*. Obviamente como os animais que nadaram durante oito semanas poderiam

apresentar uma desenvoltura melhor neste tipo de tarefa, optamos por utilizar o reconhecimento de objetos, modalidade espacial. Tarefa também reconhecidamente eficaz neste tipo de avaliação (Ennaceur e Delacour, 1988).

De acordo com Mello, Benetti *et al.*, (2008), alguns cuidados devem ser tomados na interpretação dos efeitos do exercício forçado sobre as funções cognitivas, já que uma parte delas podem ser atribuídas ao estresse inerente da atividade.

Neste trabalho foi difícil estabelecer o grau específico de estresse que difere os grupos experimentais, apesar dos resultados anteriormente citados, quanto ao peso das estruturas avaliadas, não demonstrarem diferenças significativas, sugerindo que ambos os grupos apresentaram uma boa adaptabilidade ao protocolo de exercício imposto.

Mesmo assim, de forma a garantir a similaridade, e desta forma descartar efeitos comportamentais adversos, como ansiedade e estresse, que possam vir a prejudicar ou beneficiar a capacidade motora exploratória de um dos grupos experimentais, foi realizado previamente ao teste de reconhecimento de objetos, o teste do labirinto em cruz elevado. Este por sua vez além de avaliar o estado emocional dos animais, avalia a capacidade motora exploratória através do número de entradas em cada braço do labirinto.

De acordo com os resultados, não foi encontrado nenhuma diferença significativa em qualquer um dos parâmetros emocionais ou motores avaliados, garantindo assim uma homogeneidade entre os grupos quanto aos possíveis efeitos estressores imposto pelo exercício, além de uma fidedignidade na avaliação cognitiva proporcionada pela exploração dos objetos.

Os resultados quanto ao reconhecimento de exploração dos objetos demonstram que ambos os grupos partiram de condições semelhantes, fato identificado pelo tempo total de exploração semelhante no período de treino. Ambos os grupos também apresentaram uma resposta semelhante e significativa quanto à memória de reconhecimento espacial no período de teste, ao passo que grupo exercício apresentou um desempenho significativamente melhor quando comparado ao grupo sedentário.

Nakajima, Uchida *et al.*, (2003), demonstraram que o aumento do fluxo sanguíneo cerebral no hipocampo, durante o exercício aeróbico, é pelo menos

parcialmente responsável pela melhora do aprendizado espacial, este associado com o aumento da ativação e neurogênese hipocampal.

Quanto aos mecanismos envolvidos no processo, Vaynman e Gomez-Pinilla, (2005), demonstraram que um curto período de exercício moderado é capaz de aumentar o aprendizado e a memória espacial, associado com aumentos da expressão de BDNF e seu receptor trkB, além de produtos como sinapsina I, proteína envolvida na transmissão glutamatérgica, e CREB, um modulador da transcrição gênica de proteínas como c-fos (marcador indireto de atividade neuronal).

Os benefícios do exercício sobre o aprendizado e a memória são também confirmados em outros paradigmas de avaliação. Radak, Kaneko *et al.*, (2001), através da tarefa de esquivas passiva, demonstraram que animais submetidos a um protocolo crônico de noventa dias de natação, apresentaram significativas melhoras na memória de curta e longa duração. Ao passo que O'callaghan, Ohle *et al.*, (2007), através da tarefa de reconhecimento de um novo objeto, demonstraram que animais submetidos a um protocolo de exercício em esteira, apresentaram uma significativa melhora na memória de curta duração.

5.1.3 GLUTAMATO LIBERADO

De acordo com os nossos resultados, observa-se que o modelo de isquemia *in vitro* foi eficaz na promoção de um aumento significativo das concentrações de glutamato liberado em ambos os grupos experimentais. Estes resultados estão de acordo com a literatura, em que insultos isquêmicos aumentam os níveis de glutamato extracelular como consequência do aumento excessivo de sua liberação (Siesjo, 1992a; b; Milusheva, Doda *et al.*, 1996; Nishizawa, 2001; Fujimoto, Katsuki *et al.*, 2004).

Estudos de prevenção e tratamento da isquemia cerebral demonstram que o pré-condicionamento do sistema pode reduzir os efeitos deletérios da resposta inflamatória, adaptando o metabolismo energético e promovendo efeitos neuroprotetores em diversos níveis (Dirnagl, Simon *et al.*, 2003). Confirmando esta afirmativa, observamos que o protocolo de exercício proposto efetivamente apresentou um efeito significativo sobre a liberação de glutamato, especialmente nas fatias de córtex. Além do que, a análise das

médias individuais demonstrou um aumento significativamente menor das concentrações de glutamato liberado para o grupo exercício isquemia quando este foi comparado ao grupo sedentário isquemia, em ambas as estruturas.

JIA *et al.*, (2009), demonstraram que a realização prévia de exercício físico forçado em esteira, trinta minutos por dia, durante quatro semanas, foi capaz de diminuir a liberação de glutamato e aumentar a liberação de GABA, avaliado por microdiálise na região estriatal, durante um insulto isquêmico *in vivo*. Em seu trabalho argumenta-se sobre a existência de mecanismos protetores intrínsecos, em que a ativação dos receptores pré-sinápticos glutamatérgicos induz a liberação de GABA ou taurina, que potencialmente podem neutralizar a hiperpolarização da membrana neuronal, inibindo a transmissão glutamatérgica (Costa, Leone *et al.*, 2004; Luo e Guo, 2005). Este mecanismo por sua vez, mantém o balanço entre os aminoácidos, prevenindo uma super estimulação, com conseqüente morte celular excitotóxica (Shuaib, Ijaz *et al.*, 1997; Saransaari e Oja, 2008). De acordo com o autor, alguns estudos têm demonstrado que o GABA pode diminuir a liberação de glutamato e aspartato no córtex e hipocampo em modelos de isquemia global, através da inibição pré-sináptica (Ouyang, Guo *et al.*, 2007). Associado ao exercício, pouco se especula sobre os mecanismos inerentes a este efeito, inferindo os resultados apenas a uma possível modulação dos receptores AMPA, NMDA e GABA-B. O receptor GABA-B medeia os efeitos do GABA sobre as membranas pós-sinápticas, limitando o influxo extracelular de Cálcio (Jackson-Friedman, Lyden *et al.*, 1997). Além disso, argumenta-se sobre uma importante participação dos astrócitos na recaptção de glutamato e liberação de GABA (Mckenna, Sonnewald *et al.*, 1996; Pascual, Carceller *et al.*, 1998; Danbolt, 2001; Haberg, Qu *et al.*, 2001; Matthias, Kirchhoff *et al.*, 2003), efeitos possivelmente modulados pelo exercício.

Dentre as possíveis hipóteses a respeito da modulação imposta pelo protocolo de exercício físico sobre a liberação de glutamato, este inerente ao insulto isquêmico, podemos citar seus efeitos sobre a bomba Na⁺, K⁺ ATPase, uma proteína de transporte ativo da membrana plasmática que garante a homeostase eletrolítica dos íons sódio e potássio (De Souza Wyse, Streck *et al.*, 2000).

No sistema nervoso central a Na^+ , K^+ ATPase esta presente em altas concentrações, consumindo cerca de 40-50% do ATP gerado (Erecinska e Silver, 1994). Sua atividade garante significativamente a manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, processo fundamental para o potencial de repouso, assim como para a modulação da liberação e recaptção de neurotransmissores. A diminuição de sua atividade, em virtude dos mais variados insultos energéticos, como a isquemia cerebral, afeta diretamente a atividade neural, induzindo despolarizações, afetando a liberação de glutamato e interrompendo sua recaptção, favorecendo assim o processo de excitotoxicidade e morte celular (Lees, 1991).

Souza, Oliveira *et al.*, (2009), demonstraram que um protocolo de exercício forçado de natação, sessenta minutos por dia, cinco vezes por semana, durante seis semanas, foi capaz de impedir a inibição da atividade da Na^+ , K^+ ATPase, o estresse oxidativo e diminuir o número de crises epiléticas, induzidas por pentilenotetrazol. O pentilenotetrazol é um conhecido antagonista do receptor GABA-A (Huang, Bell-Horner *et al.*, 2001), com potente efeito convulsivante pelas suas ações sobre o sistema GABAérgico e glutamatérgico (Jensen, Applegate *et al.*, 1991; Psarropoulou, Matsokis *et al.*, 1994; Thomsen, 1999; Walsh, Li *et al.*, 1999)

Lima, Oliveira *et al.*, (2009), em um artigo do mesmo grupo de Souza, Oliveira *et al.*, 2009, demonstraram que o mesmo protocolo de exercício forçado de natação também foi capaz de impedir a inibição da Na^+ , K^+ ATPase, em um modelo de traumatismo craniano.

A bomba Na^+ , K^+ ATPase parece ser particularmente sensível aos danos induzidos por agentes oxidantes sobre a composição da membrana plasmática (Siems, Hapner *et al.*, 1996; Dencher, Frenzel *et al.*, 2007; Pari e Murugavel, 2007)

Assim considerando que o exercício regular promove o desenvolvimento de respostas compensatórias ao estresse oxidativo (Salo, Donovan *et al.*, 1991; Viguie, Frei *et al.*, 1993; Somani, Ravi *et al.*, 1995; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Radak, Kaneko *et al.*, 2001; Aksu, Topcu *et al.*, 2009), além de significativas respostas adaptativas envolvendo o consumo de oxigênio e a biogênese mitocondrial (Boveris e Navarro, 2008; Packer, Cadenas *et al.*, 2008), pode-se inferir que a habilidade de recaptção do glutamato frente a um

insulto de privação energética pode ser mantida por um determinado tempo, uma vez que os mecanismos subjacentes a transmissão glutamatérgica resistem à disfunção, em função da otimização funcional imposta pelo exercício.

Alem disso, juntamente as adaptações oxidativas descritas, sugere-se que o exercício possa aumentar a função cerebral pelo aumento da atividade neuronal e da expressão de fatores neurotróficos como o BDNF (Seifert, Brassard *et al.*; Oliff, Berchtold *et al.*, 1998; Widenfalk, Olson *et al.*, 1999; Tong, Shen *et al.*, 2001; Cotman e Berchtold, 2002; O'callaghan, Ohle *et al.*, 2007; Soya, Nakamura *et al.*, 2007; Cechetti, Fochesatto *et al.*, 2008), NGF (Neeper, Gomez-Pinilla *et al.*, 1996; Ang, Wong *et al.*, 2003; Albeck, Sano *et al.*, 2006; Chae e Kim, 2009) e o GDNF (Cotman e Berchtold, 2002; Smith e Zigmond, 2003). O BDNF pode modular a liberação pré sináptica de glutamato, em culturas de neurônios de córtex, cerebelo, estriato e hipocampo, através da fosforilação de proteínas de ancoragem que participam do processo de exocitose, como a sinapsina I (Jovanovic, Czernik *et al.*, 2000).

Resultados prévios em nosso laboratório (não publicados) demonstram que a realização do mesmo protocolo de exercício, aumenta a expressão de outras proteínas de modulação da exocitose, como a sinaptotagmina, da família de proteínas de ligação ao cálcio. Este resultado sugere um intrincado controle e modulação sobre a transmissão glutamatérgica.

O exercício também pode regular a expressão de receptores pós-sinápticos como AMPA e NMDA, tanto em culturas de neurônios hipocampais com cerebrocorticais (Caldeira, Melo, Pereira, Carvalho, Correia *et al.*, 2007; Caldeira, Melo, Pereira, Carvalho, Carvalho *et al.*, 2007; Nakata e Nakamura, 2007). Assim o aumento da atividade neural pode agir como um mecanismo de sobrevivência, que condiciona o sistema a manter-se ativo e plástico frente a insultos.

Os resultados encontrados nas fatias de hipocampo, quanto ao glutamato liberado foram semelhantes aos encontrados nas fatias de córtex, salvo que o efeito isolado do fator exercício físico sobre a liberação de glutamato não apresentou uma diferença estatística. A diferença ocorreu após o insulto isquêmico, com uma interação significativa entre os dois tratamentos.

A não significância dos efeitos isolados do fator exercício pode ser justificada tanto pela sensibilidade da técnica de mensuração empregada, quanto pela alta suscetibilidade do hipocampo a privação energética. Este substrato é uma das mais sensíveis regiões do cérebro aos efeitos danosos impostos por processos isquêmicos, especialmente devido a alta densidade de células excitatórias, como as células piramidais na região de CA1 (Schmidt-Kastner e Freund, 1991).

Thomazi, Boff *et al.*, (2008), observaram um decréscimo substancial da captação de glutamato em fatias de hipocampo, submetidas à privação de sessenta minutos de oxigênio e glicose. Este fenômeno ocorre provavelmente devido ao colapso energético consequente ao insulto isquêmico, uma vez que o suprimento de ATP no cérebro aproxima-se a zero cerca de 4 minutos após o início do insulto (Krause, White *et al.*, 1988). Embora a carga energética se recupere rapidamente no prazo de 15 minutos de reperfusão (Siesjo e Ljunggren, 1973), os autores não observaram nenhum sinal de recuperação na captação de glutamato após uma, três e seis horas de reoxigenação.

Apesar disso, o grupo exercício isquemia apresentou aumentos significativamente menores quanto ao glutamato liberado e acumulado no meio, quando este foi comparado ao grupo sedentário isquemia.

O menor tempo de privação energética de nosso modelo, vinte minutos, somado as características adaptativas impostas pelo exercício, possivelmente influenciaram nestes resultados, corroborando com a discussão anterior para os achados nas fatias de córtex.

Acreditamos que a mensuração da liberação de glutamato através de uma técnica que reproduza uma condição mais fisiológica, como através do preparo de sinaptossomas (Thorne, Wonnacott *et al.*, 1991), possa demonstrar os efeitos gerais impostos pelo exercício sobre a transmissão glutamatérgica, corroborando assim com achados prévios da literatura (Cotman e Berchtold, 2002; Dietrich, Mantese *et al.*, 2005)

5.1.4 APOPTOSE E MORTE CELULAR

De acordo com as mensurações quanto a expressão de proteínas ativas, chaves no processo apoptótico, tanto na ativação (caspase-8 e -9), quanto na efetuação (caspase-3 e AIF), observou-se que o protocolo de isquemia

proposto foi significativamente eficiente em aumentar suas expressões, em ambos os grupos experimentais.

A realização prévia do protocolo de exercício apresentou uma influencia significativo neste processo, ao passo que o aumento da expressão de ambas as proteínas, após o insulto isquêmico, foi significativamente menor para o grupo exercício isquemia quando comparado ao grupo sedentário isquemia. Corroborando com os achados prévios na literatura, o exercício por si só não foi capaz de alterar significativamente a expressão das proteínas apoptóticas nos respectivos grupos controle (Kim, Kim *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados são semelhantes aos encontrado para transmissão glutamatérgica e como discutido anteriormente, em relação às adaptações sobre o estresse oxidativo e modulação da excitabilidade neuronal via fatores de crescimento, é plausível propor que a realização de exercícios de forma preventiva possa resultar em uma melhora da habilidade neuronal em resistir à depleção energética. Estudos têm demonstrado que significativas respostas adaptativas, em função da realização de exercícios regulares, aumentam a capacidade aeróbica, permitindo o aumento do consumo de oxigênio e a biogênese mitocondrial (Packer e Cadenas, 2007; Boveris e Navarro, 2008).

Dentre os mecanismos que podem ser propostos como vias de proteção, podemos citar a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt. Esta via tem sido apontada com uma função importante na regulação de diversos fatores de transcrição. PI3K pode fosforilar lipídios de inositol, produzindo fosfatidilinositol- 3, 4, 5- trifosfato, que juntamente com os seus principais alvos fosforilados, a serina-treonina kinase AKT, modula a transdução de sinais de crescimento celular. AKT, por sua vez, é ativada por fatores de crescimento envolvidos na proliferação celular, inibindo proteínas como BAX, que tornam a membrana mitocondrial permeável às proteínas normalmente limitadas a seu espaço intermembranar, como o citocromo C e AIF (Toker e Newton, 2000; Vanhaesebroeck e Alessi, 2000; Cory e Adams, 2002). A supressão da liberação do citocromo C previne a formação de complexos de ativação das caspases, e a supressão da liberação de proteínas independentes de caspase como o AIF, previne a sua translocação para núcleo e conseqüentemente a fragmentação do DNA (Li, Nijhawan *et al.*, 1997; Cao, Clark *et al.*, 2003).

Estudos como os de Chen e Russo-Neustadt, (2005) e Chae e Kim, (2009), confirmam esta hipótese, uma vez que foi demonstrado que o exercício é capaz ativar a via da fosfatidilinositol 3-quinase via o aumento da expressão de fatores de crescimento como o NGF, BDNF e seu receptor trkB.

Por fim, os resultados finais de viabilidade celular em fatias de hipocampo, reafirmam as hipóteses apresentadas, a respeito da capacidade neuroprotetora do exercício, frente à privação energética.

5.2 DISCUSSÃO GERAL

A realização regular de protocolos de exercício físico tem sido cada vez mais defendida na literatura, como uma forma de garantir a saúde, tratar e prevenir grandes desordens comumente conhecidas. Neste contexto, diversos estudos tem se empenhado na elucidação de seus subseqüentes mecanismos, de forma a garantir a correta execução e a aquisição de resultados.

Inicialmente, uma das grandes preocupações presentes neste estudo surgiu quanto ao modelo e ao protocolo de exercício a ser utilizado. Apesar de todas as dúvidas presentes na literatura quanto ao melhor modelo e os parâmetros como tempo e intensidade a serem impostos, grande parte dos estudos publicados utilizam o paradigma de esteira ou o paradigma voluntário na realização dos experimentos, juntamente aos mais variados protocolos de exercício. Assim contrariando grande parte dos artigos publicados, escolhemos a natação como modelo, juntamente a um protocolo que segue as recomendações do ACSM e AHA, para atividade física e saúde pública de adultos (Haskell, Lee *et al.*, 2007). Apesar de alguns autores como (Gobatto, De Mello *et al.*, 2001) defenderem o uso da natação como modelo, justificando-a como uma atividade inata dos animais, no caso ratos, ela apresenta importantes pontos negativos, destacando o estresse de contenção, somado a necessidade constante de manutenção dos movimentos. Assim torna-se necessário um controle fiel do estado emocional dos animais de forma a garantir a fidedignidade dos resultados.

O neuroproteção em consequência da realização do exercício é apresentado pela literatura, tanto pela sua realização previa, quanto após o insulto isquêmico. Vale ressaltar que grande parte dos trabalhos publicados

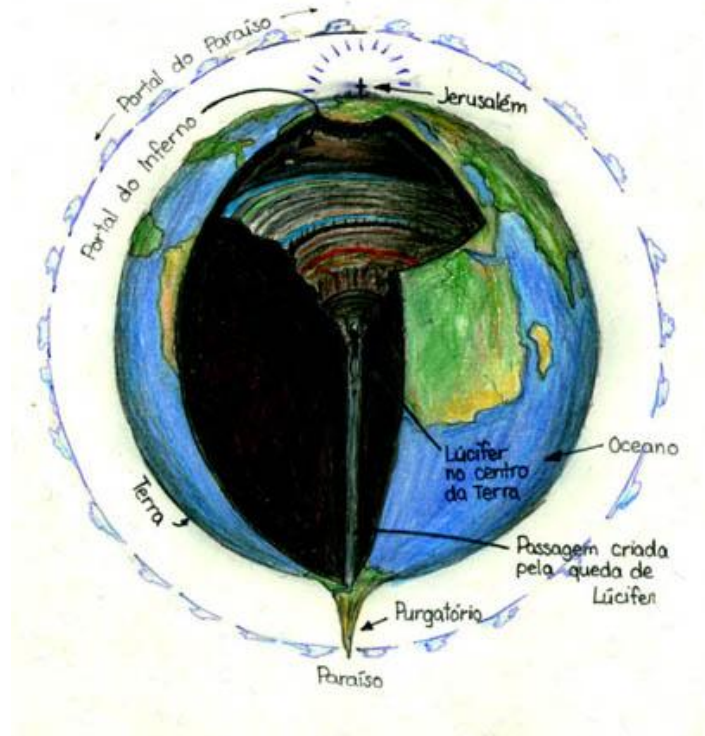
sobre o tema utiliza modelos animais de isquemia *in vivo*. Ambas as condições são acompanhadas por mecanismos benéficos semelhantes, envolvendo as adaptações ao estresse oxidativo, a liberação de fatores de crescimento, a modulação da excitabilidade neural e as adaptações sistêmicas quanto à otimização e utilização dos substratos energéticos.

Em nosso trabalho utilizamos um modelo de privação energética *in vitro*, de forma que pudéssemos avaliar o comportamento intrínseco de estruturas neurais, sem influências compensatórias sistêmicas no momento exato do insulto isquêmico. Nossos resultados corroboram com a literatura a respeito dos efeitos benéficos e protetores do exercício, além de demonstrar que vias de controle celular podem ser influenciados e adaptativamente garantir uma maior resistência e sobrevivência a insultos isquêmicos.

O estudo dos mecanismos envolvendo o exercício físico e a isquemia cerebral, juntamente a apoptose celular, ainda precisam ser mais aprofundados, principalmente através da análise de proteínas reguladoras do processo apoptótico. O aumento desenfreado da regulação da proliferação celular é considerado uma das respostas adaptativas compensatórias ao aumento da apoptose neuronal nos insultos isquêmicos. Este fenômeno é responsável em alguns casos, por estados patológicos, como por exemplo, crises epiléticas (Liu, Solway *et al.*, 1998).

Em nosso laboratório, o estudo dos mecanismos neuroprotetores subjacentes a realização profilática de protocolos de exercício de natação, tem abrangido inúmeros mecanismos, como a regulação do óxido nítrico, a homeostase do cálcio e a regulação de vias envolvendo canabinóides endógenos. Ambos os trabalhos apresentam resultados significativos quanto adaptabilidade e conseqüente neuroproteção imposta pelo exercício.

(...)



“Revela-o som de arroio, que descende
Por brecha do rochedo, que escavara
Em torno serpeando, e pouco pende.

Para voltar do mundo à face clara
Nessa vereda escusa penetramos:
De nós nenhum de repousar cuidara.

Vírgílio e eu, logo após, nos elevamos,
Té que do ledo céu as cousas belas
Por circular aberta divisamos:

Saindo a ver tornamos as estrelas”

*Canto XXXIV – “Judeca – Lúcifer – Bruto – Cássio – Judas – Centro da Terra”
Divina Comédia - Dante Alighieri*

- ✓ O protocolo de natação proposto foi capaz de impor alterações fisiológicas, quanto à massa corporal e muscular, sem alterar componentes gerais de estresse emocional;
- ✓ O protocolo de natação foi capaz de proporcionar uma melhora no desempenho cognitivo, avaliado pelo teste de reconhecimento de objetos, modalidade espacial;
- ✓ O protocolo de natação proposto foi capaz de diminuir as concentrações de glutamato liberado no meio e a expressão de importantes proteínas do processo apoptótico, como Caspases -3, -8 e -9, em fatias de córtex e hipocampo, após protocolo de privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*);
- ✓ O protocolo de natação proposto foi capaz de diminuir a expressão de AIF, proteína apoptótica independente de caspase, em fatias hipocampo, após protocolo privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*);
- ✓ O protocolo de exercício proposto foi capaz de garantir uma maior sobrevivência celular, após protocolo de privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*).

“Tu, que no val feliz, aonde as graças
E as palmas de Cipião colheu da glória,
Quando Aníbal vexavam só desgraças,

“Mil leões apresaste por memória;
Que, aos irmãos se ajudaras na alta guerra,
Se cre triunfo registrasse a história

“Dos fortes filhos da fecunda Terra!
Ao fundo transportar-nos se servido,
Onde ao Cocito o frio as águas cerra:

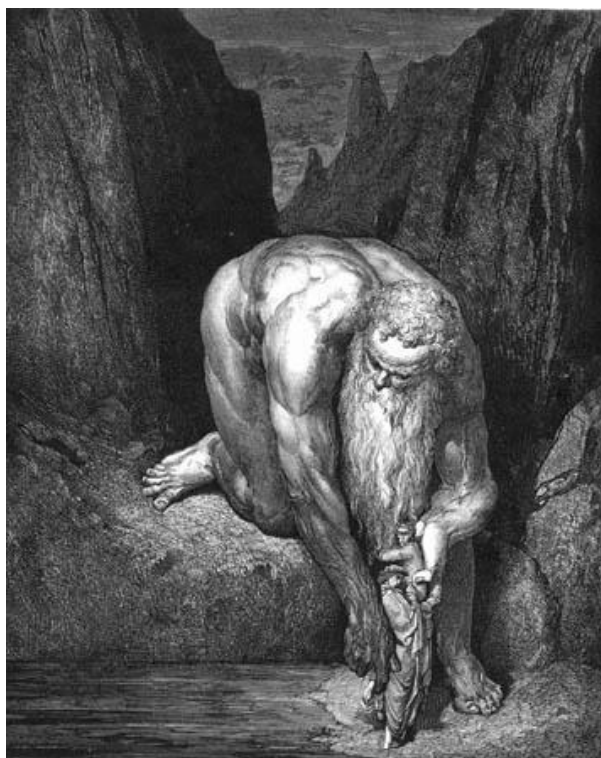


Ilustração de Gustave Doré (séc XIX).

“Te hemos a Tifo e a Tício preferido.
Dar pode este varão o que mais se ama:
Curvando-te compraz ao seu pedido.

“No mundo pode restaurar-te a fama,
Pois vive e ainda longa vida espera,
Salvo se a Graça antes do tempo o chama”.

(...)

*Canto XXXIV – “ Gigantes – Nemrod – Efialte – Anteu”
Divina Comédia - Dante Alighieri*

ABBOTT, R. D. *et al.* Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA* [S.I.], v. 292, n. 12, p. 1447-53, Sep 22 2004.

ABRAHAM, W. C. How long will long-term potentiation last? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [S.I.], v. 358, n. 1432, p. 735-44, Apr 29 2003.

ADLARD, P. A.; COTMAN, C. W. Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience* [S.I.], v. 124, n. 4, p. 985-92, 2004.

AFONSO, V. M.; EIKELBOOM, R. Relationship between wheel running, feeding, drinking, and body weight in male rats. *Physiol Behav* [S.I.], v. 80, n. 1, p. 19-26, Oct 2003.

AGGLETON, J. P. One-trial object recognition by rats. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, v. 37, n. 4, p. 279-294, Nov 1985.

AKSU, I. *et al.* Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 452, n. 3, p. 281-5, Mar 20 2009.

ALBECK, D. S. *et al.* Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 168, n. 2, p. 345-8, Apr 3 2006.

ALLEN, D. L. *et al.* Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 90, n. 5, p. 1900-8, May 2001.

ALMEIDA, P. W. *et al.* Swim training suppresses tumor growth in mice. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 107, n. 1, p. 261-5, Jul 2009.

ANDERSEN, M. L. *et al.* Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 37, n. 6, p. 791-7, Jun 2004.

ANG, E. T. *et al.* Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res* [S.I.], v. 1113, n. 1, p. 186-93, Oct 3 2006.

ANG, E. T.; GOMEZ-PINILLA, F. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem* [S.I.], v. 14, n. 24, p. 2564-71, 2007.

ANG, E. T. *et al.* Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience* [S.I.], v. 118, n. 2, p. 335-45, 2003.

_____. Cytokine changes in the horizontal diagonal band of Broca in the septum after running and stroke: a correlation to glial activation. *Neuroscience* [S.I.], v. 129, n. 2, p. 337-47, 2004.

ANKARCRONA, M. *et al.* Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* [S.I.], v. 15, n. 4, p. 961-73, Oct 1995.

AOKI, M. S.; SEELANDER, M. C. L. Suplementação lipídica para atividades de "endurance". *Rev. Paul Educ Fís*, v. 13, n. 2, p. 230-38, 1999.

ARAUJO, D. M. *et al.* Insulin-like growth factor-1 (somatomedin-C) receptors in the rat brain: distribution and interaction with the hippocampal cholinergic system. *Brain Res [S.I.]*, v. 484, n. 1-2, p. 130-8, Apr 10 1989.

BAKER, M. A.; HORVATH, S. M. Influence of Water Temperature on Oxygen Uptake by Swimming Rats. *J Appl Physiol [S.I.]*, v. 19, p. 1215-8, Nov 1964.

BALDWIN, K. M. *et al.* Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *Am J Physiol [S.I.]*, v. 222, n. 2, p. 373-8, Feb 1972.

BARNETT, S. A. *The rat : a study in behavior*. Revised ed. ed. Chicago ; London: University of Chicago Press, 1975.

BOLDIN, M. P. *et al.* Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell [S.I.]*, v. 85, n. 6, p. 803-15, Jun 14 1996.

BONITA, R. *et al.* The global stroke initiative. *Lancet Neurol [S.I.]*, v. 3, n. 7, p. 391-3, Jul 2004.

BOUILLET, P. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science [S.I.]*, v. 286, n. 5445, p. 1735-8, Nov 26 1999.

BOULE, N. G. *et al.* Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA [S.I.]*, v. 286, n. 10, p. 1218-27, Sep 12 2001.

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life [S.I.]*, v. 60, n. 5, p. 308-14, May 2008.

BRADFORD, H. F. *et al.* Glutamine--a major substrate for nerve endings. *J Neurochem [S.I.]*, v. 30, n. 6, p. 1453-9, Jun 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem [S.I.]*, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BREW, H.; ATTWELL, D. Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature [S.I.]*, v. 327, n. 6124, p. 707-9, Jun 25-Jul 1 1987.

BROOKS, G. A.; MERCIER, J. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J Appl Physiol [S.I.]*, v. 76, n. 6, p. 2253-61, Jun 1994.

BROWN, M. M. *et al.* *Stroke medicine*. London: Taylor & Francis, 2006.

BURSCHE, W. *et al.* Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 245-51, Jun 1992.

BUTLER, M. P. *et al.* Dissection of tumor-necrosis factor-alpha inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. *Neuroscience* [S.I.], v. 124, n. 2, p. 319-26, 2004.

CALDEIRA, M. V. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem* [S.I.], v. 282, n. 17, p. 12619-28, Apr 27 2007.

_____. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* [S.I.], v. 35, n. 2, p. 208-19, Jun 2007.

CAO, G. *et al.* Translocation of apoptosis-inducing factor in vulnerable neurons after transient cerebral ischemia and in neuronal cultures after oxygen-glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 23, n. 10, p. 1137-50, Oct 2003.

CAPETTINI, A. B. *Memória e aprendizado em camundongos fêmeas deficientes do transportador vesicular de acetilcolina*. Belo Horizonte: UFMG, 2009.

CARTRON, P. F. *et al.* The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* [S.I.], v. 16, n. 5, p. 807-18, Dec 3 2004.

CASTELLANOS, M. *et al.* Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 982-7, Apr 2002.

_____. Evolving paradigms for neuroprotection: molecular identification of ischemic penumbra. *Cerebrovasc Dis* [S.I.], v. 21 Suppl 2, p. 71-9, 2006.

CASTILLO, J.; LEIRA, R. Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* [S.I.], v. 11 Suppl 1, p. 40-8, 2001.

CECHETTI, F. *et al.* Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res* [S.I.], v. 1188, p. 182-8, Jan 10 2008.

_____. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* [S.I.], v. 1157, p. 121-5, Jul 9 2007.

CERTO, M. *et al.* Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* [S.I.], v. 9, n. 5, p. 351-65, May 2006.

CHAE, C. H.; KIM, H. T. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem Int* [S.I.], v. 55, n. 4, p. 208-13, Sep 2009.

CHAI, J. *et al.* Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* [S.I.], v. 406, n. 6798, p. 855-62, Aug 24 2000.

CHANG, H. C. *et al.* Effects of treadmill training on motor performance and extracellular glutamate level in striatum in rats with or without transient middle cerebral artery occlusion. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 205, n. 2, p. 450-5, Dec 28 2009.

CHEN, M. J.; RUSSO-NEUSTADT, A. A. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res* [S.I.], v. 135, n. 1-2, p. 181-93, Apr 27 2005.

CHEN, Y. W. *et al.* Exercise pretraining protects against cerebral ischaemia induced by heat stroke in rats. *Br J Sports Med* [S.I.], v. 41, n. 9, p. 597-602, Sep 2007.

CHENG, E. H. *et al.* BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 705-11, Sep 2001.

CHENNAOUI, M. *et al.* Effects of physical training on IL-1beta, IL-6 and IL-1ra concentrations in various brain areas of the rat. *Eur Cytokine Netw* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 8-14, Mar 2008.

CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* [S.I.], v. 23, n. 9, p. 1261-76, Nov 1992.

CIMAROSTI, H. *et al.* Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3beta. *Neurochem Res* [S.I.], v. 30, n. 2, p. 191-9, Feb 2005.

COGGAN, A. R. *et al.* Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am J Physiol* [S.I.], v. 268, n. 3 Pt 1, p. E375-83, Mar 1995.

CONTARTEZE, R. V. L. *et al.* Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato. *Ver Bras Med Esporte*, v. 13, n. 3, p. 169-174, Mai/Jun 2007.

CONTI, F.; WEINBERG, R. J. Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 10, p. 451-8, Oct 1999.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* [S.I.], v. 2, n. 9, p. 647-56, Sep 2002.

COSTA, C. *et al.* Coactivation of GABA(A) and GABA(B) receptor results in neuroprotection during in vitro ischemia. *Stroke* [S.I.], v. 35, n. 2, p. 596-600, Feb 2004.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 25, n. 6, p. 295-301, Jun 2002.

COTMAN, C. W. *et al.* Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 30, n. 9, p. 464-72, Sep 2007.

CRESPILHO, D. *et al.* E. Efeitos do treinamento físico sobre aspectos metabólicos e imunológicos em ratos administrados com dexametasona. *Biosci. J.* May/Aug;22(2): 109-118, 2006

CRESPILHO, D. M. *et al.* Effects of physical training on the immune system in diabetic rats. *Int J Diabetes Dev Ctries* [S.I.], v. 30, n. 1, p. 33-7, Jan.

CRYNNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. *Genes Dev* [S.I.], v. 12, n. 11, p. 1551-70, Jun 1 1998.

CUNNINGHAM, A. J. *et al.* Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 203, n. 1, p. 17-20, Jan 12 1996.

CURTIS, D. R.; WATKINS, J. C. Analogues of glutamic and gamma-amino-n-butyric acids having potent actions on mammalian neurones. *Nature* [S.I.], v. 191, p. 1010-1, Sep 2 1961.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Bax activation by Bim? *Cell Death Differ* [S.I.], v. 16, n. 9, p. 1187-91, Sep 2009.

DALLMAN, M. F. Stress update Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab* [S.I.], v. 4, n. 2, p. 62-9, Mar 1993.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001.

DANTE, A. *et al.* *The divine comedy of Dante Alighieri. Vol. 1, Inferno.* Oxford: Oxford University Press, 1997.

DAVIS, W. *et al.* Exercise pre-conditioning ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke by enhancing basal lamina. *Neurol Res* [S.I.], v. 29, n. 4, p. 382-7, Jun 2007.

DE FLORA, A. *et al.* Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca(2+)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *Cell Biochem Biophys* [S.I.], v. 28, n. 1, p. 45-62, 1998.

DE KLOET, E. R. *et al.* Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 269-301, Jun 1998.

DE SOUZA WYSE, A. T. *et al.* Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* [S.I.], v. 25, n. 7, p. 971-5, Jul 2000.

DEMIREL, H. A. *et al.* Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 86, n. 3, p. 1002-8, Mar 1999.

DENCHER, N. A. *et al.* Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 1100, p. 291-8, Apr 2007.

DENG, J. *et al.* BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 171-85, Aug 2007.

DENGEL, D. R. *et al.* Improvements in blood pressure, glucose metabolism, and lipoprotein lipids after aerobic exercise plus weight loss in obese, hypertensive middle-aged men. *Metabolism* [S.I.], v. 47, n. 9, p. 1075-82, Sep 1998.

DERE, E. *et al.* The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* [S.I.], v. 31, n. 5, p. 673-704, 2007.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* [S.I.], v. 13, n. 3, p. 239-52, Feb 1 1999.

DIAS, L. A. A. *et al.* Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 58, n. 4, p.1047-1054, 2000.

DIETRICH, M. O. *et al.* Exercise affects glutamate receptors in postsynaptic densities from cortical mice brain. *Brain Res* [S.I.], v. 1065, n. 1-2, p. 20-5, Dec 14 2005.

DING, Y. *et al.* Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience* [S.I.], v. 124, n. 3, p. 583-91, 2004.

DING, Y. H. *et al.* Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. *Neurol Res* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 184-9, Mar 2006.

DIRNAGL, U. *et al.* Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 26, n. 5, p. 248-54, May 2003.

DISHMAN, R. K. *et al.* Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring)* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 345-56, Mar 2006.

DROSTE, S. K. *et al.* Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology* [S.I.], v. 86, n. 1, p. 26-37, 2007.

DUDLEY, G. A. *et al.* Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 53, n. 4, p. 844-50, Oct 1982.

EHNINGER, D.; KEMPERMANN, G. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex* [S.I.], v. 13, n. 8, p. 845-51, Aug 2003.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* [S.I.], v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 43, n. 1, p. 37-71, May 1994.

FAGNI, L. *et al.* Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 80-8, Feb 2000.

FEDIUC, S. *et al.* Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 100, n. 6, p. 1867-75, Jun 2006.

FEIGIN, V. L. *et al.* Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* [S.I.], v. 2, n. 1, p. 43-53, Jan 2003.

FITZSIMONS, D. P. *et al.* Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 68, n. 5, p. 1950-5, May 1990.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* [S.I.], v. 42, n. 1, p. 1-11, Jan 1984.

FRICK, K. M. *et al.* The effects of nerve growth factor on spatial recent memory in aged rats persist after discontinuation of treatment. *J Neurosci* [S.I.], v. 17, n. 7, p. 2543-50, Apr 1 1997.

FUJIMOTO, S. *et al.* Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci Res* [S.I.], v. 50, n. 2, p. 179-87, Oct 2004.

GAHWILER, B. H. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 329-42, Dec 1981.

GALBO, H. *et al.* Increased hepatic glycogen synthetase and decreased phosphorylase in trained rats. *Acta Physiol Scand* [S.I.], v. 107, n. 3, p. 269-72, Nov 1979.

GIDDAY, J. M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 437-48, Jun 2006.

GINSBERG, M. D. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* [S.I.], v. 34, n. 1, p. 214-23, Jan 2003.

GLAZNER, G. W. *et al.* Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *J Neurosci* [S.I.], v. 20, n. 10, p. 3641-9, May 15 2000.

GLEESON, M. Interleukins and exercise. *J Physiol* [S.I.], v. 529 Pt 1, p. 1, Nov 15 2000.

GOBATTO, C. A. *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* [S.I.], v. 130, n. 1, p. 21-7, Aug 2001.

GOBBI, L. T. *et al.* Exercise programs improve mobility and balance in people with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* [S.I.], v. 15 Suppl 3, p. S49-52, Dec 2009.

GOMES-FILHO, A. *et al.* Selective increase of Angiotensin-(1-7) and its receptor in spontaneously hypertensive rat hearts subjected to physical training. *Exp Physiol* [S.I.], Feb 15 2008.

GOMES, R. J. *et al.* Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Horm IGF Res* [S.I.], v. 16, n. 5-6, p. 326-31, Oct-Dec 2006.

_____. Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-1 in diabetic rats. *Hippocampus* [S.I.], v. 19, n. 10, p. 981-7, Oct 2009.

GOMEZ-PINILLA, F. *et al.* Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 88, n. 5, p. 2187-95, Nov 2002.

GONZALEZ-GARCIA, M. *et al.* bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 92, n. 10, p. 4304-8, May 9 1995.

GULVE, E. A. *et al.* Effects of wheel running on glucose transporter (GLUT4) concentration in skeletal muscle of young adult and old rats. *Mech Ageing Dev* [S.I.], v. 67, n. 1-2, p. 187-200, Feb 1993.

HABERG, A. *et al.* Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of astrocytes in neuronal survival. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 21, n. 12, p. 1451-63, Dec 2001.

HALL, C.S.. Emotional behavior in the rat 1. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*, v. 18, p. 385-403, 1934.

HANISCH, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 140-55, Nov 2002.

HASKELL, W. L. *et al.* Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc* [S.I.], v. 39, n. 8, p. 1423-34, Aug 2007.

HAYES, K. *et al.* Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol* [S.I.], v. 115, n. 3, p. 289-96, Mar 2008.

HEGDE, R. *et al.* Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* [S.I.], v. 277, n. 1, p. 432-8, Jan 4 2002.

HICKSON, R. C. *et al.* Repeated development and regression of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 54, n. 3, p. 794-7, Mar 1983.

HOLLMANN, M. *et al.* Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Ren Physiol Biochem* [S.I.], v. 17, n. 3-4, p. 182-3, May-Aug 1994.

HORN, A. P. *et al.* Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res* [S.I.], v. 30, n. 3, p. 355-61, Mar 2005.

HOROWITZ, J. F.; KLEIN, S. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr* [S.I.], v. 72, n. 2 Suppl, p. 558S-63S, Aug 2000.

HUANG, D. C.; STRASSER, A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* [S.I.], v. 103, n. 6, p. 839-42, Dec 8 2000.

HUANG, R. Q. *et al.* Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 298, n. 3, p. 986-95, Sep 2001.

ISHIHARA, A. *et al.* The relationship of voluntary running to fibre type composition, fibre area and capillary supply in rat soleus and plantaris muscles. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* [S.I.], v. 62, n. 3, p. 211-5, 1991.

IVY, J. L. *et al.* Exercise training and glucose uptake by skeletal muscle in rats. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 1393-6, Nov 1983.

JACKSON-FRIEDMAN, C. *et al.* High dose baclofen is neuroprotective but also causes intracerebral hemorrhage: a quantal bioassay study using the intraluminal suture occlusion method. *Exp Neurol* [S.I.], v. 147, n. 2, p. 346-52, Oct 1997.

JAMES, D. E.; KRAEGEN, E. W. The effect of exercise training on glycogen, glycogen synthase and phosphorylase in muscle and liver. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* [S.I.], v. 52, n. 3, p. 276-81, 1984.

JENSEN, F. E. *et al.* Differential effects of perinatal hypoxia and anoxia on long term seizure susceptibility in the rat. *Life Sci* [S.I.], v. 49, n. 5, p. 399-407, 1991.

JIA, J. *et al.* Pre-ischemic treadmill training affects glutamate and gamma aminobutyric acid levels in the striatal dialysate of a rat model of cerebral ischemia. *Life Sci*, v. 84, n. 15-16, p. 505-11, Apr 10 2009.

JIANG, X. *et al.* Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* [S.I.], v. 299, n. 5604, p. 223-6, Jan 10 2003.

JOVANOVIC, J. N. *et al.* Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* [S.I.], v. 3, n. 4, p. 323-9, Apr 2000.

KANAI, Y. *et al.* A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. *FASEB J* [S.I.], v. 7, n. 15, p. 1450-9, Dec 1993.

KAR, S. *et al.* Insulin-like growth factors-I and -II differentially regulate endogenous acetylcholine release from the rat hippocampal formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 94, n. 25, p. 14054-9, Dec 9 1997.

KERR, J. F. *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972.

KIM, M. W. *et al.* Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res* [S.I.], v. 1052, n. 1, p. 16-21, Aug 2 2005.

KIM, S. H. *et al.* Treadmill exercise increases cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. *Life Sci* [S.I.], v. 71, n. 11, p. 1331-40, Aug 2 2002.

KINGWELL, B. A. *et al.* The effects of voluntary running on cardiac mass and aortic compliance in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 181-5, Feb 1998.

KRAMER, A. F. *et al.* Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* [S.I.], v. 400, n. 6743, p. 418-9, Jul 29 1999.

KRAUSE, G. S. *et al.* Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Crit Care Med* [S.I.], v. 16, n. 7, p. 714-26, Jul 1988.

KROEMER, G. *et al.* The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* [S.I.], v. 60, p. 619-42, 1998.

KUWANA, T. *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 525-35, Feb 18 2005.

LAMBERT, K. G. *et al.* Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. *Physiol Behav* [S.I.], v. 65, n. 1, p. 43-9, Aug 1998.

LANCHA, A. H., JR. *et al.* Effect of aspartate, asparagine, and carnitine supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a moderate exercise. *Physiol Behav* [S.I.], v. 57, n. 2, p. 367-71, Feb 1995.

LATIKKA, P. *et al.* Relationship between the risk of breast cancer and physical activity. An epidemiological perspective. *Sports Med* [S.I.], v. 26, n. 3, p. 133-43, Sep 1998.

LEASURE, J. L.; JONES, M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* [S.I.], v. 156, n. 3, p. 456-65, Oct 15 2008.

LEBO, D. A simplified method for measuring emotional defection in the rat. *Science* [S.I.], v. 118, n. 3085, p. 352-3, Sep 25 1953.

LEES, G. J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev* [S.I.], v. 16, n. 3, p. 283-300, Sep-Dec 1991.

LEEUEWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* [S.I.], v. 8, n. 7, p. 829-38, Jun 2001.

LEEUEWENBURGH, C. *et al.* Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* [S.I.], v. 272, n. 1 Pt 2, p. R363-9, Jan 1997.

LEME, J. A. *et al.* Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. *Growth Horm IGF Res* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 262-6, Jun 2009.

LETAI, A. *et al.* Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* [S.I.], v. 2, n. 3, p. 183-92, Sep 2002.

LI, H. *et al.* Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* [S.I.], v. 94, n. 4, p. 491-501, Aug 21 1998.

LI, J. *et al.* Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise preconditioning in rats. *Neurol Res* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 404-8, Jun 2004.

LI, L. Y. *et al.* Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* [S.I.], v. 412, n. 6842, p. 95-9, Jul 5 2001.

LI, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* [S.I.], v. 91, n. 4, p. 479-89, Nov 14 1997.

LIEBELT, B. *et al.* Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. *Neuroscience* [S.I.], v. 166, n. 4, p. 1091-100, Apr 14.

LIEBLICH, I.; GUTTMAN, R. Analysis of emotional defecation under severe and mild stress--evidence for genotype-situation interaction. *Life Sci* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 301-9, Mar 15 1968.

LIMA, F. D. *et al.* Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Res* [S.I.], v. 1279, p. 147-55, Jul 7 2009.

LINDSTEN, T. *et al.* The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 1389-99, Dec 2000.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* [S.I.], v. 79, n. 4, p. 1431-568, Oct 1999.

LIU, J. *et al.* Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* [S.I.], v. 18, n. 19, p. 7768-78, Oct 1 1998.

LOOY, H.; EIKELBOOM, R. Wheel running, food intake, and body weight in male rats. *Physiol Behav* [S.I.], v. 45, n. 2, p. 403-5, Feb 1989.

LOPEZ, A. D. *et al.* Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* [S.I.], v. 367, n. 9524, p. 1747-57, May 27 2006.

LOVE, S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [S.I.], v. 27, n. 2, p. 267-82, Apr 2003.

LUO, C.; GUO, L.J. Effect of taurine on acute ischemia-induced neuron apoptosis in rats. *Chinese Pharmacology Bulletin*, v. 90, n. 9, p. 1057–1061, 2005.

LUO, X. *et al.* Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell [S.I.]*, v. 94, n. 4, p. 481-90, Aug 21 1998.

MACDOUGALL, J. D. *et al.* Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training. *J Appl Physiol [S.I.]*, v. 84, n. 6, p. 2138-42, Jun 1998.

MARKOWSKA, A. L. *et al.* Selective effects of nerve growth factor on spatial recent memory as assessed by a delayed nonmatching-to-position task in the water maze. *J Neurosci [S.I.]*, v. 16, n. 10, p. 3541-8, May 15 1996.

MARLISS, E. B. *et al.* Gender differences in glucoregulatory responses to intense exercise. *J Appl Physiol [S.I.]*, v. 88, n. 2, p. 457-66, Feb 2000.

MARTIN, W. H., 3RD. Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. *Exerc Sport Sci Rev [S.I.]*, v. 24, p. 203-31, 1996.

MARTINS, L. M. *et al.* The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem [S.I.]*, v. 277, n. 1, p. 439-44, Jan 4 2002.

MATTHIAS, K. *et al.* Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci [S.I.]*, v. 23, n. 5, p. 1750-8, Mar 1 2003.

MATTSON, M. P. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci [S.I.]*, v. 21, n. 2, p. 53-7, Feb 1998.

_____. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol [S.I.]*, v. 1, n. 2, p. 120-9, Nov 2000.

MATTSON, M. P. *et al.* Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res [S.I.]*, v. 301, n. 1, p. 173-87, Jul 2000.

MCARDLE, W. D. *et al.* *Exercise physiology : nutrition, energy, and human performance*. 7th. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2010.

MCEWEN, B. S. *et al.* Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature [S.I.]*, v. 220, n. 5170, p. 911-2, Nov 30 1968.

MCKAY, S. E. *et al.* Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning. *Learn Mem [S.I.]*, v. 6, n. 3, p. 193-215, May-Jun 1999.

MCKENNA, M. C. *et al.* Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem* [S.I.], v. 66, n. 1, p. 386-93, Jan 1996.

MELLO, P. B. *et al.* Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc* [S.I.], v. 80, n. 2, p. 301-9, Jun 2008.

MERRY, D. E.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 20, p. 245-67, 1997.

MILUSHEVA, E. A. *et al.* Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and [Ca²⁺]_o-dependent and independent release of [3H]dopamine in rat striatal slices. *Neurochem Int* [S.I.], v. 28, n. 5-6, p. 501-7, May-Jun 1996.

MONETTE, R. *et al.* A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Brain Res Protoc* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 99-108, Jan 1998.

Montgomery, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **48**, 254–260, 1958.

MOORE, R. L. Cellular adaptations of the heart muscle to exercise training. *Ann Med* [S.I.], v. 30 Suppl 1, p. 46-53, Aug 1998.

MORASKA, A. *et al.* Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [S.I.], v. 279, n. 4, p. R1321-9, Oct 2000.

MOUSTAFA, R. R.; BARON, J. C. Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 153 Suppl 1, p. S44-54, Mar 2008.

MUZIO, M. *et al.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* [S.I.], v. 85, n. 6, p. 817-27, Jun 14 1996.

NAKAJIMA, K. *et al.* The effect of walking on regional blood flow and acetylcholine in the hippocampus in conscious rats. *Auton Neurosci* [S.I.], v. 103, n. 1-2, p. 83-92, Jan 31 2003.

NAKATA, H.; NAKAMURA, S. Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling. *FEBS Lett* [S.I.], v. 581, n. 10, p. 2047-54, May 15 2007.

NEDERGAARD, M. *et al.* Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 748-55, Sep 2002.

NEEPER, S. A. *et al.* Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* [S.I.], v. 726, n. 1-2, p. 49-56, Jul 8 1996.

NEGRAO, C. E. *et al.* Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 72, n. 5, p. 1749-53, May 1992.

NEWMAN, G. C. *et al.* Glucose utilization of ischemic hippocampal slices. *J Neurosci Methods* [S.I.], v. 28, n. 1-2, p. 23-34, May 1989.

NICHOLLS, D. G. *et al.* Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* [S.I.], v. 49, n. 1, p. 50-7, Jul 1987.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* [S.I.], v. 22, n. 8, p. 299-306, Aug 1997.

NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* [S.I.], v. 69, n. 4, p. 369-81, Jun 15 2001.

NORABERG, J. Organotypic brain slice cultures: an efficient and reliable method for neurotoxicological screening and mechanistic studies. *Altern Lab Anim* [S.I.], v. 32, n. 4, p. 329-37, Oct 2004.

O'BRIEN, R. J. *et al.* Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 364-9, Jun 1998.

O'CALLAGHAN, R. M. *et al.* The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 176, n. 2, p. 362-6, Jan 25 2007.

OLIFF, H. S. *et al.* Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* [S.I.], v. 61, n. 1-2, p. 147-53, Oct 30 1998.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 14, p. 453-501, 1991.

ORRENIUS, S. *et al.* Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 4, n. 7, p. 552-65, Jul 2003.

OSORIO, R. A. *et al.* Swimming of pregnant rats at different water temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* [S.I.], v. 135, n. 4, p. 605-11, Aug 2003.

OTERA, H. *et al.* Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J* [S.I.], v. 24, n. 7, p. 1375-86, Apr 6 2005.

OUYANG, C. *et al.* Enhanced activity of GABA receptors inhibits glutamate release induced by focal cerebral ischemia in rat striatum. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 420, n. 2, p. 174-8, Jun 13 2007.

PACKER, L.; CADENAS, E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radic Res* [S.I.], v. 41, n. 9, p. 951-2, Sep 2007.

PACKER, L. *et al.* Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 44, n. 2, p. 123-5, Jan 15 2008.

PAILLARD J. Réflexions sur l'usage du concept de plasticité en neurobiologie. *J Psychol*, v.1, p. 33-47, 1976.

PAJONK, F. G. *et al.* Hippocampal plasticity in response to exercise in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* [S.I.], v. 67, n. 2, p. 133-43, Feb.

PARI, L.; MURUGAVEL, P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology* [S.I.], v. 234, n. 1-2, p. 44-50, May 5 2007.

PASCUAL, J. M. *et al.* Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* [S.I.], v. 29, n. 5, p. 1048-56; discussion 1056-7, May 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Compact 6th ed. ed. London: Academic, 2009.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* [S.I.], v. 80, n. 3, p. 1055-81, Jul 2000.

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med* [S.I.], v. 34, n. 4, p. 246-51, Aug 2000.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.

PINHEIRO, A. C. *et al.* Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus* [S.I.], v. 19, n. 11, p. 1123-9, Nov 2009.

POLSTER, B. M. *et al.* Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* [S.I.], v. 280, n. 8, p. 6447-54, Feb 25 2005.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho*. 3a ed. São Paulo: Manole, 2000.

POWERS, S. K. *et al.* Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* [S.I.], v. 266, n. 2 Pt 2, p. R375-80, Feb 1994.

_____. High intensity exercise training-induced metabolic alterations in respiratory muscles. *Respir Physiol* [S.I.], v. 89, n. 2, p. 169-77, Aug 1992.

PSARROPOULOU, C. *et al.* Pentylentetrazol-induced seizures decrease gamma-aminobutyric acid-mediated recurrent inhibition and enhance adenosine-mediated depression. *Epilepsia* [S.I.], v. 35, n. 1, p. 12-9, Jan-Feb 1994.

RADAK, Z. *et al.* Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* [S.I.], v. 38, n. 1, p. 17-23, Jan 2001.

RAMSDEN, M. *et al.* Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion. *Brain Res* [S.I.], v. 971, n. 2, p. 239-44, May 9 2003.

REUL, J. M. *et al.* The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 405, n. 1-3, p. 235-49, Sep 29 2000.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 5, n. 11, p. 897-907, Nov 2004.

RISEDAL, A. *et al.* Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 19, n. 9, p. 997-1003, Sep 1999.

RODNICK, K. J. *et al.* Variations in running activity and enzymatic adaptations in voluntary running rats. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 66, n. 3, p. 1250-7, Mar 1989.

ROLLAND, Y. *et al.* Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clin Geriatr Med* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 75-87, Feb.

ROTONDA, J. *et al.* The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* [S.I.], v. 3, n. 7, p. 619-25, Jul 1996.

SACCO, R. L. *et al.* Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: co-sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 577-617, Feb 2006.

SALMONS, S.; HENRIKSSON, J. The adaptive response of skeletal muscle to increased use. *Muscle Nerve* [S.I.], v. 4, n. 2, p. 94-105, Mar-Apr 1981.

SALO, D. C. *et al.* HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 239-46, 1991.

SALVESEN, G. S.; DUCKETT, C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 401-10, Jun 2002.

SANCHEZ-PRIETO, J.; GONZALEZ, P. Occurrence of a large Ca²⁺-independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptosomes). *J Neurochem* [S.I.], v. 50, n. 4, p. 1322-4, Apr 1988.

SAPOLSKY, R. M. *et al.* Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci* [S.I.], v. 5, n. 5, p. 1222-7, May 1985.

_____. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 55-89, Feb 2000.

SARANSAARI, P.; OJA, S. S. Characteristics of GABA release induced by free radicals in mouse hippocampal slices. *Neurochem Res* [S.I.], v. 33, n. 3, p. 384-93, Mar 2008.

SASTRY, P. S.; RAO, K. S. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* [S.I.], v. 74, n. 1, p. 1-20, Jan 2000.

SCHAIBLE, T. F. *et al.* Chronic swimming reverses cardiac dysfunction and myosin abnormalities in hypertensive rats. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 60, n. 4, p. 1435-41, Apr 1986.

SCHEUER, J. *et al.* Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *J Clin Invest* [S.I.], v. 70, n. 6, p. 1300-5, Dec 1982.

SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* [S.I.], v. 40, n. 3, p. 599-636, 1991.

SCOPEL, D. *et al.* Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* [S.I.], v. 71, n. 1-3, p. 155-9, Dec 11 2006.

SEBURN, K. L.; GARDINER, P. Adaptations of rat lateral gastrocnemius motor units in response to voluntary running. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 78, n. 5, p. 1673-8, May 1995.

SEIFERT, T. *et al.* Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [S.I.], v. 298, n. 2, p. R372-7, Feb.

SENE-FIORESE, M. *et al.* Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* [S.I.], v. 16, n. 10, p. 2217-22, Oct 2008.

SERVAIS, S. *et al.* Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 35, n. 1, p. 24-32, Jul 1 2003.

SHEPHARD, R. J. *et al.* Exercise and the immune system. Natural killer cells, interleukins and related responses. *Sports Med* [S.I.], v. 18, n. 5, p. 340-69, Nov 1994.

_____. The impact of exercise on the immune system: NK cells, interleukins 1 and 2, and related responses. *Exerc Sport Sci Rev* [S.I.], v. 23, p. 215-41, 1995.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 459-70, Mar 2002.

SHYTLE, R. D. *et al.* Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem*, v. 89, n. 2, p. 337-43, Apr 2004.

SHUAIB, A. *et al.* GABA and glutamate levels in the substantia nigra reticulata following repetitive cerebral ischemia in gerbils. *Exp Neurol* [S.I.], v. 147, n. 2, p. 311-5, Oct 1997.

SIEMS, W. G. *et al.* 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 215-23, 1996.

SIESJO, B. K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* [S.I.], v. 77, n. 2, p. 169-84, Aug 1992a.

_____. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* [S.I.], v. 77, n. 3, p. 337-54, Sep 1992b.

SIESJO, B. K. *et al.* Acid-base changes during complete brain ischemia. *Stroke* [S.I.], v. 21, n. 11 Suppl, p. III194-9, Nov 1990.

SIESJO, B. K.; LJUNGGREN, B. Cerebral energy reserves after prolonged hypoxia and ischemia. *Arch Neurol* [S.I.], v. 29, n. 6, p. 400-7, Dec 1973.

SILVEIRA, R. F. *et al.* Utilização de substratos energéticos após exercício agudo de ratos treinados aerobicamente por natação. *Motriz*, v.13, n.1, p.07-13, Jan/Mar 2007.

SIM, Y. J. *et al.* Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 372, n. 3, p. 256-61, Dec 6 2004.

SMILIOS, I. *et al.* Hormonal responses after various resistance exercise protocols. *Med Sci Sports Exerc* [S.I.], v. 35, n. 4, p. 644-54, Apr 2003.

SMITH, A. D.; ZIGMOND, M. J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp Neurol* [S.I.], v. 184, n. 1, p. 31-9, Nov 2003.

SOMANI, S. M. *et al.* Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav* [S.I.], v. 50, n. 4, p. 635-9, Apr 1995.

SONG, Y. J. *et al.* Training in swimming reduces blood pressure and increases muscle glucose transport activity as well as GLUT4 contents in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Appl Human Sci* [S.I.], v. 17, n. 6, p. 275-80, Nov 1998.

SOUZA, M. A. *et al.* Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* [S.I.], v. 50, n. 4, p. 811-23, Apr 2009.

SOYA, H. *et al.* BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 358, n. 4, p. 961-7, Jul 13 2007.

STEINER, B. *et al.* Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* [S.I.], v. 46, n. 1, p. 41-52, Apr 1 2004.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* [S.I.], v. 267, n. 5203, p. 1445-9, Mar 10 1995.

STOPPINI, L. *et al.* A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 173-82, Apr 1991.

STRASSER, U.; FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods* [S.I.], v. 57, n. 2, p. 177-86, Apr 1995.

STUMMER, W. *et al.* Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* [S.I.], v. 25, n. 9, p. 1862-9, Sep 1994.

SUGIURA, H. *et al.* Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice. *Acta Physiol Scand* [S.I.], v. 168, n. 3, p. 413-20, Mar 2000.

SULLIVAN, V. K. *et al.* Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 78, n. 6, p. 2115-20, Jun 1995.

SUSIN, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* [S.I.], v. 397, n. 6718, p. 441-6, Feb 4 1999.

SUZUKI, M. *et al.* Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* [S.I.], v. 29, n. 2, p. 141-51, Apr 1983.

SUZUKI, Y. *et al.* A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 613-21, Sep 2001.

SWANSON, C. J. *et al.* Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov* [S.I.], v. 4, n. 2, p. 131-44, Feb 2005.

SZELENYI, J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull*, v. 54, n. 4, p. 329-38, Mar 1 2001.

TACHIBANA, M.; KANEKO, A. Differences in glutamate-induced response properties between photoreceptors and horizontal cells. *Neurosci Res Suppl* [S.I.], v. 8, p. S59-67, 1988.

TAYLOR, C. P. *et al.* Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *J Neurosci Methods* [S.I.], v. 59, n. 1, p. 121-8, Jun 1995.

THANOS, P. K. *et al.* A non-invasive method for detecting the metabolic stress response in rodents: characterization and disruption of the circadian corticosterone rhythm. *Physiol Res* [S.I.], v. 58, n. 2, p. 219-28, 2009.

THOMAZI, A. P. *et al.* Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Res* [S.I.], v. 1188, p. 233-40, Jan 10 2008.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* [S.I.], v. 267, n. 5203, p. 1456-62, Mar 10 1995.

THOMSEN, C. Pentylentetrazol-induced seizures increase [3H]L-2-amino-4-phosphonobutyrate binding in discrete regions of the rat brain. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 266, n. 1, p. 5-8, Apr 30 1999.

THORNBERRY, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* [S.I.], v. 356, n. 6372, p. 768-74, Apr 30 1992.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science* [S.I.], v. 281, n. 5381, p. 1312-6, Aug 28 1998.

THORNE, B. *et al.* Isolation of hippocampal synaptosomes on Percoll gradients: cholinergic markers and ligand binding sites. *J Neurochem* [S.I.], v. 56, n. 2, p. 479-84, Feb 1991.

TIBBITS, G. *et al.* Adaptation of the rat myocardium to endurance training. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 85-9, Jan 1978.

TOKER, A.; NEWTON, A. C. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* [S.I.], v. 275, n. 12, p. 8271-4, Mar 24 2000.

TONG, L. *et al.* Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 1046-56, Dec 2001.

TONI, N. *et al.* LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* [S.I.], v. 402, n. 6760, p. 421-5, Nov 25 1999.

VAN LOO, G. *et al.* The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 20-6, Jan 2002.

VAN PRAAG, H. *et al.* Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* [S.I.], v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* [S.I.], v. 346 Pt 3, p. 561-76, Mar 15 2000.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil Neural Repair* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 283-95, Dec 2005.

VERHAGEN, A. M. *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* [S.I.], v. 102, n. 1, p. 43-53, Jul 7 2000.

VERKHRATSKY, A. *et al.* Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* [S.I.], v. 78, n. 1, p. 99-141, Jan 1998.

VIEIRA, R. *et al.* Sistema de natação para exercício físico de ratos. *Arq Biol Tecnol*, v. 31, n. 3, p. 387-394, Ago 1988.

VIGNES, M. *et al.* The synaptic activation of the GluR5 subtype of kainate receptor in area CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* [S.I.], v. 36, n. 11-12, p. 1477-81, Nov-Dec 1997.

VIGUIE, C. A. *et al.* Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 75, n. 2, p. 566-72, Aug 1993.

VILA, N. *et al.* Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* [S.I.], v. 31, n. 10, p. 2325-9, Oct 2000.

VISSING, J. *et al.* Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 16, n. 4, p. 729-36, Jul 1996.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 322-8, 2007.

WALKER, N. P. *et al.* Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 343-52, Jul 29 1994.

WALSH, L. A. *et al.* Acute pentylenetetrazol injection reduces rat GABAA receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with No effect on benzodiazepine binding site density. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 289, n. 3, p. 1626-33, Jun 1999.

WANG, R. Y. *et al.* Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *Brain Res* [S.I.], v. 922, n. 1, p. 140-3, Dec 13 2001.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* [S.I.], v. 15, n. 22, p. 2922-33, Nov 15 2001.

WASSERMAN, D. H.; VRANIC, M. Interaction between insulin and counterregulatory hormones in control of substrate utilization in health and diabetes during exercise. *Diabetes Metab Rev* [S.I.], v. 1, n. 4, p. 359-84, 1986.

WEI, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* [S.I.], v. 292, n. 5517, p. 727-30, Apr 27 2001.

WIDENFALK, J. *et al.* Deprived of habitual running, rats downregulate BDNF and TrkB messages in the brain. *Neurosci Res* [S.I.], v. 34, n. 3, p. 125-32, Aug 1999.

WILLIAMS, G. T.; SMITH, C. A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* [S.I.], v. 74, n. 5, p. 777-9, Sep 10 1993.

WILSON, K. P. *et al.* Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* [S.I.], v. 370, n. 6487, p. 270-5, Jul 28 1994.

WINTER, B. *et al.* High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 87, n. 4, p. 597-609, May 2007.

WONG, P. C. *et al.* The genetic and molecular mechanisms of motor neuron disease. *Curr Opin Neurobiol* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 791-9, Dec 1998.

WU, C. W. *et al.* Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 105, n. 5, p. 1585-94, Nov 2008.

YUAN, J. *et al.* The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* [S.I.], v. 75, n. 4, p. 641-52, Nov 19 1993.

YUAN, J.; YANKNER, B. A. Apoptosis in the nervous system. *Nature* [S.I.], v. 407, n. 6805, p. 802-9, Oct 12 2000.

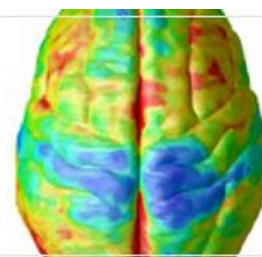
YUSTE, V. J. *et al.* Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell Death Differ* [S.I.], v. 12, n. 11, p. 1445-8, Nov 2005.

ZEEVALK, G. D.; NICKLAS, W. J. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem* [S.I.], v. 59, n. 4, p. 1211-20, Oct 1992.

ZOU, H. *et al.* Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 405-13, Aug 8 1997.



NÚCLEO DE NEUROCIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PISCINA PARA CONDICIONAMENTO FÍSICO DE RATOS & CAMUNDONGOS

Prof. Ian Lara Lamounier Andrade
Flávio Afonso Gonçalves Mourão

**Belo Horizonte
Agosto / 2008**

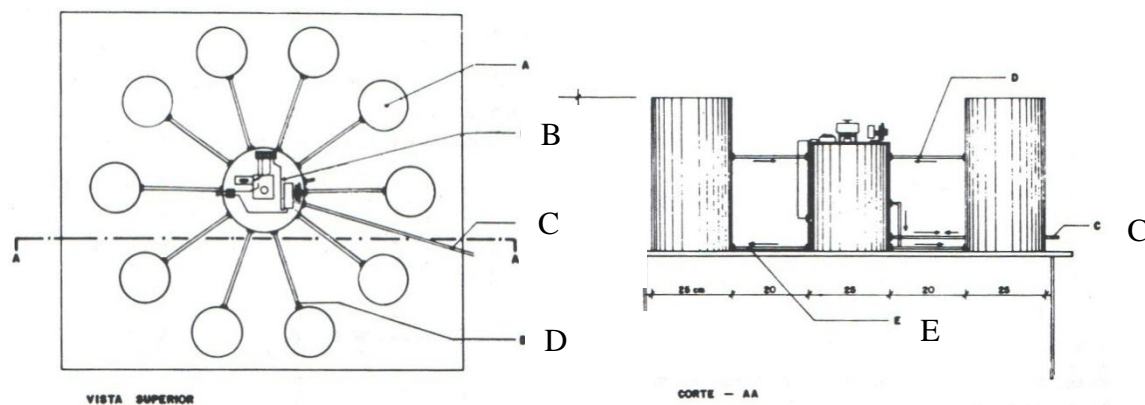


Figura 1 : Sistema proposto por *Vieira et al., 1988* - *A*: tanque de natação; *B*: central de bombeamento; *C*: mangueira para adução de líquido; *D*: tubo de controle de nível e retorno; *E*: tubo de distribuição e recirculação. *A* e *B* foram construídos com tubos de PVC (Cloreto de polivinil) e 250 mm de diâmetro. *C*, *D* e *E* são mangueiras transparentes de polietileno de 0,5 polegadas de diâmetro

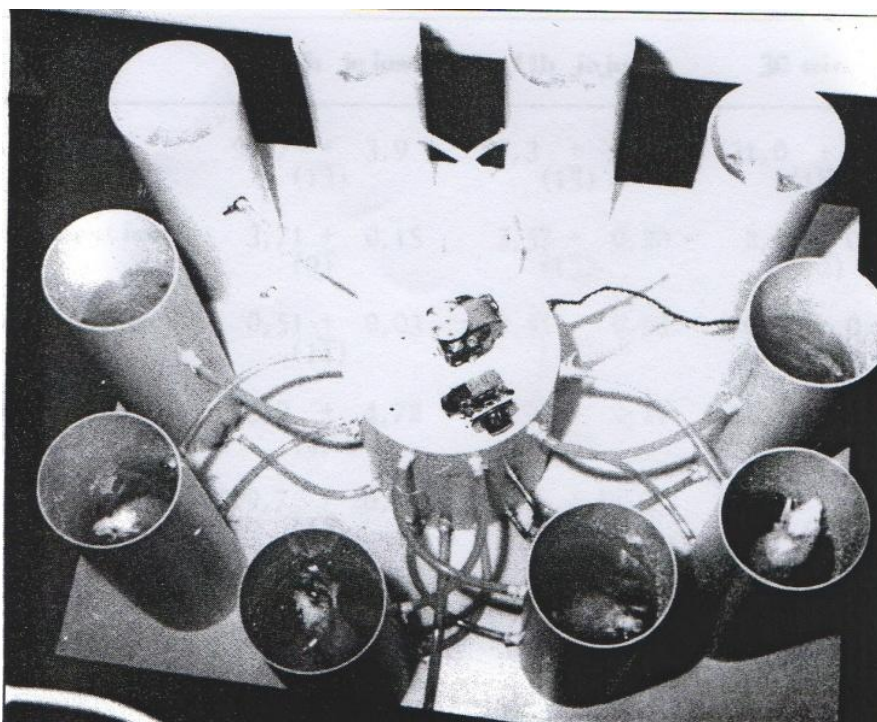


Figura 2: Sistema proposto por *Vieira et al., 1988* - Vista superior - Animais em treinamento

TANQUES E SUPORTE

Foi estipulado 4 tanques individuais, ou baias, para natação, um número menor ao referenciado anteriormente, mas que apesar da perda de produção em número de animais, viabiliza um maior controle durante o treinamento. Os tanques foram confeccionados com vidros transparentes de 8mm lateralmente e 6mm em suas divisórias e não com tubos de PVC (Cloroeto de polivinil), o que permite completa visualização e acompanhando do animal. Cada tanque apresenta dimensões de 20cm X 20cm X 70cm, correspondendo cada um a um volume de 28000cm^3 ou 28 litros, totalizando assim 112 litros. Ambos os quatro tanques são interconectados por espaçamentos inferiores entre suas divisórias, permitindo assim completa homogeneidade no meio. Cada tanque apresenta uma entrada posterior, e uma saída anterior para água, conectados ao sistema de distribuição.

Os tanques encontram-se sob um suporte de madeira compensada, com acabamento em fórmica branca, com as dimensões especificadas na figura 3, apresentando um pequeno degrau anterior.

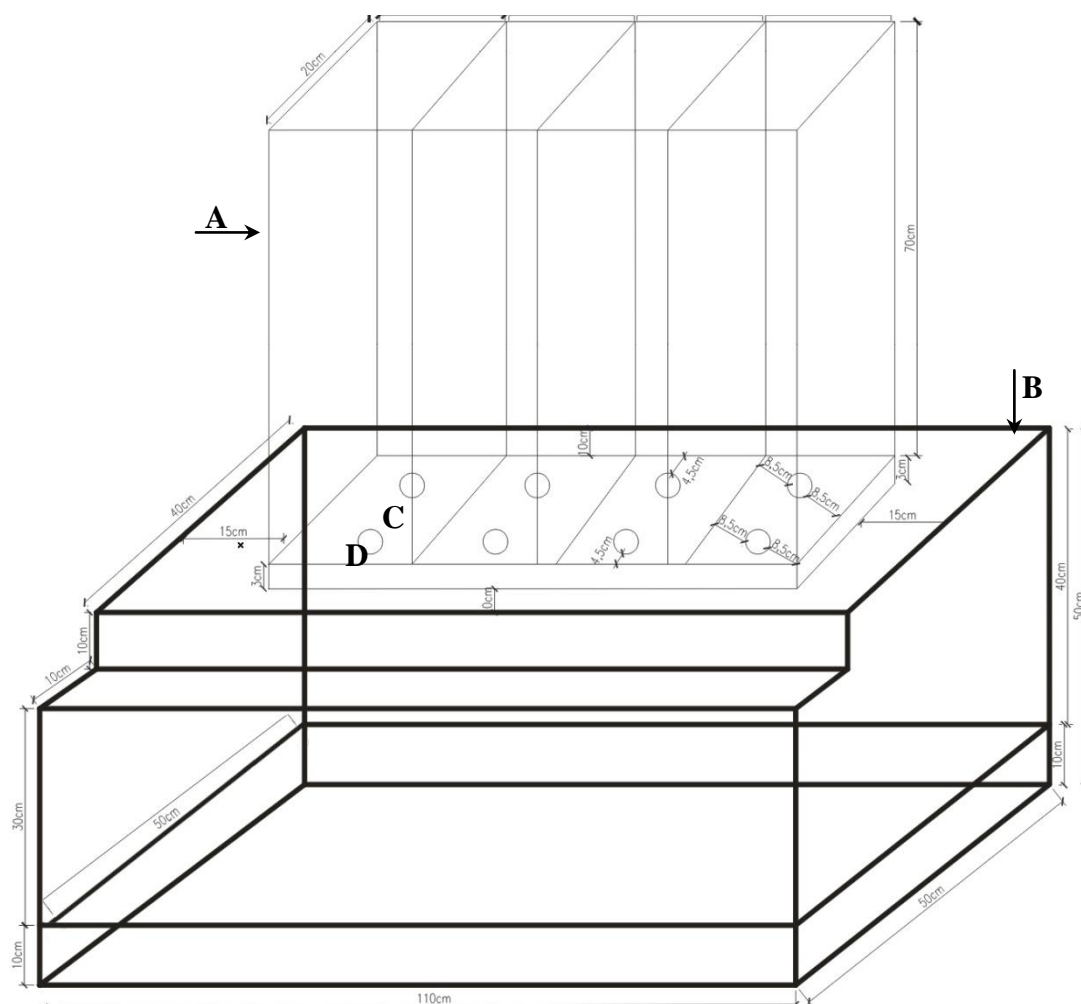


Figura 3: A: Tanques individuais de vidro transparente. B: Suporte de madeira. C: Entrada de água. D: Saída de água



Figura 4 : Vista superior – Tanques, suporte de madeira, entrada e saída de água.

SISTEMA HIDRÁULICO

O Sistema de distribuição, como esquematizado na figura 5, é um sistema cíclico de transporte de líquidos, (segue em sentido horário), que consta de uma central de bombeamento (Bomba 1/4cc – MARCA: *Thebe*[®]), um aquecedor de passagem (Maxi Aquecedor Plus – MARCA: Lorezenzetti[®] 5400w com resistência alterada para 2500w) e um filtro para macropartículas (laterais de vidros de 8mm, aberturas entrada e saída, composto por placas plásticas vazadas interpostas a fibras sintéticas), ambos interligados por conexões de 3/4 de polegada. As entradas e saídas de água dos tanques estão conectadas por mangueiras de polietileno, reforçadas, de cor preta, de 1/2 polegada.

A água é bombeada diretamente para o aquecedor, de onde parte para os tanques de condicionamento, distribuindo e atenuando a pressão, através das conexões (entradas) posteriores, retornando diretamente para o filtro através das conexões (saídas) anteriores, sendo assim filtrada (macropartículas), retornando e mantendo o ciclo de distribuição.

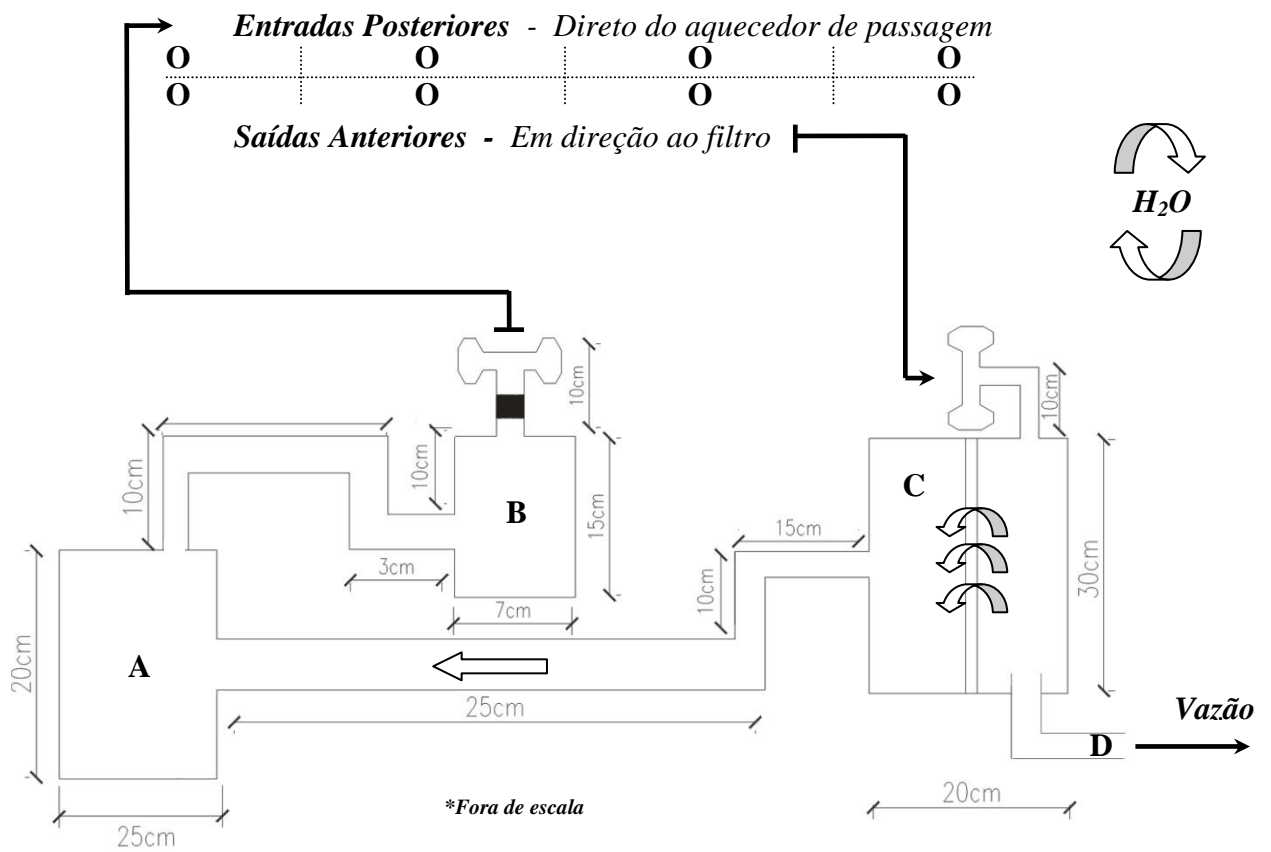


Figura 5: A: Central de Bombeamento (1/4cc); B: Aquecedor de Passagem (2500w); C: Filtro; D: Registro para vazão e eliminação da água utilizada.



Figura 6: Vista anterior – Central de bombeamento, aquecedor de passagem e filtro



Figura 7: Vista Inferior – Conexões. A: Anterior; B: Posterior; C: Conexão para o sensor de temperatura



Figura 8: Vista anterior – Visão Geral

SISTEMA ELÉTRICO

O sistema de alimentação elétrica apresenta 127voltz , ± 15 amperes. A partir de uma única fonte, a energia se distribui diretamente para um contator, seguindo para a central de bombeamento e para o aquecedor de passagem, este acionado por um disjuntor diferencial e para um termostato acionado por um disjuntor comum (Figura 10).

Para controle da temperatura um pequeno sensor foi acoplado juntamente ao sistema de distribuição de água, detectando o aquecimento (figura 6). A medida que a água se aquece e alcança o limite pré-determinado, da temperatura programada no termostato (Figura 7), automaticamente o sistema de aquecimento é desligado, voltando a ligar quando a temperatura decai abaixo do limite inferior.

De forma geral os contadores (ou chaves magnéticas) são empregados para acionar motores elétricos e o princípio de funcionamento ocorre através da atração magnética criada pela corrente elétrica ao atravessar um fio condutor. As principais partes de um contador são: Núcleo fixo, núcleo móvel, contatos fixos, contatos móveis e a bobina de alimentação. Quando ocorre energização da bobina a corrente elétrica que a atravessa cria um campo magnético que atrai o núcleo móvel; colados ou fixados no núcleo móvel estão os contatos móveis que descem e encostam-se nos contatos fixos fechando assim o circuito.

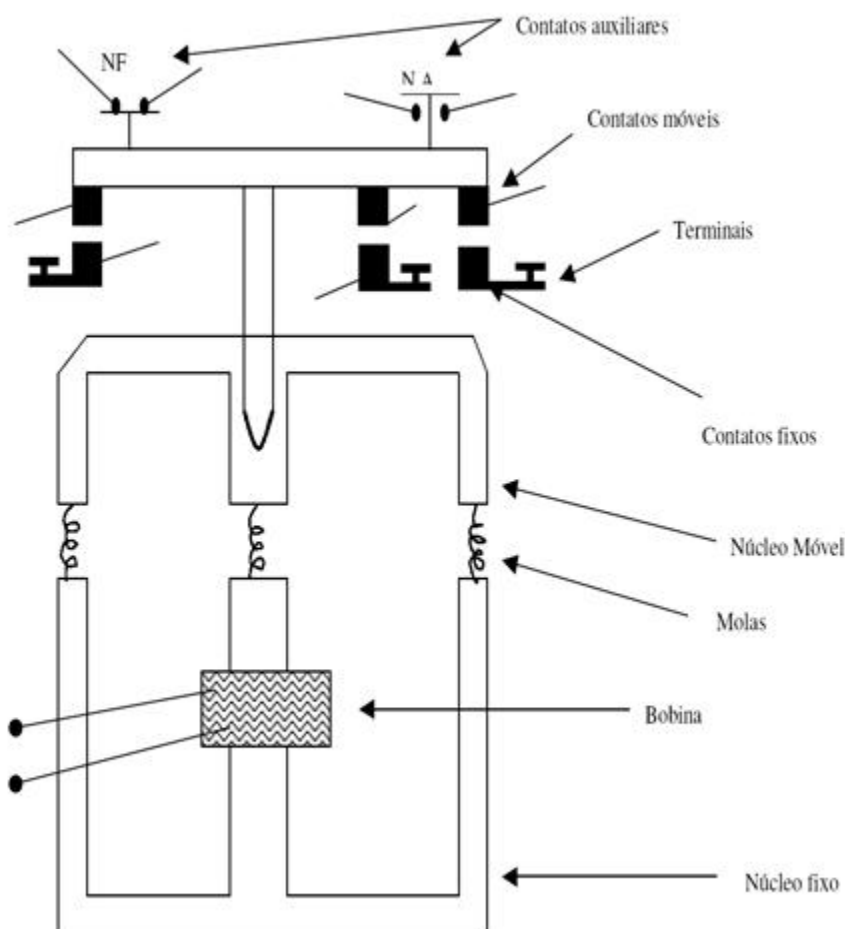


Figura 9: Representação esquemática de um Contator (Chave magnética)

Os disjuntores diferenciais (DDR's) são disjuntores com proteção diferencial, onde já estão incorporados em um único produto as funções do DR (Interruptor Diferencial) e o Mini-Disjuntor. O DDR possui proteção diferencial contra contatos diretos e indiretos e proteção contra sobrecarga e curto-circuito, detectando toda a passagem de corrente para a terra e assim desligando o circuito elétrico, ou seja, é útil tanto na proteção contra choques (proteção pessoal) como, também, contra incêndios (proteção de patrimônio).

O DR funciona com um sensor que mede as correntes que entram e saem no circuito (1). As duas são de mesmo valor, porém de direções contrárias em relação à carga. Se chamarmos a corrente que entra na carga de $+I$ e a que sai de $-I$, logo a soma das correntes é igual a zero (2). A soma só não será igual a zero se houver corrente fluindo para a terra (3), como no caso de um choque elétrico.

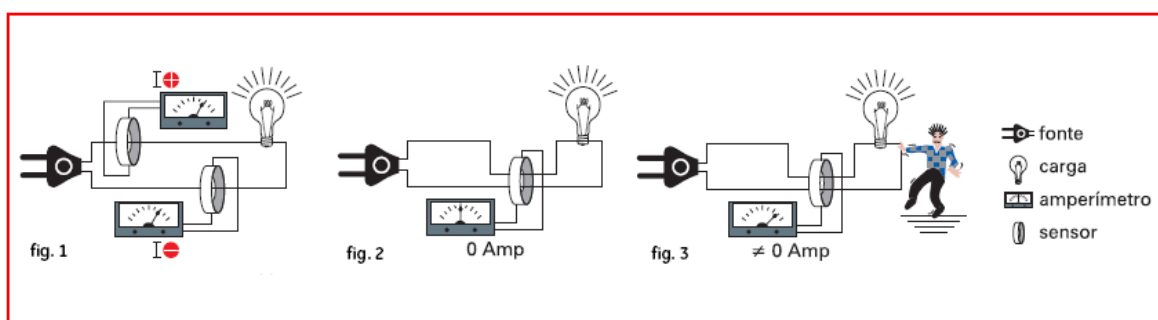


Figura 10: Representação esquemática de um Interruptor diferencial

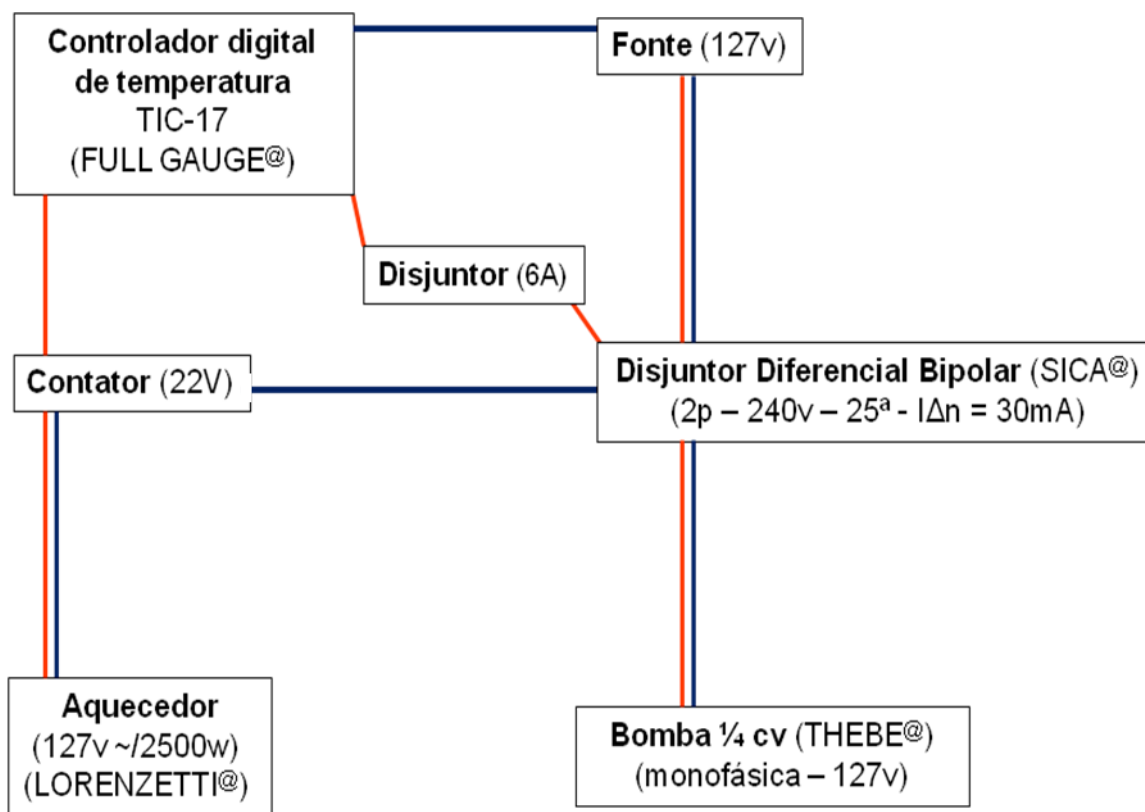


Figura 11: Representação esquemática do esquema elétrico