

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR
SOBRE A ISQUEMIA *in vitro* EM FATIAS DE HIPOCAMPO E
SOBRE O ESTADO OXIDATIVO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS
DE RATOS WISTAR**

DENISE CHERUTTI SCOPEL

Orientador: Dr. Carlos Alexandre Netto
Co-orientadora: Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Porto Alegre
2004

UFRGS
Inst. de Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR
SOBRE A ISQUEMIA *in vitro* EM FATIAS DE HIPOCAMPO E
SOBRE O ESTADO OXIDATIVO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS
DE RATOS WISTAR**

DENISE CHERUTTI SCOPEL

Orientador: Dr. Carlos Alexandre Netto
Co-orientadora: Dra. Ionara Siqueira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre
2004

UFRGS
Inst. de Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte.
A satisfação está no esforço e não apenas na realização final.

(Mahatma Gandhi)

Aos meus filhos Rafael, Rodrigo e Laura pelo carinho
e compreensão que tiveram em todas as vezes que
não pude partilhar de suas companhias.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Alex, pela confiança e dedicada orientação e por me conceder a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À professora Ionara pela amizade, pelo grande aprendizado que me proporcionou e, sobretudo pelo desafio de aceitar a orientação desta tese.

À Cíntia pela colaboração, dedicação e paciência durante os experimentos.

À professora Christianne Salbego e à Helena Cimarosti pela colaboração neste trabalho.

À professora Adriane Belló-Klein e à Maristela Rabbo pelo importante auxílio.

Aos meus filhos pela compreensão e paciência, ao meu marido pela resignação, sendo muitas vezes a motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe pela presença constante e sempre acolhendo meus filhos.

À tia Jú, aos meus sogros Marlene e Ciro e ao meu cunhado Alexandre por me auxiliarem nesta missão.

Aos colegas do laboratório pela amizade e companhia sempre agradável.

À Nice pelas orientações e momentos de descontração.

À professora Carla sempre com uma palavra de incentivo.

Aos demais amigos que não foram citados, mas que certamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação pela oportunidade de crescimento profissional.

À secretária Andreia pela dedicação e paciência durante a apresentação dos meus trabalhos.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	i
FIGURAS	iv
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Exercício	02
1.1.1. Exercício e Função Cerebral	03
1.1.2. Modelos de Exercício Físico	05
1.2. Radicais livres	06
1.2.1. Danos Oxidativos em Macromoléculas	07
1.2.2. Sistemas de Defesa Antioxidante	11
1.3. Estresse Oxidativo	11
1.3.1. Exercício e Estresse Oxidativo	12
1.4. Isquemia Cerebral	13
1.4.1. Modelo de Isquemia Cerebral in vivo	14
1.4.2. Modelo de Isquemia Cerebral in vitro	15
1.4.3. Alterações Fisiopatológicas da Isquemia Cerebral	16
1.4.4. Exercício e Isquemia Cerebral	18
1.5. Objetivo	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Animais	22
2.2. Desenho Experimental	22

2.3. Protocolo de Treinamento	22
2.4. Dissecção e Preparação das Estruturas	23
2.5. Evento Isquêmico <i>in vitro</i> (privação de oxigênio e glicose) em fatias hipocampais	23
2.5.1. Viabilidade Celular	24
2.5.2. Dano Celular	24
2.6. Avaliação do Estresse Oxidativo	25
2.6.1. Preparação de Homogeneizados	25
2.6.2. Determinação do Conteúdo de Radicais Livres	25
2.6.3. Medida de Dano em Lipídeo.....	25
2.6.4. Medida de Dano em Proteínas	26
2.6.5. Capacidade Antioxidante Total	26
2.6.6. Quantificação de Proteínas	26
2.7. Análise Estatística	27
3. RESULTADOS	28
3.1. Evento Isquêmico <i>in vitro</i>	29
3.1.1. Viabilidade Celular (Atividade Mitocondrial)	29
3.1.2. Dano Celular	29
3.2. Avaliação do Estado Oxidativo	30
3.2.1. Hipocampo	30
3.2.2. Estriado	31
3.2.3. Córtex Frontal	32
3.2.4. Cerebelo	32

4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÕES	62
6. PERSPECTIVAS	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxi-nonenal
5-HNE	5-hidroxi-nonenal
ABAP	di-hidrocloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
AVC	acidente vascular cerebral
BDNF	fator neurotrófico derivado do encéfalo "brain derived neutrophic factor"
Ca ⁺²	íon cálcio
CA1	subcampo 1 do cornu de Ammon, segundo nomenclatura de Lorent de Nó
CAT	catalase
CO ₂	dióxido de carbono
DCFH-DA	2'7'-diclorofluoresceína diacetato
DMSO	dimetilsulfóxido
EM	emissão
EO	estresse oxidativo
EPM	erro padrão da média
ERO	espécie reativa de oxigênio
EX	excitação
EXE	exercitado
EXE20	exercitado 20 minutos
EXE60	exercitado 60 minutos
GPx	glutaciona peroxidase

GR	glutathiona redutase
GSH	glutathiona
GSSG	glutathiona oxidada
GST	glutathiona transferase
H ⁺	íon hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
K ⁺	íon potásio
L [•]	radical lipídico
LDH	lactato desidrogenase
LOO [•]	radical peroxil
LPO	lipoperoxidação
MDA	malondialdeído
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio
Na ⁺	íon sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NPOG	não privadas de oxigênio e glicose
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
OH [•]	radical hidroxil
pH	potencial hidrogeniônico
POG	privação de oxigênio e glicose
RL	radical livre
RO [•]	radical alcóxil

ROO [•]	radical peroxil
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato e sódio
SED	sedentário
SOD	superóxido dismutase
TAR	reatividade antioxidante total
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	potencial antioxidante total
VO ₂ máximo	volume de oxigênio máximo
XO	xantina oxidase

FIGURAS

Figura 1 - Reações em cadeia da lipoperoxidação

Figura 2 - Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treino durante 20 minutos por dia em esteira ergométrica.

Figura 3 - Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treinamento durante 60 minutos por dia em esteira ergométrica.

Figura 04 - Lise celular de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treinamento durante 20 minutos por dia em esteira ergométrica.

Figura 05 - Lise celular de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treinamento durante 60 minutos por dia em esteira ergométrica.

Figura 06 - Efeito do exercício físico regular em esteira sobre o conteúdo de radicais livres em hipocampo, utilizando DCFH-DA como um "probe". (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 07 - Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 08 - Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em proteínas, conteúdo de resíduos de triptofano em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 09 - Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em proteínas, conteúdo de resíduos de tirosina em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 10 - Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 11 - Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 12 - Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico em estriado. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 13 - Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em estriado. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 14 - Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em estriado. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 15 - Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em córtex frontal. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 16 - Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em córtex frontal. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 17 - Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em córtex frontal. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 18 - Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em cerebelo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 19 - Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em cerebelo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Figura 20 - Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em cerebelo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

TABELA

Tabela 1. Alguns produtos da oxidação de proteínas.

RESUMO

O exercício parece diminuir o risco de acidentes vasculares cerebrais, além da mortalidade induzida pelos AVCs. A isquemia cerebral é uma das principais causas de morte e uma das maiores causas de incapacidade. Estudos demonstram que o comportamento sedentário está relacionado com o aumento de risco de AVCs. Nossos objetivos foram avaliar o potencial neuroprotetor do exercício físico num modelo de isquemia in vitro, usando fatias hipocâmpais de ratos Wistar expostas à privação de oxigênio e glicose (POG), bem como estudar o estado oxidativo celular de homogeneizados de estruturas cerebrais relevantes (hipocampo, estriado, córtex frontal e cerebelo) de ratos Wistar. Ratos Wistar (90 dias de idade) foram divididos em exercitado (EXE) e sedentário (SED). O grupo EXE foi submetido a treino de exercício com 20 minutos (EXE20) ou 60 minutos (EXE60) em esteira ergométrica adaptada para ratos durante duas semanas. O grupo SED foi sujeito à esteira sem movimento durante 3 minutos. Os animais foram decapitados 15 horas após a última sessão de exercício. Os cérebros foram dissecados, um hipocampo foi imediatamente fatiado em "chopper" e as fatias randomizadas em duas placas controle (NPOG) e privada de oxigênio e glicose (POG). Após 3h de reoxigenação, foram realizados os ensaios de avaliação da viabilidade celular, através da atividade mitocondrial, e de lise celular, pela determinação da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase. A POG reduziu significativamente a atividade mitocondrial (cerca de 40%) em fatias hipocâmpais de animais SED e EXE. A atividade mitocondrial não foi alterada pelo exercício físico. A POG aumentou a lise celular, este aumento foi reduzido em fatias de animais submetidos ao treino de 20 minutos, enquanto que em animais treinados 60 minutos, a lise causada pela POG foi significativamente

aumentada. O hipocampo não utilizado para o ensaio de POG e as demais estruturas (córtex frontal, estriado e cerebelo) foram utilizados para determinação do estado oxidativo celular. As estruturas foram homogeneizadas e centrifugadas, o sobrenadante foi usado para a avaliação do conteúdo de radicais livres, do dano em lipídeos e em proteínas e da capacidade antioxidante total dos tecidos. Os hipocampos de ratos exercitados durante 20 minutos não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados de índice de estresse oxidativo. Entretanto, o exercício melhorou alguns parâmetros de estresse oxidativo em hipocampos de ratos exercitados durante 60 minutos, estes apresentaram uma redução no conteúdo de radicais livres e um aumento no potencial antioxidante total. Paradoxalmente, foram observados maiores níveis de lipoperoxidação. O exercício moderado parece proteger células hipocâmpais do dano isquêmico em fatias hipocâmpais de ratos, considerando que os hipocampos não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados de índice de estresse oxidativo, sugere-se que o mecanismo de ação de neuroproteção pelo exercício moderado independa da melhora do estado oxidativo celular. Corroborando com esta teoria, os hipocampos de animais exercitados durante sessenta minutos apresentaram melhores valores de potencial antioxidante total, todavia um maior dano isquêmico. Os dados sugerem que o exercício físico causa, de maneira dependente da intensidade, alterações na susceptibilidade hipocâmpal ao dano isquêmico, sendo que o exercício moderado parece proteger, enquanto que o exercício intenso parece potencializar o dano isquêmico cerebral.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Exercício

O interesse histórico focado no exercício, com sua aplicabilidade para a manutenção e aquisição da saúde física, tem origem milenar. Nas últimas décadas, os estudos sobre o exercício físico foram centrados no modo como as estruturas e funções do corpo humano são alteradas quando expostas a práticas agudas e crônicas de exercício. Através de programas de condicionamento físico publicado por Kenneth Cooper, "Aerobics", em 1968, foi então estabelecida a base fisiológica da utilização do exercício para a promoção de um estilo de vida mais saudável (WILMORE e COSTILL, 2001). É sabido que o efeito do exercício físico sobre as variáveis fisiológicas, como atividade cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória, temperatura e atividade muscular, pode estar relacionado com um organismo saudável. Sendo assim, as manifestações de adaptação ao exercício são freqüentemente utilizadas como parâmetro de avaliação da capacidade funcional do organismo. O exercício tem sido encarado como um instrumento tanto preventivo como terapêutico contra vários tipos de doenças (WILMORE e COSTILL, 2001).

Há vários estudos epidemiológicos que demonstram que o exercício físico pode contribuir para a redução da incidência de tumores (MAHABIR et al., 2004; PATEL et al., 2003) e para diminuir o risco de acidentes vasculares cerebrais (AVC), além da mortalidade induzida por AVCs (LEE e PAFFENBARGER, 1998).

O exercício fornece benefícios psicológicos, proporcionando integração social e melhorando a auto-estima. O exercício físico tem potencial valor não apenas de sua fundamentação teórica e empírica, mas de sua popularidade e validade como uma forma de melhora do bem estar. Os efeitos relatados incluem ação ansiolítica e antidepressiva, melhor resistência a problemas emocionais e fisiológicos oriundos de estresses psicológicos. O exercício pode provar ser de uso especialmente no tratamento de

pacientes com problemas emocionais que rejeitam ostensivamente diagnósticos psicológicos e seus respectivos tratamentos (SALMON, 2001).

1.1.1. Exercício e Função Cerebral

Existe um paradoxo ao analisar o mecanismo de ação do exercício na saúde e no bem estar. Estudos têm demonstrado que o exercício pode reduzir doenças relacionadas à idade bem como aumentar a produção de radicais livres, o que pode ser prejudicial para a função celular. Os mecanismos bioquímicos, pela ação do exercício regular, significativamente benéficos à saúde e ao bem estar, incluindo diminuição da incidência de certas doenças, não estão bem esclarecidos (HOLLOSZY, 1993).

Vários estudos sugerem que o exercício melhora a função cerebral e, com isso, pode influenciar o comportamento. A participação em programas de atividade física pode restabelecer as habilidades mentais em idosos (DUSTIMAN et al., 1984; ELSAYED et al., 1980; KRAEMER et al., 1999).

Dentre os efeitos amplamente relatados estão as atividades ansiolítica e antidepressiva. Estes efeitos foram observados também em testes comportamentais, utilizando animais de laboratório, que demonstram efeitos benéficos do exercício na ansiedade. Após um período de exercício forçado nos testes de natação e de corrida em roda motorizada em roedores, observou-se o aumento na locomoção no campo aberto, interpretado como uma redução da ansiedade (THARP e CARSON, 1975; WEBER e LEE, 1968).

Alguns trabalhos apresentam o efeito do exercício físico sobre a memória espacial de roedores em vários modelos comportamentais. ANDERSON e colaboradores (2000), utilizando o labirinto radial de oito braços, demonstraram que ratos exercitados de forma voluntária em rodas de corrida durante sete semanas necessitaram de um menor

período de treino (30%) para adquirir o critério de desempenho. RADÁK e colaboradores (2001) demonstraram, em estudo com roedores submetidos à natação, que exercício regular pode ser um meio importante para prevenir o declínio da função cognitiva relacionada com a idade.

Muitos estudos sugerem que o exercício aperfeiçoa a função cerebral, porém há um conhecimento restrito sobre o seu mecanismo de ação. Tem sido proposto que o exercício mantém a integridade cerebrovascular (MC FARLAND, 1963), promove a capilarização (BLACK et al., 1987) e aumenta as conexões dendríticas (PYSH e WEISS, 1979). Após um programa de exercícios voluntários em camundongos adultos, VAN PRAAG e colaboradores (1999) observaram que, além de melhorar o aprendizado espacial, aumenta a neurogênese no giro denteado de maneira similar ao enriquecimento ambiental.

Existem evidências que a plasticidade energética está envolvida com os efeitos benéficos do exercício. O exercício agudo levou a um aumento transitório na utilização de glicose, captação de oxigênio e fluxo sanguíneo cerebral no córtex motor e estriado (MCCLOSKEY et al., 2001). Contudo um aumento no metabolismo oxidativo pode aumentar a geração de radicais livres, o que pode ser prejudicial para as funções celulares.

Evidências sugerem que o exercício físico pode afetar particularmente a neuroquímica hipocampal (FORDYCE E FARRAR, 1991; FORDYCE E WEHNER, 1993) e promover o aumento na expressão de certos fatores tróficos, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo ("brain-derived neurotrophic factor", BDNF), os quais são importantes para a diferenciação e sobrevivência neuronal (GOMEZ-PINILLA et al., 1998; NEEPER et al., 1996).

1.1.2. Modelos de Exercício Físico

Estudos utilizando animais de experimentação têm sido amplamente realizados no estudo do efeito do exercício físico. Contudo os dados obtidos não podem ser diretamente comparados, já que existem diferentes protocolos de treinamento. Ratos de laboratório são normalmente mantidos em caixas restringindo sua atividade física, sendo estimado que seu gasto energético diário seja de aproximadamente 10% do consumo diário (ICHIKAWA e FUJITA, 1987). Este perfil de gasto energético é semelhante ao de pessoas sedentárias (FUJITA e OHZEKI, 1993). Os autores classificam o treinamento dos animais, conforme a frequência e a intensidade do exercício físico, em: leve, moderado ou intenso. ICHIKAWA e colaboradores (2000) submeteram ratos a um programa de treinamento leve, a fim de mimetizar, experimentalmente, a atividade física normal no cotidiano em humanos, enquanto que um aumento na intensidade do exercício (tempo e potência) submete os animais a um treinamento moderado. A atividade física extenuante (intensidade alta) tem sido classificada como exercício intenso (CHENNAOUI et al., 2001).

O exercício físico pode ainda ser classificado como: forçado ou voluntário. O protocolo de treinamento forçado consiste em sessões de corrida em esteira ergométrica ou o nado forçado (RADÁK et al., 2001; RA et al., 2002). Alguns autores têm criticado estes métodos considerando-os como potenciais estressores, dificultando a interpretação dos dados, devido às respostas ao estímulo estressante concomitante com as alterações causadas pelo próprio exercício físico (SOTHMANN et al., 1996). Animais com livre acesso a uma roda de corrida podem realizar o exercício físico voluntariamente durante semanas ou meses (MONDON et al., 1985; RUSSEL et al., 1987). É digno de nota que vários trabalhos demonstram diferentes respostas aos modelos de exercício forçado e voluntário (NARATH et al., 2001).

1.2. Radicais livres

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica. São instáveis, extremamente reativos e capazes de existência independente, sendo estas as características que os tomam tão lesivos ao nosso organismo. Podem iniciar reações que danificam as membranas biológicas, além de determinar aumento de liberação de aminoácidos excitatórios (PALL, 2002). Merecem destaque, dentre os radicais livres e as moléculas que dão origem a radicais livres, o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o altamente reativo hidroxil (OH^{\cdot}), bem como os radicais alcoxil (RO^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}) e óxido nítrico (NO). Estas moléculas são continuamente produzidas durante o metabolismo oxidativo normal. Por exemplo, o oxigênio que retiramos da atmosfera através da respiração sofre uma série de transformações, que acontece na membrana interna das mitocôndrias. O oxigênio molecular passa por um processo de redução tetravalente (recebe quatro elétrons e quatro prótons ao mesmo tempo), gerando como produto final uma molécula de água. Contudo, nem todo o oxigênio passa por esse processo de redução. Aproximadamente 5% do oxigênio sofrem, na mitocôndria, uma redução monovalente formando substâncias com um número ímpar de elétrons na camada mais externa, conferindo-lhes a característica de alta reatividade. Estas substâncias são extremamente instáveis e denominadas de espécies reativas do oxigênio (ERO) (HALLWELL, 1992).

Reações oxidativas com potencial gerador de radicais livres em condições fisiológicas são importantes em outras reações biológicas, como as dos sistemas citocromo P450s e da enzima ciclooxigenase. A produção de radicais livres está envolvida também na ativação e migração de leucócitos para áreas de inflamação. Os leucócitos,

macrófagos e neutrófilos possuem a enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato) oxidase que catalisa a redução monovalente do oxigênio a $O_2^{\cdot-}$, além de outras enzimas como a mieloperoxidase, a qual gera hipoclorito a partir de H_2O_2 . Estes oxidantes produzidos nos sítios de inflamação, se não forem controlados, atacam os tecidos. As proteínas contendo metais podem ficar disponíveis, como por exemplo, a hemoglobina liberada de eritrócitos lisados nos sítios de inflamação. O excesso de H_2O_2 pode causar a degradação dos anéis heme da hemoglobina e da mioglobina, liberando ferro. O ferro (e o cobre) livre pode reagir com H_2O_2 através de uma série de reações chamadas de Reações de Fenton e Haber-Weiss, gerando a espécie mais reativa e tóxica, o radical OH^{\cdot} (HALLIWELL, 1992).

1.2.1. Danos Oxidativos em Macromoléculas

O radical livre ataca uma molécula seqüestrando um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. O excesso de radicais livres pode oxidar diretamente macromoléculas, causando peroxidação lipídica, destruição específica de proteínas e dano ao DNA (HALLIWELL, 1992).

A lipoperoxidação (LPO, Figura 1) é um processo fisiológico normal, está envolvida na renovação das membranas, bem como na produção de eicosanóides (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). Contudo, níveis aumentados na LPO das membranas podem afetar a integridade dos processos fisiológicos, como a fluidez, a permeabilidade, o potencial de membrana, a atividade de proteínas de membrana (receptores e canais iônicos) e pode ainda levar à ruptura de membranas de organelas e da própria célula. As membranas celulares, formadas principalmente por lipídios poliinsaturados, são particularmente vulneráveis ao ataque de radicais livres. O radical livre, em especial o

radical OH^\cdot , ataca um grupo metileno da cadeia de um ácido graxo poliinsaturado. A retirada de um átomo de hidrogênio leva à formação de um radical centrado no carbono (L^\cdot), que sofre alterações conformacionais formando um dieno conjugado. Em meio aeróbico, o L^\cdot reage com o oxigênio, formando o radical peróxil (LOO^\cdot). O radical LOO^\cdot seqüestra um átomo de hidrogênio da cadeia do ácido graxo poliinsaturado adjacente, transforma-se num lipídeo hidroperóxido e assim, sucessivamente, propagando a reação em cadeia. Esta reação pode terminar quando dois LOO^\cdot reagem entre si. Os lipídeos hidroperóxidos se decompõem numa reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como malondialdeído (MDA) e 5-hidroxi-nonenal (5-HNE), e hidrocarbonetos voláteis como etano e pentano (JESBERGER e RICHARDSON, 1991).

Os radicais livres podem também atacar as proteínas (Tabela 1), tanto enzimas quanto proteínas estruturais. Pode ocorrer a oxidação da proteína através da abstração de um hidrogênio de carbono α , que ao reagir com oxigênio forma um radical peróxil. Já a oxidação da cadeia lateral dos aminoácidos depende da sua estrutura. Como consequência da modificação oxidativa pode haver alterações na estrutura secundária e terciária da macromolécula, afetando sua atividade, resultando em agregação ou susceptibilidade à proteólise. Ocorrem alterações secundárias, onde as proteínas são modificadas por moléculas geradas a partir da modificação oxidativa de outras macromoléculas, como aldeídos (5-HNE e MDA), produtos da lipoperoxidação (SCHACTER et al., 1996).

Ácido graxo com 3 ligas
duplas

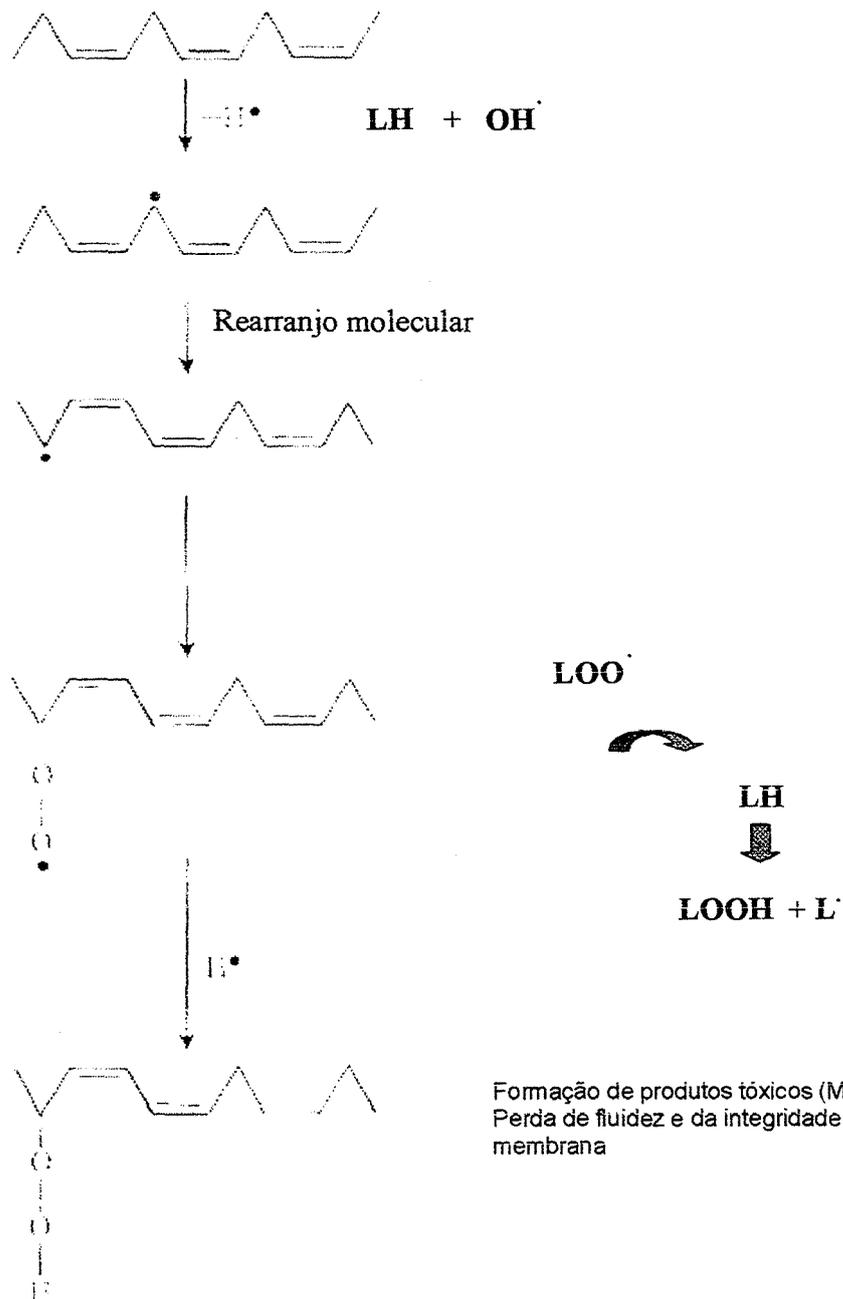


Figura 1. Reações em cadeia da lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Tabela 1. Alguns produtos da oxidação de proteínas.

Insulto oxidativo	Produto
Tirosina + OH·	DOPA
Tirosina + HOCl	3-Clorotirosina
Tirosina + radicais centrados no nitrogênio	3- Nitro-tirosina
Tirosina + OH· seguido de combinação radical-radical	Di-tirosina
Phe + OH·	<i>o</i> - e <i>m</i> -tirosina
Phe + OH·, com dimerização	Dímeros de aminoácidos hidroxilados
Triptofano + OH·	<i>N</i> - formilquinurenina; quinurenina
Triptofano + OH·	5-hidroxi-triptofano; 7-hidroxi-triptofano
Histidina + OH·	2-oxo-histidina
Glutamato + OH· em presença de O ₂	Hidroperóxido de ácido glutâmico
Leucina + OH· em presença de O ₂	Hidroperóxidos e hidróxidos de leucina; <i>α</i> -ácido isocaprônico; ácido isovalérico; compostos carbonilas
Valina + OH· em presença de O ₂	Hidroperóxidos e hidróxidos de valina; compostos carbonilas
Lisina + OH· em presença de O ₂	Hidroperóxidos e hidróxidos de lisina; compostos carbonilas
Prolina + OH· em presença de O ₂	Hidroperóxidos e hidróxidos de prolina; 5-hidróxi-2-ácido aminovalérico; compostos carbonilas
Arginina + OH· em presença de O ₂	5-Hidróxi-2- ácido aminovalérico
Isoleucina + OH· em presença de O ₂	Hidroperóxidos de isoleucina
Glicina – abstração de hidrogênio do carbono α	Ácido aminomalônico
Metionina + OH·	Metionina sulfóxido

1.2.2. Sistemas de Defesa Antioxidante

A fim de neutralizar os radicais livres, as células possuem um sistema de defesa antioxidante citosólico e de membrana. Este sistema bastante eficiente é composto de elementos enzimáticos que são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) e elementos não enzimáticos, vitaminas A, C e E, bem como a glutathione (GSH). Sabemos hoje que os antioxidantes não atuam isoladamente, mas interagem e se regeneram em um complexo sistema de ciclos. A vitamina E (tocoferol), um antioxidante lipossolúvel, ao seqüestrar um radical $LOO\cdot$ forma um radical, o tocoferoxil. O radical tocoferoxil pode ser reduzido a tocoferol pelo ubiquinol e também pelo ascorbato (ácido ascórbico, vitamina C), o qual se transforma em radical ascorbil (BISBY e PARKER, 1995).

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), a glutathione reductase (GR) e a glutathione transferase (GST) também fazem parte da rede de antioxidantes das células. A SOD catalisa a dismutação de radicais $O_2\cdot^-$. A CAT hidrolisa a transformação de H_2O_2 , formando oxigênio e água. A GPx catalisa a redução de hidroperóxidos pela GSH, utilizando então a GSH como doadora de elétrons, formando glutathione oxidada (GSSG), que é reciclada pela glutathione reductase. A GPx tem um importante papel na proteção contra o dano oxidativo de membranas e macromoléculas. Vários dos antioxidantes intracelulares são provenientes da dieta, como o ascorbato, os carotenóides, flavonóides e polifenóis (PACKER, 1996).

1.3. Estresse Oxidativo

Em situações fisiológicas normais o sistema de defesa antioxidante é capaz de evitar danos que possam ser causados pelos RL. Em situações que apresentam um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa, o estresse

oxidativo (EO), ocorre dano celular resultante do ataque dos RL às macromoléculas. O EO tem sido relacionado à patologia de várias doenças, incluindo aquelas do sistema nervoso central (HALLIWELL, 1992). O cérebro é particularmente vulnerável ao EO devido a sua alta taxa de atividade oxidativa, ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados e aos moderados níveis de moléculas antioxidantes (EVANS, 1993).

1.3.1. Exercício e Estresse Oxidativo

O exercício físico pode levar a alterações metabólicas em tecidos de vários sistemas fisiológicos. Existe um paradoxo quanto ao efeito do exercício físico sobre a saúde, já que induz a formação de radicais livres, o que pode ser prejudicial às funções celulares, enquanto há relatos de redução de uma variedade de doenças relacionadas ao envelhecimento, onde os RL parecem estar envolvidos, pelo exercício físico (RADÁK et al., 2001).

Admite-se que o aumento do consumo de oxigênio resulta em um aumento na produção de RL como bi-produto da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (BOVERIS e CHANCE, 1973).

As células produzem RL em níveis basais, que o sistema antioxidante consegue neutralizá-los, durante o estado de repouso; há relatos de que exercícios de resistência aumentam consideravelmente o consumo de oxigênio (entre 10 a 20 vezes) pelo organismo (ASTRAND e RODAHL, 1986) e a captação de oxigênio no músculo esquelético ativo aumentou em cerca de 100 a 200 vezes (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990; KEUL e DOLL, 1972). Estes dados estão relacionados ao fato que o exercício agudo e o exercício exaustivo induzem uma alta produção de RL em células musculares (DAVIES et al., 1982; SOMANI et al., 1997) e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo, o que pode ser prejudicial a este tecido. Tem-se demonstrado que o exercício regular ocasiona uma

adaptação do sistema antioxidante celular, vários trabalhos demonstram que ocorre um aumento significativo da atividade de enzimas antioxidantes, reduzindo o dano oxidativo celular e aumentando a resistência ao EO (SERVAIS et al., 2003; POWERS et al., 1994; LEEUWEENBURGH et al., 1997).

MASTALOUDIS e colegas (2001) demonstraram que o exercício de resistência extenuante (ultramaratona) induz aumento no conteúdo de isoprostanos, um índice de peroxidação lipídica, com concomitante redução nos níveis de vitamina E (tocoferol) plasmáticos. Outra modalidade de exercício de resistência, meia-maratona, resultou em um aumento dos níveis eritrocitários de tocoferol, contudo, paradoxalmente, aumentou a susceptibilidade à peroxidação *in vitro* destas células (DUTHIE et al., 1990).

Há poucos trabalhos do efeito do exercício sobre o dano oxidativo no cérebro e os raros achados são conflitantes. SUZUKI e colaboradores (1983) reportaram que o exercício voluntário aumentou a lipoperoxidação em cérebro de ratos. Enquanto, o exercício regular atenuou o dano oxidativo em proteína em ratos envelhecidos (RADÁK et al., 2001).

1.4. Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral é uma das principais causas de morte no Brasil (Sociedade Brasileira de Neurologia, 2000), é a terceira causa de morte nos Estados Unidos da América (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 1995) e uma das maiores causas de incapacidade em Países industrializados (WANNAMETHEE e SHAPER, 1999).

Um fator de risco importante para a isquemia cerebral é a alta prevalência da hipertensão arterial. A hipertensão arterial e o fumo claramente aumentam o risco do indivíduo de ser acometido por um acidente vascular, mas outros fatores de risco

potenciais incluem a inatividade física, a obesidade, a intolerância à glicose, as dislipidemias, dietas e utilização de altas doses de contraceptivos (BRONNER et al., 1995).

A isquemia cerebral é caracterizada por uma redução significativa ou pela interrupção total do aporte sanguíneo (SIESJÖ, 1978). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano isquêmico, devido à alta taxa metabólica e a uma restrita reserva energética. Insultos isquêmicos ao tecido cerebral causam disfunção neuronal e podem levar à morte celular (MELDRUM, 1990).

Diferentes populações neuronais apresentam distinta susceptibilidade ao dano induzido por eventos isquêmicos. Danos isquêmicos do tipo vulnerabilidade seletiva em hipocampo são amplamente usados para analisar mecanismos básicos do dano neuronal e avaliar efeito de drogas terapêuticas (SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991).

A isquemia é uma das causas mais freqüentes de morte celular no sistema nervoso central (SNC), a qual pode ser produzida por acidente vascular cerebral (AVC) ou infarto do miocárdio. A isquemia global transitória ocorre nos casos de parada cardíaca ou isquemia coronária grave, enquanto a isquemia focal ocorre nos casos de acidentes vasculares cerebrais trombóticos ou hemorrágicos (MELDRUM, 1990).

1.4.1. Modelo de Isquemia Cerebral *in vivo*

A isquemia global pode ser produzida experimentalmente pela oclusão temporária das artérias carótidas comuns (SMITH et al., 1984), ou pela oclusão permanente das artérias vertebrais seguida da oclusão transitória das carótidas comuns (PULSINELLI e BRIERLEY, 1979). Acidentes vasculares cerebrais são geralmente produzidos experimentalmente pela oclusão irreversível da artéria cerebral média em roedores, gatos, cães e primatas (SMITH et al., 1984).

A isquemia global induzida por oclusão das artérias vertebrais e/ou carótidas em ratos produz lesões hipocampais que estão associadas a déficits de memória e aprendizagem. Síndromes amnésicas podem ocorrer após episódios agudos de anóxia cerebral, por parada cardíaca ou AVC; estes quadros estão associados a lesões locais, sobretudo na região CA1 hipocampal (SQUIRE, 1982; BRIERLEY e GRAHAM, 1984; VOLPE et al., 1985; SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991; NETTO et al., 1993a; b). Ratos Wistar submetidos à isquemia global transitória através da cauterização permanente das artérias vertebrais e 20 minutos de oclusão das carótidas comuns apresentaram desempenho prejudicado nas tarefas de esQUIVA ativa e esQUIVA inibitória quando testados entre 21 a 28 dias após o insulto isquêmico (NETTO et al., 1995). Animais submetidos a episódios de 15 e 20 minutos de isquemia (oclusão dos quatro vasos) apresentaram perda de células piramidais CA1, além de déficit no desempenho em tarefas espaciais no labirinto aquático de Morris (NUNN et al., 1991; NETTO et al., 1993a; b).

1.4.2. Modelo de Isquemia Cerebral *in vitro*

Uma alternativa é uso de cultivo de células ou de tecidos em estudos de processos neurodegenerativos (NEWELL et al., 1993; VORNOV et al., 1994; WILDE et al., 1997). Com o intuito de mimetizar uma isquemia tem-se utilizado a privação de oxigênio e glicose (POG), ao submergir fatias de tecidos em meio livre de glicose em incubadora com atmosfera anaeróbica (BARTH et al., 1996; LAAKE et al., 1999; PRINGLER et al., 1999; BREDER et al., 2000; STRIGGOW et al., 2000). O uso de fatias hipocampais é particularmente interessante, desde que boa parte da organização celular, células inflamatórias e conexões intercelulares são preservadas (COHEN et al., 1984; NEWMAN et al., 1989; PELLMAR, 1995; TAYLOR et al., 1995). Adicionalmente, a POG é um método relativamente simples e reproduz aspectos importantes da isquemia *in vivo*, como a

vulnerabilidade seletiva das células da região CA1 (TAVARES et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2004).

1.4.3. Alterações Fisiopatológicas na Isquemia Cerebral

Inúmeras alterações fisiopatológicas interdependentes são desencadeadas pela isquemia cerebral. A interrupção do fluxo sanguíneo promove uma redução dos níveis de oxigênio ocasionando a interrupção da fosforilação oxidativa. Sendo assim, a glicólise anaeróbica passa a ser a fonte de adenosina trifosfato (ATP), conseqüentemente, o acúmulo de lactato, íons hidrogênio (H^+) e o aumento de CO_2 , resultam em acidose, podendo o pH do tecido chegar próximo de 6,0 (FUNAHASHI et al., 1994). Contudo esta fonte energética é insuficiente para as necessidades das células cerebrais. A depleção de ATP reduz o funcionamento das atividades dependentes de energia, como por exemplo, as bombas iônicas, o que ocorre em cerca de 4 minutos. A redução da funcionalidade da bomba de Na^+-K^+ -ATPase resulta na perda dos gradientes iônicos transmembrana, o que leva a despolarização da membrana e, conseqüentemente, à abertura de canais iônicos voltagem-dependentes. O Ca^{2+} , ao entrar na célula, estimula a liberação de neurotransmissores das vesículas, como o glutamato (DUGAN e CHOI, 1999).

Em cérebro de ratos submetidos à isquemia transitória as concentrações extracelulares dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato estão elevadas (GLOBUS et al., 1991), devido ao aumento da liberação sináptica destes aminoácidos bem como pela diminuição de sua recaptação. Devido à despolarização pela inativação das bombas iônicas, este fenômeno está associado, então, ao influxo e o acúmulo de Ca^{2+} livre intracelular. A ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA também leva ao influxo de cálcio (SIMON et al., 1984; ANDINE et al., 1988).

Existem várias evidências de que o processo final de injúria neuronal isquêmica seja o aumento da formação de radicais livres (BRAUGLER e HALL, 1989; SIESJÖ et al., 1989; LAFON-CAZAL et al., 1993).

Durante a isquemia o ATP é depletado e não pode ser ressintetizado com a interrupção da fosforilação oxidativa, sendo assim, ocorre o acúmulo dos seus metabólitos adenosina, inosina e hipoxantina. Além disso, proteases celulares são ativadas devido ao influxo de cálcio. As proteases celulares ativadas convertem a enzima xantina desidrogenase que, em condições normais, transforma hipoxantina em xantina e ácido úrico, em xantina oxidase que, durante a reperfusão, usa o oxigênio molecular como o receptor de elétrons, produzindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (CAO et al., 1988).

O radical $O_2^{\cdot-}$ é o principal radical livre gerado durante a isquemia/reperfusão cerebral, o qual gera o radical hidroxil (OH^{\cdot}), que, durante a reação de Haber-Weiss, possui um forte potencial de destruição dos tecidos, sendo considerado a espécie reativa de oxigênio (ERO) mais lesiva aos sistemas biológicos. O $O_2^{\cdot-}$ é gerado em mitocôndrias, leucócitos ativados, na cascata do ácido araquidônico e pode ser resultante de reações catalisadas por enzimas como a monoamina oxidase e a xantina oxidase. A enzima óxido nítrico (NO) sintase é ativada com o aumento da concentração de cálcio intracelular, gerando o radical NO. Este radical, ao reagir com $O_2^{\cdot-}$ forma o ânion peroxinitrito, o qual pode gerar radicais hidroxil (BECKMAN et al., 1990).

O influxo de cálcio leva a ativação das fosfolipases, inclusive a fosfolipase A, que gera ácido araquidônico, o qual pode ser metabolizado pelas ciclooxigenases ou lipoxigenases originando a produção de substâncias vasoativas que são as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos e radicais livres.

DEMOPOULOS e colaboradores (1980) sugeriram que a lipoperoxidação é um importante mecanismo de injúria em cérebros isquêmicos. BROMONT e colaboradores (1989) relataram o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, usadas como medida de lipoperoxidação, além da redução de seqüestradores de radicais livres.

Outro mecanismo onde os radicais livres estão envolvidos e que pode contribuir para o dano isquêmico é a resposta inflamatória, em que os neutrófilos e a microglia respondem ao dano isquêmico originando radicais livres. No endotélio microvascular cerebral, a infiltração leucocitária está relacionada ao declínio secundário no fluxo sanguíneo cerebral após o evento isquêmico (MORI et al., 1992) e na extensão da injúria isquêmica (ZHANG et al., 1994).

1.4.4. Exercício e Isquemia Cerebral

O exercício regular parece ser significativamente benéfico à saúde e ao bem-estar, como a diminuição da incidência de certas doenças (RADÁK et al., 2001). Mesmo com o conhecimento empírico de que o exercício físico tem efeito protetor em desordens isquêmicas cardíacas e cerebrais, poucos estudos têm examinado os efeitos protetores da atividade física contra as doenças cerebrovasculares.

GILLUM e INGRAM (1996) demonstraram que o comportamento sedentário está relacionado com o aumento de risco de AVC. Nesse estudo, mulheres brancas na faixa etária de 45 e 74 anos e homens brancos na faixa etária de 65 a 74 anos apresentaram taxa de risco associada ao sedentarismo.

Resultados interessantes foram descritos por SACCO e colegas (1998). Estes observaram as relações entre os benefícios e o tempo de prática de atividade física. A prática de atividade física mais freqüentemente observada foi a caminhada, e quando praticada moderadamente foram observados benefícios à saúde (SACCO et al., 1998).

YANG e colaboradores (2003) propõem que o exercício, quando realizado 24h após uma isquemia cerebral focal, reduz significativamente o volume do dano e intensifica a função neurológica em ratos. Contudo, o exercício físico voluntário (roda de corrida) após os ratos serem submetidos a um evento isquêmico focal não apresentou efeito protetor em ensaios comportamentais e histológicos (JOHANSSON e OHLSSON, 1996). STUMMER e colaboradores (1994) relataram que o exercício pré-isquêmico tem propriedades neuroprotetoras, o livre acesso de gerbilos a uma roda de corrida durante 14 dias antes da indução da isquemia global (15 e 20 minutos) resultou em um aumento na sobrevivência dos animais, sendo que 90% dos animais exercitados e 44% dos animais controles sobreviveram após o evento isquêmico. A análise histológica quantitativa mostrou que o dano foi atenuado no hipocampo, neocórtex, estriado e tálamo em animais exercitados. Baseados em seus estudos, sugerem que o exercício pré-isquêmico pode ser benéfico para a recuperação.

1.5. Objetivo

Este estudo tem como base dados epidemiológicos relacionados ao papel do exercício físico na saúde e no bem-estar, em especial como alternativa terapêutica na isquemia cerebral. Além de que, os radicais livres e o estresse oxidativo estão envolvidos na etiologia de doenças neurodegenerativas e há relatos de modulação no estado oxidativo celular pelo exercício físico.

A hipótese geral do trabalho é que o exercício físico regular pode ser uma estratégia de neuroproteção, alterando a suscetibilidade a eventos isquêmicos e pode ter como mecanismo de ação a modulação do estado oxidativo celular.

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

1) avaliar o potencial neuroprotetor do exercício físico num modelo de isquemia *in vitro*, usando fatias hipocâmpais de ratos Wistar expostas à privação de oxigênio e glicose (POG).

2) estudar o estado oxidativo celular de homogeneizados de estruturas cerebrais relevantes: hipocampo, estriado, córtex frontal, e cerebelo de ratos Wistar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com aproximadamente 90 dias de idade. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (270 X 260 X 310 mm), sendo cinco animais em cada caixa. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada com ciclo claro-escuro de 12 horas e água e comida *ad libitum*.

2.2. Desenho Experimental

Os animais foram distribuídos nos grupos experimentais: exercitado (EXE) e sedentário (SED). O grupo de animais EXE consistiu de 15 animais, sendo que oito e sete animais foram submetidos, respectivamente, a 20 (EXE20) ou 60 (EXE60) minutos de atividade física em esteira (descrito abaixo) durante duas semanas. Os animais do grupo SED foram sujeitos à esteira sem movimento durante 3 minutos, acompanhando o período de exercício dos grupos EXE. O grupo de animais SED totalizou 16 animais, sendo oito animais considerados controles de cada tempo de exercício.

2.3. Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento consistiu em sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos INBRAMED modelo TK 01. Os mecanismos da fadiga aguda, durante o exercício, envolvem a intensidade de consumo de Volume de Oxigênio máximo (VO_{2max}) na qual a atividade é realizada. Para determinação do VO_2 máximo foi aplicado o teste de esforço máximo adaptado de BROOKS (1978) por RABBO (2001). Com intensidade (expressa na velocidade na esteira rolante em $m \cdot min^{-1}$) de aproximadamente 60% do consumo máximo de oxigênio individual de cada rato. Cada sessão de exercício

teve duração de 20 ou de 60 minutos, realizados diariamente, entre 16h e 18h, durante duas semanas. No final da primeira semana foi aplicado novamente o teste de esforço com a finalidade de avaliar a adaptação dos animais ao treino.

Os animais foram mortos por decapitação cerca de 15 horas após a última sessão de exercício. Todos os animais foram mortos no mesmo período do dia, entre 9h e 10h30min.

2.4. Dissecção e Preparação das Estruturas

Após a decapitação, os cérebros foram então colocados sobre uma placa de Petry com papel filtro umedecido com soro fisiológico sobre gelo e as estruturas de interesse foram dissecadas. Um hipocampo foi dissecado e imediatamente fatiado em “chopper”. O hipocampo não fatiado e as demais estruturas dissecadas (córtex frontal, estriado e cerebelo) foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até a realização dos ensaios.

2.5. Evento isquêmico *in vitro* (privação de oxigênio e glicose) em fatias hipocampais

As fatias do hipocampo de um mesmo animal foram randomizadas em duas placas: controle (NPOG) e sujeita à privação de oxigênio e glicose (POG).

É importante ressaltar que ratos exercitados foram submetidos ao treinamento durante 20 ou 60 min/ dia (EXE20 ou EXE60) durante duas semanas. Assim, os grupos experimentais consistem em:

- animais sedentários (SED): fatias hipocampais não privadas de oxigênio e glicose (SED NPOG) e fatias privadas de oxigênio e glicose (SED POG).
- animais exercitados (EXE): fatias hipocampais não privadas de oxigênio e

glicose (EXE NPOG) e fatias privadas de oxigênio e glicose (EXE POG).

As fatias foram pré-incubadas com meio de incubação a uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 15 minutos. A placa POG então foi colocada em uma câmara anaeróbica durante uma hora (CÁRDENAS et al., 2000; CIMAROSTI et al., 2001; PORCIÚNCULA et al., 2003). Após 3h de reoxigenação, foram realizados os ensaios de avaliação da viabilidade celular e de lise celular.

2.5.1. Viabilidade Celular (Atividade Mitocondrial)

A viabilidade celular foi determinada através da avaliação da atividade mitocondrial, utilizando o reagente brometo de 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A desidrogenase mitocondrial succinato de células viáveis reduz o MTT formando produto colorido, que é extraído com dimetilsulfóxido (DMSO), monitorado a 570 nm (MOSMANN, 1983).

2.5.2. Dano Celular (Lise Celular)

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica. Em situações de lise celular esta é extravasada. A atividade de LDH, liberada no meio, foi determinada usando um *kit* comercial para LDH (método modificado de Whitaker, Doles Reagentes, Goiânia, Brazil) 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 alúmen férrico. O alúmen ferroso então reage com 1,10-fenantrolina, formando um complexo colorido, monitorado espectrofotometricamente (490 nm) (KOH e CHOI, 1987).

2.6. Avaliação do Estresse Oxidativo

Os grupos experimentais consistem em grupo sedentário (SED) e exercitado (EXE20 e EXE 60) na avaliação do estado oxidativo. As estruturas dos animais foram homogeneizadas e foram determinados: o conteúdo de radicais livres, o dano em macromoléculas (lipídios e proteínas) e a capacidade antioxidante total dos tecidos.

2.6.1. Preparação de Homogeneizados

As estruturas – hipocampo, estriado, córtex frontal e cerebelo – foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 com KCl 140 mM e EDTA 1 mM. Após centrifugação em centrífuga refrigerada, durante 10 minutos, a 980 g, o sobrenadante foi utilizado nos ensaios descritos a seguir.

2.6.2. Determinação do Conteúdo de Radicais Livres

Os níveis de radicais livres foram avaliados através da formação de produtos da modificação oxidativa da sonda exógena, 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), monitorada em espectrofluorímetro com excitação a 488 nm e emissão a 525 nm (LEBEL et al., 1990).

2.6.3. Medida de Dano em Lipídios

A lipoperoxidação (LPO) foi realizada através do método de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), baseado na formação de um composto corado entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA), resultante da lipoperoxidação, monitorado em espectrofluorímetro com emissão a 553 nm e excitação a 515 nm (BUEGE e AUST, 1978; YAGI, 1998).

2.6.4. Medida de Dano em Proteínas

O dano em proteínas foi avaliado através da quantificação de resíduos de tirosina e resíduos de triptofano, já que a modificação oxidativa de proteínas ocorre predominantemente em resíduos específicos susceptíveis ao dano pelos radicais livres. A formação de produtos hidroxilados e N-formilquinurenina a partir de resíduos de triptofano e a perda da fluorescência tem sido usados como marcadores de oxidação de triptofano (DAVIES et al., 1999). A oxidação de resíduos de tirosina pode resultar na formação de radicais fenoxil destes resíduos e sua conversão à ditirosina e produtos (AESCHBACH et al., 1976; AMATO et al., 1984), alterando a intensidade da fluorescência (GUZOW et al., 2002). O dodecil sulfato (SDS) foi adicionado a alíquotas de amostras (concentração final: 0,1%). O conteúdo de tirosina (EX: 277 e EM: 320 nm) e triptofano (EX: 280 e EM: 345 nm) foram determinados fluorimetricamente (GUZOW et al, 2002; BONDY, 1996).

2.6.5. Capacidade Antioxidante Total

O potencial antioxidante total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) foram determinados através do método da quimiluminescência produzida por um sistema gerador de radicais livres, 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloro (ABAP), a fonte de radicais aquil-peroxil, e luminol, um amplificador da resposta (LISSI et al., 1992; 1995; DESMARCHELIER et al., 1997).

2.6.6. Quantificação de Proteínas

As proteínas foram quantificadas de acordo com o método de BRADFORD (1976).

2.7. Análise Estatística

A comparação entre os grupos foi feita através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, complementada com o teste de comparações múltiplas de Duncan, ou pelo teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentasse nível de significância de pelo menos $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Evento Isquêmico *in vitro*

3.1.1. Viabilidade Celular (Atividade Mitocondrial)

Fatias hipocâmpais de animais sedentários (SED) e de animais exercitados em esteira ergométrica (EXE) foram submetidas à privação de oxigênio e glicose. A viabilidade celular (Figura 2 e Figura 3), determinada pela redução do MTT, foi alterada pela POG, tanto em fatias de animais SED como de EXE, a POG reduziu cerca de 40% da atividade mitocondrial.

A ANOVA de duas vias evidenciou efeito principal da isquemia (EXE20: $F(1,19)=81,104$, $p<0,005$; EXE60: $F(1,30)=70,388$, $p<0,005$). Entretanto, a ANOVA de duas vias demonstrou ausência de efeito em ambos os períodos de treino (EXE20 e EXE60) não alterando a atividade mitocondrial em fatias hipocâmpais quando comparados aos grupos SED (EXE20: $F(1,19)=0,637$, $p=0,437$; EXE60: $F(1,30)=1,403$, $p=0,247$), bem como ausência de interação (EXE20 x POG: $F(1,19)=0,186$, $p=0,672$; EXE60 x POG: $F(1,30)=0,015$, $p=0,902$), conforme apresentado nas figuras 2 e 3 respectivamente.

3.1.2. Dano Celular

O dano celular (lise celular) foi avaliado pela quantificação da liberação da enzima citosólica LDH no meio de incubação (Figura 4 e 5). A isquemia *in vitro* (POG) resultou em um aumento significativo na liberação da LDH (ANOVA de duas vias, $F(1,16)=37,977$, $p<0,001$). No exercício físico em esteira durante 20 minutos/dia por duas semanas houve efeito marginal do exercício com redução da lise celular induzida pela POG quando comparado com grupo SEDPOG (ANOVA de duas vias, $F(1,16)=4,335$, $p=0,058$), porém sem interação de efeitos (ANOVA de duas vias, $F(1,16)=1,416$,

$p=0,255$).

Surpreendentemente, o exercício físico *per se* (EXENPOG) com duração de 60 minutos/dia durante duas semanas levou a um aumento na lise celular em fatias hipocâmpais quando comparado ao grupo sedentário NPOG (ANOVA de duas vias, $F(1,29)=22,712$, $p<0,001$). As fatias de animais exercitados submetidas à POG (EXEPOG) apresentaram valores de LDH bastante elevados, indicando um pronunciado dano celular (ANOVA de duas vias, $F(1,29)=54,097$, $p<0,001$), porém sem interação de efeitos (ANOVA de duas vias, $F(1,29)=1,722$, $p=0,201$), apresentando, portanto, efeito aditivo ao dano causado pela POG (Figura 5).

3.2. Avaliação do Estado Oxidativo

3.2.1. Hipocampo

O exercício físico regular durante 20 minutos (EXE20) não alterou o conteúdo de radicais livres no hipocampo (Teste t de Student, $t(8)=0,43$; $p=0,680$). Contudo o exercício físico com duração de 60 minutos (EXE60) reduziu os valores de DCF, indicando uma redução no conteúdo de radicais livres no hipocampo (Teste t de Student, $t(10)=2,41$; $p=0,03$), conforme figuras 6A e B respectivamente.

Os hipocâmpos de animais submetidos ao exercício físico durante 20 minutos não apresentaram alterações nos níveis de TBARS quando comparados com o grupo de animais SED (Teste t de Student, $t(8)=0,12$; $p>0,05$). No entanto, o exercício físico com duração de 60 min apresentou um aumento nos níveis de TBARS no grupo de animais EXE quando comparados com o grupo SED (Teste t de Student, $t(13)=-2,20$; $p=0,047$), conforme figuras 7A e B respectivamente.

A quantidade de resíduos de triptofano e tirosina, um índice de dano em

proteínas, não foi alterada pelo exercício físico, Triptofano EXE20 (Teste t de Student, $t(8)=2,05$; $p=0,075$) e Triptofano EXE60 (Teste t de Student, $t(13)=0,46$; $p=0,652$), conforme figuras 8A e B; Tirosina EXE20 (Teste t de Student, $t(8)=2,03$; $p=0,077$) e Tirosina EXE60 (Teste t de Student, $t(13)= 0,32$; $p=0,758$), conforme figuras 9A e B.

Os valores de TAR não foram alterados pelo exercício físico com duração de 20 minutos (Teste t de Student, $t(7)=0,63$; $p=0,550$) e exercício físico com duração de 60 minutos (Teste t de Student, $t(12)= 0,15$; $p=0,880$), apresentados nas figuras 10A e B respectivamente.

Os níveis de TRAP de fatias hipocâmpais de animais EXE20 não apresentaram alterações significativas (Teste t de Student, $t(8)=1,28$; $p=0,237$), conforme figura 11A. No entanto, no grupo de animais EXE60, os níveis de TRAP aumentaram significativamente (Teste t de Student, $t(13)= -3,39$; $p=0,005$), conforme figura 11B.

3.2.2. Estriado

Os níveis de TBARS, no grupo de animais EXE20, não apresentaram aumento estatisticamente significativo (Teste t de Student, $t(4)= -1,30$, $p=0,255$), enquanto no grupo de animais EXE60 (Figura 13B), foram significativamente aumentados (Teste t de Student, $t(13)= -4,23$, $p=0,001$), conforme figuras 12A e B respectivamente.

Os níveis de TAR no grupo de animais EXE20 não mostraram aumento significativo (Teste t de Student, $t(8)=1,40$, $p=0,199$). Enquanto no grupo EXE60, o exercício induz um aumento nos níveis de TAR em estriado (Teste t de Student, $t(11)= -3,00$, $p=0,012$), conforme figuras 13A e B, respectivamente.

O exercício físico não alterou os valores de TRAP em estriado, tanto no grupo EXE20 (Teste t de Student, $t(8)=0,07$, $p>0,05$), quanto no grupo EXE60 (Teste t de Student, $t(13)= -0,10$, $p>0,05$), conforme figuras 14A e B respectivamente.

3.2.3. Córtex Frontal

O conteúdo TBARS em córtex frontal, no grupo de animais EXE20 não apresentou uma alteração estatisticamente significativa (Teste t de Student, $t(6)=2,21$, $p=0,069$), enquanto no grupo de animais EXE60 foi significativamente reduzido (Teste t de Student, $t(13)=2,32$, $p=0,037$), conforme figuras 15A e B respectivamente.

O exercício físico não alterou os valores de TAR no córtex frontal, tanto no grupo de animais EXE20 (Teste t de Student, $t(6)=0,59$, $p=0,577$), quanto no grupo de animais EXE60 (Teste t de Student, $t(10)=1,50$, $p=0,163$), conforme figuras 16A e B respectivamente.

O exercício físico também não mostrou alteração nos valores de TRAP tanto no grupo de animais EXE20 (Teste t de Student, $t(6)= -0,37$, $p=0,722$), como no grupo de animais EXE60 (Teste t de Student, $t(9)=0,66$, $p=0,527$), conforme figura 17A e B respectivamente.

3.2.4. Cerebelo

Os níveis de TBARS no grupo de animais EXE20 não apresentaram uma redução significativa pelo exercício (Teste t de Student, $t(4)=2,22$, $p=0,089$). No grupo de animais EXE60 aumentou significativamente os níveis de TBARS (Teste t de Student, $t(13)= -2,26$, $p=0,041$), conforme figura 18A e B respectivamente.

Os níveis de TAR no EXE20 não apresentaram alteração significativa (Teste t de Student, $t(8)=0,40$, $p=0,703$), no entanto os valores de EXE60 foram reduzidos (Teste t de Student, $t(13)=2,52$, $p=0,025$), figuras 19A e B respectivamente.

O exercício físico mostrou redução nos valores de TRAP no grupo de animais EXE20 (Teste t de Student, $t(8)=2,53$, $p=0,035$) mas não no grupo EXE60 (Teste t de Student, $t(13)=0,36$, $p=0,725$), conforme figuras 20A e B respectivamente.

Atividade Mitocondrial Exercício Físico 20 minutos/dia

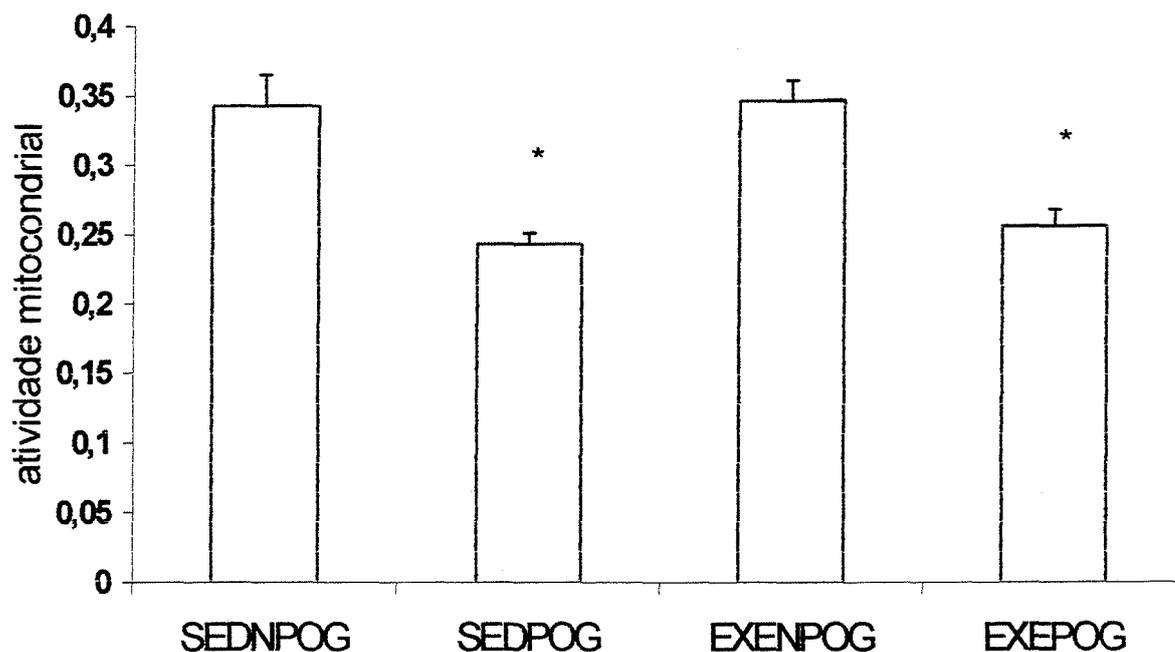


Figura 02. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treinamento durante 20 minutos por dia em esteira ergométrica. Grupo SEDNPOG, fatias hipocâmpais de ratos sedentários não privadas de oxigênio e glicose; grupo SEDPOG, fatias de ratos sedentários privadas de oxigênio e glicose; EXENPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados não privadas de oxigênio e glicose; EXEPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados privadas de oxigênio e glicose. As colunas representam média \pm EPM de triplicatas de 7-8 experimentos. * Significativamente diferente de grupos NPOG ($P < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan.

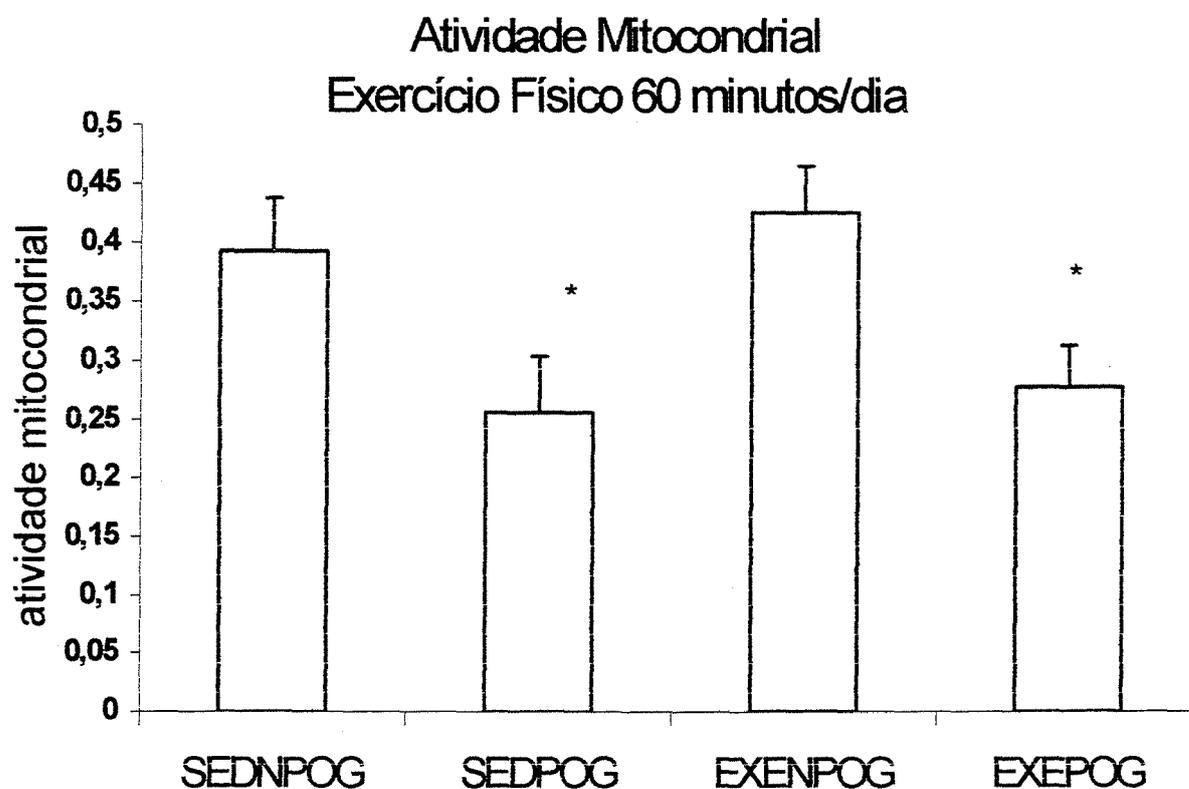


Figura 03. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treinamento durante 60 minutos por dia em esteira ergométrica. Grupo SEDNPOG, fatias hipocâmpais de ratos sedentários não privadas de oxigênio e glicose; grupo SEDPOG, fatias de ratos sedentários privadas de oxigênio e glicose; EXENPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados não privadas de oxigênio e glicose; EXEPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados privadas de oxigênio e glicose. As colunas representam média \pm EPM de triplicatas de 7-8 experimentos. * Significativamente diferente de grupos NPOG ($P < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan.

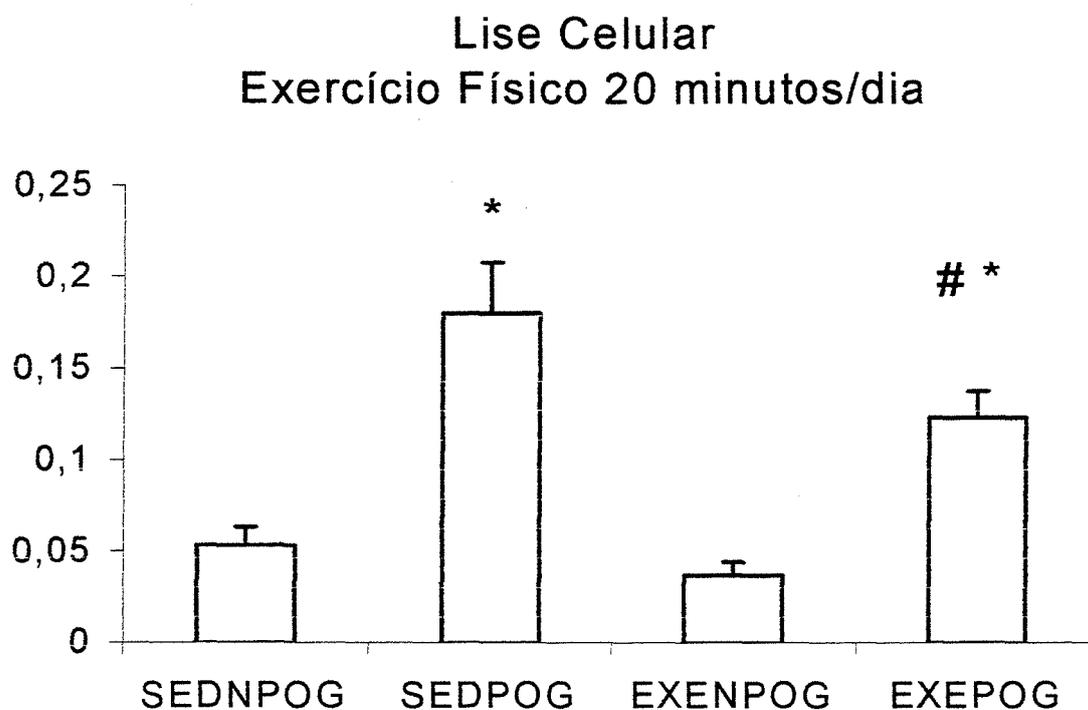


Figura 04. Lise celular de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treinamento durante 20 minutos por dia em esteira ergométrica. Grupo SEDNPOG, fatias hipocâmpais de ratos sedentários não privadas de oxigênio e glicose; grupo SEDPOG, fatias de ratos sedentários privadas de oxigênio e glicose; EXENPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados não privadas de oxigênio e glicose; EXEPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados privadas de oxigênio e glicose. As colunas representam média \pm EPM de triplicatas de 7-8 experimentos. * Significativamente diferente de grupos NPOG ($P < 0,05$), # diferente de SEDPOG. ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan.

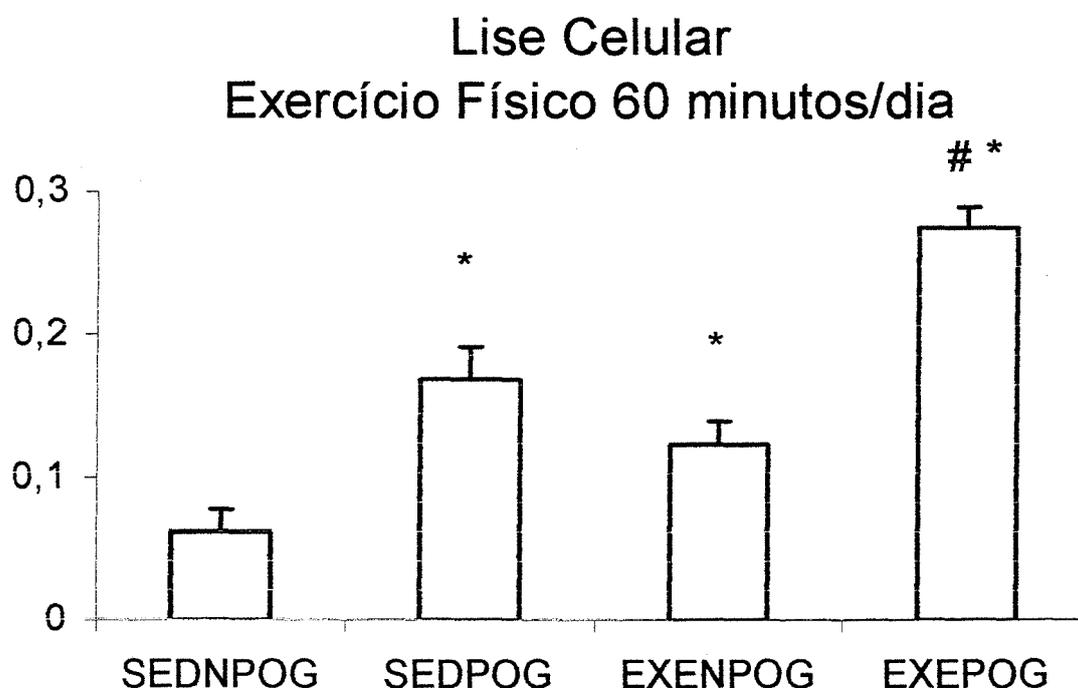


Figura 05. Lise celular de fatias hipocâmpais obtidas de ratos sujeitos a duas semanas de treinamento durante 60 minutos por dia em esteira ergométrica. Grupo SEDNPOG, fatias hipocâmpais de ratos sedentários não privadas de oxigênio e glicose; grupo SEDPOG, fatias de ratos sedentários privadas de oxigênio e glicose; EXENPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados não privadas de oxigênio e glicose; EXEPOG, fatias hipocâmpais de animais exercitados privadas de oxigênio e glicose. As colunas representam média \pm EPM de triplicatas de 7-8 experimentos. * significativamente diferente do grupo SEDNPOG ($P < 0,05$), # diferente de SEDPOG. ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan.

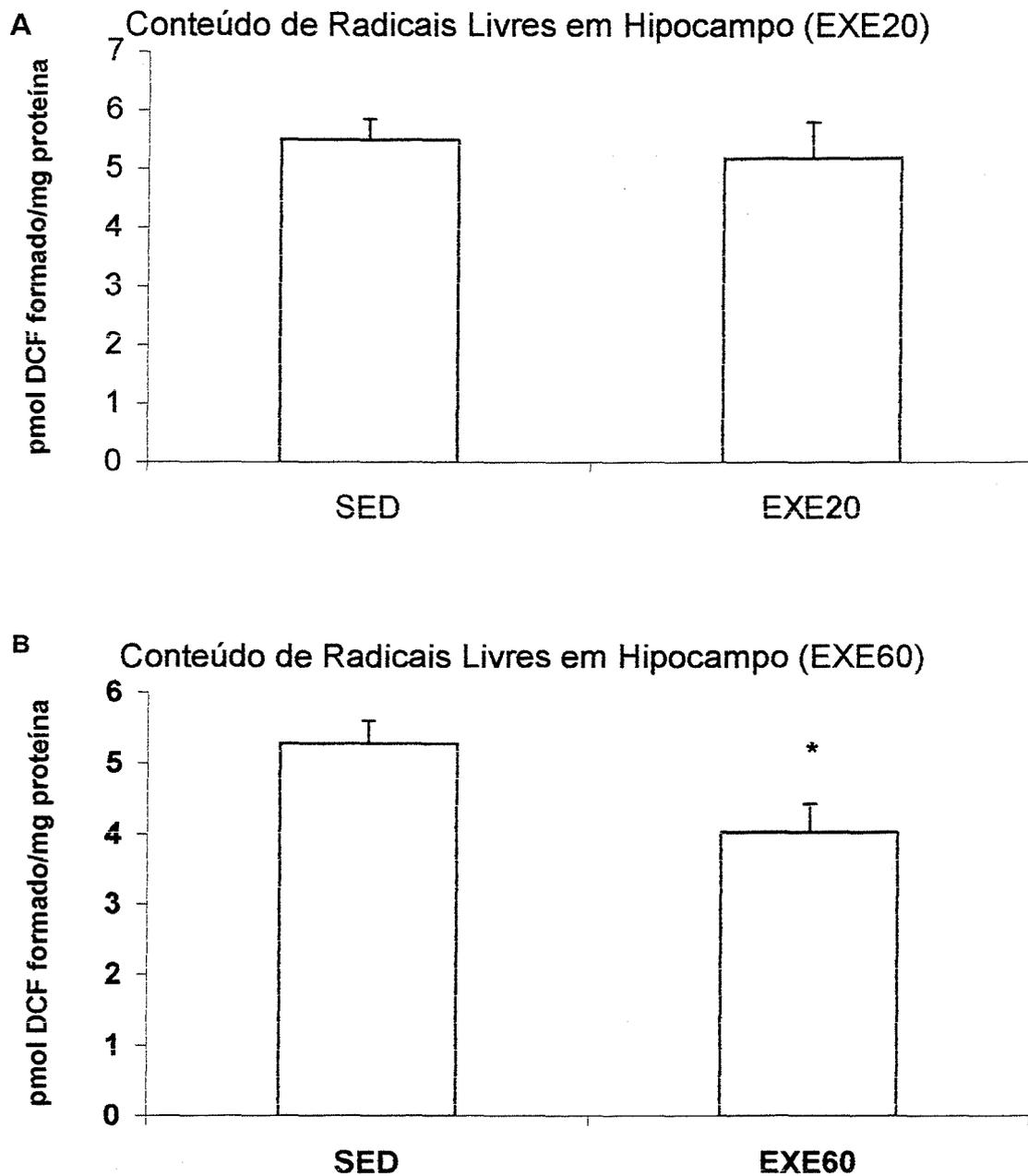


Figura 06. Efeito do exercício físico regular em esteira sobre o conteúdo de radicais livres em hipocampo, utilizando DCFH-DA como uma sonda. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 6-9 experimentos. * diferente do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

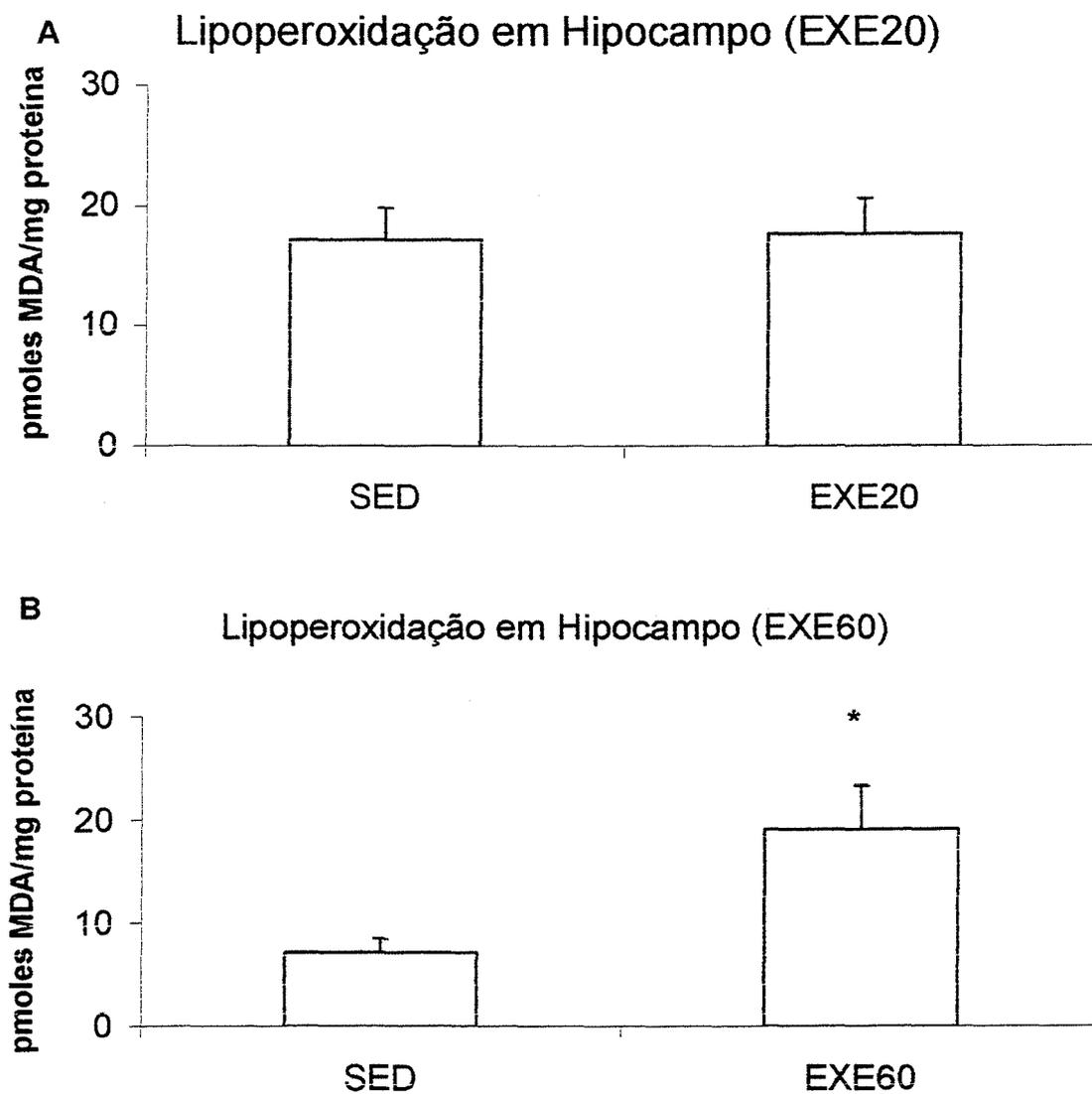


Figura 07. Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 6-9 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

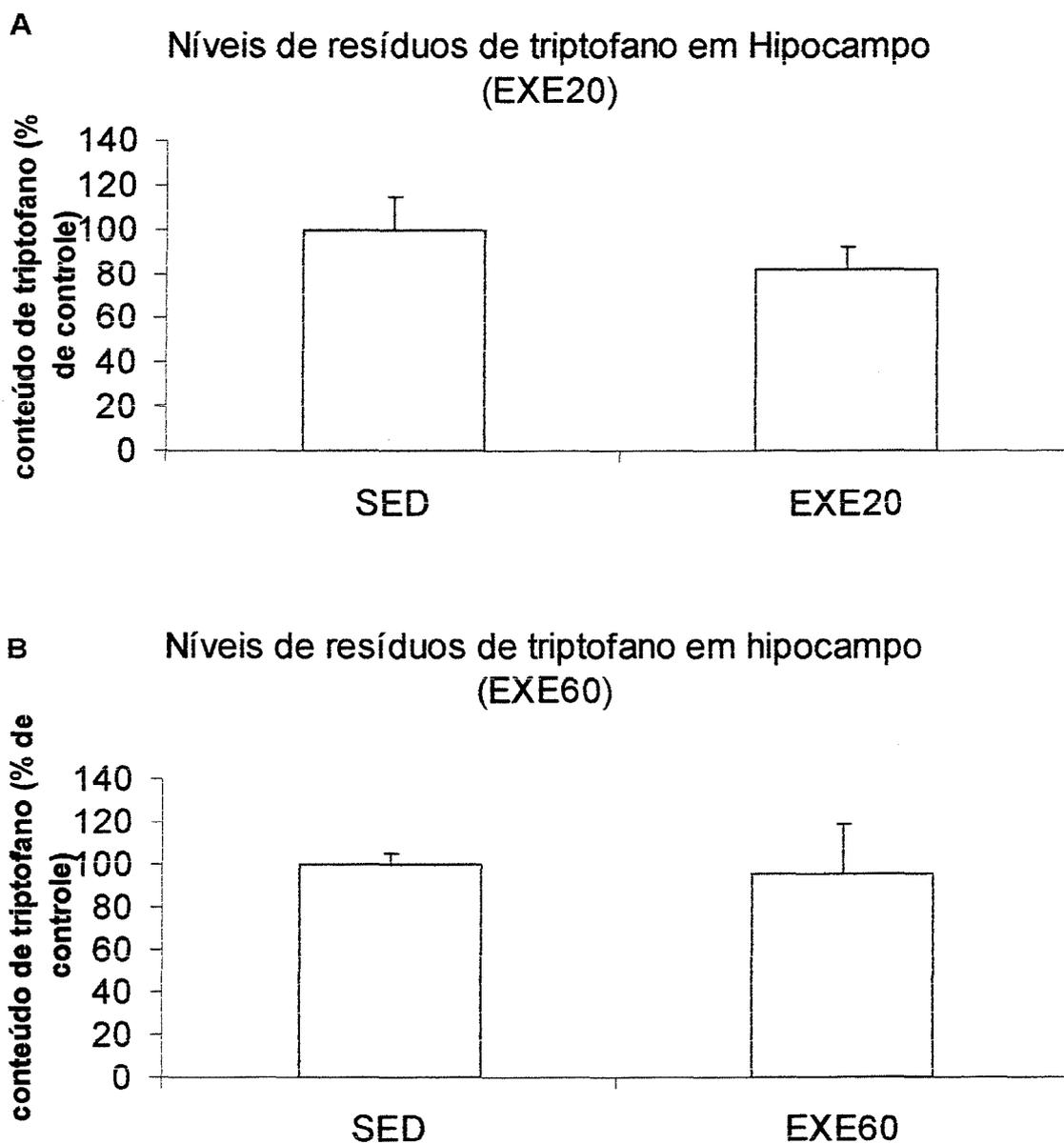


Figura 08. Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em proteínas, conteúdo de resíduos de triptofano em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como porcentagem de controle (média \pm EPM) de 6-9 experimentos. Teste t de Student.

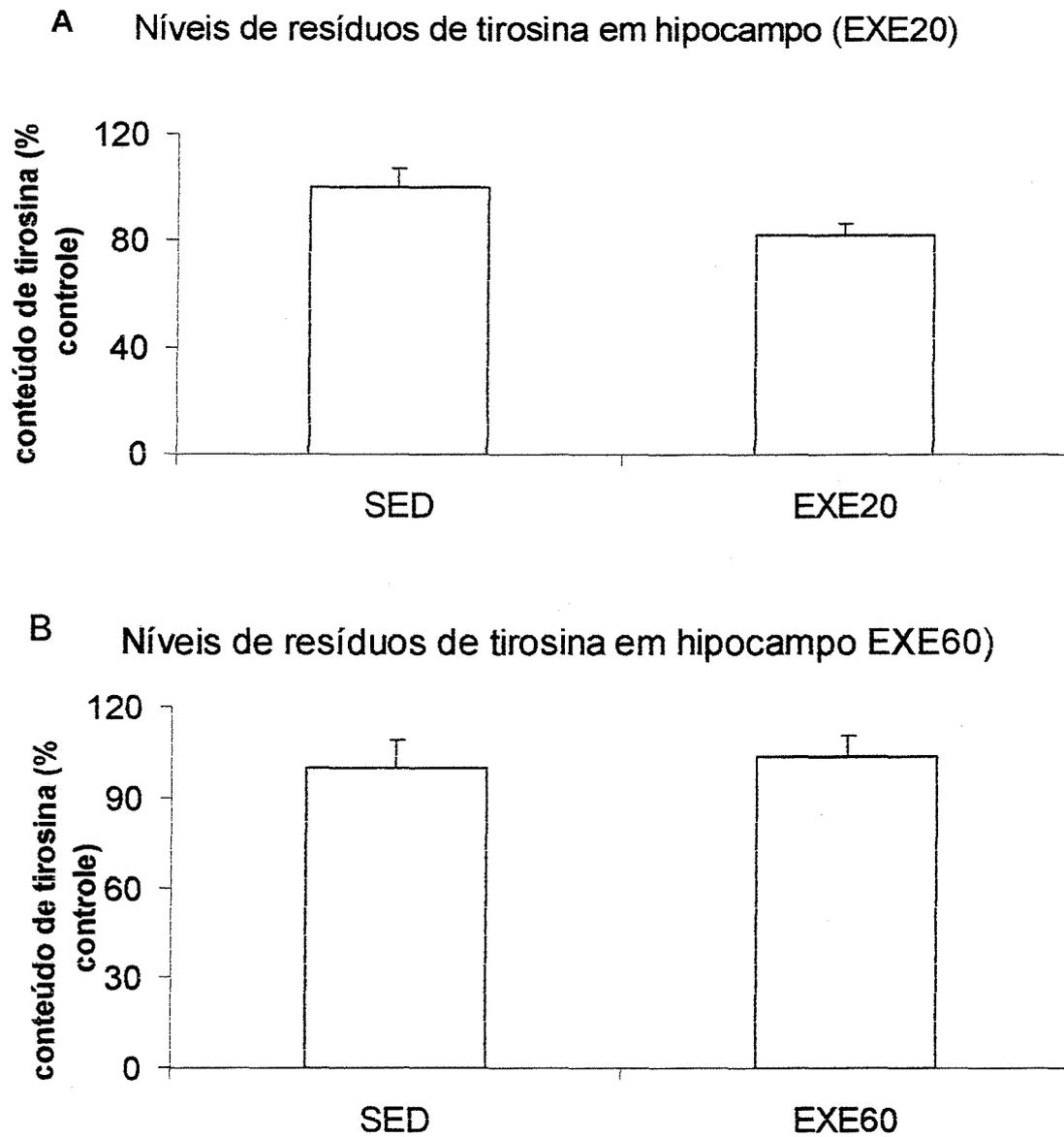


Figura 09. Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em proteínas, conteúdo de resíduos de tirosina em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como porcentagem de controle (média \pm EPM) de 6-9 experimentos. Teste t de Student.

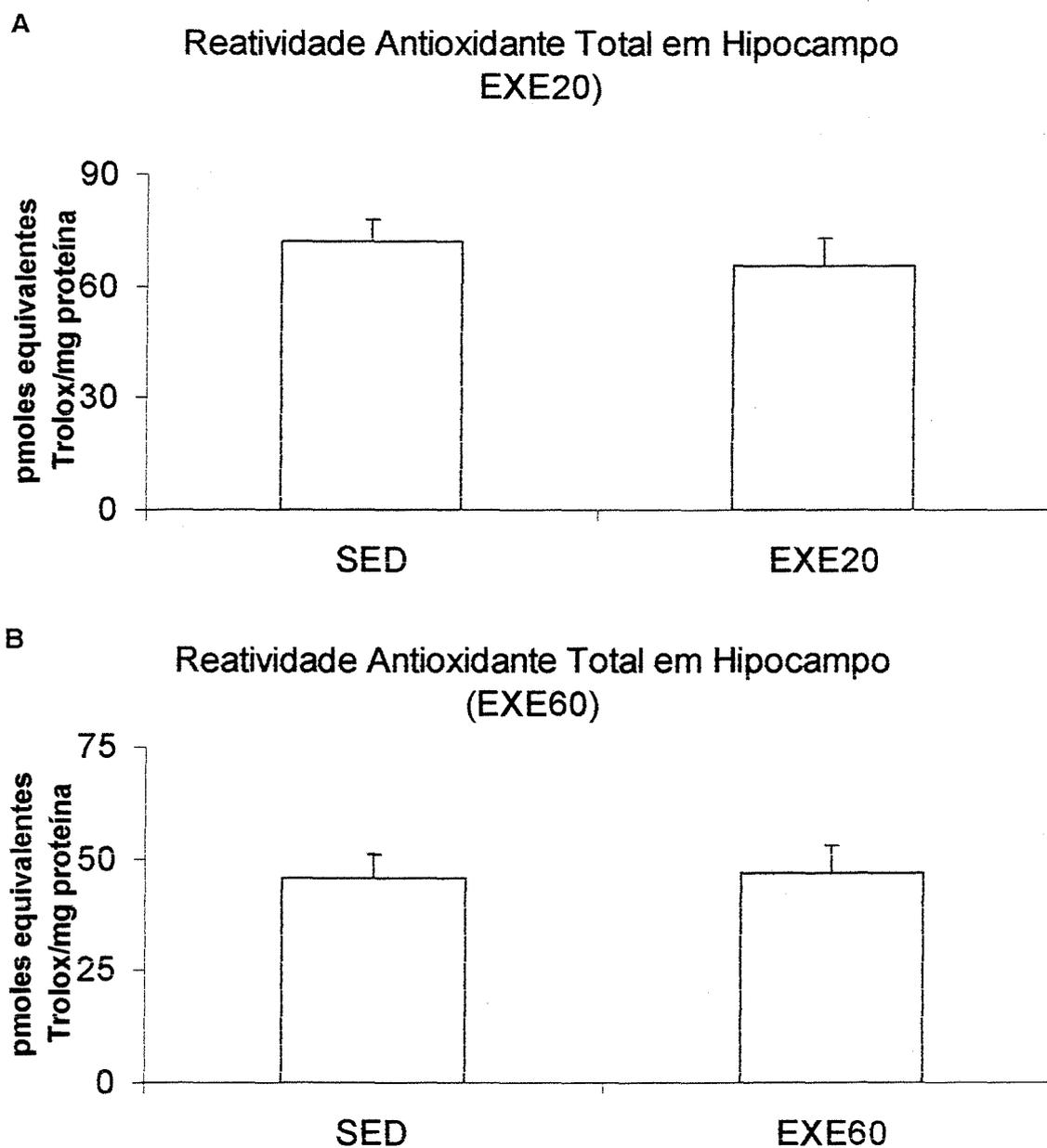


Figura 10. Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. Teste t de Student.

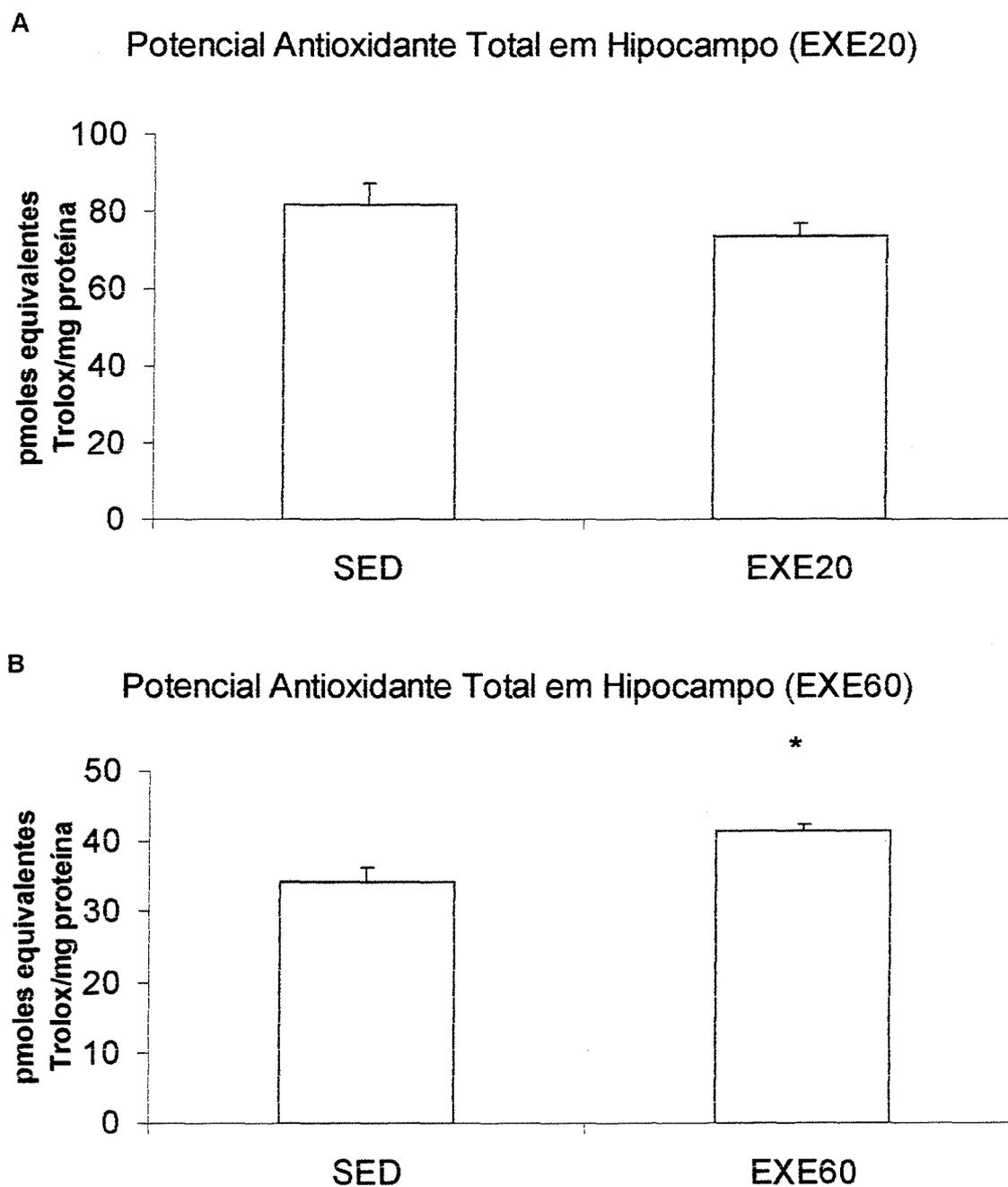


Figura 11. Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em hipocampo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

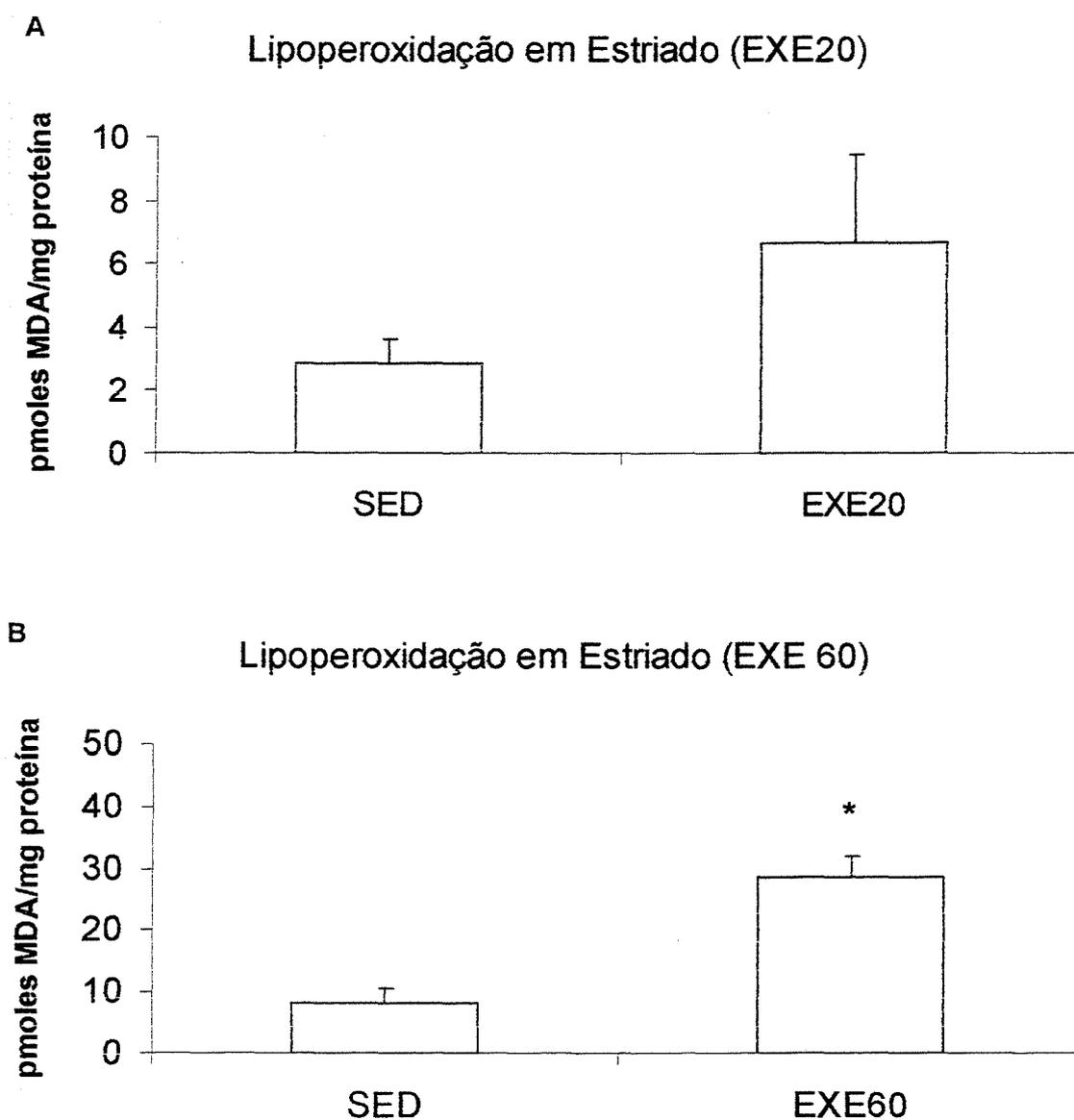


Figura 12. Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em estriado. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

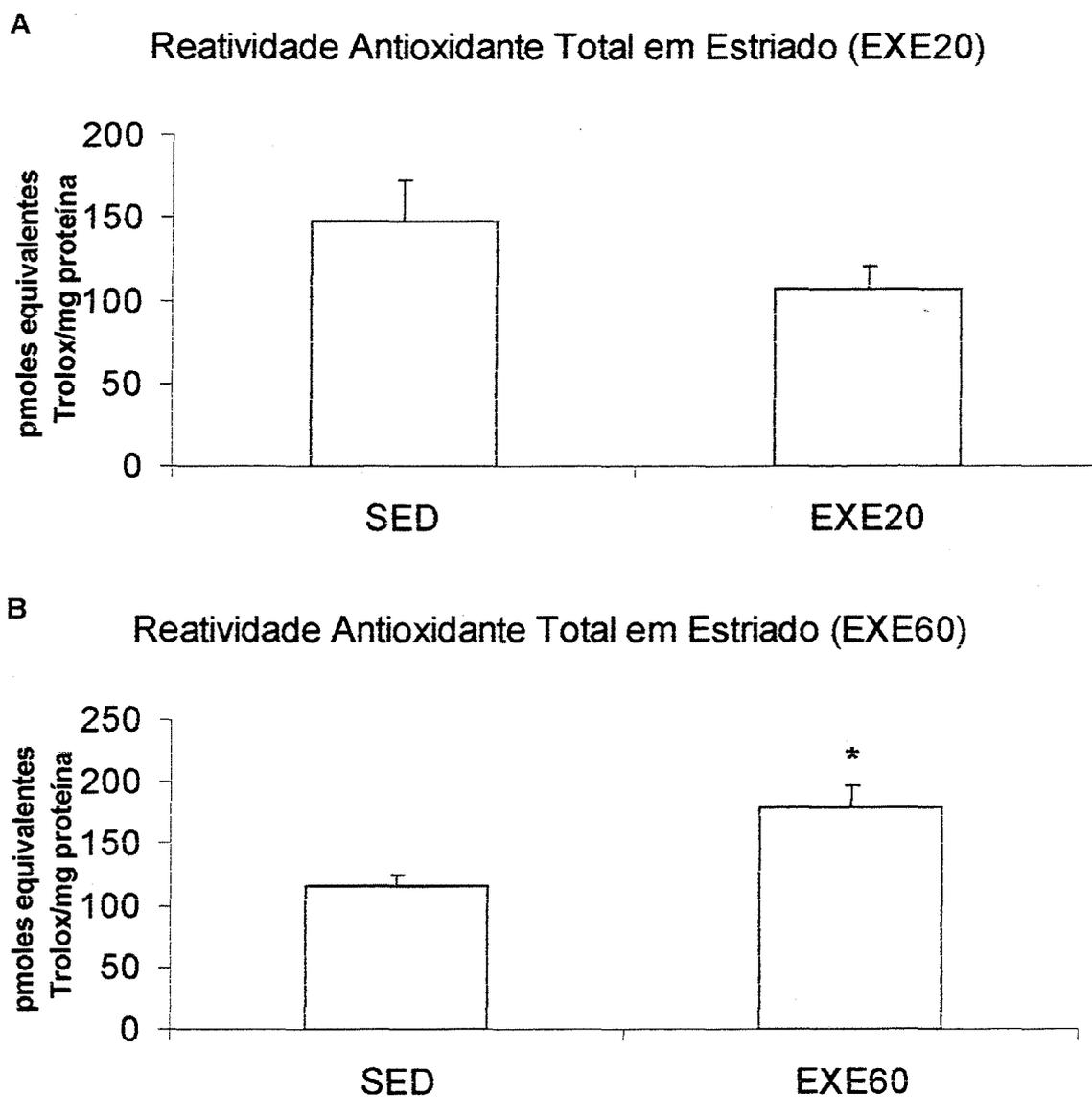


Figura 13. Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em estriado. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

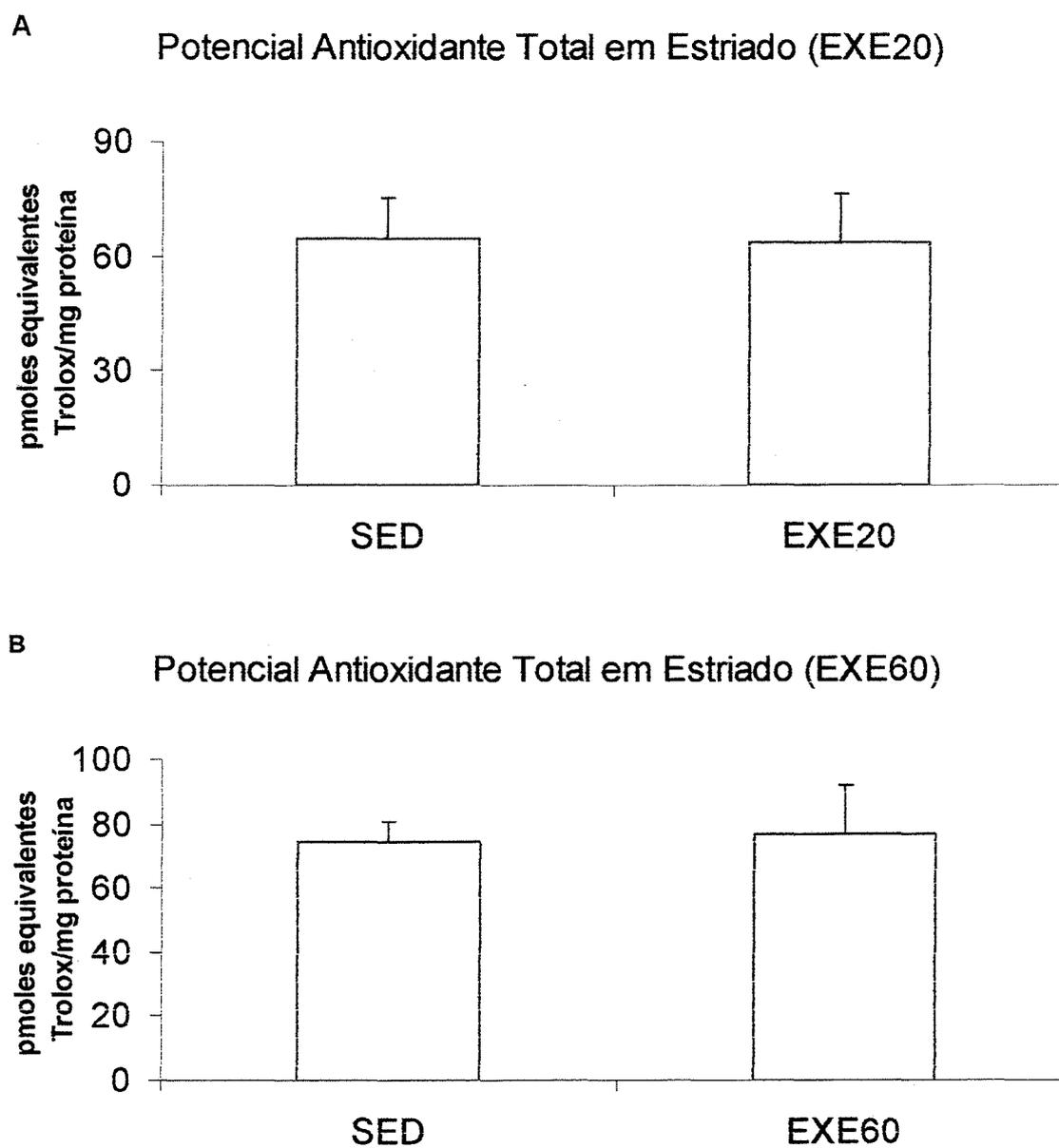


Figura 14. Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em estriado. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. Teste t de Student.

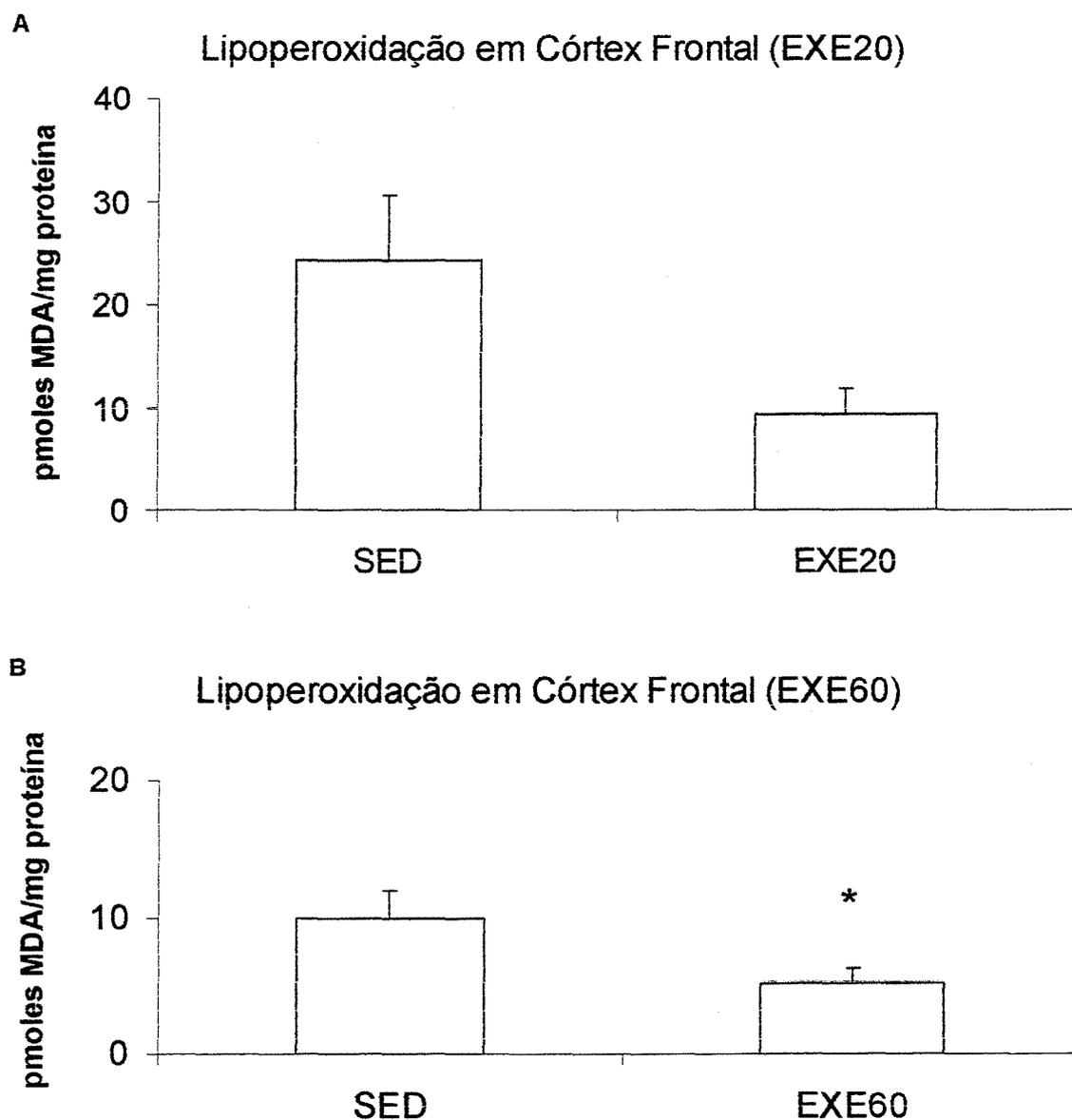


Figura 15. Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em córtex frontal. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

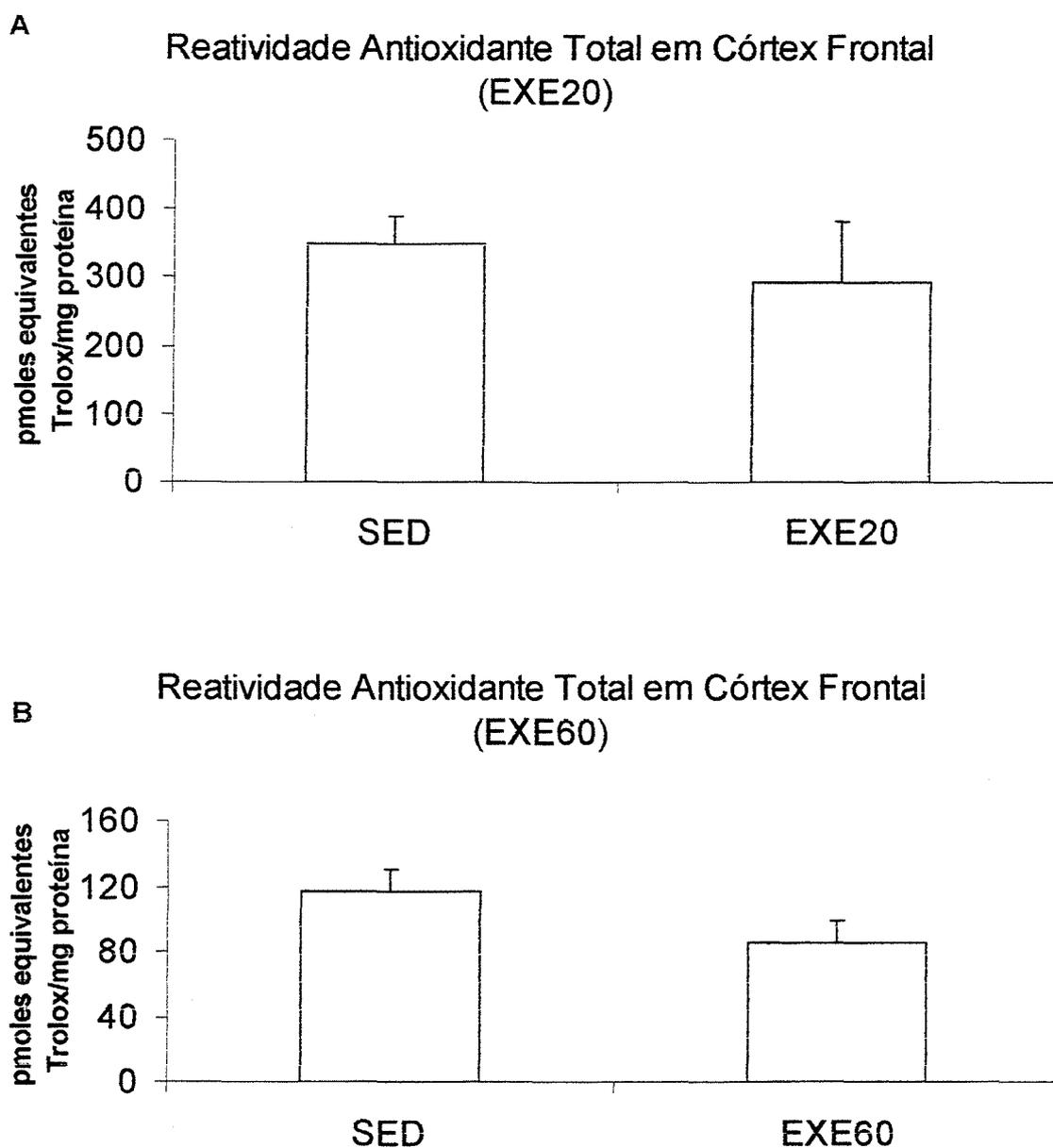


Figura 16. Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em córtex frontal. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60).

Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. Teste t de Student.

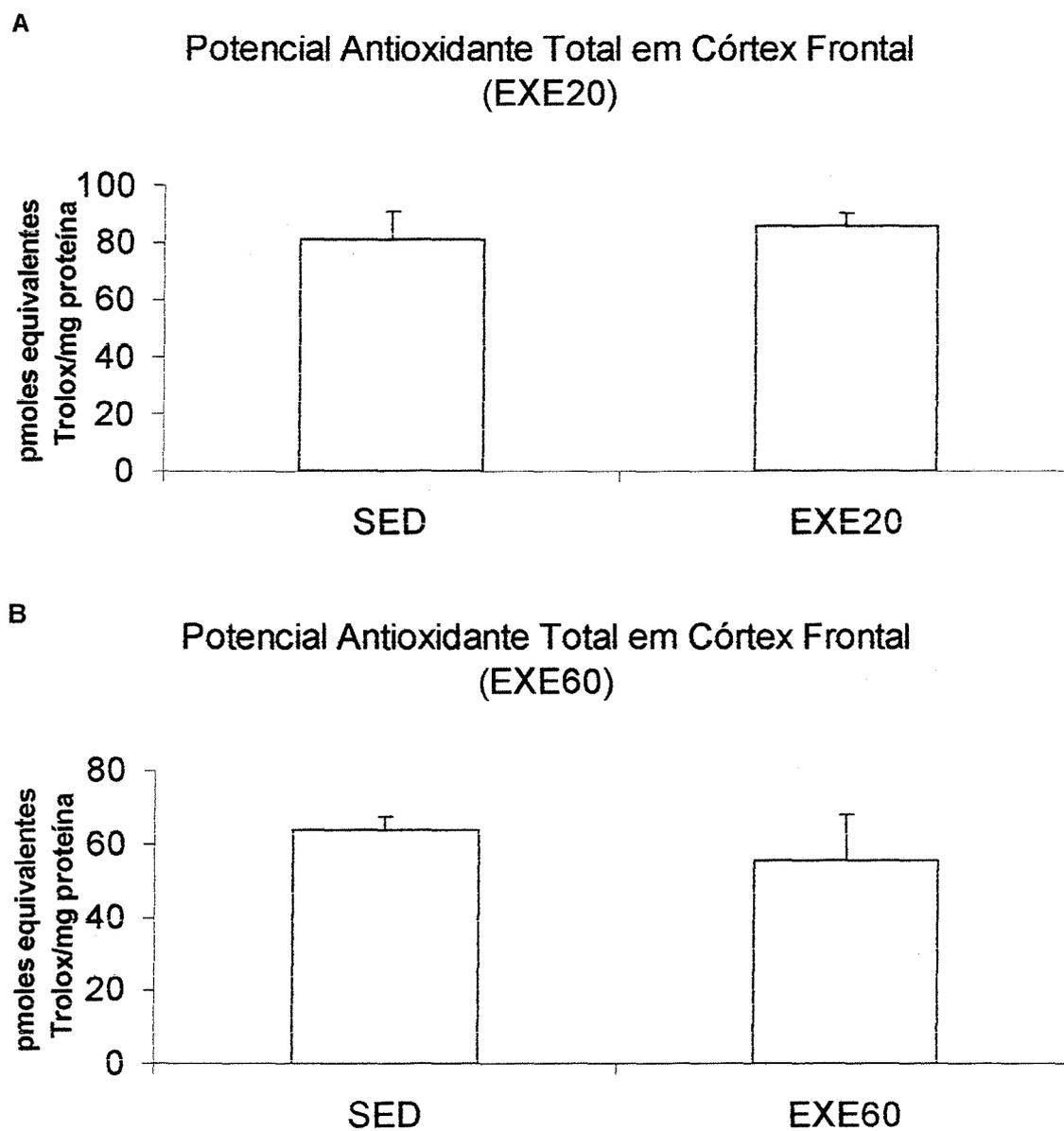


Figura 17. Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em córtex frontal. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. Teste t de Student.

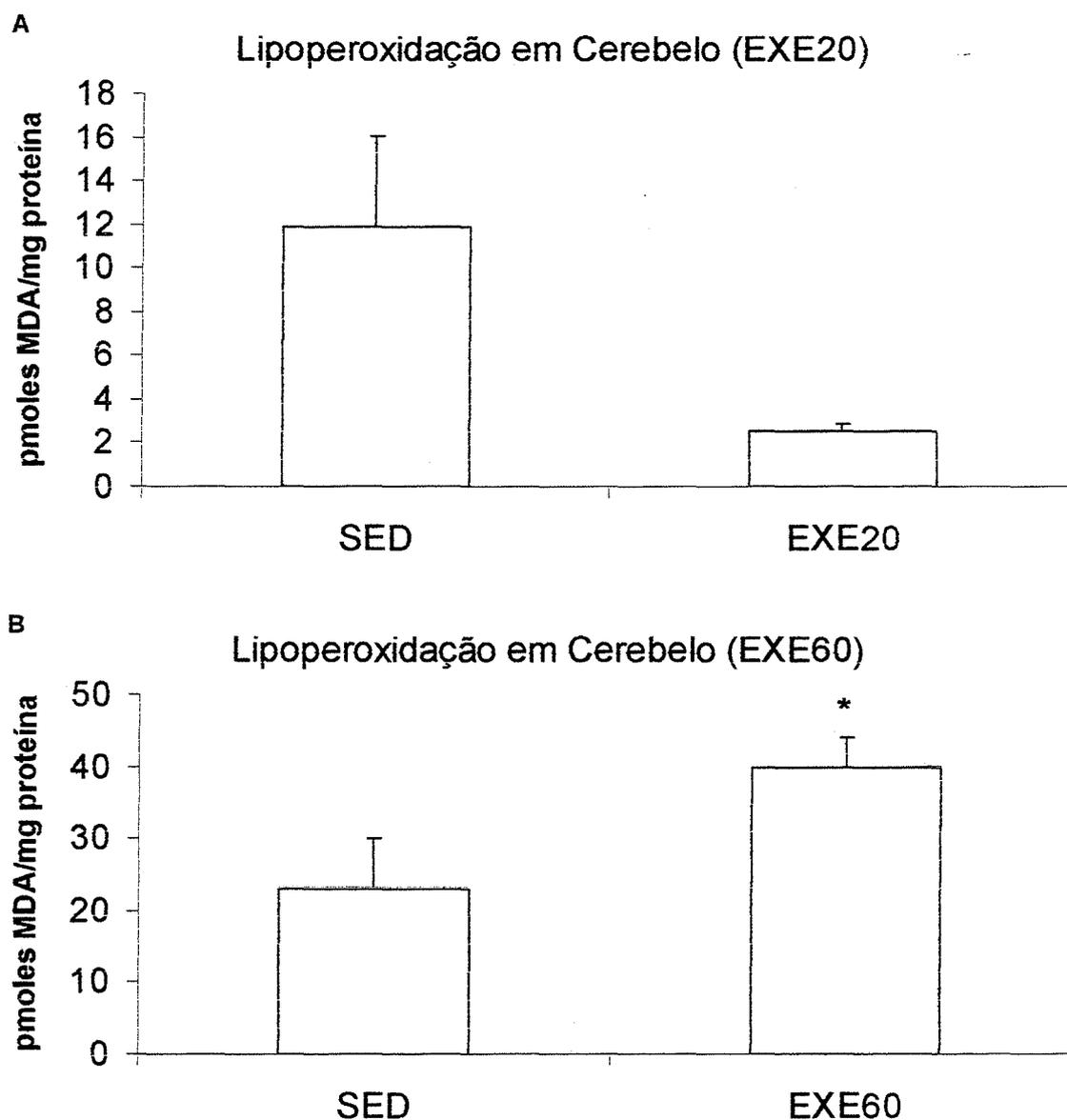


Figura 18. Efeito do exercício físico regular sobre o dano oxidativo em lipídios, lipoperoxidação, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em cerebelo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

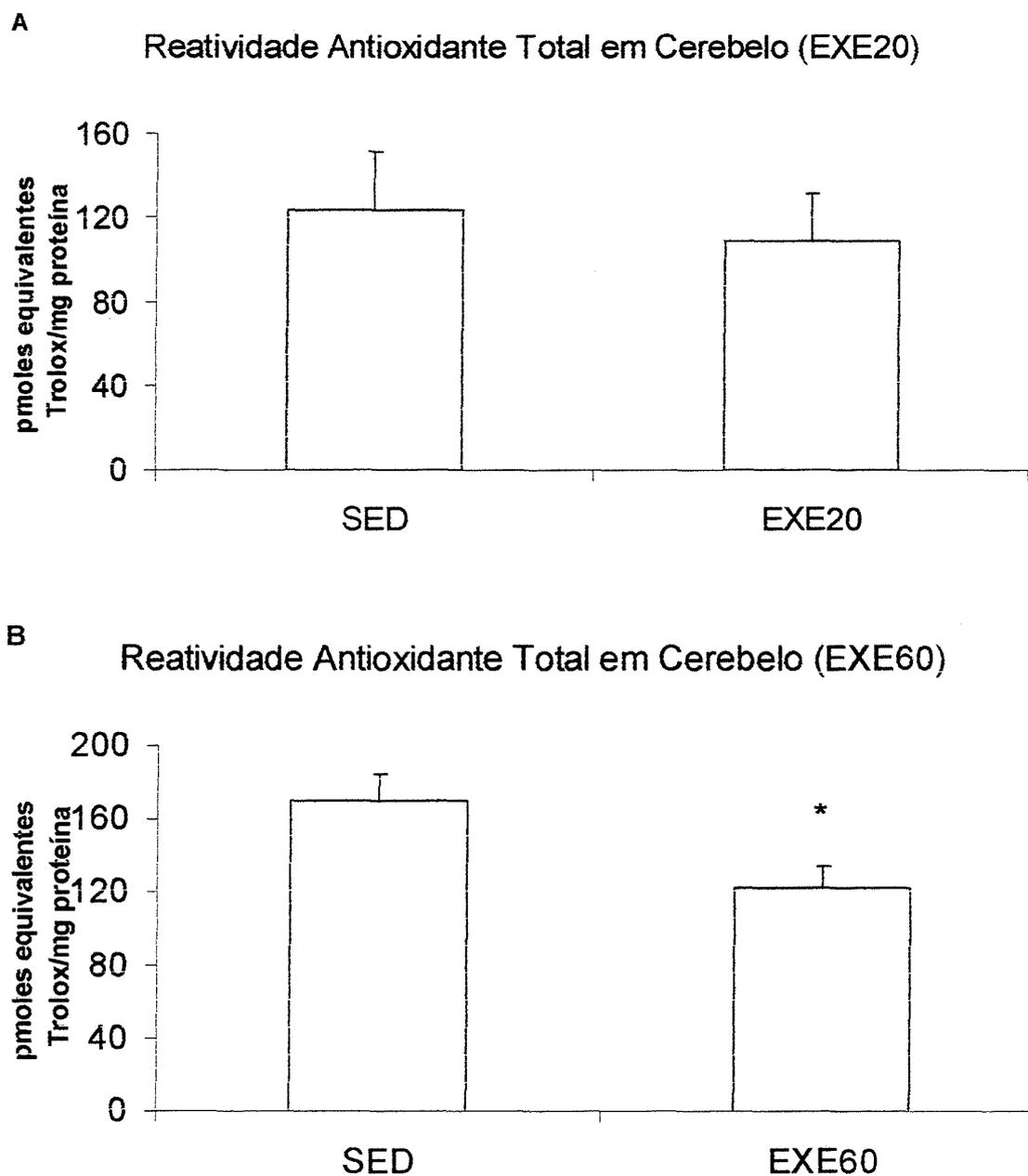


Figura 19. Efeito do exercício físico regular sobre a reatividade antioxidante total em cerebelo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

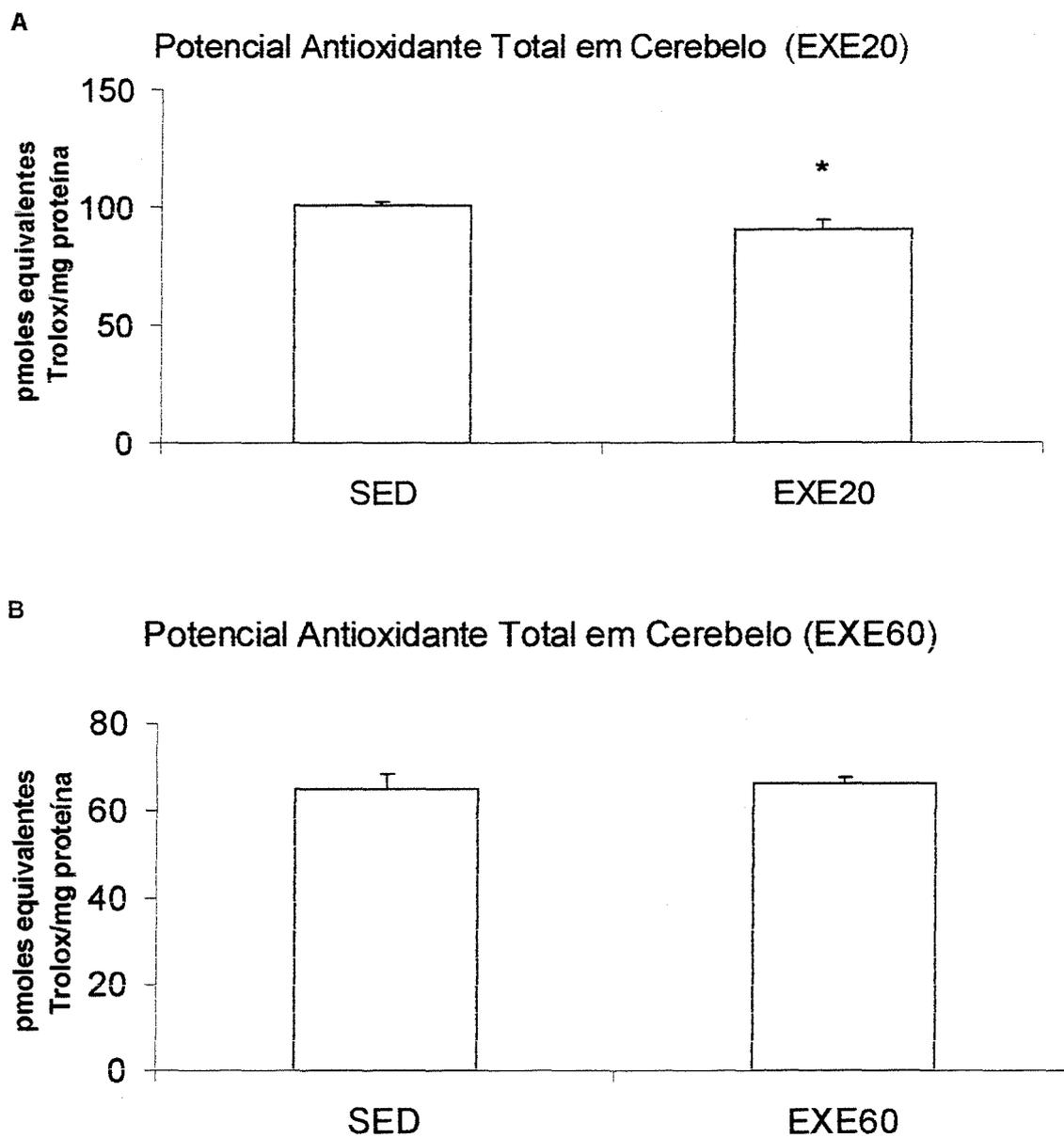


Figura 20. Efeito do exercício físico regular sobre o potencial antioxidante total em cerebelo. (A) 20 minutos em esteira (EXE20), (B) 60 minutos em esteira (EXE 60). Resultados expressos como média \pm EPM de 7-8 experimentos. * diferença significativa do grupo SED ($P < 0,05$). Teste t de Student.

4. DISCUSSÃO

As estruturas cerebrais que sofrem plasticidade relacionada ao exercício são provavelmente aquelas metabolicamente ativas durante a atividade física. Estudos de mapeamento metabólico sugerem que o hipocampo, o córtex motor e o estriado apresentam alta atividade neuronal durante o exercício (VISSING et al., 1996). O movimento está associado ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral em determinadas regiões cerebrais, como o córtex motor e o estriado em humanos (ORGOGOZO e LARSEN, 1979; ROLAND et al., 1982) e no córtex sensorio-motor e cerebelo em cães (GROSS et al., 1980). Assim as regiões de interesse para este estudo foram hipocampo, estriado, córtex frontal e cerebelo.

Os resultados demonstram que o exercício físico regular altera a susceptibilidade ao evento isquêmico *in vitro*, desde que fatias hipocampais de animais exercitados em esteira ergométrica, submetidas à privação de oxigênio e glicose, apresentaram diferente resposta de dano celular de forma dependente da intensidade. A lise celular foi avaliada pela quantificação da liberação da enzima citosólica LDH no meio de incubação.

A privação de oxigênio e glicose (POG) aumentou a liberação da LDH, sendo que este aumento foi reduzido em fatias obtidas de animais submetidos ao exercício físico em esteira durante 20 minutos/dia por duas semanas. Paradoxalmente, o exercício físico com duração de 60 minutos/dia induziu dano celular quando comparado ao grupo controle. Além disso, o exercício durante 60 minutos/dia demonstrou um efeito aditivo à lise causada pela POG.

É importante notar que as sessões de corrida em esteira ergométrica são classificadas como exercício forçado (RADÁK et al., 2001; RA et al., 2002), além de que o período de 60 minutos pode ter sido uma atividade extenuante para a nossa população de ratos, sugerindo que a exposição ao exercício em esteira durante uma hora poderia ser

um evento estressante para o animal, ativando as respostas do organismo a estímulos estressantes, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso simpático.

O hipocampo é particularmente vulnerável tanto à isquemia quanto a eventos estressantes. As células de fatias hipocâmpais de ratos submetidos a um exercício forçado com maior duração (60 minutos) apresentaram um maior dano em membranas celulares, que pode estar relacionado a uma hipersecreção de corticosterona. Em roedores, a exposição ao excesso de glicocorticóides pode levar à atrofia reversível dos dendritos hipocâmpais, e a exposição prolongada pode causar uma perda de neurônios hipocâmpais (SAPOLSKY et al., 1990).

O exercício físico forçado moderado (20 minutos/dia) reduziu o dano celular induzido pela isquemia *in vitro* em fatias hipocâmpais. Cabe lembrar que há relatos de neuroproteção pelo exercício físico após a indução de isquemia cerebral focal (YANG et al., 2003) e do exercício pré-isquêmico no modelo de isquemia global (STUMMER et al., 1994). Contudo, JOHANSSON e OHLSSON (1996) não observaram o efeito neuroprotetor do exercício físico voluntário em dano isquêmico (focal).

Estudos epidemiológicos demonstram que o comportamento sedentário está relacionado com o aumento de risco de AVC (GILLUM e INGRAM, 1996). Apesar disso, nossos resultados corroboram com as observações de SACCO e colegas (1998), que os exercícios recomendados são os aeróbios e de intensidade moderada, sendo que os mais extenuantes podem acelerar os efeitos deletérios de um AVC.

A atividade mitocondrial em fatias hipocâmpais, detectada através da redução do MTT especificamente pela enzima succinato desidrogenase, não foi alterada pelo exercício físico regular (20 e 60 minutos ao dia). O parâmetro de funcionalidade mitocondrial avaliado neste trabalho, a redução do MTT, não foi capaz de detectar diferenças entre os grupos experimentais submetidos à POG. Contudo, isto não significa

que não ocorram disfunções metabólicas; JACKSON e PEREZ-POLO (1996) sugeriram que este ensaio pode não ser apropriado para a detecção de respostas à injúria quando as células apresentam alguma disfunção metabólica, mas permanecem viáveis.

Há um conhecimento restrito sobre o mecanismo de ação do exercício físico, contudo alguns trabalhos relatam alterações no estado oxidativo celular. Há poucos trabalhos do efeito do exercício sobre o dano oxidativo no cérebro e os achados são conflitantes. Assim, este trabalho avaliou parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de estruturas cerebrais, a fim de estudar se os mecanismos pelos quais o exercício altera a suscetibilidade a eventos isquêmicos estão envolvidos com radicais livres e dano oxidativo em macromoléculas. O exercício físico forçado regular alterou vários marcadores de estresse oxidativo nas regiões cerebrais estudadas.

No hipocampo, foi estudado o conteúdo de radicais livres, avaliado pela formação de produtos da modificação oxidativa da sonda exógena, o diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína; o dano em lipídios (lipoperoxidação), através do ensaio de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); dano em proteínas, pela quantificação de resíduos de tirosina e triptofano, e a capacidade antioxidante total, através dos ensaios de reatividade antioxidante total (TAR) e potencial antioxidante total (TRAP).

A LPO leva à formação de aldeídos como o MDA e o 4-HNE, a quantificação destes compostos é uma medida indireta da LPO. O MDA é freqüentemente detectado através do ensaio de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Selecionamos o ensaio de TBARS pela sua simplicidade, associado à detecção fluorimétrica, já que esta é mais sensível e específica do que os métodos espectrofotométricos para a quantificação de MDA (DRAPER et al., 1993).

A fim de avaliar a atividade antioxidante total, usamos os ensaios do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR) descritos por Lissi et al. (1992; 1995). Os valores de TRAP indicam a quantidade de compostos antioxidantes na amostra, enquanto os valores de TAR, a qualidade dos antioxidantes presentes na amostra (LISSI et al., 1995; DESMARCHELIER et al., 1997). Conforme LISSI e colaboradores (1995) alterações nos níveis de TAR podem ser responsáveis por mudanças na susceptibilidade a eventos oxidativos.

Os hipocampos de ratos exercitados durante 20 minutos não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados de índice de estresse oxidativo: conteúdo de radicais livres, dano em macromoléculas e capacidade antioxidante total. Entretanto, o exercício melhorou alguns parâmetros de EO em hipocampos de ratos exercitados durante 60 minutos, estes apresentaram uma redução no conteúdo de radicais livres e um aumento no potencial antioxidante total (TRAP). Paradoxalmente, foram observados maiores níveis de TBARS, indicando um aumento no dano oxidativo a ácidos graxos poliinsaturados. Este dado é importante já que níveis aumentados na LPO das membranas afetam a integridade dos processos fisiológicos, alterando a permeabilidade e o potencial de membrana, além da atividade de proteínas de membrana, como receptores e canais iônicos, e pode ainda levar à ruptura de membranas de organelas e da própria célula. O dano (lise) celular pode ser resultado de um pronunciado dano oxidativo em lipídeos de membrana, alterando as propriedades físico-químicas de membranas de cérebros de roedores, o que diminuiu a fluidez destas membranas (CHOI e YU, 1995). Em consequência, a LPO induzida pelo evento isquêmico pode agir sinergicamente com as alterações provocadas pelo exercício extenuante na destruição das membranas celulares.

Em contradição, em hipocampos de ratos exercitados durante 20 minutos, que apresentaram um reduzido dano celular induzido pela POG, não foram observadas

quaisquer modificações nos ensaios de avaliação de estado oxidativo. Pode-se sugerir, então, que o efeito protetor do exercício físico moderado (20 minutos) provém de alteração da expressão de alguns genes. Há vários relatos de aumento na expressão gênica de neurotrofinas, especialmente do fator neurotrófico derivado do encéfalo ("brain-derived neurotrophic factor", BDNF), induzido pelo exercício físico (NEEPER et al., 1996; JOHNSON e MITCHELL, 2003). Estudos prévios demonstraram que o BDNF promove proliferação e/ou sobrevivência de vários tipos de neurônios, como os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (KNÜSEL et al., 1991), neurônios GABAérgicos estriatais (VENTIMIGLIA et al., 1995) e neurônios colinérgicos do prosencéfalo (núcleos basal, septal) (NONNER et al., 1996). É interessante comentar que o receptor de BDNF é um receptor tirosina-quinase, *trkB*, e a ligação ao receptor desencadeia uma série de vias de sinalização intracelular promotoras de crescimento e sobrevivência, como as cascatas Ras/MAP quinase e fosfatidilinositol-3 quinase/Akt (YUAN e YANKNER, 2000).

Evidências recentes têm sugerido que comportamentos diários e o estilo de vida, como o exercício físico e o ambiente enriquecido, dois fatores associados também à saúde emocional (ICKES et al., 2000, NEEPER et al., 1995), aumentam os níveis de expressão de BDNF no cérebro (GARZA et al., 2004). A infusão direta de BDNF no mesencéfalo produz um efeito semelhante à administração de antidepressivos em modelos comportamentais, nos paradigmas do desamparo aprendido e da natação forçada (SHIRAYAMA et al., 2002; SIUCIAK et al., 1997). Este efeito pode estar relacionado às ações ansiolíticas e antidepressivas do exercício físico, descritas por indivíduos em geral e pacientes com problemas emocionais (SALMON, 2001).

KIPRIANOVA e colaboradores (1999) demonstraram que a administração intracerebroventricular (icv) de BDNF apresentou efeito neuroprotetor da transmissão sináptica e de funções cognitivas em modelo de isquemia cerebral global transitória.

Também demonstrando que o BDNF tem efeito protetor em eventos isquêmicos, a injeção de BDNF (icv) antes da injúria hipóxica-isquêmica reverteu a ativação de caspase-3; as caspases são proteases envolvidas na morte celular programada (HAN et al., 2000).

É interessante reportar que um curto período de treinamento aumenta a expressão de BDNF. RUSSO-NEUSTADT e colaboradores (1999, 2000) demonstraram que dois, sete ou vinte dias de exercício voluntário aumentaram o conteúdo de RNAm de BDNF hipocampal.

Provavelmente, o efeito neuroprotetor do exercício intenso (60 minutos) não foi observado por se tratar de um estímulo estressante. Sabe-se que o BDNF hipocampal é reduzido em resposta ao estresse (SMITH et al., 1995). A natação forçada em água fria sem escape, que induziu estresse nos animais, reduziu a expressão do BDNF hipocampal (SMITH et al., 1996).

A alteração de expressão de outras proteínas também foi detectada em hipocampus de ratos exercitados. É digno de nota que o exercício voluntário em roda de corrida durante 21 meses reverteu a redução causada pelo envelhecimento no imunoc conteúdo de dois marcadores neuronais, a sinaptofisina e a GAP-43. A sinaptofisina é uma glicoproteína integral de membrana nas vesículas sinápticas, e há relatos de que o aumento da expressão de sinaptofisina é diretamente proporcional à formação de sinapses. A GAP-43 é uma fosfoproteína de membrana pré-sináptica, usada como marcador de plasticidade e crescimento de neuritos (CHEN et al., 1998).

Algumas das estruturas cerebrais estudadas apresentaram um aumento nos níveis de TBARS, corroborando com os achados de SUZUKI e colaboradores (1983), que reportaram que o exercício voluntário aumentou a lipoperoxidação em cérebro de ratos.

já que é uma estrutura envolvida no comportamento motor. Foi observado um aumento nos níveis de TAR em ratos exercitados durante 60 minutos, demonstrando um aumento na capacidade antioxidante total desta estrutura, contudo este aumento parece não ter sido suficiente para impedir o dano oxidativo em lipídeos. O exercício regular voluntário parece proteger células estriatais do dano isquêmico, já que gerbilos exercitados submetidos à isquemia cerebral global apresentaram uma redução parcial da perda de neurônios estriatais (STUMMER et al., 1994).

O córtex frontal é uma grande área formada por várias regiões corticais com funções distintas. O lobo frontal é responsável pelo planejamento e a iniciação das seqüências de comportamento motor. As regiões principais são o córtex motor, o pré-motor e o pré-frontal. O córtex motor controla movimentos finos, o pré-motor é ativado na seleção de seqüências de movimentos. Uma das funções do córtex pré-motor é planejar comportamentos complexos, selecionando os movimentos que são adequados (KOLB e WHISHAW, 2002). O exercício físico (60 minutos de treino/dia) reduziu o dano oxidativo em lipídios, a LPO, no córtex frontal de ratos. DEVI e KIRAN (2004) relataram que a natação durante 12 semanas (30 minutos/dia) reduziu a LPO no córtex cerebral em ratos, no entanto o efeito foi potenciado quando os ratos treinados receberam o tratamento com vitamina E.

O cerebelo de ratos treinados, uma estrutura cerebral relacionada ao comportamento motor, apresentou alterações nos níveis de LPO. Ratos treinados durante 20 minutos demonstraram uma forte tendência à redução dos níveis de TBARS nos cerebelos. Por outro lado, 60 minutos de treino, possivelmente como resultado do acréscimo do metabolismo oxidativo celular, apresentaram um aumento na LPO e uma redução significativa nos valores de TAR, indicando um estresse oxidativo celular. É interessante comentar que ratos envelhecidos perdem a capacidade de melhorar a

na LPO e uma redução significativa nos valores de TAR, indicando um estresse oxidativo celular. É interessante comentar que ratos envelhecidos perdem a capacidade de melhorar a performance numa tarefa de corrida, que está relacionada à perda da função noradrenérgica cerebelar, que parece depender, pelo menos em parte, do estresse oxidativo, pois podem ser revertidas pela intervenção nutricional com antioxidantes. (BICKFORD et al., 1992; BICKFORD, 1993, BICKFORD et al., 2000).

Enquanto que em cérebro total, o exercício regular (natação) durante nove semanas (1 hora/ dia) melhorou funções cognitivas em esQUIVA ativa com concomitante diminuição do dano oxidativo em proteína em ratos jovens (quatro semanas) e de meia-idade (14 meses) (RADÁK et al., 2001). NAVARRO e colaboradores (2004) demonstraram que o exercício moderado em esteira desde a idade jovem, em camundongos machos e fêmeas, aumentou a expectativa de vida. Além disso, esse exercício melhorou a performance em ensaios comportamentais e reduziu o estresse oxidativo avaliados aos 13 meses de idade, pois reduziu o dano em proteínas (conteúdo de carbonilas) e o dano em lipídios (níveis de TBARS) em membranas submitocondriais; aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) e da enzima mitocondrial, citocromo oxidase.

5. CONCLUSÕES

O exercício físico causa, de maneira dependente da intensidade, alterações na susceptibilidade hipocampal ao dano isquêmico.

O exercício intenso produziu um intenso estresse oxidativo em cerebelo, com redução da capacidade antioxidante total e aumento da lipoperoxidação.

O exercício moderado parece proteger células hipocampais do dano isquêmico, já que reduziu o dano celular induzido pela isquemia-reoxigenação *in vitro* em fatias hipocampais de ratos. Os dados sugerem que o mecanismo de ação de neuroproteção pelo exercício moderado seja independente de melhorar o estado oxidativo celular, pois seus hipocampus não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados de índice de estresse oxidativo. Possivelmente, a proteção provém de alteração da expressão gênica, por exemplo, de neurotrofinas, especialmente do fator neurotrófico derivado do encéfalo ("brain-derived neurotrophic factor", BDNF).

Paradoxalmente, o exercício intenso parece agravar o dano isquêmico, pois aumentou significativamente o dano celular produzido pela isquemia-reoxigenação *in vitro*. Este achado pode estar relacionado a uma ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com conseqüente hipersecreção de corticosterona, o que pode levar à perda de neurônios hipocampais. Os dados corroboram a teoria de que o mecanismo de ação de neuroproteção seja independente de melhorar o estado oxidativo celular, considerando que os hipocampus de animais exercitados diariamente durante sessenta minutos apresentaram melhores valores de potencial antioxidante total, todavia um maior dano isquêmico.

6. PERSPECTIVAS

Tem-se como perspectiva a avaliação dos efeitos da isquemia *in vitro* com outros períodos de treinamento (seis semanas em esteira ergométrica). Serão avaliados também, após duas semanas de treino, os efeitos da isquemia cerebral *in vivo*, no modelo de isquemia global transitória.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESCHBACH, R.; AMADO, R.; NEUKOM, H. *Biochim. Biophys. Acta* 439, p. 292–301, 1976.
- AMATO, R.; AESCHBACH, R.; NEUKOM, H. *Methods Enzymol.* V. 107, p. 377-388, 1984.
- ANDERSON, J.B.; RAPP, N.D.; BAEK, H.D.; MCCLOSKEY, P.D.; COBURN-LITVAK, S.P. e ROBINSON, K.J. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiology & Behavior*, v. 70, p. 425 – 429, 2000.
- ANDINE, P.; JACOBSON, I.; HAGBERG, H. Calcium uptake evoked by electrical stimulation is enhanced postischemically and precedes delayed neuronal death in CA1 of rat hippocampus: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Cerebral blood Flow and Metabolism*, v. 8, p. 799-807, 1988.
- ASTRAND, P.O.; RODAHL, K. Circulation. In: van Dalen, D. B., ed. *Textbook of work physiological basis of exercise*. New York: Mc Graw Hill Book company; p. 170-175, 1986.
- BARTH, A.; BARTH, L.; NEWELL, D.W. Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyltert-butyl-nitron enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp. Neurol.* V. 141, p. 330-336, 1996.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BICKFORD, P.A. Motor learning deficits in aged rats are correlated with loss of cerebellar noradrenergic function. *Brain Research*, v. 620, p. 133-138, 1993.
- BICKFORD, P.A.; GOULD, T.; BRIEDERICK, L.; CHADMAN, K.; POLLOCK, A.; YOUNG, D.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats, *Brain Res.*, v. 866, p. 211-217, 2000.

- BICKFORD, P.A.; HERON, C.; YOUNG, D.; GERHARDT, G.A.; DE LA GARZA, R. Impaired acquisition of novel locomotor tasks in aged and norepinephrine-depleted F344 rats. *Neurobiol. Aging*, v. 13, p. 475-481, 1992.
- BISBY, R.H.; PARKER, A.W. Reaction of ascorbate with the alpha-tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 317, p. 170-178, 1995.
- BLACK, J.E.; GREENOUGH, W.T.; ANDERSON, B.J.; ISAACS, K.R. Environment and the aging brain. *Canadian Journal Psychology*, v. 41, p. 111-130, 1987.
- BONDY, S.C. Evaluation of free radical- initiated oxidant events within the nervous system, *Methods in Neurosciences*. 30 Academic Press, Inc. p. 243-259, 1996.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* v. 134, p. 707-716, 1973.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72 p. 248-254, 1976.
- BRAUGHLER, J.M.; HALL, E.D. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* v. 6, p. 289-30, 1989.
- BREDER, J.; SABELHAUS, C.F.; OPITZ, T.; REYMANN, K.G.; SCHROER, U.H. inhibition of different pathways influencing Na(+) homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. *Neuropharmacology* v. 39, p. 1779-1787, 2000.

- BRIERLEY, J.B.; GRAHAM, D.I. Hypoxia and vascular disorders of central nervous system. In: Hulme Adams, J., Corsellis, J.A.N., Duchen, L.W. (Eds.) Greenfields Neuropathology, London: Arnold, p. 125-207, 1984.
- BROMONT, C., MARIE, C., BRALET J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 20, 918-924, 1989.
- BRONNER, L.L.; KANTER, D.S.; MANSON, J.E. Primary prevention of stroke. *New England J. Med.* v. 33, p. 1392-1400, 1995.
- BROOKS, G.A.; WHITE, T.P. Determination of metabolic responses rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol. Respiratory Environ. Exercise Physiol.* V. 45, p. 1009-1015, 1978.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BUTTERFIELD, D.A.; KANSKI, J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech. Ageing Dev.* v. 122, p. 945-962, 2001.
- CAO,W.; CARNEY J.M.; DUCHON, A.; FLOYD, R.A.; CHEVION, M. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci. Lett.* v. 88, p. 233-238, 1988.
- CÁRDENAS A., MORO M.A., HURTADO O., LEZA J.C., LORENZO P., CASTRILLO A., BODELÓN O.G., BOSCA O.G., LIZASOAIN I. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Journal of Neurochemistry* 74, 2041-2048, 2000.

- CHEN, Y.C.; CHEN, Q.S.; LEI, J.L.; WANG, S.L. Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse. *Brain Res.*, v. 806(2), p. 238-45, 1998.
- CHENNAOUI, M.; DROGOU, C.; GOMEZ-MERINO, D.; GRIMALDI, B.; FILLION, G.; GUEZENNEC, C.Y. Endurance training effects on 5-HT_{1B} receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats. *Neurosc. V.* 307, p. 33-36, 2001.
- CHOI, J.H.; YU, B.P. Brain synaptosomal aging: free radicals and membrane fluidity. *Free Radic. Biol. Med.* v. 18, p. 133-139, 1995.
- CIMAROSTI H., RODNIGHT R., TAVARES A., PAIVA R., VALENTIM L., ROCHA E., SALBEGO C. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience Letters* v. 315, p. 33-36, 2001.
- COHEN, M.M.; PETTEGREW, J.W.; KPP, S.J.; MINSHEW, N.; GLONEK, T. P-31 nuclear magnetic resonance analysis of brain: normoxic and anoxic brain slices. *Neurochem. Res.* V. 9, P. 785-801, 1984.
- DAVIES, C.J.; FU, S.; WANG, H.; DEAN, R.T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic. Biol Med.* V. 27, p. 1151-1163, 1999.
- DAVIES, K.J.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L. F. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 107, p. 1198-1205, 1982.
- DEMOPOULOS, H.B.; FLAMM, E.S.; PIETRONIGRO, D.D.; SELIGMAN, M.L. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, v. 492, p. 91-119, 1980.

- DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G. Total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in SOUTHWEST AMAZONIA (BOLIVIA AND PERU). *INT. J. PHARMACOG.*, v. 35, p. 288-296, 1997.
- DEVI, S. A.; KIRAN, T. REGIONAL RESPONSES IN ANTIOXIDANT SYSTEM TO EXERCISE TRAINING AND DIETARY VITAMIN E IN AGING RAT BRAIN. *NEUROBIOL AGING.*, v. 25, p. 501-508, 2004.
- DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A COMPARATIVE evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med.* v. 15, p. 353-363, 1993.
- DUGAN, L.; CHOI, D. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. *Basic Neurochemistry: Molec. Cell and Med. Aspects*, 6 edição, Lipincott Williams & Wilkins, 1999.
- DUSTIMAN, R.E.; RUHLING, R.O.; RUSSEL, E.M.; SHEARER, D.E.; BONEKAT, H.W.; SHIGEOKA, J.W.; WOOD, J.S.; BRADFORD, D.C. Aerobic exercise training and improved neuropsychological function of older individuals. *Neurobiol. Aging*, v. 5, p. 35-42, 1984.
- DUTHIE, G.G.; ROBERTSON, J.D.; MAUGHAN, R.J.; MORRICE, P.C. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 282(1), p. 78-83, 1990.
- ELSAYED, M.; ISMAIL, A.H.; YOUNG, R.J. Intellectual differences of adult men related to age and physical fitness before and after an exercise program. *J. Gerontol.*, v. 35, p. 383-387, 1980.
- EVANS, P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology, *Br. Med. Bull.*, v. 49, p. 577-587, 1993.

- FORDYCE, D.E.; FARRAR, R. P. Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. *Behav. Brain Res.* V. 43, p. 115-123, 1991.
- FORDYCE, D.E.; WEHNER, J.M. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and mice. *Brain Res.* V 619, p. 111-119, 1993.
- FUJITA, Y.; OHZEKI, I. Energy requirements for frail elderly females. *Jpn. J. Geriatri.* V.30, p. 568-571, 1993.
- FUNAHASHI, T.; FLOYD, R.A.; CARNEY, J.M. Age effect on brain pH during ischemia/reperfusion and pH influence on peroxidation. *Neurobiol. Aging* v. 15, p. 161-167, 1994.
- GARZA, A.A.; HA, T.G.; GARCIA, C.; CHEN, M.J.; RUSSO-NEUSTADT, A.A. Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v. 77, p. 209-20, 2004.
- GILLUM, R.F.; INGRAM, D.D. Relation between residence in the southeast region of the United States and stroke incidence. The NHANES I Epidemiologic Followup Study. *Am. J. Epidemiol.* V.144, p 665-73, 1996.
- GLOBUS, M.Y-T.; BUSTO, R.; MARTINEZ, E.; VALDES, I.; DIETRICH, W.D.; GINSBERG, M.D. Comparative effect of transient global ischaemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and Y-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *Journal of Neurochemistry*, v. 57, p. 470-478, 1991.
- GOMEZ-PINILLA, F.; SO, V.; KESSLAK, J. P. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: Neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience*, v. 85, p. 53-61, 1998.

- GROSS, P.M.; MARCUS, M.L.; HEISTAD, D.D. Regional distribution of cerebral blood flow during exercise in dogs. *J. Appl. Physiol.* V. 48, p. 213-217, 1980.
- GUZOW, K.; SZABELSKI, M.; RZESKA, A.; KAROLEZAK, J.; SULOWSKA, H.; WIESK, W. Photophysical properties of tyrosine at low pH range, *Chemical Physics Letters.* V. 362, p. 519-526, 2002.
- GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* V. 15, p. 129-35, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radical in biology and medicine.* 2nd Edition. New York: Oxford University Press Inc.; 1989.
- HALLIWELL, B.H. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? *Ann. Neurol.*, v. 32, p. 510-515, 1992.
- HAN BH, D'COSTA A, BACK SA, PARSADANIAN M, PATEL S, SHAH AR, GIDDAY JM, SRINIVASAN A, DESHMUKH M, HOLTZMAN DM. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol. Dis.* v. 7(1), p. 38-53, 2000.
- HOLLOSZY, J.O. Exercise increases longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation, *Journal of Gerontology.* V. 48, p. 97-100, 1993.
- ICHIKAWA, M.; FUJITA, Y.; EBISAWA, H.; OZEKI, T. Effects of long-term, light exercise under restricted feeding on age-related changes in physiological and metabolic variables in male Wistar rats. *Mechanisms of Ageing and Development.* V. 113, p. 23-35, 2000.
- ICHIKAWA, M.; FUJITA, Y. Effects of nitrogen and energy metabolism on body weight in later life of Wistar rats consuming a constant amount of food. *J. Nutr.* V. 117, p. 1751-1758, 1987.

- ICKES, B.R.; PHAM, T.M.; SANDERS, L.A.; ALBECK, D.S.; MOHAMED, A.H.; GRNHOLM, A.C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophins levels in rat brain. *Exp Neurol.* v. 164, p. 45-2, 2000.
- JACKSON, G.R.; PEREZ-POLO, J.R. Paradigms for Study of Neurotrophin Effects in Oxidant Injury, In: Perez-Polo, J.R., ed. *Methods in Neurosciences*, vol. 30; San Diego: Academic Press, Inc. p. 1-25. 1996.
- JESBERGER, J. A.; RICHARDSON, J. S. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci.* v. 57, p. 1-17, 1991.
- JOHANSSON, B., B.; OHLSSON, A., L. Environment, social interaction and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol.* v. 139, p. 322-327, 1996.
- JOHNSON, R.A.; MITCHELL, G.S. Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. *Brain Res.* v. 983, p. 108-14, 2003.
- KEUL, J.; DOLL, E. Oxidative energy supply. In: JOKL, E., ed. *Energy metabolism of human muscle*. Basel: Karger, p. 52-71, 1972.
- KIPRIANOVA I, SANDKUHLER J, SCHWAB S, HOYER S, SPRANGER M. Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat. *Exp Neurol.* V. 159(2), p. 511-9, 1999.
- KNÜSEL, B.; WINSKOW, J.; ROSENTAL, A.; BURTON, L.; SEID, D.; NIKOLIES, K. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophine. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* V. 88, p. 961-965, 1991.

- KOH, J.Y.; CHOI, D.W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosc. Methods*, v. 20, p. 83-90, 1987.
- KOLB, B. e WHISHAW, I.Q. *Neurociência do Comportamento*. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2002.
- KRAEMER, A.F.; HAHN, S.; COHEN, N.J.; BANICH, M.T.; MCAULEY, E.; HARRISON, C.R.; CHASON, J.; VAKIL, E.; BARDELL, L.; BOILEAU, R.A.; COLOMBE, A. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature*, v. 400, p. 418-419, 1999.
- LAAKE, J.H.; HAUG, F.M.; WIELOCH, T.; OTTESEN, O.P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res. Protoc.* V. 4, p. 173-184, 1999.
- LAFON-CAZAL, M.; PIETRI, S.; CULCASI, M.; BOCKAERT, J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, v. 364, p. 535-537, 1993.
- LEBEL, C.P.; ALI, S.F.; MCKEE, M.; BONDY, S.C. Organometal induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V. 104, p. 17-24, 1990.
- LEE, I.M.; PAFFENBARGER, R.S. JR. Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study. *Stroke*. 1998, 29(10):2049-54.
- LEEUWENBURGH, C.; HOLLANDER, J.; LEICHTWEIS, S.; GRIFFITHS, M.; GORE, M.; JI, L.L. Adaptation of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.* V. 272, p. 363-369, 1997.
- LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic. Res Comm.*, v. 17, p. 299-231, 1992.

- LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 18, p. 153-158, 1995.
- MAHABIR, S, LEITZMANN MF, PIETINEN P, ALBANES D, VIRTAMO J, TAYLOR PR. Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers. *Int J Cancer*. 2004 Feb 10;108(4):600-5.
- MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S. W.; TABER, M. G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, p. 911-922, 2001.
- MCCLOSKEY, P.D.; ADAMO, S.D.; ANDERSON J.B. Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain Research*, v. 891, p. 168-175, 2001.
- McFARLAND, D.J.J. Experimental evidence of the relationship between aging and oxygen want: in search of a theory of aging. *Ergonomics*. V. 6, p, 339-366, 1963.
- MELDRUM, B.S. Pathophysiology of cerebral ischaemia and trauma in relation to possible therapeutic approaches. In: MELDRUM , B.S.; WILLIAMS, M. (Eds) *Current and Future Trends in Anticonvulsant, Anxiety and Stroke Therapy*. New York: Wiley-Liss, p. 275-290, 1990.
- MONDON, C.E.; DOLKAS, C.B.; SIMS, C.; REAVEN, G.M. Spontaneous running activity in male rats: effect o age. *J. ppl. Physiol*. V. 58, p. 1553-1985, 1985.
- MORI, E.; DEL ZOPPO, G.J.; CHAMBERS, J.D.; COPELAND, B.R.; ARFORS, K.E. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke*, v. 23, p. 712-8, 1992.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, v. 65, p. 55-63, 1983.

- NARATH, E.; SKALICKY, M.; VIIDIK, A. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp. Gerontol.* v. 36, p. 1699-1711, 2001.
- NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS. Health, United States, 1995. Hystaville, Md; Public Health Service, 1996.
- NAVARRO, A.; GOMEZ, C.; LOPEZ-CEPERO, J.M.; BOVERIS, A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v. 286: R505-511, 2004
- NEEPER, S.A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature.* V. 373, p. 109, 1995.
- NEEPER, S.A.; GOMEZ-PINILA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* V. 726, p. 49-56, 1996.
- NETTO, C.A.; HODGES, H.; SINDEN, J.D.; LEPEILLET, E.; KERSHAW, T.; SOWINSKI, P.; MELDRUM, B.; GRAY, J. Effects of foetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience*, v. 54, p. 69-92, 1993a.
- NETTO, C.A.; HODGES, H.; SINDEN, J.D.; LEPEILLET, E.; KERSHAW, T.; SOWINSKI, P.; MELDRUM, B.; GRAY, J. CA1 foetal grafts alleviate ischaemic-induced behavioral deficits in the water maze. *Behavioural Brain Research*, v. 58, p. 107-112, 1993b.
- NETTO, C.A.; WEBBER, A.; BARLEM, A.; SOUZA, C.; RUVIARO, C.; ZWETSCH, G.; TRINDADE, L.; ARTENI, N.; SCHIERHOLT, R. Memory deficits after recovery of transient forebrain ischemia in rats: a preliminary report. *Ciência e Cultura*, v. 47, p. 261-265, 1995.

- NEWELL, D.W.; HSU, S.S.; PAPERMASTER, V.; MALOUF, A.T. Colchicine is selectively neurotoxic to dentate granule cells in organotypic cultures of hippocampus. *Neurotoxicology* v. 14, p. 375-380, 1993.
- NEWMAN, G.C.; HOSPOD, F.E.; WU, P. Glucose utilization of hippocampal slices. *J. Neurosc. Methods.*, v. 28, p. 23-34, 1989.
- NONNER, D.; BARRETT, E.; BARRETT, J. Neurotrophin effects on survival and expression of cholinergic properties in cultured rat septal neurons under normal and stress conditions. *J. Neurosci.* V. 6, p. 6665-75, 1996.
- NUNN, J.A.; LEPELLEIT, E.; NETTO, C.A.; SOWINSKI, P.; HODGES, H.; GRAY, J.A.; MELDRM, B. CA1 cell loss produces deficits in learning and memory in the water maze regardless on additional intra- and extra-hippocampal damage, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 11, p. S338, 1991.
- ORGOGOZO, J.M.; LARSEN, B. Activation of supplementary motor area during voluntary movement in man suggests it works as a supramotor area. *Science.* v. 206, p. 847-850, 1979.
- PACKER, L. Prevention of Free radical damage in the brain: protection by α -lipoic acid In: *Free Radicals in Brain Physiology and Disorders* Packer L., Hiramatsu M, Yoshikawa T London: Academic Press, Inc. 313-329, 1996.
- PALL, M.L. NMDA sensitization and stimulation by peroxynitrite, nitric oxide, and organic solvents as the mechanism of chemical sensitivity in multiple chemical sensitivity. *FASEB J.* v. 16, p. 1407-1417, 2002.
- PATEL, A.V.; PRESS, M.F.; MEESKE, K.; CALLE, E.E.; BERNSTEIN, L. Lifetime recreational exercise activity and risk of breast carcinoma in situ. *Cancer.* V. 98, p. 2161-9, 2003.

- PELLMAR, T.C. Use of brain slices in the study of free-radical actions. *J. Neurosci. Methods*, v. 59, p. 93-8, 1995.
- PORCIUNCULA L.O., ROCHA J.B., CIMAROSTI H., VINADE L., GHISLENI G., SALBEGO C.G., SOUZA D.O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunoccontent of inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience Letters* 346, 101-4, 2003.
- POWERS, S.K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L.L.; MARTIN, D.; HERB, R.A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* V. 266, p. 376-380, 1994.
- PRINGLER, A.K.; THOMAS, S.J.; SIGNORELLI, F.; IANNOTTI, F. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res.* V. 845, p. 152-164, 1999.
- PULSINELLI, W.A.; BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemisphere ischaemic in the unanesthetised rat. *Stroke*, v. 10, p. 267-272, 1979.
- PYSH, J.J.; WEISS, G.M. Exercise during development induces and increases in Purkinje cell dendritic tree size. *Science*, v. 206, p. 230-231, 1979.
- RA, S.; KIM, H.; JANG, M.; SHIN, M.; LEE, T.; LIM, B.; KIM, E.; KIM, K.; KIM, S. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Neurosc.* V. 333, p. 123-126, 2002.
- RABBO, M.P.S. Estresse Oxidativo Cardíaco e Hepático em distintas frequências de exercício físico em rato. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 24-25.

- RADÁK, Z.; KANECO, T.; TAHARA, S.; NAKATO, H.; PUCSOK, J.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C. E
GOTO, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative
damage in rat brain. *Neurochemistry International*, v. 38, p. 17 – 23, 2001.
- ROLAND, P.E.; MEYER, E.; SHIBASAKI, T.; Yamamoto, Y.L.; THOMPSON, C.J. Regional
cerebral blood flow changes in cortex and basal ganglia during voluntary
movements in normal human volunteers. *J. Neurophysiol.*, v. 48, p. 467-480, 1982.
- RUSSEL, J.C.; EPLING, W.F.; PERCE, D.; AMY, R.M.; BOER, D.P. Induction of voluntary
prolonged running by rats. *J. Appl. Physiol.* V. 63, p. 2549-2553, 1987.
- RUSO-NEUSTADT, A.; BEARD, R.C.; COTMAN, C.W. Exercise, antidepressant
medications, and enhanced brain-derived neurotrophic factor expression.
Neuropsychopharmacology. V. 21, p. 679-682, 1999.
- RUSO-NEUSTADT, A.; BEARD, R.C.; COTMAN, C.W. Physical activity and
antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived
neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience*. V. 101, p.
305-312, 2000.
- SACCO, R.L.; GAN, R; BODEN-ALBALA, B; LIN, I-F.; KARGMAN, D.E.; HAUSER, W. A;
SHEA, S.; PAIK, M.C. Leisure-Time Physical Activity and Ischemic Stroke Risk: The
Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*. v. 29, p. 380-387, 1998.
- SALMON, P. Effect of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a
unifying theory. *Clinical Psychology Review*, v. 21, n° 1, p. 33-61, 2001.
- SAPOLSKY RM, UNO H, REBERT CS, FINCH CE. Hippocampal damage associated with
prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*. v. 10, p. 2897-902, 1990.

- SCHACTER, E.; WILLIAMS, J.A.; STADMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins IN: PUNCHARD, N.; FELLY, F.J. (ed) Free radicals a practical approach, Oxford: IRL Press, p. 159-170, 1996.
- SCHMIDT – KASTNE, R.; FREUD, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, v. 40, p. 599-636, 1991.
- SERVAIS, S. COUTURIER, K.; KOUBI, H.; ROUANET, J.L.; DESPLANCHES, D.; SORNAY-MAYET, M.H.; SEMPORE, B.; LAVOIE, J.M.; FAVIER, R. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal, and intermyofibrillar mitochondria, *Free Radical Biology & Medicine*. V. 35, p. 24-32, 2003.
- SHACTER, E.; WILLIAMS, J.A.; STADMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins IN: PUNCHARD, N.; FELLY, F.J. (ed) Free radicals a practical approach, Oxford: IRL Press, p.159-170, 1996.
- SHIRAYAMA Y, CHEN AC, NAKAGAWA S, RUSSELL DS, DUMAN RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. v. 22, p. 3251-61, 2002.
- SIESJO, B.K. AGARDH CD, BENGTSSON F. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, v. 1(3), p. 165-211, 1989.
- SIESJO, B.K. *Brain Energy Metabolism*, John Wiley ed. New York, 1978.
- SIMON, R.P.; GRIFFITHS, T.; EVANS, M.C.; SWAN, J.H.; MELDRUM, B.S. Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J. Cereb Blood Flow Metab.* v. 4, p. 350-361, 1984.
- SIQUEIRA, I.R.; CIMAROSTI, H.; FOCHESTATTO, C.; NUNES, D.S.; SALBEGO, C.; ELISABETSKY, E.; NETTO, C.A. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sciences*, *in press*, 2004.

- SIUCIAK, J.A.; LEWIS, D.R.; WIEGAND, S.J.; LINDSAY, R.M. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav.* V. 56, p. 131-7, 1997.
- SMITH, M.A.; MAKINO, S.; KVETNANSKY, R.; POST, R.M. Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann NY Acad Sci.* V. 771, p. 234-9, 1995.
- SMITH, M.A. Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factor. *Behav Brain Res.* v. 78, p. 25-36, 1996.
- SMITH, M.L.; AUER, R.N.; SIESJO, B.K. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2- 10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathologica*, v. 64, p. 319-332, 1984.
- SOMANI, S.M.; HUSAIN, K.; SCHLORFF, E.C. Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In: Baskin S.I., Salem H., editors. *Oxidants, Antioxidants and Radicals*. Washington: Taylor and Francis, p. 125-143, 1997.
- SOTHMANN, M.S.; BUCKWORTH J.; CLAYTON, R.P.; COX, R.H.; WHITE-WELKLEY, J.E.; DISHMAN, R.K. Exercise training and the cross-stressor adaptation hypothesis. *Exercise Sport Sci Rev.* V. 24, p. 267-287, 1996.
- SQUIRE, L.R. The neuropsychology of human memory. *Annual Review of neurosciences*, v. 5, p. 241-273, 1982.
- STRIGGOW, F.; RIEK, M.; BREDER, J.; HENRICH-NOACK, P.; REYMANN, K.G.; REISER, G. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 97, p. 2264-2269, 2000.

- STUMMER, W.; WBWE, K.; TRAMER, B.; BAETHMANN, A. E KEMPSKI, O. Reduced Mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke*, vol. 25, p. 1862-1869, 1994.
- SUZUKI, M.; KATAMINE, S.; TATSUMI, S. Exercis-induced enhancement of lipid peroxid metabolism in tissues and their transference into brain in rat. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. V. 29, p. 141-151, 1983.
- TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; VALENTIM, L.; SALBEGO, C. Profile of phosphoprotein labeling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport* v. 12, p. 2705-2709, 2001.
- TAYLOR, C.P.; BURKE, S.P.; WEBWE, M.L. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *J. Neurosci. Methods* v. 59, p. 121-128, 1995.
- THARP, G.D.; CARSON, W.H. Emotionality changes in rats following chronic exercise. *Med. Sci. Sports*. V. 7, p. 123-126, 1975.
- VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* v. 2, p. 266-270, 1999.
- VENTIMIGLIA, R.; MATHE, R.P.; JONES, B.; LINDSAY, R. The neurotrophins BDNF, NT-3, NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* v. 7, p. 213-222, 1995.
- VISSING, J.; ANDERSEN, M. DIEMER, N.H. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilizton in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab*, v. 16, p. 729-736, 1996.

- VOLPE, B.T.; PULSINELLI, W.A.; DAVIS, H.P. Amnesia in humans and animals after ischemic cerebral injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 444, p. 492-492, 1985.
- VORNOV, J.J.; TASKER, R.; COYLE, J. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke* v. 25, p. 457-464, 1994.
- WANNAMETHEE, S.G.; SHAPER, A. Gerald. Physical activity and the prevention of stroke. *J. Cardiovasc. Risk*. V. 6, p. 213-216, 1999.
- WEBER, J.C.; LEE, R.A. Effects of differing prepuberty exercise programs on the emotionality of male albino rats. *Am. Assoc. Health Phys. Ed. Rec. Res.* v. 39, p. 748-751, 1968.
- WILDE, G.J.; PRINGLE, A. K.; WRIGHT, P.; IANOTI, F. Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J. Neurochem.* V. 69, 883-886, 1997.
- WILMORE, J.H.; COSTIL, D.L. *Fisiologia do Esporte e do Exercício*. 2ª Edição, Editora Manole, São Paulo, 2001.
- YAGI, K. Simple procedure for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. In: Armstrong D. (ed.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 108: Free radical and Antioxidant Protocols, Humana Press Inc, Totowa, NJ, p. 101-106, 1998.
- YANG, Y.R.; WANG, R.Y.; WANG, P.S.G. Early and treadmill training after brain ischemia in rats. *Neuroscience Letters*, v. 339, p. 91-94, 2003.
- YUAN, J.L.; YANKNER, B. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. V. 407, p. 802-9, 2000.
- ZHANG, R.L.; CHOPP, M.; LI, Y.; ZALOGA, C.; JIANG, N.; JONES, M.L.; MIYASAKA, M.; WARD, P.A. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* v. 44, p. 1747-1751, 1994.