

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA**

HÉRCULES RIBEIRO LEITE

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA
NEUROPROTEÇÃO MEDIADA PELO TREINAMENTO FÍSICO
EM FATIAS CEREBRAIS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE
OXIGÊNIO E GLICOSE**

**BELO HORIZONTE
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA**

HÉRCULES RIBEIRO LEITE

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA
NEUROPROTEÇÃO MEDIADA PELO TREINAMENTO FÍSICO
EM FATIAS CEREBRAIS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE
OXIGÊNIO E GLICOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. André Ricardo Massensini (Orientador)

Prof.^a Dr.^a Juliana Carvalho Tavares (Co-orientadora)

**BELO HORIZONTE
2011**

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais

Emília e Cristalino,

aos meus irmãos

Adriane, Cristavin e Washington, e

a minha namorada

Débora

... Porque sem o apoio e amor de cada um deles, tudo ainda seria
incerteza.

*"Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida
e nela só tenho uma chance de fazer o que quero.
Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas,
elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus
caminhos."*

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por ter permitido nascer numa família tão maravilhosa!

Ao meu orientador André Ricardo Massensini, serei eternamente grato por ter acreditado em mim! Pela confiança que me depositou para a plena realização e execução deste trabalho. O seu jeito de conduzir a orientação permitiu-me que eu adquirisse uma enorme autoconfiança e maturidade científica. Obrigado por abrir as portas do NNC pra mim!

À minha co-orientadora Juliana Carvalho Tavares, obrigado imensamente pela atenção, solicitude e disponibilidade para as discussões científicas!

Aos meus pais Emília e Cristalino, pelo apoio, amor, dedicação e incentivo ao longo da minha vida. Por ter me fornecido toda a base necessária para que eu conseguisse alcançar todos os meus objetivos. Obrigado por tudo que tenho na minha vida. Amo vocês mais do que podem imaginar!

Aos meus irmãos, KaKá, Dri e Washington, vocês são peças fundamentais na construção deste caminho que escolhi. Cada um de vocês da sua maneira, dando um conselho, preocupando com o irmão caçula que já cresceu faz tempo, financiando meus livros, e o mais importante de tudo: o INCENTIVO! Vocês não têm idéia do tanto que isso foi importante para mim. Obrigado por vocês serem meus irmãos!!!

A minha namorada, companheira, amiga, Dedé. Você sabe mais do que ninguém o quanto defender esse mestrado é importante pra mim! Você que sempre escutou todas as minhas reclamações, meus sonhos (e não são poucos), e objetivos, hoje posso dividir com você essa realização pessoal e profissional! Sem você o caminho seria muito mais árduo. Obrigado pelo amor, carinho, incentivo, elogios, seu abraço e seu colo nos momentos de desânimo, e principalmente compreensão, caso contrário já teria terminado o mestrado sozinho. Te amo muito!

Aos meus sogros, cunhados e concunhados, minha segunda família em Belo Horizonte. Gostaria de agradecer pelo enorme apoio nesta trajetória. Obrigado pela estadia incondicional quando eu mais precisei! (Isto não tem preço), pelos manjares da Elaine, pelo bom humor do Guilherme e da Celine, pela paciência do Osvaldir por me aturar todos os fins de semana em sua casa! E à Érika e ao Tiago pela companhia sempre prazerosa! A ajuda de vocês foi fundamental...

Aos meus cunhados Luciana e Anderson, obrigado pelo suporte e incentivo;

À minha tia Carolina pelo carinho e acolhida em sua casa;

Aos amigos das antigas de Paraopeba e aos novos amigos de Diamantina, em especial ao Zé Márcio, Ana Paula e Karina, obrigado pela confiança, amizade e incentivo, obrigado por caminharem comigo neste sonho!

Ao amigo e mestre Clynton Lourenço, agradeço pelo exemplo de vida, pelo professor que você é! Pela idéia inicial deste projeto de pesquisa, enfim obrigado simplesmente por ter acreditado e apostado em mim;

À Prof.^a Grace Schenatto pelo suporte científico, pela idéias que sempre foram muito bem vindas, pela amizade, confiança e descontração. Agradeço por sempre me incentivar! E mais, como poderia esquecer-me dos biscoitos, chocolates, frutas, etc. Obrigado por alimentar “o pretinho”;

Ao Prof. Márcio Flávio Moraes, exemplo de mestre, tenho grande admiração pelo cientista que você é, além da enorme satisfação de conviver e trabalhar com você!!!

A todos os colegas de laboratório do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Lab. Cálcio (Emerson e Lídia), Cardiovascular (Josiane, Luciano e Rosária) e Eletrocel (Aline e Enéas), obrigado pela “interação” científica;

À Prof.^a Virgínia Soares Lemos por sanar várias das minhas dúvidas, e também pelo suporte e colaboração científica no mundo do NO. Também agradeço à sua aluna Josiane, que sempre me ajudou prontamente na condução dos experimentos;

Ao Prof. Tasso Moraes do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia, onde foram realizados os ensaios de lipoperoxidação e atividade da superóxido dismutase;

Ao grupo “Primavera” (nome dado pela Luciana), Flávio, Luciana e Talita, trabalhar com vocês foi a melhor coisa que aconteceu neste mestrado, formamos um grupo, ou melhor, uma família. A Lu é a nossa mãe, sempre solícita, com suas idéias contraditórias que matam qualquer um de raiva. Além disso, sua maturidade científica é de invejar qualquer um, obrigado por sua amizade, pelo pão com salame e pelos biscoitos que apareciam de surpresa lá pelas 23h! Ao Flávio, vulgo “Japa da Pompéia”, quanta coisa vivemos neste mestrado, foi muito perrengue e lamentações, mas resistimos bravamente. Obrigado por todo o suporte intelectual e braçal na condução dos experimentos, e por deixar todo o dia de trabalho, sempre

muito engraçado! E não menos importante, à Talita, que mesmo chegando aos 45 min do segundo tempo, foi ajuda ímpar na condução experimental, sempre bem humorada, e de prontidão para ajudar. O mais importante de tudo é a amizade, espero um dia poder trabalhar no laboratório de algum de vocês! Vocês já são grandes cientistas!

Aos inúmeros amigos do NNC, Aninha, Danielle Bernardes, Marcelão, Leandro, Daniel, Brisa, Onésia, Gustavo Rezende, Brunão, Tupete, Tiago, Dani Fontes, Maira, Natália, Iva, João, Guilherme Cunha, Gustavo Lopes, Patrícia, Renata, Gabriel, Lockman, Cristina, Aíla, Mauro, Isabella, obrigado pela amizade e pelos inúmeros momentos de descontração no lab. Cada um de vocês contribuiu a sua maneira para que os meus dias no ICB fossem mais agradáveis! Dani e Renata, obrigado pelo auxílio nos experimentos de metabolismo e estresse oxidativo.

À Suellem e Marielle, sempre presentes!

Aos alunos de iniciação Gustavo Belleza, Guilherme e Giselle, pela “mão” nos experimentos;

Ao Taquinho pelo bom humor e pelo auxílio técnico;

Aos animais que possibilitaram a realização deste trabalho e p

Ao Leandro Bastos, por ter possibilitado o *upgrade* na minha vida Belo Horizontina!

elo avanço em prol da ciência;

Ao programa de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia;

Às agências financiadoras Capes, CNPq e Fapemig.

ABREVIACOES

ACA	Artéria cerebral anterior	Anterior cerebral artery
ACM	Artéria cerebral média	Middle cerebral artery
AIF	Fator indutor de apoptose	Apoptosis inducing factor
AVE	Acidente vascular encefálico	Stroke
AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico	Ischemic stroke
AAE	Aminocidos excitatrios	Excitatory amino acids
BHE	Barreira hematoenceflica	Blood brain barrier
BH4	Tetrahidrobiopterina	Tetrahydrobiopterin
BDNF	Fator neurotrfico derivado do cérebro	Brain derived neurotrophic factor
CuZnSOD	Cobre zinco superóxido dismutase	Copper zinc superoxide dismutase
eNOS	xido nítrico sintase endotelial	Endothelial nitric oxide synthase
EPM	Erro padrão da média	Standard error mean
ERN	Espcies reativas de nitrogênio	Reactive nitrogen species
ERO	Espcies reativas de oxigênio	Reactive oxygen species
EthD-1	Etídio-homodímero	Ethidium-homodimer
EUA	Estados Unidos da América	United States of American
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto	Fibroblast growth factor
GDH	Glutamato desidrogenase	Glutamate dehydrogenase
GPx	Glutathiona peroxidase	Glutathione peroxidase
IGF	Fator de crescimento insulínico	Insulin growth factor
iNOS	óxido nítrico sintase induzível	Inducible nitric oxide synthase
KA	Cainato	Kainate
KRH	Krebs Ringer Henseilt	Krebs Ringer Henseilt
LDH	Lactato desidrogenase	Lactate dehydrogenase
MDA	Malondialdeido	Malondialdehyde
MnSOD	Manganês superóxido dismutase	Manganese superoxide dismutase
NAD	Nicotinamina adenina dinucleotídeo	Nicotinamine adenine dinucleotide
nNOS	xido nítrico sintase neuronal	Neuronal nitric oxide synthase
nPOG	No privao de oxigênio e glicose	Non oxygen glucose deprivation
SED	Sedentário	Sedentary
TRE	Treinado	Trained
NT	Neurotrofina	Neurotrophin
ON	xido nítrico	Nitric oxide
NOS	xido nítrico sintase	Nitric oxide synthase
SNP	Sistema nervoso perifrico	Peripheral nervous system
SNK	Student Neuwman Keuls	Student Neuwman Keuls

OMS	Organização mundial da saúde	World Health Organization
POG	Privação de oxigênio e glicose	Oxygen glucose deprivation
POG SED	Privação de oxigênio e glicose sedentário	Oxygen glucose deprivation sedentary
POG TRE	Privação de oxigênio e glicose treinado	Oxygen glucose deprivation trained
PSD-95	Post synaptic density protein	Post synaptic density protein
SOD	Superóxido dismutase	Superoxide dismutase
SNC	Sistema nervoso central	Central nervous system
SUS	Sistema Único de Saúde	Brazilian Health Care System
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	Thiobarbituric acid reactive substances
TEM	Teste de esforço máximo	Maximal effort test

SUMÁRIO

APOIO FINANCEIRO	III
AGRADECIMENTOS	VI
ABREVIACÕES	IX
SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELA	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	1
1.2 MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL	2
1.3 EXCITOTOXICIDADE E MORTE CELULAR.....	4
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ISQUEMIA CEREBRAL	6
1.4.1 Estresse Oxidativo	6
1.4.2 Lipoperoxidação.....	8
1.4.3 Mecanismos de Defesa Antioxidante	9
1.4.4 Óxido Nítrico	10
1.4.4.1 Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS)	12
1.5 NEUROPROTEÇÃO	14
1.5.1 <i>Exercício Físico</i>	14
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 MÉTODOS	20
4.1 ANIMAIS	20
4.2 SISTEMA DE NATAÇÃO	20
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
4.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO	22
4.5 DISSECAÇÃO E PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS	24
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR	27
4.7 VIABILIDADE CELULAR.....	28

4.7.1	Lactato Desidrogenase	28
4.7.2	Etídio-homodímero	28
4.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO.....	29
4.9	ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE	30
4.10	MENSURAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	31
4.11	QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO.....	31
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS.....	33
5.1	TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO.....	33
5.2	GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO	34
5.3	VIABILIDADE CELULAR.....	34
5.3.1	LDH.....	34
5.3.2	ETÍDIO-HOMODÍMERO.....	36
5.4	NITRITO ($[NO_2^-]$)	38
5.5	SUPERÓXIDO DISMUTASE	40
5.6	LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS).....	42
5.7	GLUTAMATO.....	42
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO.....	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9	APÊNDICE.....	68
9.1	APÊNDICE 1.....	68
9.2	APÊNDICE 2.....	69
9.3	APÊNDICE 3.....	70
9.4	APÊNDICE 4.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA SIMPLIFICADO DOS MECANISMOS PATOFISIOLÓGICOS DA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL.	5
FIGURA 2. VIA METABÓLICA QUE LEVA À FORMAÇÃO DO NO.....	11
FIGURA 3. PAPEL DUAL DO NO APÓS ISQUEMIA CEREBRAL.	12
FIGURA 4. SISTEMA DE NATAÇÃO COMPOSTO POR QUATRO BAIAS, TEMPERATURA CONTROLADA 32 °C ± 1, FILTRO E VAZÃO DE ÁGUA.....	21
FIGURA 5. PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO.	23
FIGURA 6. CONFECÇÃO DAS CARGAS DE TREINAMENTO.	24
FIGURA 7. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE E COLETA DAS AMOSTRAS.	26
FIGURA 8. REAÇÃO DO NITRITO EM MEIO ÁCIDO COM O REAGENTE DAN (2,3-DIAMINONAFTALENO GERANDO O PRODUTO FLUORESCENTE 1(H)-NAFTOTRIAZOL.....	30
FIGURA 9. CARGA MÁXIMA SUPORTADA (G) PELOS ANIMAIS SEDENTÁRIOS E TREINADOS DURANTE A REALIZAÇÃO DO TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO (TEM).....	33
FIGURA 10. MEDIDA DO GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO AVALIADOS NOS ANIMAIS SEDENTÁRIOS E TREINADOS 48 H APÓS O ÚLTIMO TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO (APÓS 8 SEMANAS DE TREINAMENTO FÍSICO)	34
FIGURA 11. EFEITO INDUZIDO PELO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	36
FIGURA 12. EFEITO INDUZIDO PELO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	37
FIGURA 13. EFEITO INDUZIDO PELO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRITO [NO ₂].	39
FIGURA 14. EFEITO INDUZIDO PELO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	41
FIGURA 15. EFEITO INDUZIDO PELO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMATO.....	44

LISTA DE TABELA

TABELA 1. EFEITO INDUZIDO PELO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) (% nmol MDA/mg PROTEÍNA), AVALIADA NO HOMOGENATO DE FATIAS DE CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (60 min) E REOXIGENAÇÃO (240 min).....	42
---	----

RESUMO

A isquemia leva a uma variedade de eventos patológicos, incluindo excitotoxicidade, inflamação, disfunção neuronal tardia e morte celular por meio da hiper-ativação de receptores glutamatérgicos e produção de radicais livres, como o óxido nítrico (NO). Os mecanismos pelos quais o excesso da formação do NO cerebral medeia a morte neural, tais como a depleção energética, a peroxidação lipídica e proteica, a nitrosilação de proteínas e o dano ao DNA, não foram bem elucidados. Neste contexto, há evidências sustentando o fato de que o exercício físico regular exerce efeitos benéficos sobre o cérebro, indicando que este poderia ativar vias celulares e moleculares que contribuiriam para a neuroproteção. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação das vias de estresse oxidativo na neuroproteção mediada pelo treinamento físico em fatias cerebrais submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG). Neste estudo, ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: grupo treinado (TRE) e grupo sedentário (SED). O grupo TRE foi submetido a um protocolo de natação 5x/semana, 30 min/dia, durante 8 semanas, com uma intensidade de treinamento moderado (60% da carga máxima). Após o término do protocolo de treinamento, os animais foram decapitados e os córtices cerebrais e os hipocampos rapidamente removidos e fatiados numa espessura de 400 µm. As fatias de um mesmo animal foram então aleatoriamente divididas em: (1) fatias controle SED e TRE, não submetidas à privação de oxigênio e glicose por 60 min (nPOG SED; nPOG TRE), e (2) fatias Isquemia SED e TRE, submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG SED; POG TRE). Posteriormente, ambos os grupos foram submetidos a um período sem POG por 240 min. Os tecidos e os meios de incubação foram coletados e armazenados a 80 °C. As seguintes respostas foram avaliadas: viabilidade celular (lactato desidrogenase/LDH; e etídio-homodímero/EthD-1), glutamato, nitrito ($[NO_2^-]$), atividade da superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico/TBARS). Além disso, também foram avaliadas as respostas associadas ao treinamento físico: glicogênio hepático e muscular, e carga máxima suportada no teste de esforço máximo (TEM). Para a análise estatística utilizou-se análise de variância de uma ou duas vias. Os resultados foram expressos como erro padrão da média (\pm E.P.M), com nível de significância $p < 0,05$. Observou-se que o treinamento físico aumentou as reservas de glicogênio hepático e muscular, e conseqüentemente, aumentou o condicionamento físico no TEM. Houve redução da morte celular nas fatias corticais TRE POG ($92,64 \pm 19,18$), e hipocampais TRE POG ($183,4 \pm 46,84$), bem como menores concentrações de glutamato no TRE POG ($2,26 \pm 0,31$), apenas nas fatias hipocampais deste último grupo. Em relação às concentrações de NO_2^- e TBARS, houve uma diminuição apenas das fatias corticais TRE POG ($1,0 \pm 0,28$) e ($69,03 \pm 10,16$), respectivamente. Por outro lado, o exercício, per si, aumentou a atividade da SOD cortical no grupo TRE nPOG ($0,10 \pm 0,22$) e TRE POG ($1,15 \pm 0,26$). Os resultados deste estudo indicam que o treinamento físico induz neuroproteção no córtex cerebral e hipocampos submetidos à POG; diminui as concentrações de NO_2^- , aumenta a atividade da SOD nestas fatias, e diminui a lipoperoxidação apenas nas fatias corticais, bem como causa menor excitotoxicidade glutamatérgica na fatias hipocampais POG TRE.

Palavras-chaves: exercício, estresse oxidativo, privação de oxigênio e glicose.

ABSTRACT

Ischemia leads to a variety of pathological events, including excitotoxicity, inflammation, delayed neuronal dysfunction and cell death through hyperactivation of glutamate receptors and production of free radicals, such as nitric oxide (NO). The mechanism by which cerebral excess formation of NO, which mediates neuronal death involving energy depletion, lipid peroxidation and protein nitrosylation of proteins and DNA damage have not been fully elucidated. In this context, there is evidence supporting the fact that regular exercise has beneficial effects on the brain, which activate cellular and molecular pathways that contribute to neuroprotection. Thus, the purpose of this study was to evaluate the role played by oxidative stress pathways in neuroprotection induced by exercise in brain slices submitted to oxygen and glucose deprivation (OGD). Male Wistar rats were divided into two groups: trained (TRA) and sedentary groups (SED). The TRA group was submitted to a swimming protocol 5x/week, 30 min/day for 8 weeks, with moderate training intensity (60% of maximum load). At the end of training protocol animals were decapitated and cerebral cortices and hippocampus were quickly removed and sliced (thickness 400 μ m). The slices of the same animal were then randomized into: (1) SED and TRE control slices not submitted to oxygen glucose deprivation (SED nOGD; nOGD TRE), and (2) submitted to oxygen glucose deprivation for 60 min (OGD SED; OGD TRE). Thereafter, both groups were submitted to 4-hours without OGD. Then, tissues and medium incubation were collected and stored at 80 °C. The following parameters were evaluated: cell viability (lactate dehydrogenase/LDH, and homodimer-ethidium/EthD-1), glutamate, nitrite ($[\text{NO}_2^-]$), superoxide dismutase activity (SOD) and lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances/TBARS). In addition, parameters associated to physical training, such as muscle and liver glycogen, and the maximum load in the maximal effort test (MET), were also evaluated. For statistical analysis we used one-way and two-way ANOVA. The results were expressed as standard error mean (\pm S.E.M) with significance of $p < 0.05$. It was observed that exercise training increased hepatic and muscle glycogen storage, and improves performance in MET. There was a reduction in the number of cell death in cortical slices from TRA OGD group (92.64 ± 19.18), and hippocampal TRA OGD (183.4 ± 46.84) and lower levels of glutamate in TRA OGD (2.26 ± 0.31), only in hippocampus. NO_2^- and TBARS concentration decreased only in cortical TRA OGD (1.0 ± 0.28) and (69.03 ± 10.16), respectively. Moreover, exercise, per se, increased cortical nPOG SOD activity (0.10 ± 0.22). The results suggest that, exercise training is able to induce neuroprotection in cerebral cortex and hippocampus submitted to OGD, decreasing the levels of NO_2^- and lipoperoxidation, besides increasing the SOD activity in these slices, and lower glutamatergic excitotoxicity in hippocampal OGD TRA slices.

Keywords: exercise, oxidative stress, oxygen glucose deprivation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidente Vascular Encefálico

As doenças crônicas levaram a 35 milhões de óbitos no mundo em 2005, sendo o acidente vascular encefálico (AVE) responsável por 5,7 milhões (16,6%) dos óbitos, e os países subdesenvolvidos os mais afetados (87%) (Lopez, Mathers et al. 2006). A taxa de incidência em pessoas com 80 anos ou mais é cerca de 20 pessoas em 1.000 (Knollemma, Knigge et al. 1995), sendo maior em homens em todas as faixas etárias. Além disso, entre as pessoas que sofrem algum tipo de processo isquêmico, 20% morrem na primeira semana e 33% morrem no primeiro ano (Ricci, Celani et al. 1991).

No Brasil, apesar da saúde apresentar um perfil epidemiológico marcado pela heterogeneidade, os AVE's destacam-se nos índices de mortalidade. Segundo a última estatística oficial do Ministério da Saúde (DataSUS, 2007), o AVE foi responsável por 8,9% de todos os óbitos ocorridos no país em 2004 (90.930 dentre 1.024.073 mortes), além de corresponder a pouco mais de 80% das internações pelo Sistema Único de Saúde (SUS), considerando pessoas em idade produtiva, 20 a 59 anos (Carvalho, Lessa et al. ; Falcão, Carvalho et al. 2004).

O AVE é caracterizado por um distúrbio neurológico focal, ou às vezes global, de início súbito, durando mais que 24 h, de origem vascular (WHO 2006), e rápido desenvolvimento dos sintomas (Warlow 1998). Os AVE's podem ser do tipo isquêmico ou hemorrágico. Os isquêmicos ocorrem por obstrução das principais artérias que levam sangue ao cérebro, onde as áreas irrigadas por essas artérias deixam de receber sangue oxigenado. Os hemorrágicos ocorrem por ruptura de uma dessas artérias do encéfalo, levando ao sangramento intra-encefálico (Thom, Haase et al. 2006). De acordo com *American Heart Association*, o AVE isquêmico (AVEi) é quatro vezes mais comum que o hemorrágico. O AVEi corresponde a 61% a 81% dos casos de AVE, dos quais a maioria resulta de infartos da circulação anterior que envolve as artérias cerebrais anterior (ACA) e média (ACM) (Winstein, Merians et al. 1999).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2006) existem vários fatores de risco associados aos AVE's, dentre eles tidos como modificáveis, não modificáveis e ambientais. Os fatores de risco modificáveis são: hipertensão, tabagismo,

sedentarismo, alcoolismo, dieta (baixa ingestão de frutas e verduras), obesidade e diabetes; fatores não modificáveis: idade, sexo, genético e história familiar; e fatores ambientais: fumante passivo e acessibilidade a tratamento médico (WHO 2006). Desse modo, a detecção e o controle dos fatores de risco são tarefas prioritárias, pois permitem uma redução significativa da incidência e recidiva do AVE (Pires, Gagliardi et al. 2004; Araújo, Silva et al. 2008) cuja taxa de mortalidade varia de 14% a 26%, por meio de mudanças de hábitos de vida, terapia medicamentosa, neuro-radiologia intervencionista ou cirurgia (Pires, Gagliardi et al. 2004). Assim, meta-análises utilizando estudos observacionais salienta que a prática da atividade física em intensidade moderada está associada com a redução do risco de AVE isquêmico e hemorrágico (Lee, Kim et al. 2003; Wendel-Vos, Schuit et al. 2004), e, conseqüentemente, redução do dano cerebral (Ding, Li et al. 2004).

1.2 Modelos de Isquemia Cerebral

Para o estudo dos mecanismos envolvidos na patofisiologia da isquemia cerebral têm-se utilizado modelos *in vivo* e *in vitro*. Modelos experimentais de isquemia cerebral *in vivo* têm sido desenvolvidos em muitas espécies animais (camundongos, ratos, gatos e primatas) usando numerosos procedimentos. Alguns estudos têm utilizado modelos de isquemia cerebral focal em animais de grande e pequeno porte, com preferência pela oclusão da ACM (Feuerstein and Wang 2000). O modelo experimental de oclusão da ACM em ratos, além de ser o mais utilizado para estudos de lesão isquêmica e para teste da eficácia de drogas neuroprotetoras (Reglodi, Tamas et al. 2003), é também o mais relevante clinicamente (Hossmann 1998). Como permite a sobrevivência do animal por longos períodos, esse modelo é utilizado em vários tipos de estudos, inclusive para investigar a eficácia de determinados testes para detectar melhoras funcionais (Riek-Burchardt, Henrich-Noack et al. 2004) e o efeito neuroprotetor do exercício antes e após isquemia cerebral (Lee, Kim et al. 2003).

Paralelamente, as técnicas de isquemia cerebral *in vitro* são importantes ferramentas de estudo em diversas doenças neurodegenerativas, uma vez que se caracterizam como modelos mais simples para os estudos moleculares que os ensaios *in vivo* (Pringle, Iannotti et al. 1997). São utilizados dois modelos de isquemia *in vitro*: (a) culturas celulares organotípicas de neurônios hipocâmpais,

cerebelares, corticais e hipotalâmicos; (b) e a utilização de fatias cerebrais (principalmente hipocampais) (Lipton 1999).

Neste modelo de isquemia *in vitro* as fatias cerebrais têm sido utilizadas amplamente para o estudo dos danos isquêmicos ou anóxicos (Kass and Lipton 1982). Neste experimento a solução de banho ou meio de incubação é rapidamente substituída de O₂/CO₂ por N₂/CO₂. Quando só a glicose é mantida no tampão anóxico, a lesão é denominada anóxica (ou hipóxica), e quando a glicose é omitida, é denominada isquemia *in vitro* ou privação de oxigênio/glicose (Roberts and Sick 1988).

Os modelos experimentais *in vitro* utilizam células ou tecido cerebral expostos à privação de oxigênio e glicose (POG) e são assim chamados porque, na verdade, são modelos nos quais são produzidas condições similares, mas não idênticas às produzidas *in vivo*. Estes modelos permitem estudar a resposta celular à lesão isquêmica por meio de um sistema no qual as condições podem ser controladas (Faroqui, Haun et al. 1994).

Apesar de a POG ser a principal perturbação durante a isquemia *in vitro*, o sangue contém ainda muitos fatores, tais como alta concentração de íons, que podem determinar a ocorrência do dano isquêmico. Desse modo, durante os estudos *in vitro*, a cultura de células é geralmente cercada por excesso de meio extracelular, de forma que o acúmulo destes produtos possa ser atenuado. Este é um dos principais obstáculos dos estudos da isquemia por POG (Faroqui, Haun et al. 1994).

Entretanto, a POG pode ser considerada como um método relativamente simples e capaz de reproduzir *in vitro* condições e aspectos importantes de uma isquemia *in vivo*, sendo considerado adequado para o estudo da lesão celular isquêmica, assim como para a avaliação de substâncias com potencial neuroprotetor ou neurotóxico. De um modo geral este método oferece muitas vantagens sobre o estudo *in vivo* no estudo dos mecanismos envolvidos no processo isquêmico, tais como: (a) acesso imediato e direto ao compartimento extracelular devido à falta de barreira hematoencefálica (BHE), (b) os fatores ambientais podem ser diretamente controlados, (c) a morfologia do tecido é relativamente inalterada comparada ao animal intacto (desde que as conexões intercelulares estejam preservadas) (De Alba, Cardenas et al. 1999), (d) mantém mediadores inflamatórios (Tavares, Cimarosti et al. 2001), além de ser um excelente ensaio para medidas

farmacológicas quantitativas, bem como para o estudo dos efeitos neuroprotetores do exercício físico frente à POG (Scopel, Fochesatto et al. 2006; Cechetti, Rhod et al. 2007).

1.3 Excitotoxicidade e Morte Celular

O glutamato foi o primeiro neurotransmissor excitatório, identificado em 1960, uma vez que vários agentes farmacológicos que bloqueavam as ações do glutamato também preveniam excitação sináptica fisiológica (Curtis and Watkins 1961). Além disso, é o aminoácido mais abundante no cérebro, com concentrações intracelulares de aproximadamente 10 mM. Participa da síntese proteica e do metabolismo de carboidratos via transaminação do α -cetoglutarato. As ações sinápticas do glutamato são finalizadas através de sua recaptação para dentro dos terminais sinápticos e/ou por astrócitos, sendo a recaptação glial o mecanismo predominante (Hara and Snyder 2007).

Os efeitos pós-sinápticos do glutamato são mediados por receptores de membrana funcionalmente e farmacologicamente distintos, tais como os receptores ionotrópicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), Cainato (KA), e 2-amino-3 (3-hidróxi-5-metilisoxazol-4-il) propionato (AMPA), bem como os receptores metabotrópicos (Hollmann and Heinemann 1994). A abertura de receptores ionotrópicos leva à passagem de íons Na^+ , K^+ , e Ca^{+2} , dependendo do tipo de receptor. Os receptores metabotrópicos não estão necessariamente associados com o poro do canal iônico, mas suas ações dependem de proteínas de ligação dependente de GTP, levando à mobilização de Ca^{+2} por meio da mobilização de estoques internos, tais como retículo endoplasmático (Sattler and Tymianski 2000).

No sistema nervoso central (SNC), a morte neuronal pode ser induzida por excitotoxicidade, mecanismo envolvido em muitas doenças neurológicas, tais como isquemia, epilepsia, traumas ao sistema nervoso, e outras lesões neurodegenerativas (Oppenheim 1991). Observações prévias revelaram que o glutamato poderia ser uma potente neurotoxina, uma vez que injeções de L-glutamato destruíam a camada neural interna da retina de camundongos. Estas observações permaneceram incertas até que foram reproduzidas por Olney, confirmando a excitotoxicidade relacionada com a liberação de aminoácidos

excitatórios (AAE). Introduziu-se, assim, o termo excitotoxicidade, como um resultado da liberação excessiva de glutamato sináptico (Olney 1969).

O tecido cerebral tem um alto consumo de oxigênio e glicose, e depende quase exclusivamente da fosforilação oxidativa para a produção energética. Assim, restrições no fluxo sanguíneo focal limitam a oferta de substratos, particularmente oxigênio e glicose, o que prejudica a manutenção adequada dos gradientes iônicos (Martin, Lloyd et al. 1994). Com a depleção energética, o potencial de membrana é perdido, possibilitando que os neurônios e células gliais despolarizem-se (Katsura, Rodriguez de Turco et al. 1993). Conseqüentemente, os somato-dendritos, bem como os canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem pré-sinápticos tornam-se ativados e AEE são liberados no espaço extracelular (figura 1). Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, tais como recaptação de AAE, são impedidos, o que aumenta o acúmulo de glutamato no espaço extracelular. Ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e metabotrópicos contribui para o acúmulo de $[\text{Ca}^{+2}]_i$. Como resultado da hiper-ativação glutamatérgica, Na^+ e Cl^- entram nos neurônios via canais iônicos monovalentes (como por exemplo, receptores glutamatérgicos do tipo AMPA). Além disso, a água flui passivamente, uma vez que o influxo de Na^+ e Cl^- é muito maior do que o efluxo de K^+ , causando edema celular (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

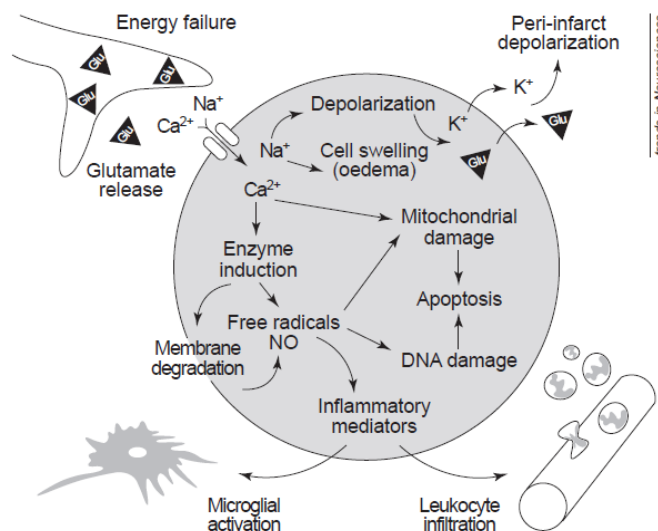


Figura 1. Esquema simplificado dos mecanismos patofisiológicos da isquemia cerebral focal.

Adaptado de (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

Sabe-se que o aumento das concentrações do segundo mensageiro universal, $[Ca^{+2}]_i$, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares que impactam o desenvolvimento do dano tecidual, levando à ativação de enzimas tais como calpaínas e outras proteases, proteínas cinases, óxido nítrico sintases (NOS), calcineurinas, e endonucleases. Presumivelmente, isto leva a uma maior produção de produtos tóxicos como radicais livres, alterações letais na organização do citoesqueleto e/ou ativação de sinais gênicos, culminando em morte celular (Sattler and Tymianski 2000).

A morte celular isquêmica pode ser definida pela incapacidade das células de recuperarem sua forma e funções normais mesmo quando todos os processos envolvidos na propagação do dano celular são interrompidos farmacologicamente (Nedergaard 1987). Há pelo menos três formas distintas de morte celular que participam do processo isquêmico: autofagia, apoptose (tardia) e necrose (aguda) (Clarke 1990; Majno and Joris 1995; Bursch, Ellinger et al. 1996). As duas primeiras estão claramente envolvidas em processos fisiológicos, ocorrendo durante os diferentes estágios de desenvolvimento celular (Clarke 1990). A terceira categoria, também denominada de morte celular necrótica, é fundamentalmente diferente da apoptose e da autofagia, uma vez que somente ocorre após uma lesão exógena, além de não ser uma morte programada ou fisiológica. Os neurônios possuem todas estas formas de morte em resposta a uma lesão isquêmica, sendo que a via de sinalização de morte celular depende da natureza da lesão, do tipo celular, idade, e muito provavelmente do status celular no momento do dano isquêmico (Lipton 1999). Assim, excitotoxicidade é o alvo primário para intervenções terapêuticas do AVE, e sua eficácia terapêutica consiste em estratégias de inibição desta excitotoxicidade tanto *in vivo* como *in vitro* (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

1.4 Estresse Oxidativo e Isquemia Cerebral

1.4.1 Estresse Oxidativo

Como já citado anteriormente, a isquemia cerebral inicia uma cascata complexa de eventos metabólicos, vários destes envolvidos na geração de radicais livres (Love 1999). Podem ser classificados como radicais livres as moléculas orgânicas e inorgânicas, e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (Halliwell, Aeschbach et al. 1995). Essa

configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas. Entretanto, a presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Pompella 1997).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) consistem de radicais livres de oxigênio e moléculas associadas que inclui ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio *singlet* (1O_2), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$) (Chong, Li et al. 2005), hidroxila (OH^\cdot), e o radical semiquinona (Q^\cdot) (Storz and Imlay 1999). Muitas dessas espécies são geradas em baixas concentrações, durante condições fisiológicas normais, em resposta a estímulos internos e externos. Baixas concentrações de ERO podem ser indispensáveis em diversos processos, incluindo: sinalização intracelular de mecanismos de proliferação ou apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos. Por outro lado, altas concentrações ou remoção inadequada das ERO por sistemas antioxidantes endógenos resultam em estresse oxidativo, que pode causar disfunções metabólicas graves e danos às macromoléculas biológicas. Ou seja, as células normalmente são capazes de balancear a produção de oxidantes e antioxidantes para manter um equilíbrio de oxidação-redução. O estresse oxidativo ocorre quando esse equilíbrio é alterado pelo excesso de ERO e/ou pela depleção das defesas antioxidantes (Mates and Sanchez-Jimenez 1999). Assim, o estresse oxidativo representa uma via relevante que leva à destruição de células neuronais e vasculares no SNC, podendo levar à lesão celular por meio da destruição da membrana lipídica e dano ao DNA (Chong, Li et al. 2005).

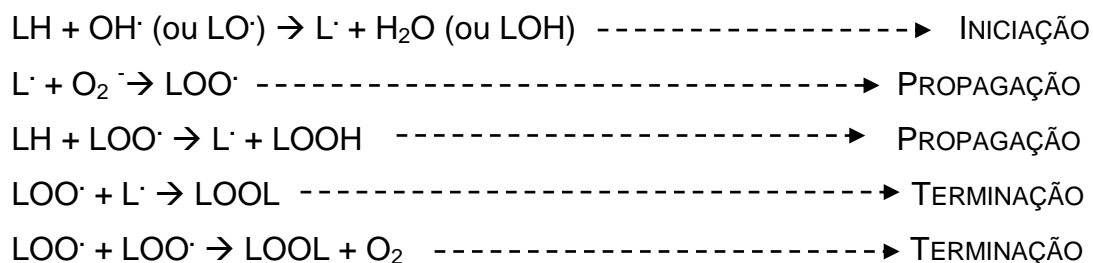
O estresse oxidativo no cérebro ocorre quando a geração de ERO supera a habilidade dos sistemas antioxidantes endógenos em remover o excesso de ERO, levando ao dano celular. Diversas características celulares do cérebro indicam que ele é altamente sensível ao estresse oxidativo, como, por exemplo, possui o maior índice metabólico de oxigênio dentre todos os órgãos (MAIESE 2002). Esta alta taxa metabólica aumenta a probabilidade de maior produção de ERO. Além disso, os tecidos cerebrais contêm grandes quantidades de ácidos graxos insaturados que podem ser metabolizados por radicais livres de oxigênio. Por fim, o cérebro contém concentrações elevadas de ferro que podem estar associadas com lesões causadas por radicais livres (Demougeot, Van Hoecke et al. 2004). Adicionalmente, é interessante notar que esse órgão também apresenta um sistema de defesa inadequado contra o estresse oxidativo. Diferente da glutathione peroxidase (GPx), que é encontrada em altas concentrações no cérebro, há pouca catalase na

substância branca e cinzenta cerebral (Wefers, Komai et al. 1984; Floyd and Carney 1992).

1.4.2 Lipoperoxidação

No SNC as ERO promovem a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares (Mukherjee, Marcheselli et al. 2004), dano ao DNA durante a hidroxilação da guanina e metilação da citosina, e oxidação de proteínas que geram derivados carbonil de proteína e nitrotirosina (Adams, Green et al. 2001). Além dos efeitos deletérios na integridade celular, as ERO podem inibir complexos enzimáticos na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias, resultando no bloqueio da respiração mitocondrial (Yamato, Yamasaki et al. 2002). No sistema vascular cerebral, os efeitos celulares das ERO podem levar à destruição de membranas de células endoteliais e aumentar a permeabilidade das mesmas (Sakamaki 2004).

A peroxidação lipídica é uma das maiores responsáveis por mediar lesões teciduais (Montine, Neely et al. 2002), e ocorre quando os ácidos graxos poliinsaturados nas membranas são atacados por radicais livres na presença de O₂ molecular, levando a uma cadeia de reações de lipoperoxidação, eventualmente possibilitando a formação de gases hidrocarbonetos (p.ex.: metano, etano e pentano) e aldeídos (p.ex.: malondialdeído, MDA) (Leeuwenburgh and Heinecke 2001) que possuem atividade neurotóxica. A lipoperoxidação consiste em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Montine, Neely et al. 2002), como mostrado a seguir:



As reações acima se iniciam com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo OH[·] ou pelo LO[·] (radical alcóxila), com conseqüente formação do L[·] (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L[·] reage rapidamente com o O₂, resultando em

LOO[•] (radical peroxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L[•] na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L[•] e LOO[•]) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até se destruírem (GARDÈS-ALBERT, JORE et al. 1991). Um importante aspecto destas reações é que a peroxidação lipídica não termina até que o substrato seja consumido ou a terminação ocorra (Montine, Neely et al. 2002).

1.4.3 Mecanismos de Defesa Antioxidante

Para proteger contra os danos causados pelo estresse oxidativo, as células possuem várias enzimas antioxidantes e mecanismos de reparação (Storz and Imlay 1999). Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (Sies 1993).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Além disso, os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, aminoácidos das proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (Bianchi and Antunes 1999).

Normalmente três enzimas antioxidantes principais defendem contra os danos oxidativos, superóxido dismutase (SOD), catalase e GPx (Goss, Taffe et al. 1997), que são responsáveis pela degradação do O₂^{•-} e H₂O₂. Três formas de SOD, codificadas por três genes separados, são expressas em células eucariotas: SOD cobre-zinco (CuZnSOD) é encontrada no citosol; SOD manganês (MnSOD) localizada na matriz mitocondrial; e uma outra forma de CuZnSOD extracelular encontrada no plasma e fluidos extracelulares (Nakazono, Watanabe et al. 1991). Todas as três formas de SOD catalisam a dismutação do O₂^{•-} a H₂O₂, que pode ser convertido espontaneamente ao radical OH[•]. Por outro lado, outra defesa antioxidante crítica é por meio das enzimas catalase e GPx, já que ambas removem o H₂O₂ do ambiente intracelular por meio da redução à H₂O e O₂, antes que os

radicais OH[•] possam ser produzidos. Além disso, lesões necróticas podem causar um aumento compensatório da catalase, GPx (Goss, Taffe et al. 1997) e SOD (Brongholi, Souza et al. 2006).

1.4.4 Óxido Nítrico

O NO é a única molécula mensageira primeiramente identificada como um fator de relaxamento derivado do endotélio (Furchgott and Zawadzki 1980). Durante os últimos 20 anos, milhares de artigos têm sido publicados desvendando as funções biológicas do NO (Calabrese, Mancuso et al. 2007).

A NOS é a enzima que catalisa a conversão da L-arginina, NADPH e O₂ em L-citrulina, NO e NADP⁺. Três isoformas de NOS foram caracterizadas: enzima neuronal (nNOS ou NOS1), constitutivamente expressa nestas células (Knowles and Moncada 1994; Merrill, Murphy et al. 1997); a enzima endotelial (eNOS ou NOS3), em células endoteliais; e a enzima induzível (iNOS ou NOS2), induzida em células da glia (astrócitos, micróglia e oligodendrócitos) (Knowles and Moncada 1994). Além desta distribuição, deve-se considerar que muitos tipos de células no cérebro são capazes de expressar várias isoformas de NOS. Assim, astrócitos também podem produzir NO via atividade da nNOS (Simmons and Murphy 1992). Embora estas três enzimas utilizem co-fatores comuns e mecanismos de ações similares, elas são estruturalmente distintas uma das outras (Furfin, Harmon et al. 1994). Na presença de O₂, NADPH e co-fatores tais como flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), heme e tetrahydrobiopterina (BH₄), as NOS catalisam a oxidação do nitrogênio guanidil terminal do aminoácido L-arginina à L-citrulina e NO (Bredt 1999) (figura 2). Uma vez formado, o NO facilmente difunde-se dentro das células ou através da membrana celular, envolvendo-se em ações autócrinas e parácrinas (Calabrese, Mancuso et al. 2007).

No SNC a produção de NO está associada com funções cognitivas, controle do sono, apetite, temperatura corporal e neurosecreção (Guix, Uribealgo et al. 2005). No sistema nervoso periférico (SNP), NO regula a vasodilatação de células musculares lisas, como por exemplo, do trato gastrointestinal e urogenital (Takahashi 2003), neuroproteção e neurotoxicidade (Calabrese, Mancuso et al. 2007).

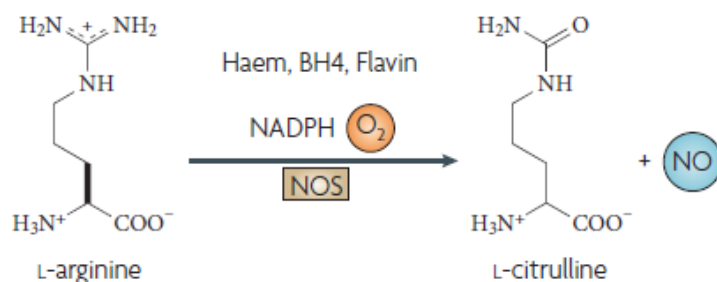


Figura 2. Via metabólica que leva à formação do NO. Adaptado de (Calabrese, Mancuso et al. 2007). As óxido nítrico sintases catalisam a formação do NO através da oxidação do aminoácido L-arginina na presença de O₂ e co-fatores como NADPH, Heme, Flavina e BH₄, no aminoácido L-citrulina e NO.

O NO pode conferir neuroproteção por vários mecanismos. Ele S-nitrosila caspase-3 e as subunidades do receptor NR1 e NR2 do receptor glutamatérgico NMDA, como consequência desta reação, o influxo de Ca⁺² através deste receptor e a atividade da caspase-3 são ambos inibidos, levando à diminuição da morte celular (Melino, Bernassola et al. 1997; Tennesi, D'Emilia et al. 1997; Jaffrey, Erdjument-Bromage et al. 2001); por meio da estimulação de proteínas CREB e Akt, que são moléculas envolvidas na transdução de sinais de fatores neurotróficos, importantes para a sobrevivência neuronal (Contestabile and Ciani 2004; Riccio, Alvania et al. 2006). Em adição a estas vias, NO induz a atividade da heme-oxygenase-1, que gera biliverdina, precursora da molécula antioxidante, bilirrubina (Motterlini, Green et al. 2002).

O NO torna-se neurotóxico quando é produzido em excesso. Quando a célula está em um estado pró-oxidante, NO pode levar à reação de oxi-redução para formar compostos tóxicos, pertencentes à família de espécies reativas de nitrogênio (ERN), que podem levar à morte celular. Recentemente, o termo estresse nitrosativo, implicados na patofisiologia de doenças neurodegenerativas, tem sido usado para indicar o dano celular que é provocado pelo excesso de NO e ERN (principalmente ONOO⁻) (Guix, Uribealga et al. 2005).

Há fortes evidências mostrando que o NO está envolvido em mecanismos de neurotoxicidade após isquemia cerebral. O papel do NO tem sido estudado usando modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo* em roedores. As evidências indicam que o NO possa exercer efeitos protetores ou deletérios, dependendo de fatores tais como: estágio temporal após o início da isquemia cerebral, isoforma de NOS, bem como a

fonte celular de NO. Assim, o NO liberado pela ação da eNOS poderia ser protetora por promover vasodilatação e inibição da agregação e adesão plaquetária na microvasculatura cerebral. Entretanto, após o desenvolvimento da isquemia, NO produzido pela hiper-ativação da nNOS e, posteriormente, o NO liberado *de novo* pela expressão da iNOS contribuiriam para o dano cerebral (Moro, Cardenas et al. 2004) (figura 3).

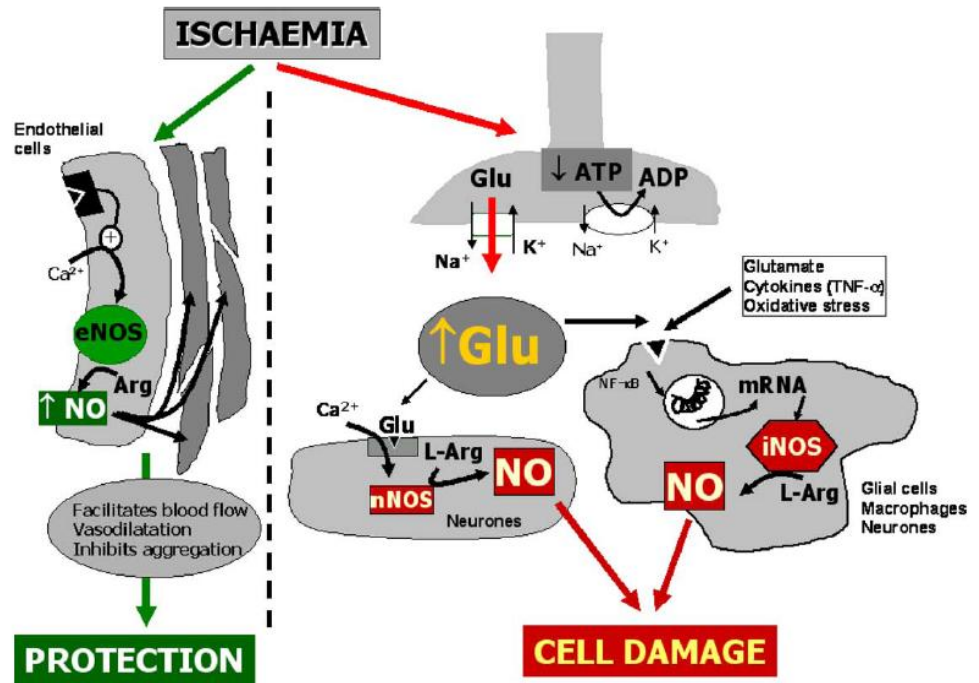


Figura 3. Papel dual do NO após isquemia cerebral. Adaptado de (Moro, Cardenas et al. 2004). Imediatamente após a isquemia cerebral NO liberado pela eNOS é protetora por promover vasodilatação e por inibir agregação e adesão na microvasculatura, entretanto, após o desenvolvimento da isquemia, NO produzido pela hiper-ativação da nNOS e, posteriormente, liberado pela produção *de novo* pela iNOS contribuem para o dano isquêmico.

1.4.4.1 Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS)

Dentre as três isoformas de NOS, a nNOS constitui a fonte predominante de NO em neurônios e localiza-se nas espinhas sinápticas. Adicionalmente, nNOS está presente no músculo esquelético (Schwarz, Kleinert et al. 1999), cardíaco e liso, onde NO controla o fluxo sanguíneo e a contratilidade muscular (Stamler and Meissner 2001).

A NOS neuronal consiste de 1.434 aminoácidos, com um peso molecular de 160.8 KDa (Boissel, Schwarz et al. 1998). O monômero da nNOS é inativo, a forma dimérica é ativa e a dimerização requer BH₄, heme e L-arginina (Reif, Frohlich et al. 1999). O monômero exibe um bi-domínio contendo um domínio oxigenase (N-terminal) e um domínio redutase (C-terminal) que pode ser separado por um grupo ligado à calmodulina (Sagami, Daff et al. 2001).

Vários estudos conduzidos em roedores e primatas têm mostrado que a nNOS é abundante em áreas cerebrais tais como: córtex cerebral, núcleo endopiriforme, *claustrum*, bulbo olfatório, núcleo *accumbens*, estriato, amígdala, hipocampo (em particular para as regiões CA1 e giro denteado), hipotálamo, tálamo, núcleo do trato solitário e cerebelo (Rodrigo, Springall et al. 1994). A nNOS é expressa em neurônios independentes do seu estado de desenvolvimento. Uma vez que o NO não pode ser estocado nas células, são necessárias novas sínteses para que possa exercer suas propriedades funcionais. Assim, nNOS deve estar vinculada direta ou indiretamente (através de proteínas de ancoragem) à membrana plasmática. Adicionalmente, estudos têm demonstrado que a nNOS também existe na forma particulada e solúvel (Hecker, Mulsch et al. 1994), podendo ser encontrada no núcleo ou citoplasma (Rothe, Canzler et al. 1998). Estas diferenças na localização da nNOS poderia contribuir para suas diversas funções (Zhou and Zhu 2009).

Em condições fisiológicas a nNOS produz NO somente quando as concentrações de [Ca⁺²]_i estão elevadas, produzindo NO em pequenas quantidades em condições normais. No entanto, durante isquemia cerebral, onde as concentrações de [Ca⁺²]_i estão elevadas, nNOS torna-se permanentemente ativada e produz altas concentrações de NO (Iadecola, Zhang et al. 1995). Os mecanismos que levam a excessiva ativação da nNOS são mediados pela hiper-ativação de receptores glutamatérgicos, especialmente do tipo NMDA, em neurônios pós-sinápticos, que levam ao aumento da [Ca⁺²]_i livre, e subsequente ativação da nNOS (Almeida, Heales et al. 1998) Concomitantemente, a crise energética celular causada pelo processo isquêmico leva à disfunção mitocondrial, onde a capacidade mitocondrial de reduzir O₂ a H₂O torna-se ineficiente, levando à formação de O₂⁻. Se este for o caso, o O₂⁻ reage avidamente com o NO para formar ONOO⁻, que é um inibidor irreversível da função mitocondrial, e pró-oxidante que lesa lipídios,

proteínas e DNA, levando a dano celular e morte neuronal (Bolanos and Almeida 1999).

Após isquemia cerebral, as concentrações de NO na área isquêmica aumentam em taxas micro molares dentro de 20 min (Nomura and Kitamura 1993). Neste contexto, tem sido descrito que a atividade da nNOS aumenta aos 10 min após isquemia cerebral focal e retorna às concentrações normais após 60 min (Merrill, Murphy et al. 1997), sendo encontrada uma supra-regulação de mRNA de nNOS, bem como um aumento da imunorreatividade em neurônios após isquemia cerebral *in vivo* (Agullo and Garcia 1992). Entretanto, tem sido descrito que a atividade da nNOS sofre uma infra-regulação após 20 min isquemia ou privação de oxigênio e glicose (Iadecola, Zhang et al. 1995). Esta infra-regulação pode ser uma consequência direta do dano isquêmico, pelos quais proteínas citosólicas são perdidas devido ao rompimento da membrana plasmática; bem como, pela inibição causada pela excessiva formação de NO resultado da expressão tardia da iNOS (Rengasamy and Johns 1993).

Neste contexto, onde a excitotoxicidade glutamatérgica causada pela cascata isquêmica é uma das responsáveis por aumentar a produção de ERO, e estes por sua vez culminam em processos patofisiológicos de lesão e morte celular, tem sido observado o aumento de mecanismos compensatórios, tais como a expressão e atividade de moléculas antioxidantes. Assim, estratégias terapêuticas que possibilitem o aumento de tais defesas podem ser neuroprotetoras (Wang, Cheng et al. 2003).

1.5 Neuroproteção

Neuroproteção é definida como qualquer intervenção farmacológica ou não capaz prevenir morte neuronal. Assim, o exercício físico dependendo da intensidade tem sido utilizado como uma ferramenta não invasiva na prevenção e tratamento de muitas doenças neurodegenerativas, capaz de diminuir lesão cerebral através de possíveis mecanismos neuroprotetores (Cotman and Berchtold 2002).

1.5.1 Exercício Físico

Os roedores são os animais mais utilizados nos principais modelos experimentais que investigam os paradigmas do exercício físico nas funções

cerebrais e seus mecanismos. Os dois principais modelos de atividade física são: (1) atividades voluntárias como atividades em rodas de correr (Brown and Van Huss 1973) e ambientes enriquecidos (Lewis 2004), e (2) exercícios forçados como natação (Ostman and Nyback 1976) e esteira (Ploughman, Granter-Button et al. 2005). Estes modelos geralmente visam estimular respostas a um treinamento com predominância de metabolismo aeróbio, pois este tipo de exercício está associado com benefícios à saúde em geral.

Atividade física é definida como qualquer movimento do corpo produzido pelos músculos esqueléticos que resulte em gasto energético maior que o gasto basal (Kozakova, Palombo et al. 2007). O exercício é um subgrupo da atividade física que é planejado, estruturado e repetitivo, e que tem como objetivo o aumento ou manutenção do condicionamento físico (Caspersen, Powell et al. 1985).

Há vários estudos epidemiológicos demonstrando que o exercício físico regular é capaz de beneficiar positivamente a saúde, aumentando a qualidade de vida e diminuindo a incidência de disfunções relacionadas ao estilo de vida (Radak, Kaneko et al. 2001). Também contribui para a redução de tumores (Mahabir, Leitzmann et al. 2004), diminui o risco de AVE, bem como a mortalidade induzida pelo mesmo (Lee and Paffenbarger 1998). Entretanto, estes benefícios ainda são controversos quanto à extensão dos mesmos ao cérebro (Ramsden, Berchtold et al. 2003).

Os benefícios do exercício sobre a saúde mental têm sido reconhecidos por séculos. Tão cedo quanto 4 anos a.C a 65 d.C, Sêneca, filósofo e dramaturgo romano já prescrevia o exercício em seus manuscritos como um meio para se obter aumento da saúde mental e corporal (James 1890). Porém, só nas últimas duas décadas que as investigações científicas ampliaram-se substancialmente a cerca dos efeitos do exercício sobre o SNC. Assim, tanto estudos clínicos (Berkman, Seeman et al. 1993) quanto em modelos animais (Friedland, Fritsch et al. 2001) têm repetidamente demonstrado que o exercício beneficia a função neuronal, aumentando aprendizado e memória, reduzindo os declínios na função mental que aparecem com a senescência (Hill, Storandt et al. 1993), facilitando recuperação funcional após lesão cerebral e medular (Carro, Trejo et al. 2001), e depressão (Young, Lawlor et al. 1999).

Os efeitos do exercício no cérebro estendem-se além do aumento do suprimento sanguíneo regional (Lindvall, Kokaia et al. 1994), muito menos fica

restrito às regiões sensório-motoras. O exercício pode ativar circuitos neurais específicos que modificam a maneira pela qual a informação é transmitida através das células nas sinapses, possivelmente por atuar em moléculas especializadas (Lu and Chow 1999). Fatores de crescimento, tais como da família das neurotrofinas (NT), são potenciais candidatos, pelo fato de serem importantes moduladores da sobrevivência e plasticidade neuronal (Neeper, Gómez-Pinilla et al. 1996). Entre os fatores tróficos elevados no cérebro pelo exercício estão: fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor*, IGF) (Carro, Trejo et al. 2001), de fibroblasto (*fibroblast growth factor 2*) (Gómez-Pinilla, Dao et al. 1997) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF) (Neeper, Gómez-Pinilla et al. 1996). Embora, outros fatores tróficos tenham importantes participações na promoção da plasticidade neuronal, o aumento de BDNF e moléculas associadas à plasticidade têm sido o foco para os efeitos do exercício no cérebro, especialmente no hipocampo, área vital relacionada ao aprendizado e memória, bem como córtex cerebral, cerebelo e medula espinhal (Neeper, Gomez-Pinilla et al. 1995).

Os benefícios do exercício físico também estão associados com o balanço entre estresse oxidativo e mecanismos antioxidantes. Ratos jovens e velhos após treinamento físico de natação aprimoraram o aprendizado e a memória (Radak, Kaneko et al. 2001) além de diminuírem a carbonilação de proteínas (Ogonovszky, Berkes et al. 2005) e lipoperoxidação em cerebelo (Radak, Toldy et al. 2006), hipocampo e córtex cerebral (Jolitha, Subramanyam et al. 2006). Sendo que a redução da produção de radicais livres persistiram mesmo após 8 semanas do término de treinamento físico (Radak, Toldy et al. 2006). O aumento da atividade de enzimas antioxidantes no cérebro como resposta ao treinamento físico regular está ligado ao excesso de formação de radicais livres (Radak, Asano et al. 1995).

Em casos de isquemia cerebral *in vivo*, que envolvem a área da ACM, o exercício físico realizado antes da lesão tem efeito neuroprotetor: menor volume de infarto cerebral, maior expressão de fatores neurotróficos (fator de crescimento neural e BDNF) no córtex cerebral e no estriado, bem como um maior número de vasos sanguíneos no estriado (Ang, Wong et al. 2003; Ding, Li et al. 2004). Ratos machos que realizaram duas ou quatro semanas de exercício na esteira, antes de serem submetidos à oclusão da ACM por 60 min, apresentaram menor volume de infarto e edema cerebral menos grave, quando comparados ao grupo sedentário e

ao grupo de animais que se exercitou apenas por uma semana (Wang, Yang et al. 2001).

Modelos de isquemia cerebral *in vitro* também têm demonstrado os efeitos neuroprotetores do exercício prévio. Fatias hipocâmpais de ratos submetidos a um treinamento leve em esteira, com intensidade moderada (60% $VO_{2\text{ máx}}$), (3x/semana, 12 semanas, 20 min/dia) quando submetidas à POG (60 min), apresentaram menor morte celular quando comparadas às fatias controles de animais sedentários. Entretanto, as fatias hipocâmpais de animais submetidas ao treinamento extenuante em esteira, numa intensidade moderada (60% $VO_{2\text{ máx}}$), (2x/semana, 60 min/dia, 2 semanas), apresentaram maior vulnerabilidade frente à POG (45 min) (Scopel, Fochesatto et al. 2006; Cechetti, Rhod et al. 2007).

Neste contexto, onde o exercício físico é capaz de induzir neuroproteção frente à lesão cerebral isquêmica, um dos possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos seriam através da participação de vias relacionadas ao estresse oxidativo, haja vista sua contribuição para a o dano e morte celular após isquemia-reperfusão tecidual. Sendo assim foi hipótese deste trabalho que as vias de estresse oxidativo participam na neuroproteção mediada pelo treinamento físico em fatias corticais e hipocâmpais submetidas à privação de oxigênio e glicose.

2 JUSTIFICATIVA

O AVE é uma permanente causa de morte e de incapacidade no Brasil e no mundo. Uma vez que o tratamento efetivo ainda seja limitado, e muitos sobreviventes necessitem de reabilitação e cuidados contínuos, é de suma importância que mais pesquisas sejam feitas nesta área, com o objetivo de desenvolver terapias mais eficazes na prevenção e no tratamento. Particularmente, estratégias neuroprotetoras que incluiriam antagonismo das ações glutamatérgicas, bloqueadores de canais de Ca^{+2} , diminuição da atividade das NOS e aumento de fatores neurotróficos.

Neste panorama, o maior foco das pesquisas científicas na área de exercício físico e neuroproteção estão em delinear o potencial terapêutico do exercício em lesões no SNC. Entretanto, o ponto limitante da aplicação do exercício como terapia de reabilitação está na seguinte questão: *Quais são os mecanismos moleculares e as vias de sinalização através dos quais o exercício promove o aumento dos mecanismos de defesa antioxidante, plasticidade sináptica, recuperação funcional, e neuroproteção?*

O uso de novas ferramentas como o exercício físico, de baixo custo, não invasivo, eficaz e que possa ser aplicado com outros protocolos, tais como células-troncos e manipulações farmacológicas são relevantes no sentido de aumentar a neuroproteção, e proporcionar uma maior expectativa e melhor qualidade de vida aos sobreviventes de AVE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação das vias de estresse oxidativo na neuroproteção mediada pelo treinamento físico em fatias de hipocampo e córtex cerebral submetidas à privação de oxigênio e glicose.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a carga máxima suportada no teste de esforço máximo de animais submetidos ou não a um protocolo de natação;

Avaliar marcadores de condicionamento físico no fígado e músculo de animais submetidos ou não a um protocolo de natação;

Quantificar a morte celular em fatias corticais e hipocampais de animais sedentários e treinados submetidos ou não à POG;

Quantificar a concentração de nitrito [NO₂⁻] acumulado em meio de incubação em fatias corticais e hipocampais de animais sedentários e treinados submetidos ou não à POG;

Avaliar a atividade da enzima SOD em fatias corticais e hipocampais de animais sedentários e treinados submetidos ou não à POG;

Avaliar a lipoperoxidação em fatias corticais e hipocampais de animais sedentários e treinados submetidos ou não à POG.

Quantificar a concentração de glutamato acumulado em meio de incubação em fatias corticais e hipocampais de animais sedentários e treinados submetidos ou não à POG.

4 MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 37 ratos machos, pesando 150-200 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-UFMG). Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água “*ad libitum*”, tendo a temperatura ambiente controlada (25 °C), com foto período de 12 h claro/escuro.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo nº. 139/2009 (Vide Anexos). Todos os experimentos foram conduzidos de forma a evitar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados.

4.2 Sistema de Natação

A natação é frequentemente utilizada, pois apresenta custos mais baixos em comparação à esteira rolante e é considerada uma habilidade inata destes animais (de Araujo, Papoti et al. 2007). Além disso, permite selecionar sobrecargas de exercício através da variação de 3% a 6% da massa corporal do animal e impõe menor estresse mecânico devido ao empuxo da água, recrutando diferentes grupos musculares e reduzindo os efeitos da gravidade (Jolitha, Subramanyam et al. 2006). Estudos realizados utilizando esse modelo revelam ocorrência de adaptações ao treinamento físico semelhantes às observadas em humanos e ratos treinados em esteira rolante (Gobatto, de Mello et al. 2001; Voltarelli, Gobatto et al. 2002; de Araujo, Papoti et al. 2007).

O uso da natação tem sido proposto por diversos autores para o estudo de suas adaptações no SNC (Kelliher, Connor et al. 2000; Radak, Kaneko et al. 2001; Bilanz Bleuel, Rech et al. 2002; De Groote and Linthorst 2007). Apesar de evidências prévias, demonstrando que o treinamento com a natação melhora algumas funções cognitivas em ratos, e que em paralelo atenua o acúmulo do dano protéico oxidativo (Murakami, Shimomura et al. 1997; Snyder 1998), a piscina como método para exercício físico, não tem sido utilizada consistentemente como terapia neuroprotetora.

O sistema de natação utilizado neste trabalho foi adaptado tendo em vista a necessidade de um instrumento que viabilize o treinamento físico de animais em nosso laboratório e que seja adequado, barato, de fácil manuseio e acesso, que busque melhor visualização e acompanhamento dos animais durante o treinamento, aquecimento da água à temperatura fisiológica e higienização.

O sistema constitui-se por quatro tanques individuais, ou baias, para natação, viabilizando um maior controle durante o treinamento. Os tanques foram confeccionados com vidros transparentes de 8 mm lateralmente e 6 mm em suas divisórias, o que permite completa visualização e acompanhamento do animal. Cada tanque apresenta dimensões de 20 cm x 20 cm x 70 cm, correspondendo cada um a um volume de 28 l. Todos os quatro tanques são interconectados por espaçamentos inferiores entre suas divisórias, permitindo assim completa homogeneidade da água no meio (figura 4).

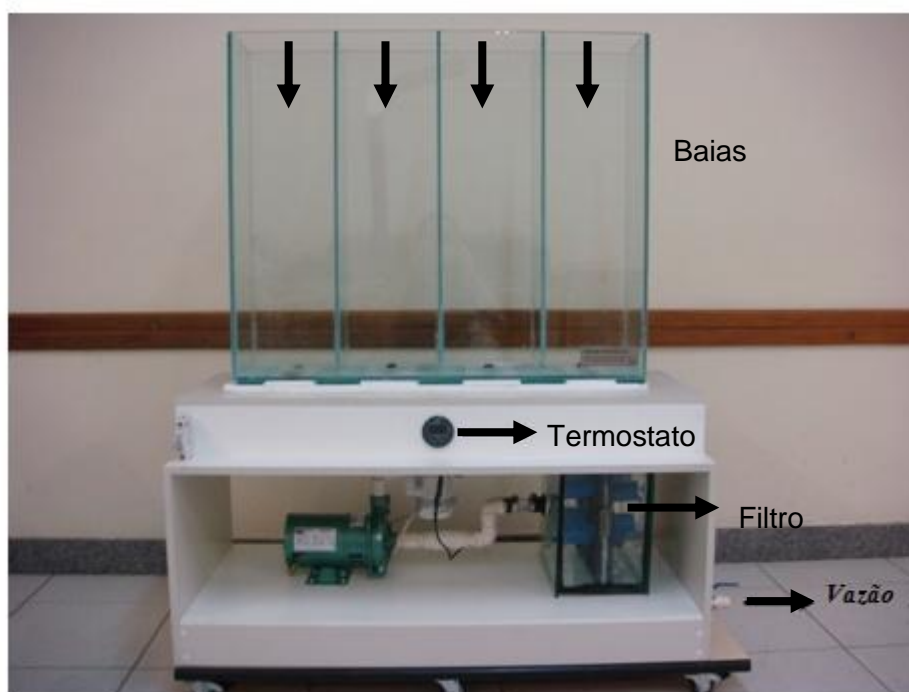
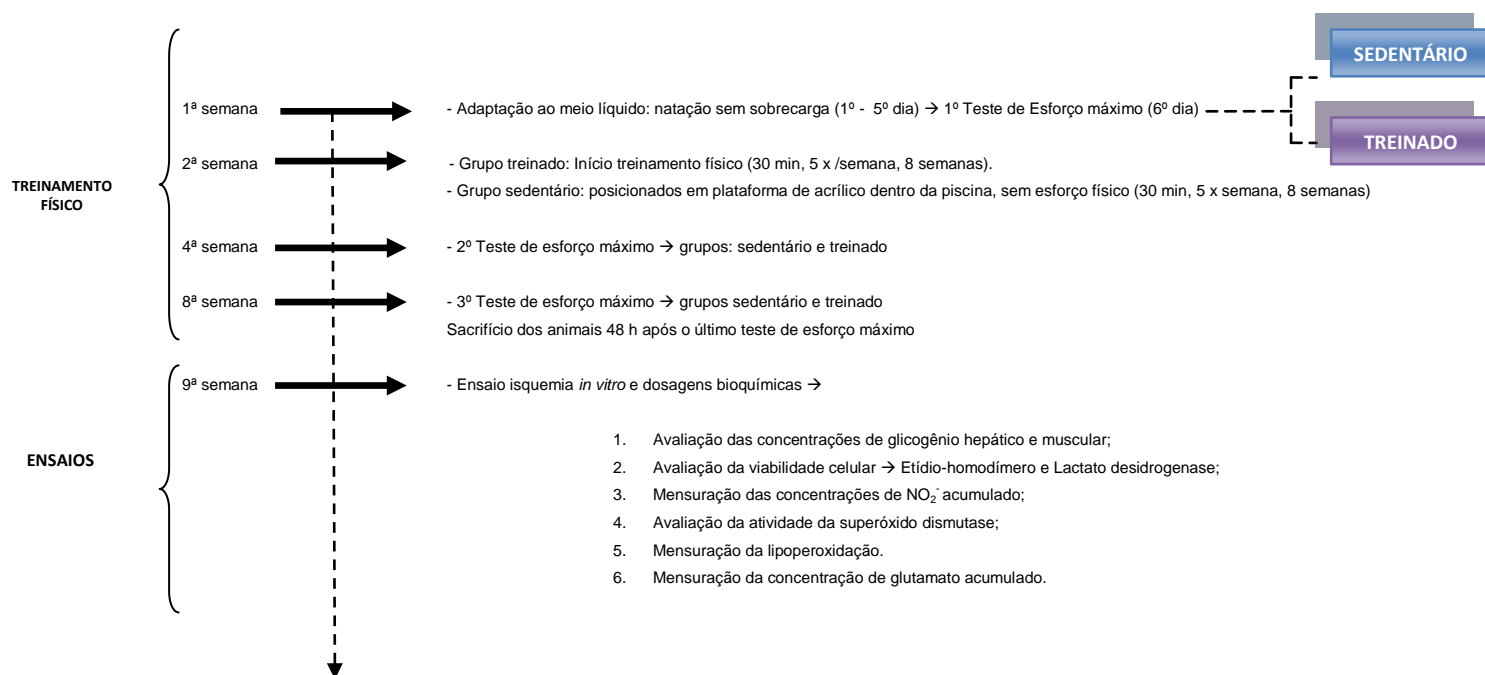


Figura 4. Sistema de natação composto por quatro baias, temperatura controlada $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, filtro e vazão de água.

4.3 Delineamento Experimental



4.4 Protocolo de Treinamento Físico

Inicialmente todos os animais foram pesados e adaptados ao meio líquido, na mesma piscina onde foram treinados, em uma temperatura aproximada de 32 °C ± 1, com períodos progressivos de natação (5 – 25 min), sem sobrecarga, durante cinco dias consecutivos. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal sem promover adaptações relacionadas ao treinamento (Voltarelli, Gobatto et al. 2002). Terminado o período de adaptação, todos os animais foram novamente pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos, grupo exercício e grupo sedentário. No dia seguinte à adaptação ao meio líquido, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo (TEM), com o objetivo de identificar o aumento da capacidade física destes animais, bem como a carga que seria imposta aos mesmos nas semanas de treinamento subsequentes (Almeida, Gomes-Filho et al. 2009).

O TEM consiste em um período de natação com incrementos da carga de 1% do peso corporal, a cada 3 min. As cargas foram colocadas à cauda do animal até o momento da exaustão, identificada quando o animal permaneceu abaixo da

superfície por mais de 10 s (Baker and Horvath 1964; Almeida, Gomes-Filho et al. 2009). A intensidade do treinamento físico subsequente foi obtida por meio do cálculo de 60% do peso máximo obtido no TEM. O peso máximo suportado pelos animais no TEM foi convertido a uma porcentagem do peso corporal do animal. Assim, a cada semana, os ratos eram pesados e, usando uma porcentagem do valor calculado, uma nova carga de trabalho era obtida e a sobrecarga de 60% era determinada (Almeida, Gomes-Filho et al. 2009).

Os ratos foram treinados no decorrer de 8 semanas, 5x/semana, durante 30 min. O grupo sedentário no decorrer do período de exercício foi colocado dentro da piscina, sobre uma plataforma de acrílico, profundidade da água de 5 cm, permitindo que este grupo presenciasse o mesmo ambiente do grupo exercício mas sem realizar esforço físico (Tatchum-Talom, Schulz et al. 2000) (figura 5). Sendo que o período de treinamento foi entre 13 – 18 h.

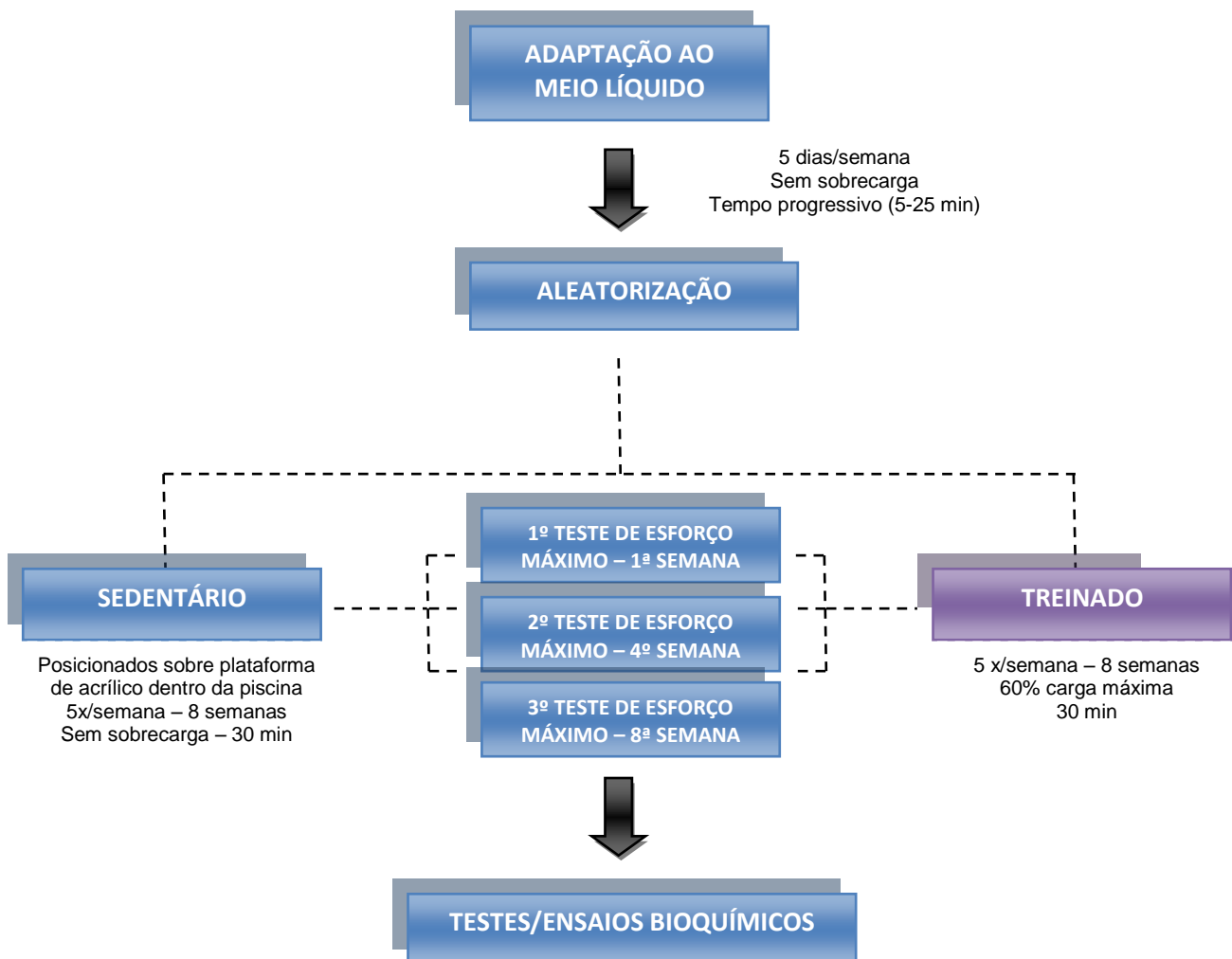


Figura 5. Protocolo de exercício físico.

Ao final de quatro e oito semanas de treinamento, um novo TEM foi realizado com ambos os grupos, proporcionando a imposição de uma sobrecarga fiel ao condicionamento subsequente dos animais do grupo treinado com o passar do tempo, e uma comparação entre os grupos (sedentário e treinado) quanto à capacidade física subsequente ao treinamento físico.

As cargas de treinamento foram confeccionadas utilizando fios de solda, baseados no peso corporal do animal. Foram construídas peças de 1% do peso corporal para o teste de esforço máximo e 60% do peso corporal para o protocolo de exercício físico (figura 6).

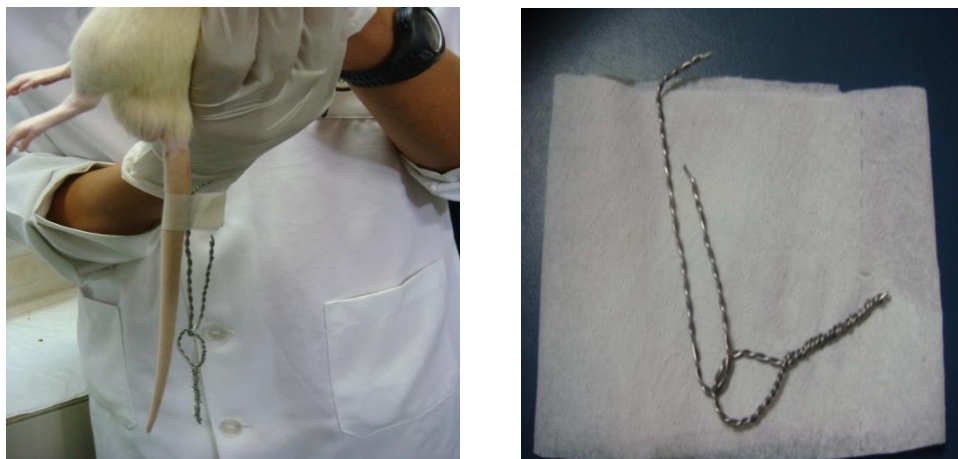


Figura 6. Confeção das cargas de treinamento.

4.5 Dissecação e Preparação das Estruturas

Após 48 h do último teste de esforço máximo, os animais foram sacrificados por decapitação, o músculo gastrocnêmio (pata traseira esquerda) e o fígado foram dissecados, pesados e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise. Os cérebros foram rapidamente removidos e colocados sobre uma placa de Petry com papel de filtro, invertida sobre o gelo, umedecida com solução de *Krebs Ringer Henseilt* (KRH) gelado ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e aerado, para a dissecação dos córtices e os hipocampus dos animais. Em seguida, foram fatiados imediatamente numa espessura de $400\text{ }\mu\text{m}$ usando-se fatiador de tecidos do tipo “chopper” (as três primeiras fatias do hipocampo de cada extremidade do tecido foram descartadas), e levadas para o banho de agitação, mantido a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As fatias de um mesmo animal foram então divididas aleatoriamente em: (1) fatias controle sedentário e treinado, não

submetidas à privação de oxigênio e glicose (nPOG SED; nPOG TRE), (2) e submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG SED; POG TRE).

Em resumo, as fatias de córtex cerebral (2 ml de KRH) e hipocampo (1 ml de KRH) foram incubadas, por 15 min, em uma solução de KRH modificada (pré-incubação), aeradas com uma mistura de 95% O₂/5% CO₂) contendo (mM): NaCl, 120; KCl, 2; CaCl₂, 0.5; NaHCO₃, 26; MgSO₄, 10; KH₂PO₄, 1.18; glicose, 11 e sacarose 200 (Garthwaite, Woodhams et al. 1979). A sacarose foi adicionada para obter uma solução hipertônica para prevenir edema celular, e as altas concentrações de magnésio e baixa concentração de cálcio foi utilizada para prevenir danos causados pela ativação do receptor NMDA (Aitken, Breese et al. 1995; Lizasoain, Knowles et al. 1995). Em seguida as fatias foram novamente incubadas nesta solução de pré-incubação, entretanto sem sacarose por 45 min. Após o período de pré-incubação, as fatias foram incubadas em outra solução de KRH modificada (solução de incubação) contendo (mM): NaCl, 120; KCl, 2; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 26; MgSO₄, 1.19; KH₂PO₄, 1.18; glicose, 11 e 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄), 10 μM; aerada com 95% O₂/5% CO₂. A BH₄ foi adicionada uma vez que experimentos prévios mostraram que, na ausência de BH₄, a atividade das NOS declinam com o tempo de incubação (ex.: tempo 0 min 10.9 ± 0.9 pmol/min/mg proteína; 60 min, 6.1 ± 0.3 pmol/min/mg proteína), a inclusão de BH₄ (10 μM) previne este declínio (60 min, 10.6 ± 1 pmol/min/mg proteína), mantendo a atividade das NOS nas fatias às concentrações que não são estatisticamente diferentes do tecido fresco (Lizasoain, Knowles et al. 1995). As fatias correspondentes ao grupo controle (nPOG SED; nPOG TRE) foram então incubadas nestas condições por 60 min. As fatias do grupo privação de oxigênio e glicose (POG SED; POG TRE) foram introduzidas em solução de incubação sem glicose e equilibrada com 95% N₂/5% CO₂, mimetizando uma condição isquêmica por 60 min. Após este período foram coletados e congelados, em freezer – 80 °C, os meios de incubação dos grupos controle (nPOG SED; nPOG TRE) e isquemia (POG SED; POG TRE) para posterior análise.

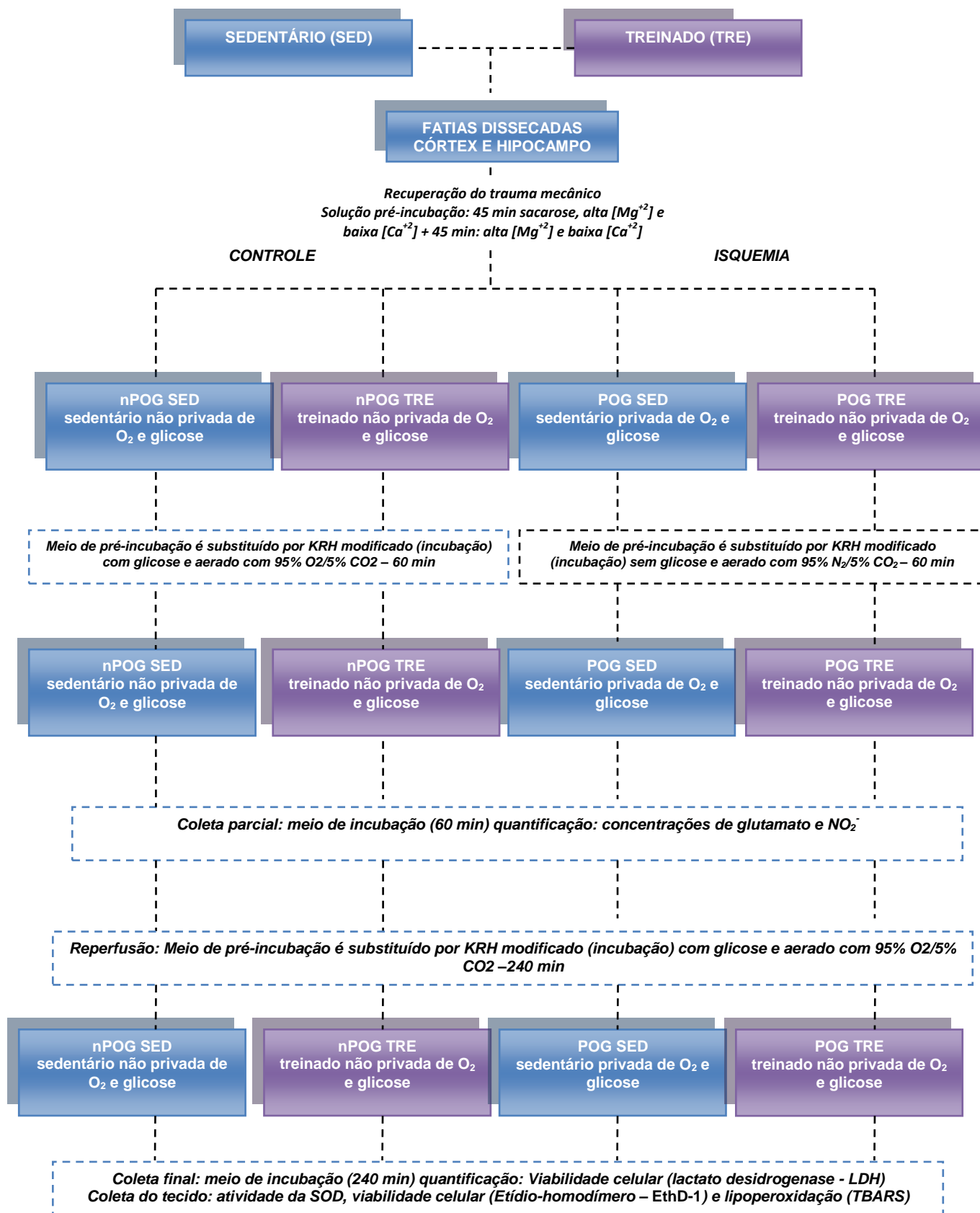


Figura 7. Esquema representativo da privação de oxigênio e glicose e coleta das amostras.

As fatias restantes tiveram o meio substituído com solução de incubação rico em glicose e equilibrado com 95% O₂/5% CO₂ para simular um período de reperfusão durante 240 min. Em seguida, o meio de incubação e as fatias foram coletados, processados, e armazenados a – 80 °C para posteriores análises bioquímicas (figura 7). As fatias permaneceram durante todo o período em banho de agitação mantido à temperatura de 37 °C, apenas as fatias de hipocampo destinadas ao protocolo de viabilidade celular, Etídio-homodímero (EthD-1), permaneceram em banho-maria, 37 °C durante todo o protocolo, a fim de minimizar os danos causados pelo banho de agitação, possibilitando melhor visualização das imagens (De Alba, Cardenas et al. 1999).

4.6 Determinação da Concentração do Glicogênio Hepático e Muscular

Para a quantificação do glicogênio, fez-se inicialmente a digestão alcalina de 200 mg de tecido muscular e 100 mg de tecido hepático em 1 mL de KOH 6N, por 3 a 5 min. Em seguida, um volume de 200 µL da suspensão foi transferido para 3 mL de etanol e 100 µL de K₂SO₄ (10%), sendo esta solução centrifugada a 3000 r.p.m por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 2,5 mL de água destilada. Uma alíquota foi adicionada a 500 µl de fenol (4,1%) seguido da adição de ácido sulfúrico concentrado ao meio (Dubois, Gilles et al. 1956). Os tubos de reação foram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 480 nm. A concentração de glicosil-glicose foi estimada a partir de um padrão de glicose contendo 100 nmols (Bidinotto, Moraes et al. 1997). A concentração de glicogênio muscular e hepático foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$[\text{Glicogênio}] = \frac{\text{Abs. Am} * [\text{padrão glicose}] * \text{Diluição}}{\text{Abs. Padrão} * \text{Peso Tecido}}$$

Em que:

Abs. Am. = absorbância da amostra;

[padrão glicose] = concentração padrão de glicose (100 nmols);

Diluição = diluição do extrato (músculo = 50 x; fígado = 125x)

Abs. Pd. = absorbância padrão;

Peso do tecido = 200 mg de músculo e 100 mg de fígado.

4.7 Viabilidade Celular

4.7.1 Lactato desidrogenase

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica que faz parte da via anaeróbia da última etapa da via glicolítica, que é uma reação de oxi-redução catalisada pela referida enzima (Papoti, Leme de Almeida et al. 2008). Em situações de lise celular esta é extravasada, apresentando máxima atividade no período de 1 h após isquemia-reperfusão tecidual, e estabilizando nos períodos subsequentes (Fernández-López, Martínez-Orgado et al. 2005). A atividade da LDH, liberada no meio de incubação, foi determinada usando um *kit* comercial para LDH (método modificado de Whitaker, Doles® Reagentes, Goiânia, Brasil) a fim de verificar o dano celular (lise). Este método emprega a reação lactato/piruvato com a geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), que reduz a fenazina metossulfato e este o alumínio férrico. O alumínio ferroso então reage com 1,10-fenantrolina, formando um complexo colorido, monitorado espectrofotometricamente (490 nm) (Koh and Choi 1987). A quantificação foi realizada num período máximo de 24 h após a coleta do meio de incubação. A normalização foi realizada por meio da quantificação de proteínas totais das amostras das fatias de córtex cerebral e hipocampo homogeneizadas previamente (Bradford 1976).

4.7.2 Etídio-homodímero

Para a quantificação da morte celular utilizou-se o marcador EthD-1 (2 mM) (*Live/Dead – Viability/Cytotoxicity Kit – Molecular Probes Inc.*), que permite a avaliação de alterações físicas e químicas em células com membranas danificadas. Após o processo de isquemia e consequente 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 3 µl

de EthD-1 (2 mM), dissolvido em 1 ml de solução de KRH com glicose, oxigenada previamente. Manteve-se a incubação protegida da luz por um período de 30 min, à temperatura ambiente. Após incubação a solução de marcação foi retirada e as fatias foram lavadas com 1 ml de solução de KRH com glicose, oxigenada previamente, por 30 min (Monette, Small et al. 1998).

Após lavagem, as fatias foram fixadas em 1 ml de paraformaldeído 4% por 15 min, lavadas com 1 ml de solução tampão fosfato por 5 minutos, seguidas de mais 2 lavagens rápidas com 1 de KRH com glicose, oxigenada previamente por 5 min. Assim, após fixação e lavagem, as fatias foram montadas em lâminas *Vectashield*[®], sobrepostas com lamínulas e encaminhadas ao microscópio de fluorescência (*Axio Imager.M2* - Zeiss). As imagens no microscópio de fluorescência foram adquiridas através do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*, com aumentos de 20x. As regiões CA1 dos hipocampos foram selecionadas e o tempo de exposição à luz calculada automaticamente. A captação da fluorescência, resultante da marcação com EthD-1 (excitação/emissão: 528/617nm), foi realizada através de um filtro óptico correspondente a seu comprimento de onda. Posteriormente, foram submetidas a um processamento, 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 determinada fosse exibida de uma forma adaptada a um histograma. As imagens adquiridas foram salvas em alta resolução (1024 x 768) e gravadas como arquivos no formato *.tiff para posterior quantificação.

A análise quantitativa das imagens foi realizada no *software livre Image J*. 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. Estabelecido este 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.

4.8 Determinação da Concentração de Nitrito ([NO₂])

A importância da NOS tem sido ressaltada pela elucidação de seu papel em vários processos fisiológicos e patofisiológicos. Assim, técnicas para a detecção de nitrato/nitrito, produtos da oxidação do NO, são ferramentas úteis que definem a

contribuição da NO nestes processos citados anteriormente. Desenvolveu-se um método fluorimétrico rápido e sensível para a quantificação de nitrato/nitrito baseado na reação do nitrito com o reagente 2,3 diaminonaftaleno para formar o produto, 1-(H)-naftotriazol (figura 8). Este ensaio pode ser utilizado para detectar concentrações de até 10 nm de nitrito ($[\text{NO}_2^-]$) sendo 50 – 100 vezes mais sensível do que a conhecida técnica de Griess. Além disso, este ensaio foi adaptado para leitura em placa (96 wells), facilitando o manuseio de um número maior de amostras para a quantificação de nitrito gerado de fontes *in vivo* e *in vitro* (Misko, Schilling et al. 1993). A quantificação foi realizada num período máximo de 24 h após a coleta do meio de incubação.

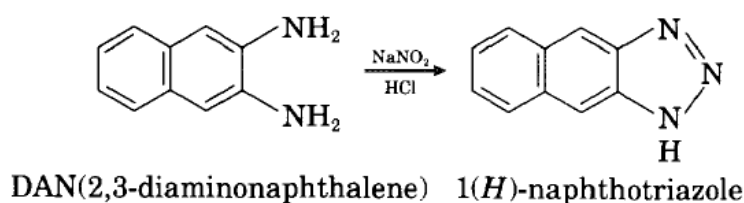


Figura 8. Reação do nitrito em meio ácido com o reagente DAN (2,3-diaminonaftaleno gerando o produto fluorescente 1(H)-naftotriazol. Adaptado de (Misko, Schilling et al. 1993).

As medidas de nitrito foram realizadas através do método fluorescente utilizando o 2,3-diaminonaftaleno (DAN; Sigma), com modificações (Misko, Schilling et al. 1993). Em resumo, 15 μL de DAN (0,05 mg/ml em HCl 0,62 N)) foram adicionados a 150 μl de meio de incubação das fatias de hipocampo e córtex. Após 10 min de incubação a 20 $^{\circ}\text{C}$ protegido da luz, a reação foi interrompida com 15 μl de NaOH 2.8 mol/l. A formação do produto fluorescente foi medida utilizando um leitor de placa fluorescente (*Cary Eclipse Microplate reader; Varian*®) excitação a 360 nm e emissão a 440 nm. A normalização foi realizada através da quantificação de proteínas totais das amostras das fatias de córtex cerebral e hipocampo homogeneizadas previamente, como citado anteriormente (Bradford 1976).

4.9 Atividade da Superóxido dismutase

Foram preparados homogenatos a 10% (p/v) do córtex cerebral e hipocampo, separadamente, em tampão fosfato de sódio 50 mM, acrescido de KCl 140 mM, pH

7,4. Foi realizada uma centrifugação a 750xg, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado em tubo plástico de 1 ml e estes mantidos a – 80 °C até a realização das seguintes análises bioquímicas: atividade da SOD, lipoperoxidação e quantificação de proteínas. Todas as análises foram realizadas em duplicatas. A SOD é uma enzima antioxidante que protege o organismo contra as reações danosas do radical superóxido, uma das principais ERO. A medida de atividade da SOD se baseia na inibição da auto-oxidação do pirogalol ou ácido pirogálico (MARKLUND and MARKLUND 1974). Em resumo, 780 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4), 20 µL de EDTA 50 mM e 100 µL da amostra foram adicionados a 100 µL de ácido pirogálico (Synth®) 2 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) durante 5 min. O resultado foi expresso como U/mg proteína, sendo U a quantidade de enzima que inibe 50% da auto-oxidação do ácido pirogálico.

4.10 Mensuração da Peroxidação Lipídica

Bioprodutos da peroxidação lipídica são os marcadores mais estudados da lesão tissular oxidativa durante o exercício. Assim como as modificações oxidativas causadas às proteínas (incluindo enzimas) e ácidos nucleicos (Banerjee, Mandal et al. 2003). A peroxidação lipídica é uma reação pró-oxidante na qual os ácidos graxos poliinsaturados são degradados pelas ERO e o malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos desta reação. Em nosso trabalho a concentração de MDA foi determinada de acordo com a metodologia conhecida como TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (Esterbauer and Cheeseman 1990). O TBARS se baseia na reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico formando um complexo colorido MDA-TBA, que pode ser quantificado espectrofotometricamente. Em resumo, 250 µl água *mili-Q*, 250 µl de amostra (o hipocampo não foi diluído em água) foram incubados em água fervente (100 °C) por 25 min com 1 ml de TBA 1%. Após resfriamento foi realizada a leitura no espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol MDA/ mg de proteína (Bradford 1976).

4.11 Quantificação de Glutamato

A mensuração do glutamato acumulado no sobrenadante das fatias foi determinada por meio de uma reação enzimática do aumento da fluorescência devido à produção de NADPH⁺, na presença de glutamato desidrogenase (GDH) e NADP⁺ (Nicholls, Sihra et al. 1987). O ensaio consiste na adição de NADP⁺ (40 mM), GDH (50 U.I) em solução KRH (185 µl), e amostra (10 µl) a 37 °C. Este ao ser excitado por luz com um comprimento de onda de 340 nm emite uma fluorescência que pode ser detectada e quantificada em comprimento de onda de 440 nm em um espectrofluorímetro de placa (*Synergy*®) (Reis, Massensini et al. 2000). 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 KRH. Para a quantificação final utilizou-se um padrão interno de glutamato (5 nmol/µl) como referência, acrescentado à solução ao final da reação (5 µl). A normalização foi realizada através da quantificação de proteínas totais das amostras das fatias de córtex cerebral e hipocampo homogeneizados previamente, como citado anteriormente (Bradford 1976). Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína.

4.12 Análise Estatística

Para a análise de dispersão dos dados foram utilizados os testes de normalidade: *Kolmogorov-Smirnov*, *D'Agostino e Pearson*, e *Shapiro Wilk*. A Análise de variância de uma via, seguida do pós-teste *T-Student* não pareado, foi utilizada para verificar o nível de significância das medidas das concentrações de glicogênio e TEM. Para as demais análises utilizou-se análise de variância de duas vias, seguida do pós-teste *Student Newman-Keuls (SNK)* ou teste *T Student*. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) e valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Esforço Máximo

O TEM consistiu de três avaliações realizadas no último dia de adaptação e após 4 e 8 semanas de exercício físico. Apenas no segundo e terceiro TEM o grupo treinado ($22,32 \pm 0,90$; $30,46 \pm 2,20$ g) suportou uma maior carga quando comparado ao seu respectivo controle ($17,93 \pm 1,15$; $21,80 \pm 2,25$) no mesmo período de avaliação ($p= 0,0346$; $p<0,0001$), respectivamente, indicando que a sobrecarga imposta pelo protocolo de exercício físico em piscina foi capaz de aumentar a carga máxima suportada (figura 9).

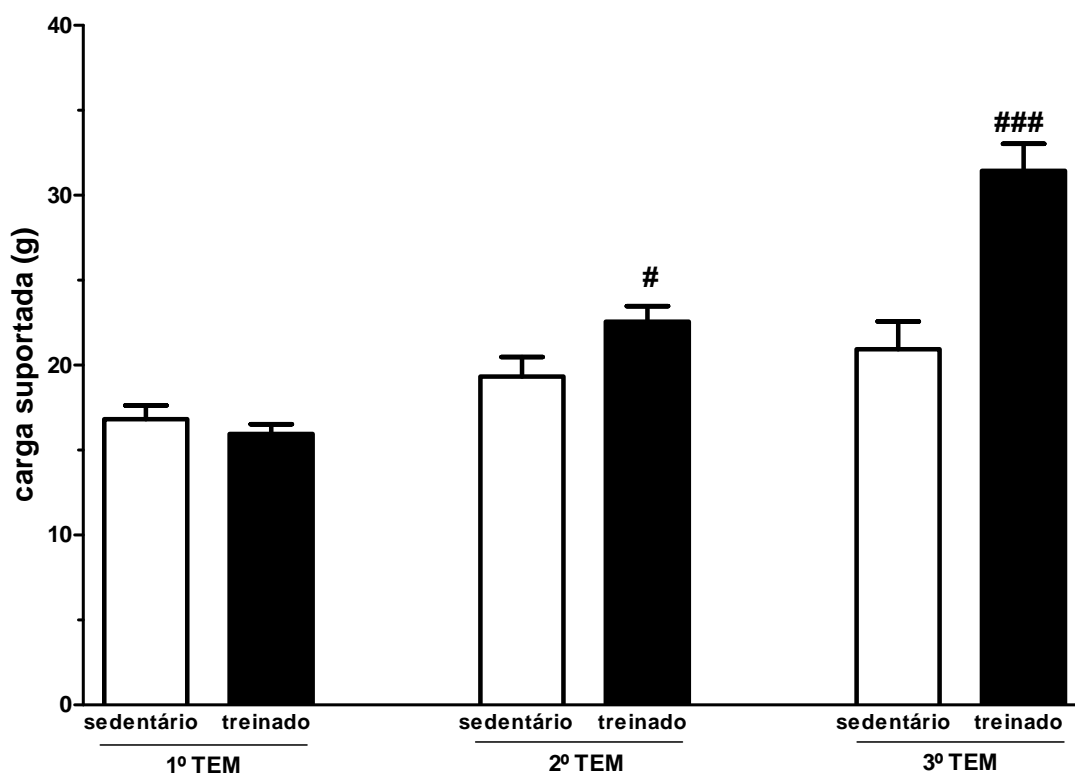


Figura 9. Carga máxima suportada (g) pelos animais sedentários e treinados durante a realização do teste de esforço máximo (TEM).

Os animais foram avaliados em três momentos: antes do início do treinamento (1º TEM), e após 4 (2º TEM) e 8 (3º TEM) semanas de treinamento físico. O teste consiste no incremento de 1% do peso corporal (g) a cada 3 seg. A carga máxima (CM) (100%) é atingida quando o animal permanece submerso por um tempo maior ou igual a 10 s. A partir da CM definida os animais foram incentivados a nadar com uma carga relativa a 60% da mesma, durante 8 semanas, 5x/semana, 30 min, n=18. Colunas representam média ± E.P.M (erro padrão da média). Comparação intergrupo, # $p<0,05$, ### $p< 0,0001$. Análise de variância de uma via, seguida do pós-teste *T Student*.

5.2 Glicogênio Muscular e Hepático

As medidas de glicogênio hepático e muscular, utilizadas como marcadores de treinamento aeróbio, demonstraram um aumento de seus estoques energéticos. Houve um aumento estatisticamente significativo ($p= 0,046$) das concentrações de glicogênio muscular entre os grupos treinado ($4,21 \pm 0,25$) e sedentário ($3,09 \pm 0,29$), $p= 0,02$ comparado ao grupo sedentário ($50,18 \pm 8,48$), bem como nas concentrações de glicogênio hepático no grupo treinado ($86,30 \pm 13,39$ mg/g) (figura 10).

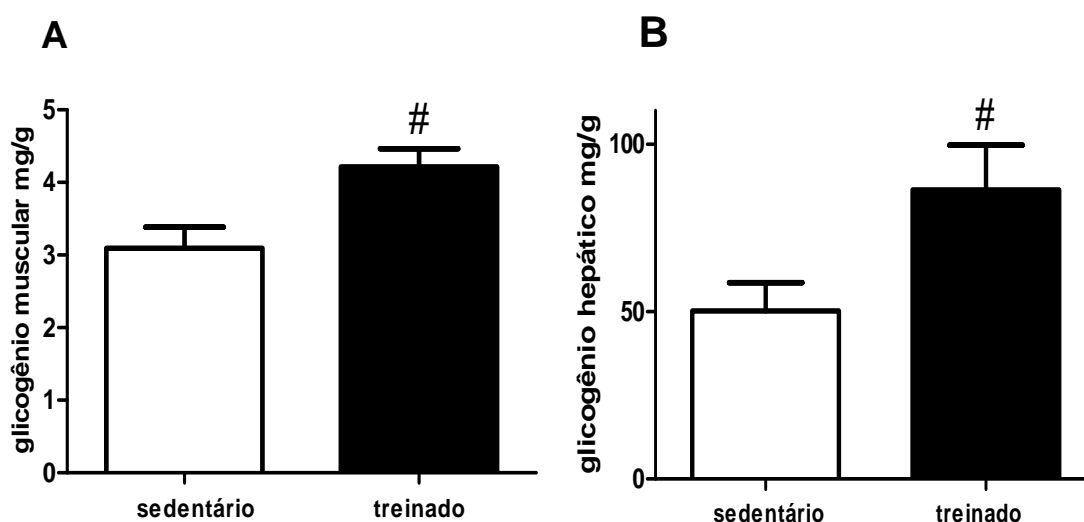


Figura 10. Medida do glicogênio muscular (n=5) (A), e hepático (n=6) (B) avaliados nos animais sedentários e treinados 48 h após o último teste de esforço máximo (após 8 semanas de treinamento físico).

Colunas representam média \pm E.P.M (erro padrão da média). #Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sedentários e treinados, $p<0,05$. Análise de variância de uma via seguida do pós-teste *T-Student*.

5.3 Viabilidade Celular

5.3.1 LDH

A análise da viabilidade celular medida pela atividade da LDH, um marcador de necrose celular no meio de incubação, demonstrou uma morte celular significativamente maior no córtex cerebral ($p<0,01$) dos animais POG SED ($207,1 \pm 34,99$ U/L/mg proteína), quando comparado aos controles nPOG SED ($54,31 \pm 12,75$). Entretanto, houve uma redução estatisticamente significativa ($p<0,01$) entre os grupos POG SED e POG TRE ($92,64 \pm 19,18$). Um efeito significativo da POG e

do exercício foi observado sem nenhuma interação entre POG e condição TRE (Análise de variância de duas vias: para POG, $F_{1,8}=5,32$, $p<0,05$; para TRE, $F_{1,8}=5,32$, $p<0,05$; interação POG*TRE, $F_{1,8}=5,32$, $p>0,05$). Embora tenha sido observada uma redução da atividade da LHD nas fatias corticais POG TRE, não foi observado o mesmo quando se compara as fatias hipocampais POG TRE ($29,91 \pm 2,88$) e POG SED ($33,50 \pm 8,47$). Observou-se uma interação significativa apenas para a condição POG (Análise de variância de duas vias: para POG, $F_{1,8}=5,32$, $p<0,05$; para o treinamento: $F_{1,8}=5,32$, $p>0,05$; interação TRE*POG: $F_{1,8}=5,32$, $p>0,05$) (figura 11).

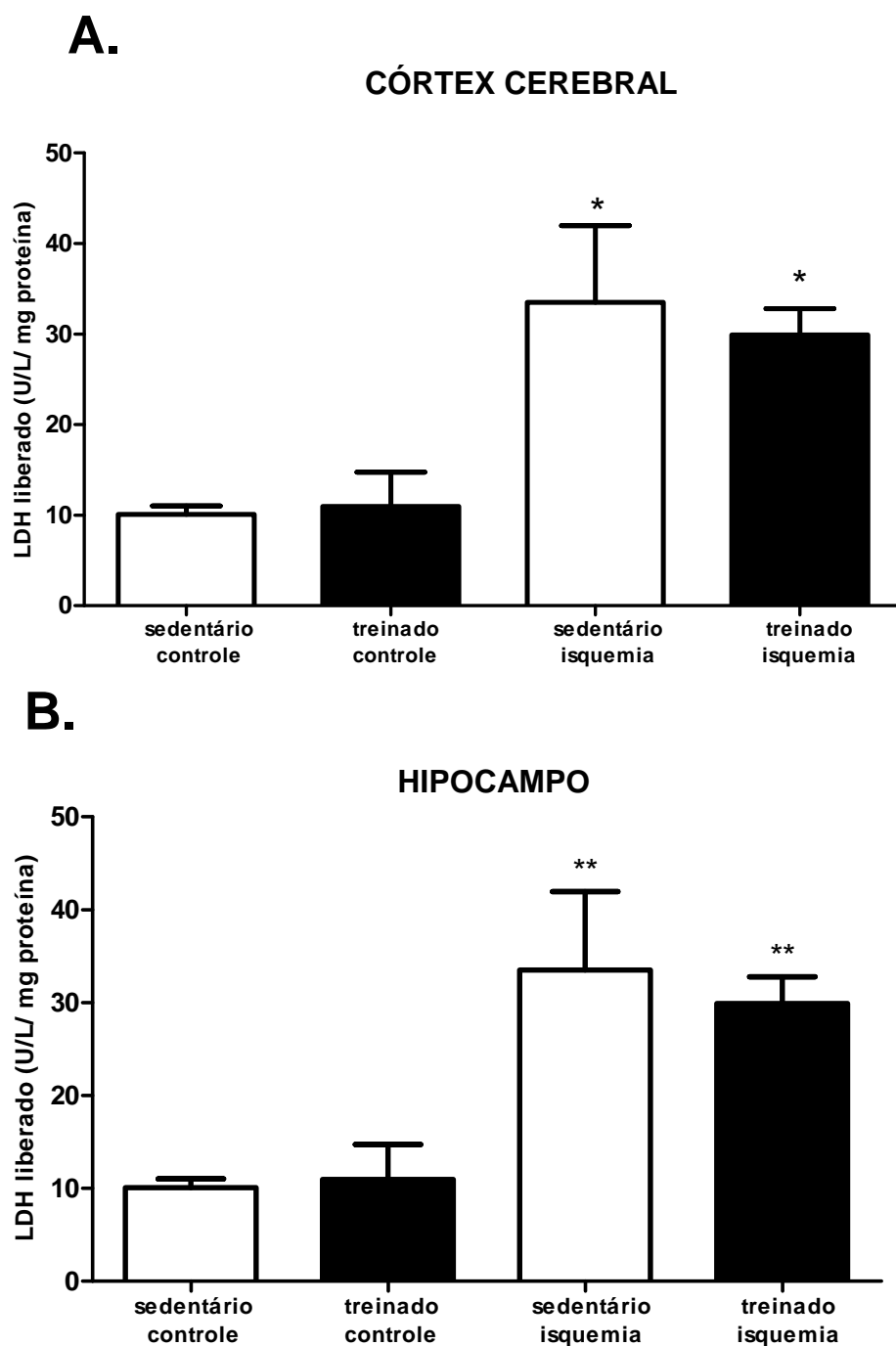


Figura 11. Efeito induzido pelo treinamento físico sobre a viabilidade celular. Avaliada pela quantificação da atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH), acumulada no meio de incubação, em fatias de córtex cerebral **(A)** e hipocampo **(B)** de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose (60 min) e reoxigenação (240 min). O grupo controle foi mantido em tampão *Krebs Henseilt* durante todo o período do experimento. Colunas representam média \pm E.P.M (erro padrão da média), $n=5$. Comparação intragrupo, * $p<0,05$, ** $p<0,01$; intergrupo, ## $p<0,01$. Análise de variância de duas vias seguida do pós-teste SNK.

6.3.2 Etídio-Homodímero

A análise da viabilidade celular verificada pela marcação fluorescente revelou menor porcentagem de morte celular estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo TRE POG ($183,4 \pm 46,84$ % morte celular) em comparação ao SED POG ($317,4 \pm 28,64$). Um efeito significativo da POG e do TRE*POG foi observado sem nenhuma interação da condição treinado (Análise de variância de duas vias: para POG, $F_{1,8}=5,32$, $p < 0,05$; para TRE, $F_{1,8}=5,32$, $P > 0,05$; interação TRE*POG, $F_{1,8}=5,32$, $p < 0,05$) (figura 12

HIPOCAMPO – CA1

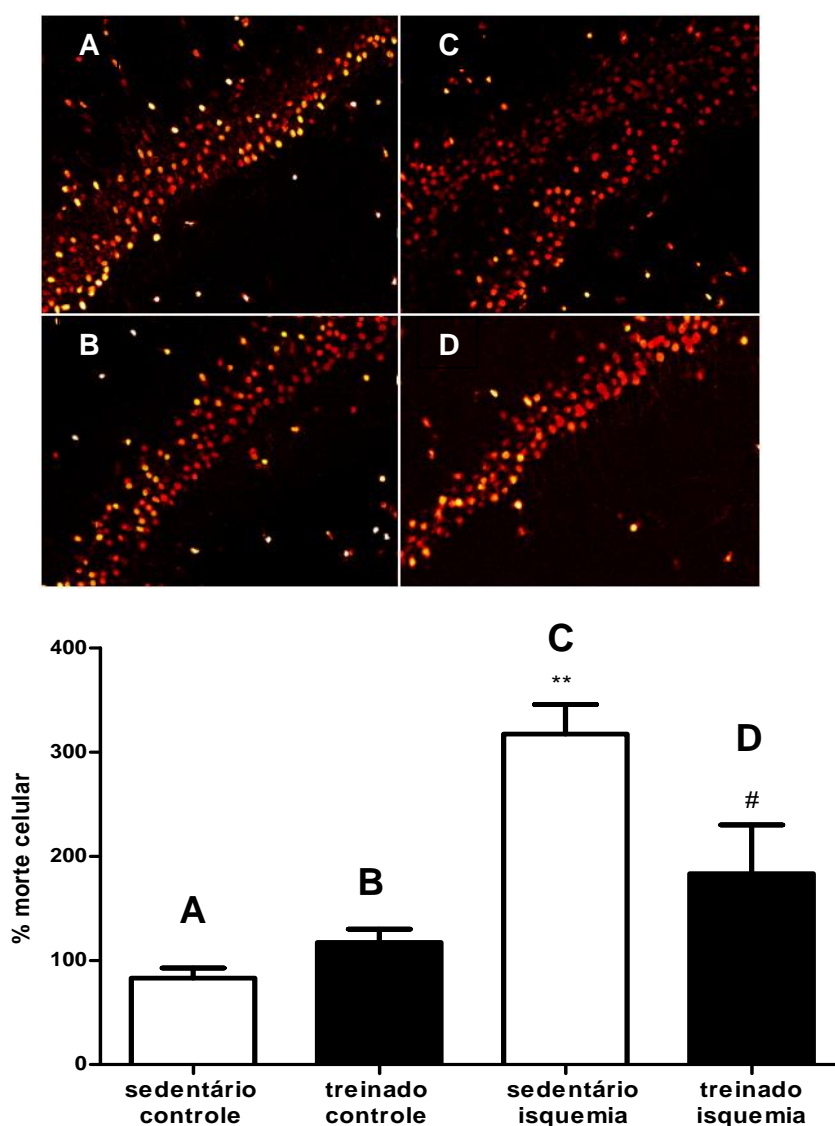


Figura 12. Efeito induzido pelo treinamento físico sobre a viabilidade celular
Avaliada pela quantificação do marcador fluorescente de necrose celular (EthD-1) nas fatias hipocámpicas (CA1) de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose (60 min) e reoxigenação (240 min). O grupo controle foi mantido em tampão *Krebs Henseilt* durante todo o período do experimento. Colunas representam média \pm E.P.M (erro padrão da média), $n=5$. Comparação intragrupo, ** $p < 0,01$; intergrupo, # $p < 0,05$. Análise de variância

de duas vias seguida do pós-teste SNK. SED nPOG **(A)**; nPOG TRE; **(B)**; SED POG **(C)**; e POG TRE **(D)**.

5.4 Nitrito ($[\text{NO}_2^-]$)

Quanto às concentrações de nitrito no meio de incubação, houve uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo POG TRE ($1,0 \pm 0,28$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) apenas nas fatias corticais comparadas às fatias do grupo POG SED ($1,93 \pm 0,39$), além de um aumento significativo entre os grupos POG SED ($1,93 \pm 0,40$) e nPOG e SED ($0,57 \pm 0,18$). Houve efeito significativo da POG e POG*TRE (Análise de variância de duas vias: para POG, $F_{1,8}=5,32$, $p < 0,05$; TRE, $F_{1,8}=5,32$, $p > 0,05$; POG*TRE, $F_{1,8}=5,32$, $p < 0,05$). Em relação às concentrações de nitrito liberado pelas fatias hipocâmpais, observou-se um aumento significativo no grupo POG SED ($0,42 \pm 0,04$) comparados ao seu respectivo controle nPOG SED ($0,19 \pm 0,06$), bem como nos grupos POG TRE ($0,42 \pm 0,09$) e nPOG TRE ($0,19 \pm 0,06$). Houve efeito significativo apenas da POG (Análise de variância de duas vias: POG, $F_{1,8}=5,32$, $p > 0,05$; TRE e POG*TRE, $F_{1,8}=5,32$, $p > 0,05$) (figura 13).

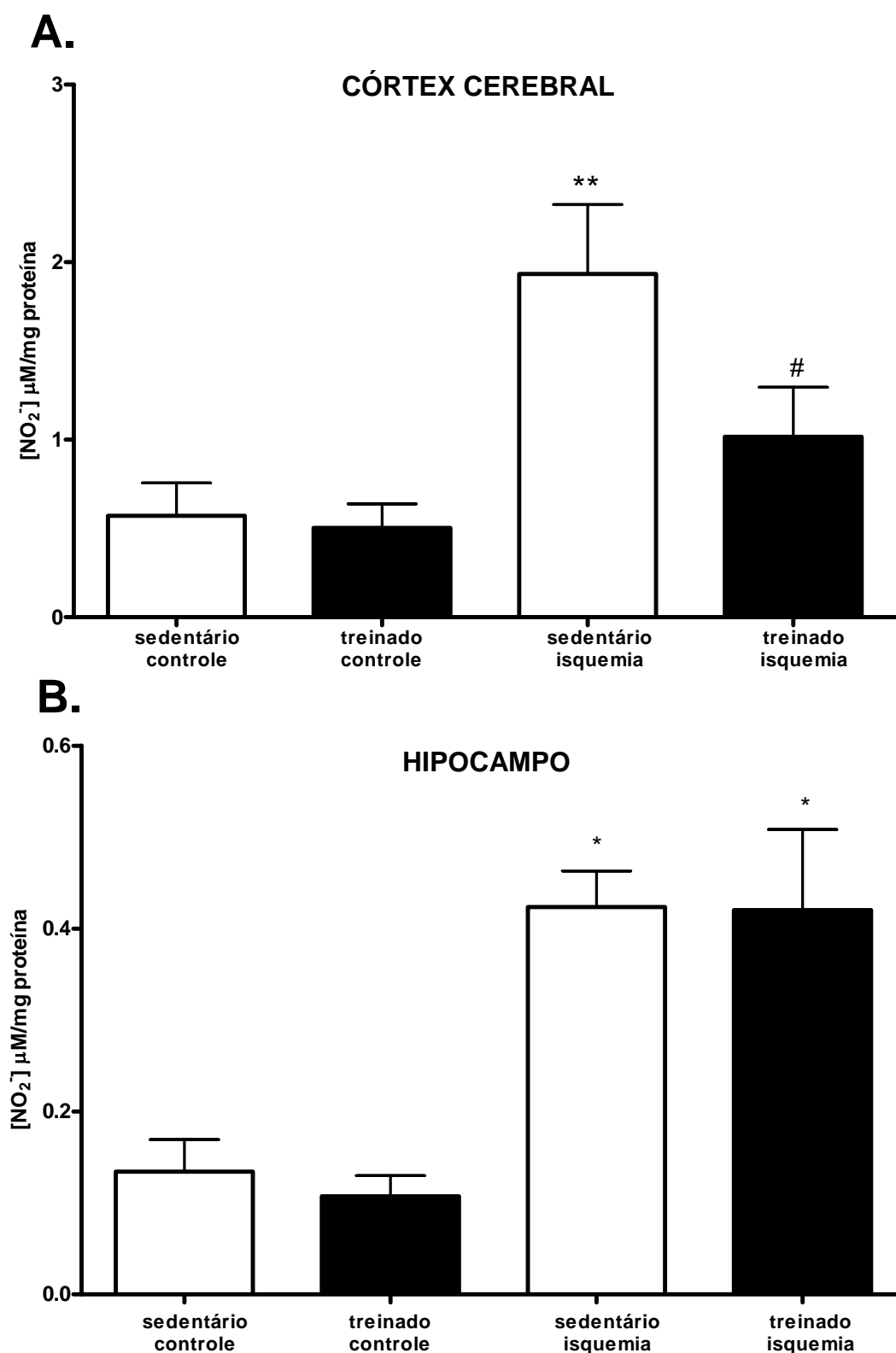


Figura 13. Efeito induzido pelo treinamento físico sobre a concentração de nitrito [NO₂⁻].

Acumulado no meio de incubação, 60 min após o período de privação de oxigênio e glicose, em fatias de córtex cerebral **(A)** e hipocampo **(B)** de ratos. O grupo controle foi mantido em tampão *Krebs Henseilt* durante todo o período do experimento. Colunas representam média ± E.P.M (erro padrão da média), n=5. Comparação intragrupo, * p<0,05; **p<0,01 intergrupo, # p<0,05. Análise de variância de duas vias seguida do pós-teste *SNK*.

5.5 Superóxido Dismutase

Outro parâmetro avaliado foi a atividade da SOD em fatias de córtex cerebral e hipocampo. Assim, observou-se um aumento da atividade da SOD em fatias de córtex cerebral estatisticamente diferentes entre os grupos nPOG SED ($0,39 \pm 0,06$ U/mg proteína) e nPOG TRE ($0,10 \pm 0,22$), bem como entre POG SED ($0,49 \pm 0,03$) e POG TRE ($1,15 \pm 0,26$). Não foram observadas diferenças entre os demais grupos. Além disso, observou-se efeito significativo apenas do TRE (Análise de variância de duas vias: POG e POG*TRE: $F_{1,8}=5,32$, $p>0,05$; TRE: $F_{1,8}=5,32$, $p<0,05$). Nas fatias hipocampais observou-se um aumento significativo entre as fatias TRE nPOG ($0,14 \pm 0,01$) e TRE POG ($0,17 \pm 0,01$), bem como SED POG ($0,14 \pm 0,01$) e TRE POG. Entretanto nenhuma diferença foi observada no hipocampo, entre os grupos, nPOG SED ($0,14 \pm 0,01$) e POG SED ($0,11 \pm 0,02$). Observamos um efeito significativo apenas da POG*TRE (Análise de variância de duas vias: POG e TRE= $F_{1,8}=5,32$, $p>0,05$; e POG*TER= $F_{1,8}=5,32$, $p<0,05$) (figura 14).

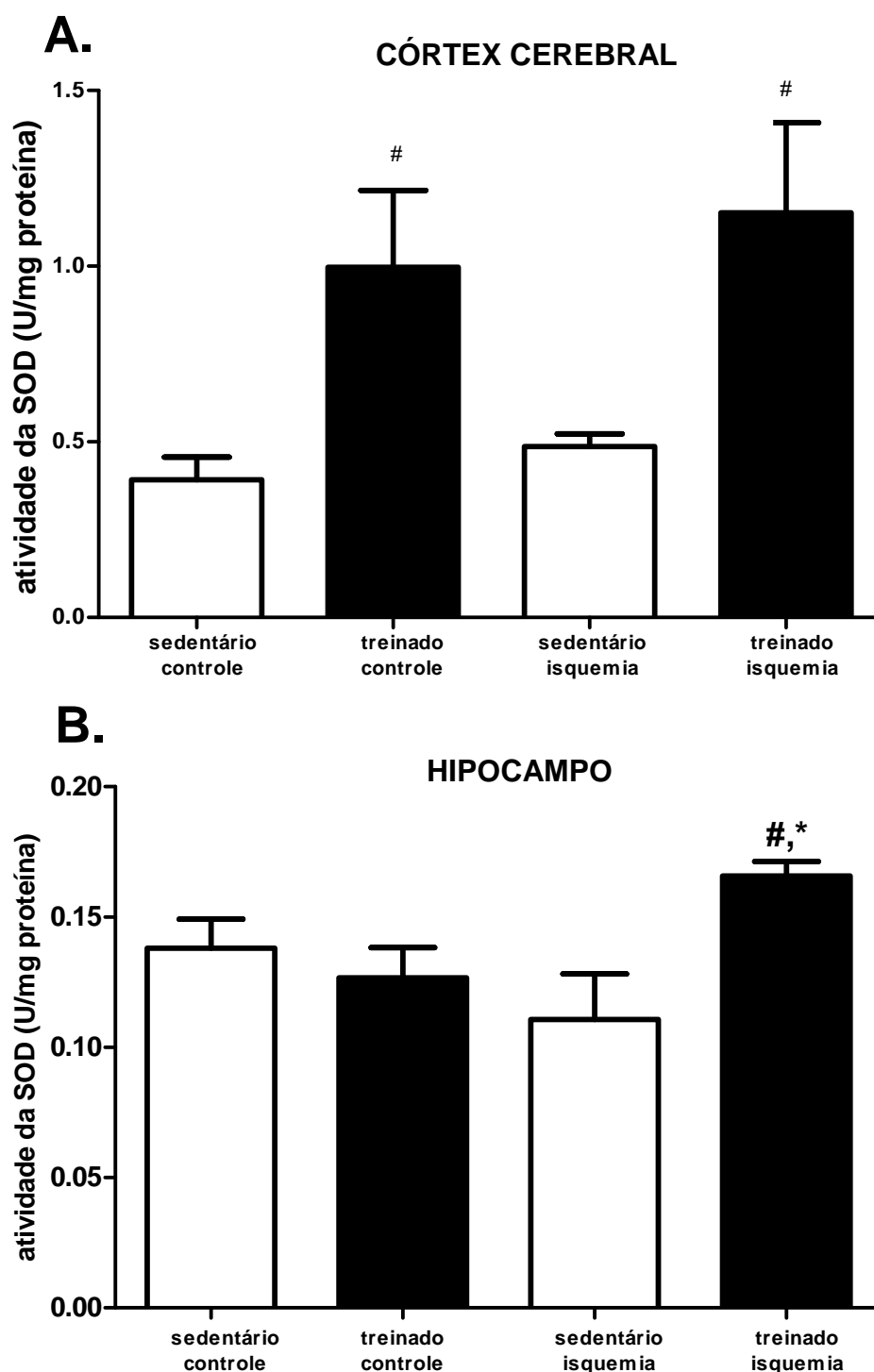


Figura 14. Efeito induzido pelo treinamento físico sobre a atividade antioxidante da superóxido dismutase (SOD).

Avaliada no homogenato de fatias de córtex cerebral (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose (60 min) e reoxigenação (240 min). O grupo controle foi mantido em tampão KRH durante todo o período do experimento. Colunas representam média \pm E.P.M (erro padrão da média), $n=5$. Comparação intergrupo, * $p<0,05$, # $p<0,05$. Análise de variância de duas vias seguida do pós-teste *SNK* (A) e *T-Student* (B).

5.6 Lipoperoxidação (TBARS)

Finalmente, os valores referentes à lipoperoxidação apresentaram resultados distintos entre as fatias de córtex cerebral e hipocampo. Houve um aumento significativo na lipoperoxidação nas fatias corticais nPOG SED e POG SED, e uma diminuição significativa no grupo POG TRE. A interação foi significativa para a POG e POG *TRE (Análise de variância de duas vias: TRE: $F_{1,8}$: 5,32, $p > 0,05$; POG: $F_{1,8}$: 5,32, $p < 0,05$; TRE e POG*TRE: $F_{1,8}$: 5,32, $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os resultados das fatias hipocampais, nem mesmo interações significativas (Análise de variância de duas vias: POG, TRE, e POG*TRE: $F_{1,8}$: 5,32, $p > 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1. Efeito induzido pelo treinamento físico sobre a concentração de malondialdeído (MDA) (% nmol MDA/mg proteína), avaliada no homogenato de fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose (60 min) e reoxigenação (240 min).

GRUPO	CÓRTEX CEREBRAL	HIPOCAMPO
Sedentário isquemia:	100.	100.
Treinado isquemia:	69,03 ± 10,16 [#]	108,3 ± 13,63
Sedentário controle:	43,84 ± 9,24 ^{**}	92,77 ± 20,47
Treinado controle:	50,78 ± 9,00	104,8 ± 10,75

Efeito induzido pelo treinamento físico sobre a lipoperoxidação (TBARS), avaliada no homogenato de fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose (60 min) e reoxigenação (240 min). O grupo controle foi mantido em tampão *Krebs Henseilt* durante todo o período do experimento. Colunas representam média ± E.P.M (erro padrão da média), n=5. ^{**}Comparação intragrupo, $p < 0,01$ Comparação intergrupo, [#] $p < 0,05$. Análise de variância de duas vias seguida do pós-teste *SNK*.

5.7 Glutamato

A quantificação de glutamato no meio de incubação das fatias corticais demonstrou um aumento da liberação de glutamato estatisticamente significativo ($p < 0,01$) entre os grupos POG SED (35,27 ± 7,50 nmol/mg proteína) e nPOG (6,20 ±

1,50), bem como nos grupos POG TRE (25,00 ± 4,61) e nPOG TRE (7,61 ± 2,53) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos POG SED e POG TRE. Quanto à interação, apenas a condição POG apresentou significância (Análise de variância de duas vias: para POG, $F_{1,8}=5,32$, $p < 0,05$; para exercício: $F_{1,8}=5,32$, $p > 0,05$; interação EXE*POG: $F_{1,8}=5,32$, $p > 0,05$). Diferentemente, a liberação de glutamato das fatias hipocâmpais POG TRE (2,26 ± 0,31) demonstraram uma liberação significativamente ($p < 0,01$) menor comparado ao grupo POG SED (4,14 ± 0,71), as fatias dos grupos POG SED e nPOG (1,57 ± 0,29) também apresentaram valores estatisticamente diferentes ($p < 0,01$). A interação foi significativa para a POG (Análise de variância de duas vias: para POG, $F_{1,8}=5,32$, $p < 0,05$; para treinamento, e POG*TRE: $F_{1,8}=5,32$, $p > 0,05$) (figura 15).

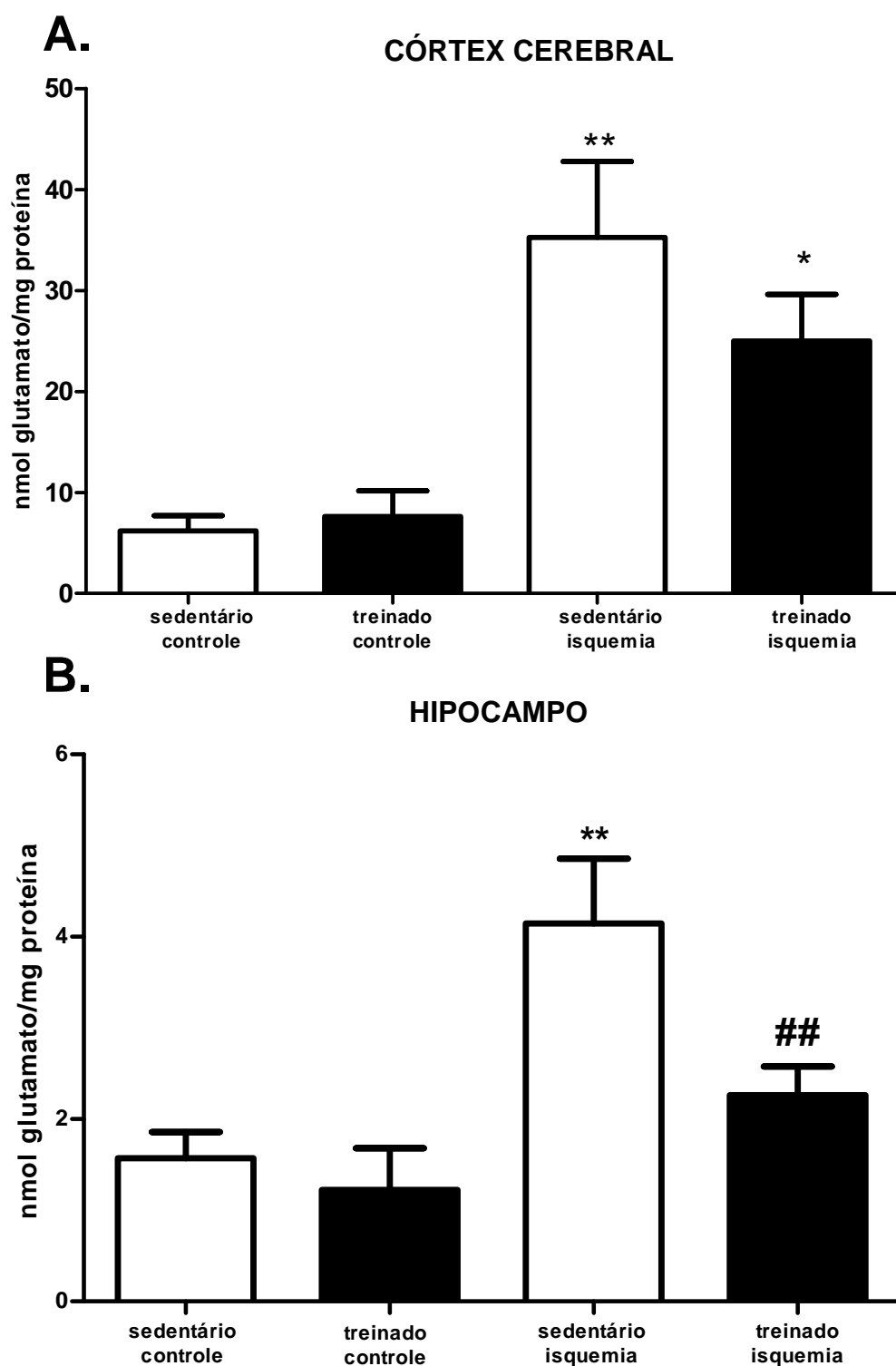


Figura 15. Efeito induzido pelo treinamento físico sobre a concentração de glutamato

Acumulado no meio de incubação, avaliado pela conversão do L-glutamato em α -cetoglutarato, na presença de NAD⁺ e da enzima desidrogenase glutâmica (GDH) no meio de incubação 60 min após o período de privação de oxigênio e glicose, em fatias de córtex cerebral (A) e hipocampo (B) de ratos. O grupo controle foi mantido em tampão *Krebs Henseilt* durante todo o período do experimento. Colunas representam média \pm E.P.M (erro padrão da média), n=5. Colunas representam média \pm E.P.M (erro padrão da média), n=5.

Comparação intragrupo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, e intergrupo, ## $p < 0,01$. Análise de variância de duas vias seguida do pós-teste *SNK*.

6 DISCUSSÃO

Verificou-se neste presente estudo que o protocolo de natação crônico utilizado foi capaz de aumentar a sobrecarga suportada durante a realização do TEM após 4 e 8 semanas de treinamento em comparação com os animais sedentários. Além disso, observou-se também maiores concentrações de glicogênio hepático e muscular nos animais treinados submetidos à natação, o que poderia confirmar a eficácia do protocolo de treinamento empregado em promover adaptações metabólicas (Murakami, Shimomura et al. 1997).

A musculatura esquelética e o fígado constituem os principais órgãos de armazenamento de glicogênio. Embora seja encontrada no fígado uma maior concentração desse composto, as reservas são maiores, em termos absolutos, na musculatura esquelética. As reservas de glicogênio muscular e hepático são estreitamente relacionadas ao desempenho e tempo de sustentação do esforço em determinado exercício (Newsholme 1979). Além disso, já está bem estabelecido que o treinamento aeróbio aumenta a taxa de re-síntese muscular e hepática de glicogênio (Kim, Youn et al. 2000), sendo que os aumentos das reservas de glicogênio muscular estariam relacionados com a maior atividade da enzima glicogênio sintase, frente ao treinamento físico (Terjung, Baldwin et al. 1974; Holloszy and Booth 1976). Tais fatos corroboram os resultados do nosso estudo onde se encontrou um aumento das reservas de glicogênio hepático e muscular. Adicionalmente, a maior sobrecarga suportada no TEM também teria uma contribuição destas maiores reservas de glicogênio, o que permitiria este aumento na capacidade física e tempo de sustentação da carga destes animais treinados.

A partir da padronização do nosso protocolo de exercício físico como uma ferramenta capaz de induzir adaptações metabólicas passamos a avaliar as subsequentes adaptações do SNC após treinamento físico, frente à lesões cerebrais, tais como isquemia cerebral *in vitro*, nas regiões de hipocampo e córtex cerebral.

O hipocampo e o córtex cerebral estão entre as principais regiões utilizadas para o estudo das alterações patofisiológicas decorrentes das lesões isquêmicas. Isto se deve ao fato de que são os principais substratos acometidos por processos isquêmicos envolvendo a oclusão da ACM em modelos *in vivo*; elevada vulnerabilidade celular frente à isquemia cerebral, onde tem sido demonstrado que

após isquemia-reperfusão tecidual *in vivo*, tanto o córtex quanto o hipocampo apresentam concentrações elevadas de bioprodutos da oxidação de lipídios de membrana plasmática, tais como o MDA, indicando um aumento do estresse oxidativo, o que justificaria a maior vulnerabilidade (Candelario-Jalil, Mhadu et al. 2001); além disso, o estudo destes substratos é de extrema importância, haja vista, suas contribuições em mediar funções relacionadas ao aprendizado e memória (hipocampo) (Holscher 2003), bem como participar das funções motoras, sensoriais, visuais, auditivas, dentre outras (córtex cerebral).

A tolerância isquêmica cerebral é um fenômeno em que uma resistência à isquemia cerebral é induzida por meio de estímulos nocivos abaixo do limiar capaz de induzir um dano celular (Kitagawa, Matsumoto et al. 1990). Múltiplos estímulos têm sido estudados, tais como hipóxia (Gidday, Fitzgibbons et al. 1994), isquemia (Kitagawa, Matsumoto et al. 1990), anóxia (Pérez-pinzón, Mumford et al. 1996), estresse oxidativo (Ohtsuki, Matsumoto et al. 1992), bem como inibidores da fosforilação oxidativa (Riepe, Esclaire et al. 1997). Entretanto, tais métodos profiláticos não são bem aceitos pelos pacientes, bem como não poderiam ser facilmente aplicados como intervenção clínica em indivíduos portadores de fatores de risco ao AVE. Assim, vários estudos objetivando identificar pré-tratamentos eficazes e menos invasivos, que induzem uma resistência isquêmica cerebral, sugerem o exercício físico como uma ferramenta neuroprotetora (Liebelt, Papapetrou et al. 2010).

Durante os últimos 20 anos, os benefícios do exercício físico nas lesões relacionadas ao AVE têm sido demonstrado tanto em estudos *in vivo*, onde há uma redução dos déficits neurológicos, redução do volume de infarto e edema, melhora da disfunção da BHE, manutenção da integridade neurovascular, promoção da sobrevivência neuronal (Stummer, Baethmann et al. 1995; Ang, Wong et al. 2003; Endres, Gertz et al. 2003; Li, Luan et al. 2004; Ding, Young et al. 2005; Ding, Ding et al. 2006); e em menor escala estudos *in vitro*, também evidenciando menor morte celular (Scopel, Fochesatto et al. 2006; Cechetti, Rhod et al. 2007). Embora os benefícios sejam claros, os mecanismos intracelulares ainda são pouco esclarecidos (Cechetti, Rhod et al. 2007). Partindo deste pressuposto, antes de investigarmos os mecanismos neuroprotetores relacionados ao exercício físico prévio, também investigamos se existe um papel neuroprotetor (redução da morte temporal), e se

este se modifica de forma espacial, ou seja, em diferentes substratos: fatias de córtex cerebral e hipocampo.

A avaliação da viabilidade celular foi verificada indiretamente neste presente estudo através da liberação da LDH para o meio de incubação, uma medida indireta de morte celular por necrose. Assim, observou-se uma neuroproteção mediada pelo treinamento físico nas fatias corticais, uma vez que os animais treinados apresentaram menor morte celular frente à POG comparados ao grupo sedentário. Esta neuroproteção não foi encontrada nas fatias hipocampais POG TRE. A fim de confirmar tal fato, utilizou-se outro método para avaliar a morte celular destas fatias hipocampais.

A análise da viabilidade celular utilizando um marcador fluorescente permite avaliar diretamente o dano celular necrótico. Pode-se verificar por meio desta técnica uma neuroproteção mediada pelo exercício físico, já que as fatias hipocampais POG TRE apresentaram menor morte celular após POG na região de CA1. Alguns trabalhos têm demonstrado uma neuroproteção, utilizando a medida do LDH em fatias hipocampais, mediada pelo exercício moderado em esteira (3 x/semana, 12 semanas, 20 min) submetidas à POG por 60 min bem como em esteira (2 semanas, 20 min/dia) e POG por 45 min, respectivamente seguidas de 180 min de reperfusão tecidual (Scopel, Fochesatto et al. 2006; Cechetti, Rhod et al. 2007). Até o presente momento não foi demonstrado na literatura neuroproteção hipocampal após 60 min de POG, mediada pelo protocolo de natação, bem como um possível efeito protetor deste ou qualquer outro protocolo de exercício físico em fatias corticais submetidas a este mesmo protocolo de POG *in vitro*.

Apesar de evidências prévias demonstrarem que o treinamento com a natação melhora algumas funções cognitivas em ratos e que em paralelo atenua o acúmulo do dano protéico oxidativo (Murakami, Shimomura et al. 1997; Snyder 1998) a piscina como método para exercício físico, não tem sido utilizada consistentemente como proposta terapêutica neuroprotetora, uma vez que a natação impõe menor estresse devido à pressão d'água, recruta outros grupos musculares e reduz os efeitos da gravidade (Flaim, Minter et al. 1979). No tocante ao protocolo adotado neste estudo, este foi capaz de reduzir a morte celular em ambos os substratos avaliados, sugerindo-se o uso da natação como uma ferramenta neuroprotetora. Entretanto, se outros protocolos de natação também possibilitam tais

características, outros estudos precisam ser realizados a fim de melhor elucidar tais fatos.

Após avaliação do efeito neuroprotetor do protocolo de natação sobre a morte por POG em fatias hipocampais e corticais, o próximo passo foi investigar os possíveis mecanismos intracelulares que medeiam esta neuroproteção. Desse modo, já está bem estabelecido na literatura de que o exercício físico aumenta os níveis de NT, principalmente o BDNF, sendo este o responsável por permitir neuroproteção em diversas doenças neurológicas. Este é transportado retrogradamente e anterogradamente nas sinapses onde: aumenta a transcrição gênica; modifica a morfologia sináptica; aumenta a resiliência neuronal; promove diferenciação e extensão de neuritos; aumenta sobrevivência de neurônios hipocampais, corticais, cerebelares, e outros (Cotman and Berchtold 2002). Além dos fatores neurotróficos, há que considerar que o aumento do status antioxidante advindo do exercício físico pode diminuir a formação de ERO, possibilitando o aumento de diversas funções fisiológicas, tais como aprendizado e memória (Radak, Kaneko et al. 2001). Entretanto, os mecanismos relacionados à proteção neuronal parecem envolver outros mecanismos que permitem uma redução do dano oxidativo causado pela lesão isquêmica. Assim, haja vista o papel das ERO na geração e propagação do dano celular, principalmente do NO, como explanado minuciosamente na introdução, investigar as concentrações do NO, indiretamente através do seu produto de oxidação, o NO_2^- , se julga necessário. Desse modo, questionou-se, se as fatias corticais e hipocampais que apresentaram menor morte celular, também liberariam uma menor quantidade de NO_2^- , para o meio de incubação, imediatamente após lesão isquêmica, uma vez que a maior produção de NO, principalmente pela isoforma nNOS, mais abundante no SNC, se dá de forma aguda após o início da POG (Nomura and Kitamura 1993; Merrill, Murphy et al. 1997; Rawal, Muddeshwar et al. 2004; Scorziello, Pellegrini et al. 2004), advindo da excitotoxicidade glutamatérgica (Almeida, Heales et al. 1998).

Neste presente estudo, encontrou-se uma menor concentração de NO_2^- nas fatias corticais POG TRE em relação ao seu controle SED POG, sugerindo também menor formação do radical NO. Entretanto não foi encontrada diferença nas concentrações de NO_2^- referentes às fatias hipocampais SED POG e TRE POG. O aumento de NO_2^- , encontrado nas fatias corticais e hipocampais POG SED, logo após a lesão isquêmica está de acordo com outros estudos (Rawal, Muddeshwar et

al. 2004; Scorziello, Pellegrini et al. 2004). A ativação excitotóxica do receptor NMDA leva a excessiva produção e liberação de NO (Malinski, Bailey et al. 1993), iniciando uma cascata que pode ser responsável pela neurotoxicidade tardia vista após lesões neurológicas (isquemia, epilepsia ou traumatismos cranianos) (Moncada, Palmer et al. 1991).

Em culturas corticais neuronais, a eliminação da nNOS através de técnicas transgênicas possibilitam maior resistência à neurotoxicidade NMDA-induzida (Dawson, Dawson et al. 1991; Dawson, Dawson et al. 1993; Dawson, Kizushi et al. 1996). Adicionalmente, culturas neuronais de animais nNOS *-/-* são predominantemente mais resistentes à POG comparados com culturas advindas de animais selvagens. Estes estudos *in vitro* indicam que o NO derivado da nNOS é a maior fonte de neurotoxicidade em neurônios (Zhou and Zhu 2009). Em modelos animais de isquemia *in vivo*, a ativação da nNOS está intimamente relacionada ao dano neuronal isquêmico (Eliasson, Huang et al. 1999). Camundongos nNOS *-/-* quando submetidos à isquemia *in vivo* focal apresentam menor volume de infarto. Além disso, o uso de inibidores seletivos para a nNOS, tais com 7-NI ou ARL 174777 (Huang 1999) também podem reduzir o volume de infarto neste mesmo modelo de isquemia, bem como apresentar melhoras das lesões isquêmicas (Luo, Zhu et al. 2007).

A morte neuronal associada com a POG ocorre seletivamente em áreas cerebrais bem definidas (McDonald and Johnston 1990). O cérebro adulto apresenta regiões vulneráveis distintas à lesão isquêmica, tais como o córtex cerebral, cerebelo e hipocampo (Greenamyre, Penney et al. 1987). Estas áreas são conhecidas pela alta expressão de receptores de glutamato (Greenamyre, Penney et al. 1987) (Rothman and Olney 1986), destacando o hipocampo que apresenta uma alta densidade de receptores glutamatérgicos (Monaghan and Cotman 1985). Além disso, há estudos corroborando o fato de que as regiões que expressam nNOS são as regiões mais susceptíveis à POG. Sendo assim, foi identificado que no córtex cerebral de animais adultos há poucos neurônios nNOS-positivos. Em contrapartida, o hipocampo apresenta altas concentrações de nNOS em CA1, seguido de CA3 e ausência em CA2 (Black, Bedolli et al. 1995).

Outro ponto importante a ser considerado é o fato de que a localização da nNOS é modificada quando os tecidos são submetidos à POG ou super-estimulação glutamatérgica (Zhou and Zhu 2009), bem como uma diminuição da solubilidade da

mesma frente à isquemia (Takagi, Logan et al. 2000). Além disso, a isquemia cerebral também altera de modo marcante a interação entre a nNOS e a PSD-95, e assim a atividade da nNOS. Desse modo, seria provável que o aumento da atividade da nNOS seja devido as diferentes localizações sub-celulares causadas pela isquemia (Zhou and Zhu 2009).

Têm sido evidenciado tanto em modelo de isquemia *in vivo* como *in vitro* o papel dos receptores GABAérgicos contrabalanceando os efeitos da excitação glutamatérgica excessiva. Assim, estudos utilizando agonistas GABAérgicos muscimol e baclofen, ou a co-aplicação de ambos podem proteger os neurônios hipocampais de CA1 da morte neuronal através da infra-regulação da função do receptor NMDA (Zhang, Li et al. 2007; Zhou, Li et al. 2008). Em nosso estudo não encontramos diferenças nas concentrações de NO_2^- entre as fatias hipocampais POG de animais sedentários e treinados. Possivelmente se tivéssemos avaliado separadamente as diferentes regiões do hipocampo quanto à liberação de NO_2^- , estas talvez apresentassem um perfil heterogêneo, diferente da avaliação conjunta realizada. De modo abrangente, outra possibilidade seria a atuação deste mecanismo GABAérgico na neuromodulação do treinamento físico sobre a produção de NO_2^- em fatias corticais POG TRE, haja vista que um dos efeitos neuromoduladores do exercício físico seria o de aumentar o tônus GABAérgico, que será melhor discutido a seguir.

Acreditamos que este seja o primeiro estudo no qual verificou-se uma menor liberação de NO_2^- após POG pela fatias corticais de animais treinados, sendo que o mesmo não foi encontrado nas fatias hipocampais POG TRE. As diferenças regionais quanto à vulnerabilidade seletiva à excitotoxicidade glutamatérgica poderiam justificar tais diferenças nestes dois substratos avaliados. Os efeitos neuromodulares do treinamento físico sobre a atividade da NOS nas fatias hipocampais submetidas à POG poderiam ser ineficazes, uma vez que estas apresentam maior densidade de receptores glutamatérgicos (Rothman and Olney 1986; Greenamyre, Penney et al. 1987), bem como um maior número de neurônios nNOS-positivos (Black, Bedolli et al. 1995). Também devem ser considerados possíveis fatores relacionados com a localização intracelular da nNOS frente à lesão isquêmica, citado anteriormente. Tais fatos precisam ser mais bem elucidados.

A partir do pressuposto de que o NO é um gás, pode difundir-se livremente a partir dos neurônios que o produziram, e reagir com o O_2^- formando peroxinitrito e

outros radicais livres, induzindo morte celular nos neurônios circundantes do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (Dawson, Dawson et al. 1991). Dando suporte a este ponto de vista, mecanismos antioxidantes contra a ação de radicais livres ou inibidores da peroxidação lipídica protegem o cérebro contra os danos após isquemia cerebral (Chan 2001). Assim, evidências têm sugerido que neurônios que expressam NOS apresentam maior resistência à toxicidade NMDA-induzida devido às maiores concentrações de SOD, que presumivelmente previnem interações do NO com o O_2^- para formar o potente oxidante peroxinitrito (Eliasson, Huang et al. 1999). Adicionalmente, camundongos que super expressam SOD são mais resistentes à isquemia cerebral associada com reperfusão tecidual (Yang, Chan et al. 1994), e contrariamente, animais SOD $-/-$ possuem maior área de volume de infarto (Kim, Kondo et al. 2002).

Além da redução das concentrações de NO_2^- das fatias corticais POG TRE, observou-se também um aumento da atividade da SOD nas fatias corticais dos animais submetidos ao treinamento físico nPOG TRE, mantendo as concentrações constantes após a POG. Embora não tenhamos encontrado uma alteração nas concentrações de NO_2^- nas fatias hipocampais POG TRE, os benefícios relacionados à neuroproteção poderiam estar também relacionados a um aumento da atividade da SOD neste substrato. Assim, observamos neste presente estudo um aumento da atividade da SOD nas fatias hipocampais dos animais treinados e submetidos à POG.

A atividade da SOD após treinamento de corrida em esteira mostra-se elevada no estriado e tronco cerebral, além do acréscimo na concentração de glutathiona no córtex e tronco cerebral (Somani and Husain 1996). O hipocampo, e em menor escala o córtex cerebral, é a região que apresenta as menores alterações da atividade SOD após treinamento em esteira (Somani, Ravi et al. 1995), o que justifica sua maior susceptibilidade a eventos isquêmicos. Em contrapartida, estudos mais recentes tem demonstrado aumentos significativos da atividade da SOD após treinamento em piscina por 6 semanas (Souza, Oliveira et al. 2009), corroborando com os resultados obtidos neste presente estudo. Não foi observado em nosso trabalho um aumento da SOD após POG SED em ambos os substratos avaliados, o que está em acordo com outros estudos, uma vez que não foram encontradas alterações na atividade da SOD após 60 min de POG em fatias hipocampais submetidas a 2 h reperfusão (Brongholi, Souza et al. 2006), embora outros trabalhos

tenham observado um aumento da mesma após 30 min de POG hipocampal seguida de 180 min de reperfusão (Rawal, Muddeshwar et al. 2004). Até o presente momento nenhum outro estudo havia avaliado a função da SOD em fatias de animais treinados frente à POG.

O aumento da capacidade antioxidante nas fatias corticais e hipocampais estão em consonância com a neuroproteção das fatias POG TRE. Apesar de termos encontrado um aumento da atividade da SOD, outros mecanismos antioxidantes também deveriam ser mais bem elucidados posteriormente, a fim de investigar a contribuição das enzimas catalase e glutathione peroxidase em ambos os substratos avaliados.

Outro parâmetro envolvido nas lesões induzidas pelas ERO é a peroxidação lipídica, já explicitado anteriormente. Observamos um aumento da peroxidação lipídica nas fatias corticais nPOG SED e POG SED, como já referenciado na literatura (Scorziello, Pellegrini et al. 2001), e uma redução da lipoperoxidação no grupo TRE POG. Acredita-se que esta redução seja devido à menor produção de ERO causada pelo treinamento frente à isquemia, uma vez que a menor produção de NO_2^- , pode também estar associado a menores concentrações de radicais livres. Além disso, salienta-se a maior atividade antioxidante encontrada neste substrato, possibilitando menor dano às membranas plasmáticas. Estudos têm evidenciado uma diminuição da lipoperoxidação no grupo nPOG TRE (Jolitha, Subramanyam et al. 2006; Radak, Toldy et al. 2006), devido ao efeito do treinamento físico *per si*, o que não foi visto neste presente estudo, e em outros estudos realizados (Radák, Kaneko et al. 2001).

Dentre as fatias hipocampais não foram encontradas quaisquer alterações nos grupos avaliados, o que poderia ser devido ao protocolo utilizado, ao qual talvez fosse necessário um período maior de reperfusão para evidenciar alguma alteração em comparação às concentrações basais. Após protocolo de 90 min de isquemia *in vivo* e reperfusão de 24 h seguida de sacrifício e quantificação pela técnica TBARS não foram encontradas alterações estatisticamente significativas nas regiões de córtex cerebral e hipocampo (Bromont, Marie et al. 1989). Apesar de não termos encontrado alterações na peroxidação lipídica, outros parâmetros como menores danos protéicos e ao DNA poderiam corroborar com a neuroproteção encontrada neste estudo. Salienta-se que outros estudos sejam feitos para compreender melhor estes mecanismos.

Sabe-se que o treinamento físico é capaz de diminuir as concentrações de glutamato em modelos de isquemia *in vivo*, o que poderia justificar em parte as menores concentrações de NO_2^- encontradas nas fatias corticais POG TRE deste estudo, bem como a neuroproteção observada nos dois substratos avaliados, em particular para as fatias hipocampais, uma vez que as respostas de NO_2^- e lipoperoxidação mantiveram-se inalterados após POG nas fatias dos animais treinados. Assim, a próxima etapa do nosso trabalho foi verificar as concentrações de glutamato liberado para o meio de incubação posteriormente à lesão isquêmica (60 min após POG) a fim de investigar sua participação na neuroproteção observada em nosso estudo.

Observamos uma maior liberação de glutamato nas fatias SED POG comparadas ao controle nPOG SED, nos dois substratos avaliados. Entretanto só as fatias hipocampais apresentaram uma redução significativa do grupo POG TRE, embora as fatias corticais POG TRE demonstrem um menor delta de variação (nPOG TRE e POG TRE), comparado ao delta do respectivo grupo sedentário (nPOG SED e POG SED). Alguns estudos têm mostrado que o GABA pode diminuir a liberação de glutamato e aspartato no hipocampo e córtex cerebral frente à isquemia cerebral, por meio da inibição sináptica (Jia, Hu et al. 2009). Assim, uma das ferramentas que poderia aumentar a liberação de GABA e inibir a ação glutamatérgica seria através do exercício físico. Dessa forma, tem sido verificado que o treinamento em esteira pré-isquemia diminui a liberação de glutamato e aumenta a liberação de GABA no estriado durante a fase aguda da isquemia/reperfusão tecidual, sugerindo um importante mecanismo de neuroproteção. O decréscimo de glutamato e aumento de GABA durante a isquemia após treinamento físico pode estar associado com inativação e/ou ativação de receptores NMDA, AMPA/KA e GABA-b (Jia, Hu et al. 2009; Zhang, Wu et al. 2010).

Os transportadores de glutamato (GLT-1) expressos pelos astrócitos são os primeiros responsáveis em remover o glutamato da região prosencefálica. Estes transportam o glutamato em excesso para dentro dos astrócitos para evitar excitotoxicidade (Danbolt 2001). Assim, os astrócitos também poderiam estar envolvidos nestes mecanismos induzidos pelo treinamento físico (Jia, Hu et al. 2009). Além disso, tem sido relatado uma infra-regulação da expressão gênica das subunidades mGluR5 e NR2B de receptores glutamatérgicos, no estriado, 80 min

após oclusão da ACM, mais um mecanismo que contribuiria para a menor ativação e lesão NMDA-induzida (Zhang, Jia et al. 2010).

Adicionalmente, a neuroproteção advinda do exercício prévio também pode ser explicada pela interação das mudanças induzidas pelo exercício no sistema opióide endógeno com a transmissão glutamatérgica. É sabido que o receptor NMDA dispõe de uma afinidade com os opióides e os morfinóides, e que a ligação destes ao receptor NMDA resulta em antagonismo não competitivo dos seus efeitos (Choi 1987; Swan and Meldrum 1990). Uma vez que tem sido demonstrado que o exercício físico e o estresse físico estão associados com o aumento da liberação de opióides endógenos (Christie, Chesher et al. 1981; Amir 1982; Shyu, Andersson et al. 1982; Øktedalen, Solberg et al. 2001), a estimulação excitotóxica do receptor NMDA mediada pelo glutamato pode também ser inibida (Stummer, Weber et al. 1994).

Outros fatores que também poderiam contribuir para a menor atividade dos receptores glutamatérgicos, e menor liberação de glutamato para o meio incubação seriam a maior atividade da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ induzida pelos efeitos da natação crônica (6 semanas) em modelo animal de traumatismo craniano, bem como epilepsia. Foi observado nestes animais epilépticos ou com traumatismo craniano, submetidos a um protocolo de treinamento físico prévio, maior atividade da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em comparação com os animais sedentários. Esta maior atividade estaria relacionada com a maior captação de glutamato, e, portanto menor excitotoxicidade e morte neuronal (Lima, Oliveira et al. 2009; Souza, Oliveira et al. 2009).

Assim, sugere-se que tais mecanismos poderiam estar envolvidos neste presente trabalho. Uma vez que não foi encontrada uma redução significativa das concentrações de glutamato nas fatias corticais POG TRE, outros eventos compensatórios, como os citados anteriormente, poderiam estar envolvidos na neuromodulação da síntese de NO.

Adicionalmente, tem sido verificada em alguns estudos a participação do NO em ativar mediadores de morte neuronais tardios envolvidos com o mecanismo de apoptose, tais como caspase-3 (Sun, Zhao et al. 2009) e fator de indução da apoptose (AIF) (Yu, Wang et al. 2002). O uso de inibidores seletivos da nNOS, tais como o 7-NI, tem mostrado diminuir a ativação de caspase-3, e concomitantemente menor morte neuronal. Estudos ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa

também têm demonstrado neuroproteção via exercício físico. Foi demonstrado utilizando o mesmo protocolo adotado neste estudo, salvo num tempo de isquemia de 20 min menor atividade das caspase-3,-8 e -9, bem como menor expressão de AIF no córtex cerebral e hipocampo. Possivelmente, haja vista a participação do NO nestes mecanismos, a neuroproteção encontrada neste presente estudo poderia estar associada com a menor ativação da via das caspases e do AIF.

A partir do que foi exposto neste presente estudo, outros trabalhos precisam ser realizados a fim de elucidar melhor os mecanismos envolvidos entre a liberação de NO_2^- , glutamato e neuroproteção, bem como o papel de cada isoforma de NOS frente à POG. Além disso, investigar outros marcadores de dano celular, tais como fragmentação de DNA e carbonilação de proteínas; a participação das enzimas antioxidantes, catalase e glutathione peroxidase de animais treinados frente à lesão isquêmica; o envolvimento de outros neurotransmissores tais como GABA e aspartato mediando neuroproteção induzida pelo exercício; e verificar a neuroproteção mediada pelos neurônios através de técnicas de imuno-colocalização astrócito/neurônio e morte celular.

7 CONCLUSÃO

A partir do que foi exposto neste presente estudo concluiu-se que o treinamento físico:

Aumentou os níveis de glicogênio hepático e muscular no grupo treinado, bem como maior carga suportada no TEM;

Diminuiu a morte celular nas fatias corticais e hipocampais POG TRE;

Diminuiu os níveis de NO_2^- apenas nas fatias corticais POG TRE;

Aumentou a atividade da SOD nas fatias corticais nPOG e POG TRE, e hipocampais POG TRE;

Diminuiu a lipoperoxidação apenas nas fatias corticais POG TRE;

Diminuiu os níveis de glutamato apenas nas fatias hipocampais POG TRE.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, S., P. Green, et al. (2001). "Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways." Front Biosci **6**: A17-24.
- Agullo, L. and A. Garcia (1992). "Different receptors mediate stimulation of nitric oxide-dependent cyclic GMP formation in neurons and astrocytes in culture." Biochem Biophys Res Commun **182**(3): 1362-1368.
- Aitken, P., G. Breese, et al. (1995). "Preparative methods for brain slices: a discussion." Journal of neuroscience methods **59**(1): 139-149.
- Almeida, A., S. J. Heales, et al. (1998). "Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion." Brain Res **790**(1-2): 209-216.
- Almeida, P., A. Gomes-Filho, et al. (2009). "Swim training suppresses tumor growth in mice." Journal of Applied Physiology **107**(1): 261.
- Amir, S. (1982). "Involvement of endogenous opioids with forced swimming-induced immobility in mice." Physiology & Behavior **28**(2): 249-251.
- Ang, E. T., P. T. Wong, et al. (2003). "Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors?" Neuroscience **118**(2): 335-345.
- Araújo, A., P. Silva, et al. (2008). "Prevalência dos fatores de risco em pacientes com acidente vascular encefálico atendidos no setor de neurologia da clínica de fisioterapia da UNIPAR-campus sede; Prevalence of the risk factors in the patients with stroke attended in the sector of neurology of the clinic of physiotherapy of the UNIPAR-campus." Arg. ciências saúde UNIPAR **12**(1): 35-42.
- Baker, M. and S. Horvath (1964). "Influence of water temperature on oxygen uptake by swimming rats." Journal of Applied Physiology **19**(6): 1215.
- Banerjee, A., A. Mandal, et al. (2003). "Oxidant, antioxidant and physical exercise." Molecular and cellular biochemistry **253**(1): 307-312.
- Berkman, L., T. Seeman, et al. (1993). "High, usual and impaired functioning in community-dwelling older men and women: findings from the MacArthur Foundation Research Network on Successful Aging." Journal of Clinical Epidemiology **46**(10): 1129-1140.
- Bianchi, M. and L. Antunes (1999). "Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta." Rev. Nutr **12**(2): 123-130.
- Bidinotto, P. M., G. Moraes, et al. (1997). "Hepatic glycogen in light tropical fresh water teleost fish. A procedure for field determinations of micro samples." Boletim técnico do CEPTA **10**: 53-60.
- Bilang Bleuel, A., J. Rech, et al. (2002). "Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat." European Journal of Neuroscience **15**(6): 1048-1060.
- Black, S., M. Bedolli, et al. (1995). "Expression of neuronal nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain." Neurobiology of Disease **2**(3): 145-155.
- Boissel, J. P., P. M. Schwarz, et al. (1998). "Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation." Nitric Oxide **2**(5): 337-349.
- Bolanos, J. P. and A. Almeida (1999). "Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 415-436.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Bredt, D. S. (1999). "Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology." Free Radic Res **31**(6): 577-596.
- Bromont, C., C. Marie, et al. (1989). "Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats." Stroke **20**(7): 918.

- Brongholi, K., D. G. Souza, et al. (2006). "Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices." *Brain Res* **1083**(1): 211-218.
- Brown, B. S. and W. Van Huss (1973). "Exercise and rat brain catecholamines." *J Appl Physiol* **34**(5): 664-669.
- Bursch, W., A. Ellinger, et al. (1996). "Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy." *Carcinogenesis* **17**(8): 1595-1607.
- Calabrese, V., C. Mancuso, et al. (2007). "Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity." *Nat Rev Neurosci* **8**(10): 766-775.
- Candelario-Jalil, E., N. H. Mhadu, et al. (2001). "Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils." *Neurosci Res* **41**(3): 233-241.
- Carro, E., J. Trejo, et al. (2001). "Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy." *Journal of Neuroscience* **21**(15): 5678.
- Carvalho, E., F. Lessa, et al. "O processo de transição epidemiológica e iniquidade social: o caso de Pernambuco. *Rev Assoc Saúde Pública Piauí* 1998; 1: 107-19." *Links*.
- Caspersen, C. J., K. E. Powell, et al. (1985). "Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research." *Public Health Rep* **100**(2): 126-131.
- Cechetti, F., A. Rhod, et al. (2007). "Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation." *Brain Res* **1157**: 121-125.
- Chan, P. (2001). "Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **21**(1): 2-14.
- Choi, D. (1987). "Dextrorphan and dextromethorphan attenuate glutamate neurotoxicity." *Brain Research* **403**(2): 333-336.
- Chong, Z. Z., F. Li, et al. (2005). "Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease." *Prog Neurobiol* **75**(3): 207-246.
- Christie, M., G. Chesher, et al. (1981). "The correlation between swim-stress induced antinociception and [3H] leu-enkephalin binding to brain homogenates in mice." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **15**(6): 853-857.
- Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol (Berl)* **181**(3): 195-213.
- Contestabile, A. and E. Ciani (2004). "Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation." *Neurochem Int* **45**(6): 903-914.
- Cotman, C. and N. Berchtold (2002). "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity." *Trends in neurosciences* **25**(6): 295-301.
- Cotman, C. W. and N. C. Berchtold (2002). "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity." *Trends Neurosci* **25**(6): 295-301.
- Curtis, D. R. and J. C. Watkins (1961). "Analogues of glutamic and gamma-amino-n-butyric acids having potent actions on mammalian neurones." *Nature* **191**: 1010-1011.
- Darbolt, N. (2001). "Glutamate uptake." *Progress in Neurobiology* **65**(1): 1-105.
- Dawson, V., T. Dawson, et al. (1993). "Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures." *Journal of Neuroscience* **13**(6): 2651.
- Dawson, V., T. Dawson, et al. (1991). "Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(14): 6368.
- Dawson, V., V. Kizushi, et al. (1996). "Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice." *Journal of Neuroscience* **16**(8): 2479.
- De Alba, J., A. Cardenas, et al. (1999). "Use of brain slices in the study of pathogenic role of inducible nitric oxide synthase in cerebral ischemia-reperfusion." *Gen Pharmacol* **32**(5): 577-581.
- de Araujo, G. G., M. Papoti, et al. (2007). "Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **148**(4): 888-892.

- De Groote, L. and A. Linthorst (2007). "Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus." Neuroscience **148**(3): 794-805.
- Demougeot, C., M. Van Hoecke, et al. (2004). "Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model." J Pharmacol Exp Ther **311**(3): 1080-1087.
- Ding, Y., Y. Ding, et al. (2006). "Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model." Neurological research **28**(2): 184-189.
- Ding, Y., J. Li, et al. (2004). "Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin." Neuroscience **124**(3): 583-591.
- Ding, Y., C. Young, et al. (2005). "Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion." Acta Neuropathologica **109**(3): 237-246.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.
- Dubois, M., K. Gilles, et al. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." Analytical chemistry **28**(3): 350-356.
- Eliasson, M., Z. Huang, et al. (1999). "Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage." Journal of Neuroscience **19**(14): 5910.
- Endres, M., K. Gertz, et al. (2003). "Mechanisms of stroke protection by physical activity." Annals of neurology **54**(5): 582-590.
- Esterbauer, H. and K. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods in enzymology **186**: 407.
- Falcão, I., E. Carvalho, et al. (2004). "Acidente vascular cerebral precoce: implicações para adultos em idade produtiva atendidos pelo Sistema Único de Saúde." Rev bras saúde matern infant **4**(1): 95-102.
- Faroqui, A. A., S. E. Haun, et al. (1994). "Ischemia and hypoxia. In:." 1980.
- Fernández-López, D., J. Martínez-Orgado, et al. (2005). "Immature rat brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy." Journal of neuroscience methods **145**(1-2): 205-212.
- Feuerstein, G. Z. and X. Wang (2000). "Animal models of stroke." Mol Med Today **6**(3): 133-135.
- Flaim, S., W. Minter, et al. (1979). "Cardiovascular response to acute aquatic and treadmill exercise in the untrained rat." Journal of Applied Physiology **46**(2): 302.
- Floyd, R. A. and J. M. Carney (1992). "Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress." Ann Neurol **32** Suppl: S22-27.
- Friedland, R., T. Fritsch, et al. (2001). "Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(6): 3440.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
- Furfine, E. S., M. F. Harmon, et al. (1994). "Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline." J Biol Chem **269**(43): 26677-26683.
- GARDÈS-ALBERT, M., D. JORE, et al. (1991). "IMembrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research." 2-30.
- Garthwaite, J., P. Woodhams, et al. (1979). "On the preparation of brain slices: morphology and cyclic nucleotides." Brain Research **173**(2): 373.
- Gidday, J., J. Fitzgibbons, et al. (1994). "Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat." Neuroscience letters **168**(1-2): 221-224.
- Gobatto, C. A., M. A. de Mello, et al. (2001). "Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **130**(1): 21-27.

- Gómez-Pinilla, F., L. Dao, et al. (1997). "Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus." Brain Research **764**(1-2): 1-8.
- Goss, J. R., K. M. Taffe, et al. (1997). "The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat." Exp Neurol **146**(1): 291-294.
- Greenamyre, T., J. Penney, et al. (1987). "Evidence for transient perinatal glutamatergic innervation of globus pallidus." Journal of Neuroscience **7**(4): 1022.
- Guix, F. X., I. Uribesalgo, et al. (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." Prog Neurobiol **76**(2): 126-152.
- Halliwell, B., R. Aeschbach, et al. (1995). "The characterization of antioxidants." Food Chem Toxicol **33**(7): 601-617.
- Hara, M. R. and S. H. Snyder (2007). "Cell signaling and neuronal death." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 117-141.
- Hecker, M., A. Mulsch, et al. (1994). "Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase." J Neurochem **62**(4): 1524-1529.
- Hill, R., M. Storandt, et al. (1993). "The impact of long-term exercise training on psychological function in older adults." Journal of Gerontology **48**(1): P12.
- Hollmann, M. and S. Heinemann (1994). "Cloned glutamate receptors." Annu Rev Neurosci **17**: 31-108.
- Holloszy, J. and F. Booth (1976). "Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle." Annual Review of Physiology **38**(1): 273-291.
- Holscher, C. (2003). "Time, space and hippocampal functions." Rev Neurosci **14**(3): 253-284.
- Hossmann, K. A. (1998). "Experimental models for the investigation of brain ischemia." Cardiovasc Res **39**(1): 106-120.
- Huang, P. (1999). "Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **32**: 1353-1359.
- Iadecola, C., F. Zhang, et al. (1995). "Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **15**(3): 378-384.
- Jaffrey, S. R., H. Erdjument-Bromage, et al. (2001). "Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide." Nat Cell Biol **3**(2): 193-197.
- James, W. (1890). "The principles of psychology, I-II." New York: Holt: 449.
- Jia, J., Y. Hu, et al. (2009). "Pre-ischemic treadmill training affects glutamate and gamma aminobutyric acid levels in the striatal dialysate of a rat model of cerebral ischemia." Life sciences **84**(15-16): 505-511.
- Jolitha, A., M. Subramanyam, et al. (2006). "Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status." Experimental gerontology **41**(8): 753-763.
- Kass, I. S. and P. Lipton (1982). "Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice." J Physiol **332**: 459-472.
- Katsura, K., E. B. Rodriguez de Turco, et al. (1993). "Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia." J Neurochem **61**(5): 1677-1684.
- Kelliher, P., T. J. Connor, et al. (2000). "Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions." Physiol Behav **69**(4-5): 531-539.
- Kim, C., J. Youn, et al. (2000). "Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats." American Journal of Physiology- Endocrinology And Metabolism **278**(6): E977.
- Kim, G., T. Kondo, et al. (2002). "Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals." Stroke **33**(3): 809.
- Kitagawa, K., M. Matsumoto, et al. (1990). "[] Ischemic tolerance'phenomenon found in the brain." Brain Research **528**(1): 21-24.

- Knollemma, S., M. F. Knigge, et al. (1995). "Het cerebrovasculair accident in de praktijk." Patient care **22**: 21-22.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochem J **298 (Pt 2)**: 249-258.
- Koh, J. and D. Choi (1987). "Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay." Journal of neuroscience methods **20(1)**: 83-90.
- Kozakova, M., C. Palombo, et al. (2007). "Habitual physical activity and vascular aging in a young to middle-age population at low cardiovascular risk." Stroke **38(9)**: 2549-2555.
- Lee, I. M. and R. S. Paffenbarger, Jr. (1998). "Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study." Stroke **29(10)**: 2049-2054.
- Lee, M. H., H. Kim, et al. (2003). "Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils." Life Sci **73(19)**: 2455-2465.
- Leeuwenburgh, C. and J. W. Heinecke (2001). "Oxidative stress and antioxidants in exercise." Curr Med Chem **8(7)**: 829-838.
- Lewis, M. H. (2004). "Environmental complexity and central nervous system development and function." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **10(2)**: 91-95.
- Li, J., X. Luan, et al. (2004). "Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise preconditioning in rats." Neurological research **26(4)**: 404-408.
- Liebelt, B., P. Papapetrou, et al. (2010). "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 **166(4)**: 1091-1100.
- Lima, F., M. Oliveira, et al. (2009). "Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury." Brain Research **1279**: 147-155.
- Lindvall, O., Z. Kokaia, et al. (1994). "Neurotrophins and brain insults." Trends in neurosciences **17(11)**: 490-496.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." Physiol Rev **79(4)**: 1431-1568.
- Lizasoain, I., R. Knowles, et al. (1995). "Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rat forebrain slices." Journal of neurochemistry **64(2)**: 636-642.
- Lopez, A. D., C. D. Mathers, et al. (2006). "Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data." Lancet **367(9524)**: 1747-1757.
- Love, S. (1999). "Oxidative stress in brain ischemia." Brain Pathol **9(1)**: 119-131.
- Lu, B. and A. Chow (1999). "Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity." Journal of neuroscience research **58(1)**: 76-87.
- Luo, C., X. Zhu, et al. (2007). "Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia induced hippocampal neurogenesis by up regulating inducible nitric oxide synthase expression." Journal of neurochemistry **103(5)**: 1872-1882.
- Mahabir, S., M. F. Leitzmann, et al. (2004). "Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers." Int J Cancer **108(4)**: 600-605.
- MAIESE, K. (2002). "Organic brain disease. In: Ramachandran, V.S." 509-527.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146(1)**: 3-15.
- Malinski, T., F. Bailey, et al. (1993). "Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion." Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism **13(3)**: 355.
- MARKLUND, S. and G. MARKLUND (1974). "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase." European Journal of Biochemistry **47(3)**: 469-474.

- Martin, R. L., H. G. Lloyd, et al. (1994). "The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?" Trends Neurosci **17**(6): 251-257.
- Mates, J. M. and F. Sanchez-Jimenez (1999). "Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes." Front Biosci **4**: D339-345.
- McDonald, J. and M. Johnston (1990). "Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development." Brain Research Reviews **15**(1): 41-70.
- Melino, G., F. Bernassola, et al. (1997). "S-nitrosylation regulates apoptosis." Nature **388**(6641): 432-433.
- Merrill, J. E., S. P. Murphy, et al. (1997). "Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes." J Neurosci Res **48**(4): 372-384.
- Misko, T., R. Schilling, et al. (1993). "A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples." Analytical Biochemistry **214**(1): 11-16.
- Monaghan, D. and C. Cotman (1985). "Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H] glutamate-binding sites in rat brain." Journal of Neuroscience **5**(11): 2909.
- Moncada, S., R. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacological reviews **43**(2): 109.
- Monette, R., D. Small, et al. (1998). "A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices." Brain Research Protocols **2**(2): 99-108.
- Montine, T. J., M. D. Neely, et al. (2002). "Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **33**(5): 620-626.
- Moro, M. A., A. Cardenas, et al. (2004). "Role of nitric oxide after brain ischaemia." Cell Calcium **36**(3-4): 265-275.
- Motterlini, R., C. J. Green, et al. (2002). "Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide." Antioxid Redox Signal **4**(4): 615-624.
- Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, et al. (2004). "Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(22): 8491-8496.
- Murakami, T., Y. Shimomura, et al. (1997). "Enlargement glycogen store in rat liver and muscle by fructose-diet intake and exercise training." J Appl Physiol **82**(3): 772-775.
- Nakazono, K., N. Watanabe, et al. (1991). "Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?" Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10045-10048.
- Nedergaard, M. (1987). "Neuronal injury in the infarct border: a neuropathological study in the rat." Acta Neuropathol **73**(3): 267-274.
- Neeper, S., F. Gomez-Pinilla, et al. (1995). "Exercise and brain neurotrophins." Nature **373**(6510).
- Neeper, S., F. Gómez-Pinilla, et al. (1996). "Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain." Brain Research **726**(1-2): 49-56.
- Newsholme, E. (1979). "The control of fuel utilization by muscle during exercise and starvation." Diabetes **28**: 1.
- Nicholls, D., T. Sihra, et al. (1987). "Calcium-dependent and-independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry." Journal of neurochemistry **49**(1): 50-57.
- Nomura, Y. and Y. Kitamura (1993). "Inducible nitric oxide synthase in glial cells." Neurosci Res **18**(2): 103-107.
- Ogonovszky, H., I. Berkes, et al. (2005). "The effects of moderate-, strenuous-and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain." Neurochemistry international **46**(8): 635-640.
- Ohtsuki, T., M. Matsumoto, et al. (1992). "Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons." Brain Research **599**(2): 246-252.
- Øktedal, O., E. Solberg, et al. (2001). "The influence of physical and mental training on plasma beta endorphin level and pain perception after intensive physical exercise." Stress and Health **17**(2): 121-127.

- Olney, J. W. (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." *Science* **164**(880): 719-721.
- Oppenheim, R. W. (1991). "Cell death during development of the nervous system." *Annu Rev Neurosci* **14**: 453-501.
- Ostman, I. and H. Nyback (1976). "Adaptive changes in central and peripheral noradrenergic neurons in rats following chronic exercise." *Neuroscience* **1**(1): 41-47.
- Papoti, M., P. Leme de Almeida, et al. (2008). "Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica." *Motriz. Revista de Educação Física. UNESP* **9**(2): 97.
- Pérez-pinzón, M., P. Mumford, et al. (1996). "Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine." *Neuroscience* **75**(3): 687-694.
- Pires, S., R. Gagliardi, et al. (2004). "Estudo das frequências dos principais fatores de risco para acidente vascular cerebral isquêmico em idosos." *Arq Neuropsiquiatr* **62**(3B): 844-851.
- Ploughman, M., S. Granter-Button, et al. (2005). "Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia." *Neuroscience* **136**(4): 991-1001.
- Pompella, A. (1997). "Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation." *Int J Vitam Nutr Res* **67**(5): 289-297.
- Pringle, A. K., F. Iannotti, et al. (1997). "Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia." *Brain Res* **755**(1): 36-46.
- Radak, Z., K. Asano, et al. (1995). "Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise." *Journal of Applied Physiology* **79**(1): 129.
- Radak, Z., T. Kaneko, et al. (2001). "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain." *Neurochem Int* **38**(1): 17-23.
- Radák, Z., T. Kaneko, et al. (2001). "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain." *Neurochemistry international* **38**(1): 17-23.
- Radak, Z., A. Toldy, et al. (2006). "The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain." *Neurochemistry international* **49**(4): 387-392.
- Ramsden, M., N. C. Berchtold, et al. (2003). "Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion." *Brain Res* **971**(2): 239-244.
- Rawal, A., M. Muddeshwar, et al. (2004). "Effect of *Rubia cordifolia*, *Fagonia cretica* linn, and *Tinospora cordifolia* on free radical generation and lipid peroxidation during oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices." *Biochemical and biophysical research communications* **324**(2): 588-596.
- Reglodi, D., A. Tamas, et al. (2003). "Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats." *Brain Res Bull* **59**(6): 459-466.
- Reif, A., L. G. Frohlich, et al. (1999). "Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase." *J Biol Chem* **274**(35): 24921-24929.
- Reis, H., A. Massensini, et al. (2000). "Calcium channels coupled to depolarization-evoked glutamate release in the myenteric plexus of guinea-pig ileum." *Neuroscience* **101**(1): 237-242.
- Rengasamy, A. and R. A. Johns (1993). "Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide." *Mol Pharmacol* **44**(1): 124-128.
- Ricci, S., M. G. Celani, et al. (1991). "A community-based study of incidence, risk factors and outcome of transient ischaemic attacks in Umbria, Italy: the SEPIVAC study." *J Neurol* **238**(2): 87-90.
- Riccio, A., R. S. Alvania, et al. (2006). "A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons." *Mol Cell* **21**(2): 283-294.
- Riek-Burchardt, M., P. Henrich-Noack, et al. (2004). "Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia." *J Neurosci Methods* **137**(2): 227-233.
- Riepe, M., F. Esclaire, et al. (1997). "Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning"." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **17**(3): 257-264.

- Roberts, E. L., Jr. and T. J. Sick (1988). "Calcium-sensitive recovery of extracellular potassium and synaptic transmission in rat hippocampal slices exposed to brief anoxia." Brain Res **456**(1): 113-119.
- Rodrigo, J., D. R. Springall, et al. (1994). "Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1312): 175-221.
- Rothe, F., U. Canzler, et al. (1998). "Subcellular localization of the neuronal isoform of nitric oxide synthase in the rat brain: a critical evaluation." Neuroscience **83**(1): 259-269.
- Rothman, S. and J. Olney (1986). "Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage." Annals of neurology **19**(2): 105-111.
- Sagami, I., S. Daff, et al. (2001). "Intra-subunit and inter-subunit electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase: effect of calmodulin on heterodimer catalysis." J Biol Chem **276**(32): 30036-30042.
- Sakamaki, K. (2004). "Regulation of endothelial cell death and its role in angiogenesis and vascular regression." Curr Neurovasc Res **1**(4): 305-315.
- Sattler, R. and M. Tymianski (2000). "Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity." J Mol Med **78**(1): 3-13.
- Schwarz, P. M., H. Kleinert, et al. (1999). "Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(11): 2584-2590.
- Scopel, D., C. Fochesatto, et al. (2006). "Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation." Brain Res Bull **71**(1-3): 155-159.
- Scorziello, A., C. Pellegrini, et al. (2001). "Differential vulnerability of cortical and cerebellar neurons in primary culture to oxygen glucose deprivation followed by reoxygenation." Journal of Neuroscience Research **63**(1): 20-26.
- Scorziello, A., C. Pellegrini, et al. (2004). "Neuronal NOS activation during oxygen and glucose deprivation triggers cerebellar granule cell death in the later reoxygenation phase." Journal of Neuroscience Research **76**(6): 812-821.
- Shyu, B., S. Andersson, et al. (1982). "Endorphin mediated increase in pain threshold induced by long-lasting exercise in rats." Life sciences **30**(10): 833.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.
- Simmons, M. L. and S. Murphy (1992). "Induction of nitric oxide synthase in glial cells." J Neurochem **59**(3): 897-905.
- Snyder, A. C. (1998). "Overtraining and glycogen depletion hypothesis." Med Sci Sports Exerc **30**(7): 1146-1150.
- Somani, S. and K. Husain (1996). "Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues." Biochemistry and molecular biology international **38**(3): 587.
- Somani, S., R. Ravi, et al. (1995). "Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat." Pharmacology Biochemistry and Behavior **50**(4): 635-639.
- Souza, M., M. Oliveira, et al. (2009). "Swimming training prevents pentylentetrazol induced inhibition of Na⁺, K⁺ ATPase activity, seizures, and oxidative stress." Epilepsia **50**(4): 811-823.
- Stamler, J. S. and G. Meissner (2001). "Physiology of nitric oxide in skeletal muscle." Physiol Rev **81**(1): 209-237.
- Storz, G. and J. A. Imlay (1999). "Oxidative stress." Curr Opin Microbiol **2**(2): 188-194.
- Stummer, W., A. Baethmann, et al. (1995). "Cerebral protection against ischemia by locomotor activity in gerbils: underlying mechanisms." Stroke **26**(8): 1423.
- Stummer, W., K. Weber, et al. (1994). "Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia." Stroke **25**(9): 1862.
- Sun, M., Y. Zhao, et al. (2009). "Inhibition of nNOS reduces ischemic cell death through down-regulating calpain and caspase-3 after experimental stroke." Neurochemistry international **54**(5-6): 339-346.

- Swan, J. and B. Meldrum (1990). "Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischaemia." Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism **10**(3): 343.
- Takagi, N., R. Logan, et al. (2000). "Altered Interaction Between PSD 95 and the NMDA Receptor Following Transient Global Ischemia." Journal of neurochemistry **74**(1): 169-178.
- Takahashi, T. (2003). "Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract." J Gastroenterol **38**(5): 421-430.
- Tatchum-Talom, R., R. Schulz, et al. (2000). "Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training." American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology **279**(4): H1757.
- Tavares, A., H. Cimarosti, et al. (2001). "Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus." Neuroreport **12**(12): 2705-2709.
- Tenneti, L., D. M. D'Emilia, et al. (1997). "Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases." Neurosci Lett **236**(3): 139-142.
- Terjung, R., K. Baldwin, et al. (1974). "Glycogen repletion in different types of muscle and in liver after exhausting exercise." American Journal of Physiology **226**(6): 1387.
- Thom, T., N. Haase, et al. (2006). "Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." Circulation **113**(6): e85-151.
- Voltarelli, F. A., C. A. Gobatto, et al. (2002). "Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test." Braz J Med Biol Res **35**(11): 1389-1394.
- Wang, C., T. Yang, et al. (2001). "An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat." Journal of neuroscience methods **109**(2): 147-151.
- Wang, H., E. Cheng, et al. (2003). "Over-expression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults." J Neurochem **87**(6): 1527-1534.
- Warlow, C. P. (1998). "Epidemiology of stroke." Lancet **352** Suppl 3: SIII1-4.
- Wefers, H., T. Komai, et al. (1984). "Protection against reactive oxygen species by NAD(P)H: quinone reductase induced by the dietary antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). Decreased hepatic low-level chemiluminescence during quinone redox cycling." FEBS Lett **169**(1): 63-66.
- Wendel-Vos, G. C., A. J. Schuit, et al. (2004). "Physical activity and stroke. A meta-analysis of observational data." Int J Epidemiol **33**(4): 787-798.
- WHO (2006). "World Health Organization (WHO): Steps Stroke Manual."
- Winstein, C., A. Merians, et al. (1999). "Motor learning after unilateral brain damage." Neuropsychologia **37**(8): 975-987.
- Yamato, T., S. Yamasaki, et al. (2002). "Modulation of the stress response by coffee: an in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat." Neurosci Lett **332**(2): 87-90.
- Yang, G., P. Chan, et al. (1994). "Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia." Stroke **25**(1): 165.
- Young, D., P. Lawlor, et al. (1999). "Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective." Nature medicine **5**(4): 448-453.
- Yu, S., H. Wang, et al. (2002). "Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor." Science **297**(5579): 259.
- Zhang, F., J. Jia, et al. (2010). "The Effect of Treadmill Training Pre-Exercise on Glutamate Receptor Expression in Rats after Cerebral Ischemia." International journal of molecular sciences **11**(7): 2658.
- Zhang, F., C. Li, et al. (2007). "Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion." Neuroscience **150**(4): 938-949.
- Zhang, F., Y. Wu, et al. (2010). "Pre-Ischemic Treadmill Training Induces Tolerance to Brain Ischemia: Involvement of Glutamate and ERK1/2." Molecules (Basel, Switzerland) **15**(8): 5246.

- Zhou, C., C. Li, et al. (2008). "Neuroprotection of aminobutyric acid receptor agonists via enhancing neuronal nitric oxide synthase (Ser847) phosphorylation through increased neuronal nitric oxide synthase and PSD95 interaction and inhibited protein phosphatase activity in cerebral ischemia." Journal of Neuroscience Research **86**(13): 2973-2983.
- Zhou, L. and D. Y. Zhu (2009). "Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications." Nitric Oxide **20**(4): 223-230.

9 APÊNDICE

9.1 Apêndice 1



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 139/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos do treinamento físico sobre a expressão de nNos em modelo de isquemia in vitro**", 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 **26/ 08/2009**.

Este certificado expira-se em **26/ 08/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 139/2009**, related to the project entitled "**Effects of physical training under nNos expression in a model of glucose-oxygen deprivation**", 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 **August 26, 2009**.

This certificate expires in **August 26, 2014**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto 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

9.2 Apêndice 2

Lista de Equipamentos utilizados durante o trabalho:

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
VDRL Shaker	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
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
Termômetro	Panvel [®]
Placa de elisa (96 wells)	Analítica
Espectrofotômetro	Axyo [®] Anthos [®] Hitachinaka [®]
Espectrofluorímetro	Varian [®]
Microscópio de fluorescência	Axio Imager.M2 / Carl Zeiss
Lâminas (26x76mm)	Bioslide
Homogeneizador de tecidos	Pellet Pestle [®] Motor

9.3 Apêndice 3

Listra de Drogas, Reagentes e Anticorpos

nNOS, nNOSp	Santa Cruz biotechnology®
Ácido Pirogálico (pirogalol)	Synth®
Ácido Tiobarbitúrico	Sigma-Aldrich®/T5500
Live/Dead – Viability/Cytotoxicity *for mammalian cells*	Kit Molecular Probes Inc. / L-3224®
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich®
Nitrato de Sódio (NaNO ₂)	Sigma-Aldrich®
Ácido Clorídrico (HCl)	Synth®
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
β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatte (NADP)	Sigma-Aldrich® / N0505
Ácido bis-(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
Ázida de Sódica (NaN ₃)	Sigma-Aldrich® / S8032
NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , NaHCO ₃ , CaCl ₂ , KH ₂ PO ₄ , Glicose, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ .	Merck & Co., Inc
Paraformaldeído 95%	Sigma-Aldrich® / 158127
2,3 diaminonaphtalene (DAN)	Sigma-Aldrich®/D2757-16
PMSF	Sigma-Aldrich®/P7626
Ortovanadato	Sigma-Aldrich®/S6508
NAF	Sigma -Aldrich®/80373
5,6,7,8 Tetrahidrobiopterin (BH ₄)	Sigma-Aldrich®/T4425

9.4 Apêndice 4

Lista de Soluções utilizadas nos experimentos:

KREBS RINGER HEINSEILT (solução pré-incubação)	NaCl (120) KCl (2) CaCl ₂ (0,5) MgSO ₄ (10) NaHCO ₃ (26) KH ₂ PO ₄ (1,8) Sacarose (200) q.s.p água mili-Q pH=7,4
KREBS RINGER HEINSEILT (solução pré-incubação)	NaCl (120) KCl (2) CaCl ₂ (0,5) MgSO ₄ (10) NaHCO ₃ (26) KH ₂ PO ₄ (1,8) q.s.p água mili-Q pH=7,4
KREBS RINGER HEINSEILT (solução incubação)	NaCl (120) KCl (2) CaCl ₂ (2) MgSO ₄ (1,19) NaHCO ₃ (26) KH ₂ PO ₄ (1,18) BH4 (10 µM) q.s.p água mili-Q pH=7,4
Tampão de Lise	H ₂ Od Cloreto de Sódio (NaCl) (125) TRIS-HCl (20) pH=7,6 EGTA (10) EDTA (5) Cocktail de inibidor de protease 40µL/mL
MIX: KREBS-RINGER-HEPES (KRH) NADP+ GDH	H ₂ Od Cloreto de Sódio (NaCl) (124) Cloreto de potássio (4) Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (1,2) HEPES (25) Glicose (10) pH=7,4
Paraformaldeído 4% Buffer 0,1M	H ₂ Od NaOH (100) Tampão fosfato (200) pH=7,4
Tampão fosfato (PB - 0,2M)	H ₂ Od

	Na ₂ HPO ₄ (400) NaH ₂ PO ₄ (200) pH=7,4
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 O 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 O
Tampão de Corrida 10x	Solução TRIS-HCl 0,25M pH= 8,3 Glicina (1910) SDS 1% (p/v) H ₂ O
Tampão de Transferência 10x	TRIS (120) Glicina (950) Metanol 20% (acrescentado apenas na solução final 1x) (v/v) H ₂ O
Solução TBS 10x	Tris-Base (190) NaCl (490) H ₂ O pH=7,5
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