

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Efeitos do Exercício Físico Intenso e da Suplementação de N-acetilcisteína e Deferoxamina sobre os Marcadores de Estresse Oxidativo e do Metabolismo Energético em Cérebro de Camundongos

Aderbal Silva Aguiar Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador:
Dr. Ricardo Aurino de Pinho

Criciúma – SC
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Efeitos do Exercício Físico Intenso e da Suplementação de N-acetilcisteína e Deferoxamina sobre os Marcadores de Estresse Oxidativo e do Metabolismo Energético em Cérebro de Camundongos

Aderbal Silva Aguiar Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador:
Dr. Ricardo Aurino de Pinho

Criciúma – SC
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A282e Aguiar Júnior, Aderbal Silva.

Efeitos do exercício físico intenso e da suplementação de N-acetilcisteína e deferoxamina sobre os marcadores de estresse oxidativo e do metabolismo energético em cérebro de camundongos / Aderbal Silva Aguiar Júnior ; orientador : Ricardo Aurindo de Pinho. – Criciúma : Ed. do autor, 2006. 144 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense. Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2006.

1. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos. 2. Sistema nervoso – Degeneração. 3. Estresse oxidativo. 4. Antioxidantes. 5. Metabolismo energético I. Título.

CDD. 21ª ed. 613.71

Bibliotecária: Flávia Cardoso – CRB 14/840
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



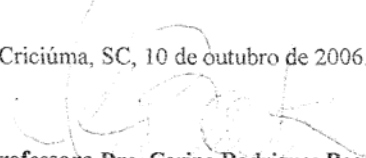
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Diretoria de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

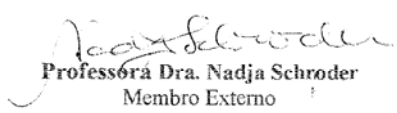
PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **ADERBAL SILVA AGUIAR JÚNIOR**, sob o título: "**Efeitos do exercício físico intenso e da suplementação de N-acetilcisteína e deferoxamina sobre os marcadores de estresse oxidativo e do metabolismo energético em cérebro de camundongos**", para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Criciúma, SC, 10 de outubro de 2006.


Professora Dra. Carina Rodrigues Boeck
Membro Relator


Professora Dra. Nadja Schroder
Membro Externo


Professor Dr. Ricardo Aurino de Pinho
Presidente da Banca e Orientador

Se vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.

Isaac Newton

Carta a Robert Cooke – 1676

AGRADECIMENTOS

Ao longo de todo projeto, recebi o apoio dos membros do Lafibe: Luciano, Paulo, Cléber, Luís Gustavo, Fernanda e em especial da Talita, na realização dos 2 experimentos envolvendo desde o treinamento até os ensaios de laboratório. Agradeço também ao César e Dunga, juntamente ao Prof. Dr. Emílio, pelo auxílio no experimento da COX, assim como ao Prof. Dr. João Quevedo e ao pessoal de Porto Alegre pelo ensaio do BDNF.

O meu agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo, pela condução do trabalho nestes dois anos e por proporcionar uma total mudança de planos na minha vida, para melhor.

Agradeço aos meus pais, por também me apoiarem neste projeto, que com certeza foi um dos mais difíceis.

Agradeço especialmente minha namorada Ana Elisa, pelo amor e pela compreensão da distância.

RESUMO

Disfunção mitocondrial, danos oxidativos e decréscimo nos níveis de BDNF (fator de crescimento derivado do cérebro) são mecanismos patológicos comuns do envelhecimento cerebral e da neurodegeneração. A atividade física geralmente protege o cérebro de estresse oxidativo e promove neuroproteção induzida pela BDNF causando aumento da plasticidade sináptica e da função cognitiva. Entretanto, existem conflitos entre a grande produção de radicais livres induzidos pelo exercício e os benefícios do mesmo, em relação às neurotrofinas e ao metabolismo oxidativo cerebral. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do exercício de intensidade moderada a forte no estado redox do estriado e hipocampo de camundongos, associado à suplementação de n-acetilcisteína (NAC), deferoxamina (DFX), ou uma combinação de ambos no experimento I; enquanto no experimento II foi investigar os efeitos do treinamento físico intenso na atividade da citocromo c oxidase (COX) e nos níveis de BDNF e lipoperoxidação (TBARS) no córtex cerebral de camundongos. Primeiramente, quarenta e cinco camundongos adultos machos C57BL-6F foram divididos randomicamente em cinco grupos: controle não treinado e não suplementado, exercício sem suplementação de NAC ou DFX, exercício com suplementação de NAC, exercício com suplementação de DFX, e exercício com suplementação de NAC e DFX. A suplementação foi realizada durante o mesmo período do treinamento, doze semanas. Segundo, vinte e sete camundongos adultos machos CF-1 foram divididos em três grupos: controle sem treinamento, exercício intermitente (3x15 min/dia), e exercício contínuo (45 min/dia) durante oito semanas. Nos dois experimentos, os camundongos foram sacrificados 48 h após a última sessão de treinamento. O estriado e o hipocampo foram retirados para o experimento I e o córtex cerebral foi dissecado para o experimento II, sendo imediatamente congelados a -80°C para posterior análise. O lactato sanguíneo foi determinado na primeira e última sessão de treinamento e o músculo sóleo foi isolado para determinação da atividade da enzima citrato sintase (CS), em ambos os experimentos (I e II). O experimento I analisou TBARS, oxidação de proteínas (carbonil) e a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase no estriado e hipocampo. O experimento II analisou TBARS, BDNF e atividade da COX no córtex cerebral. A atividade CS do sóleo demonstrou adaptação ao exercício e o lactato sanguíneo indicou que o exercício foi de intensidade moderada a forte. O experimento I demonstrou que o exercício intenso induz danos oxidativos a lipídios e proteínas no estriado e hipocampo e que a suplementação antioxidante de NAC e DFX promovem neuroproteção contra o dano oxidativo. O experimento II demonstrou que o exercício intenso causa disfunção mitocondrial no córtex cerebral de camundongos e diminui a concentração de BDNF no córtex dos camundongos. Concluímos que o exercício físico intenso causa danos oxidativos no cérebro de camundongos, e a suplementação antioxidante de NAC e/ou DFX ameniza estes danos. O exercício intenso também causa disfunção mitocondrial cerebral e diminuição dos níveis de BDNF no cérebro de camundongos.

Palavras chave: exercício físico; estresse oxidativo; citocromo c oxidase; BDNF; N-acetilcisteína; deferoxamina.

ABSTRACT

Mitochondrial dysfunction, oxidative damage and decreased BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) levels are common pathological mechanisms of brain aging and neurodegeneration. Physical activity generally enhances synaptic plasticity and cognitive function by protection against neuronal oxidative stress and improves neuroprotection induced by BDNF. However, there are conflicts between the beneficial effects of free radical overproduction induced by intense exercise in neurotrophins and brain oxidative metabolism. The objective of this study was analyze the effects of moderate-intense exercise on brain redox status of striatum and hippocampus, associated to supplementation of N-acetylcysteine (NAC), deferoxamine (DFX) or a combination of both in experiment I; whereas in the experiment II was investigate the effects of intense physical training on BDNF levels, cytochrome c oxidase (COX) activity, and lipid peroxidation levels (TBARS) on mice brain cortex. First, forty-five C57BL-6F adult male mice were randomly assigned to 5 groups designated: control untrained and not supplemented, exercise not supplemented, exercise with NAC supplementation, exercise with DFX supplementation, and exercise with NAC plus DFX supplementation. The supplementation was performed on the same period of training during twelve weeks. Second, twenty-seven albino adult male CF1 mice were assigned to 3 groups: control untrained, intermittent exercised (3 x 15 min) and continuous exercised (45 min) during eight weeks. In the two experiments, mice were sacrificed 48h after last exercise session and their striatum and hippocampus to experiment I and brain cortex to experiment II were desiccated and immediately stored at -80°C for posterior analyses. Blood lactate levels were determined on the first and the last session of exercise and soleus muscle was isolated to assay citrate synthase (CS) activity in the two experiments. Experiment I analyzed lipid peroxidation (TBARS), protein oxidation (Carbonyl) and the activities of catalase and superoxide dismutase enzymes in striatum and hippocampus. Experiment II analyzed TBARS, BDNF and COX activity in brain cortex. Soleus CS activity showed exercise adaptation and blood lactate indicates a moderate to high intensity of exercise. Experiment I showed that intense exercise induces TBARS and protein carbonylation in striatum and hippocampus and the antioxidant supplementation of NAC and DFX promotes neuroprotection against this oxidative damage. Experiment II showed that intense exercise promotes mitochondrial dysfunction in mice brain cortex. We conclude that intense physical exercise promotes oxidative damage in brain mice, and the NAC and/or DFX antioxidant supplementation inhibit this damage. The intense exercise also promotes mitochondrial dysfunction and decrease in BDNF levels of brain mice.

Key words: physical exercise; oxidative stress; cytochrome c oxidase; BDNF; n-acetylcysteine; deferoxamine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RR – risco relativo.

$\dot{V}O_{2max}$ – volume tissular máximo de captação de oxigênio.

$\dot{Q}O_2$ – taxa celular de intercâmbio de Oxigênio.

$\dot{Q}CO_2$ – taxa celular de intercâmbio dióxido de carbono.

BDNF – *Brain Derived Neurotrophic Factor* (Fator de Crescimento Cérebro Derivado).

BDNF mRNA – *Brain Derived Neurotrophic Factor messenger RNA* (RNA mensageiro do Fator de Crescimento Cérebro Derivado).

TrkB – *Tyrosine Kinase* κ B (Receptor do BDNF).

TrkB mRNA – *Tyrosine Kinase* κ B mRNA (RNA mensageiro Receptor do BDNF).

SNC – Sistema Nervoso Central.

TMC – Taxa Metabólica Cerebral.

ATP – Adenosina Trifosfato.

PPTM – poros de permeabilidade transitória mitocondrial.

SUMÁRIO

PARTE I	12
CAPÍTULO 1	12
1. Introdução	13
1.1. Organização da dissertação	13
1.2. O Exercício.....	13
1.3. Exercício e Cérebro	16
1.4. Cérebro e Estresse Oxidativo	17
1.5. Objetivos	22
PARTE II	23
CAPÍTULO 2	24
EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE NO ESTADO REDOX CEREBRAL	24
Introdução.....	26
Modelos de Exercício Físico para Estudo do SNC.....	27
Exercício Físico e Neurotrofinas	29
Exercício e Estresse Oxidativo	32
Conclusão	38
Referências	38
CAPÍTULO 3	53
N-ACETYLCYSTEINE AND DEFEROXAMINE PREVENT BRAIN OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY MODERATE-INTENSE PHYSICAL EXERCISE IN ADULT MICE	53
1. Introduction	55
2. Results	56
3. Discussion	58
4. Experimental Procedure	61
5. Literature References.....	66
Tables	77
Figures.....	79
CAPÍTULO 4	85
MODERATE-INTENSE PHYSICAL EXERCISE INDUCES MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND DECREASES BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR LEVELS IN MICE BRAIN	85
INTRODUCTION.....	87
EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	89
RESULTS.....	93
DISCUSSION	94
REFERENCES.....	98
Tables	111
Figures.....	112
PARTE III	115
CAPÍTULO 5	116
DISCUSSÃO GERAL	116

CAPÍTULO 6	124
CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXOS	147

PARTE I
CAPÍTULO 1

1. Introdução

1.1. Organização da dissertação

A dissertação está organizada em três partes. A introdução encontra-se no capítulo 1 da parte I. A parte II está dividida em três capítulos (2, 3 e 4), apresentada na forma de artigos e normatizados de acordo com a revista ao qual foram submetidos. O capítulo 2 é uma revisão de literatura sobre os efeitos do exercício físico no sistema nervoso central, submetido à *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. O capítulo 3 avalia o efeito da suplementação de n-acetilcisteína e/ou deferoxamina sobre o estado redox do estriado e hipocampo de camundongos submetidos a um programa de doze semanas de corrida em esteira de forte intensidade, sendo este artigo submetido à *Brain Research*. O capítulo 4 analisa os danos oxidativos a lipídios, níveis de neurotrofinas e metabolismo energético no córtex de camundongos após oito semanas de corrida contínua e corrida intervalada de forte intensidade, submetido à *Neuroscience*. A parte III do trabalho abrange todos os artigos, sendo dividida em capítulo 5 para a discussão geral e capítulo 6 para as conclusões. As referências bibliográficas apresentadas nos itens que não aqueles referentes aos artigos estão presentes no final dessa dissertação.

1.2. O Exercício

Para a maioria dos animais, a mobilidade é essencial para a sobrevivência. Nos seres humanos, a atividade física está longe de significar apenas um meio de sobrevivência, mas também vem a ser um estilo de vida, recreação, e algumas vezes, um meio terapêutico. A

atividade física é um estresse fisiológico à homeostase e aos processos sistêmicos biológicos que exigem solicitações energéticas acima dos níveis de repouso (Hauswirth e Lehenaff, 2001; Stepto et al, 2001; Poehlman e Melby, 1998). Atualmente, sabe-se que a prática regular de atividade física está relacionada a menores índices de mortalidade (Cote, 2006; Carlsson et al, 2006; Klieman et al, 2006) e morbidade (Cooper et al, 2006; Chan et al, 2006; Makrilakis e Katsilambros, 2003) nas doenças crônico-degenerativas. A situação contrária – baixos níveis de atividade física – é um fator de risco modificável para doenças cardiovasculares e uma ampla variedade de doenças crônicas, incluindo Diabetes Mellitus (Miche et al, 2006; Sengupta, 2005; Jimenez, 1997), câncer (cólon e reto) (Hennessy et al, 2005; Swenson et al, 2005; Campbell et al, 2005), hipertensão arterial (Mazzeo e Tanaka, 2001), e depressão (Ernst, 2006; Duman, 2006). O risco relativo (RR) para doenças cardiovasculares causadas por estilo de vida sedentário está estimado em 1.9, comparado com outros fatores de risco modificáveis como a hipertensão (RR = 2.1) e tabagismo (RR = 2.5), mas a prevalência de baixos níveis de atividade física é muito maior (Ricciardi, 2005). Menos de 10% das mulheres acima de 75 anos são fumantes enquanto 75% são sedentárias (Warburton et al, 2006; deRuiter e Faulkner, 2006).

Quando a atividade física é realizada regularmente sua definição muda para exercício físico, pois o organismo adapta-se a este estímulo através de modificações morfológicas e funcionais, provocando o desenvolvimento do desempenho físico e benefícios à saúde em geral (Zaryski e Smith, 2005). Estas modificações ao exercício são maximizadas quando são utilizados princípios de treinamento físico, como os princípios da intensidade e volume de treinamento (Neary, 2004; Kraemer et al, 1998). Um dos princípios mais importantes do treinamento é o princípio da sobrecarga a ser aplicada, pois as adaptações do exercício físico seguem uma curva hiperbólica de dose-resposta (Nied e Franklin, 2002), individualizando os efeitos de acordo com a capacidade de realizá-lo. Dentre os fatores que compõe a sobrecarga

– intensidade e volume – a intensidade parece ser o mais importante determinando quase que isoladamente, a existência e a configuração – ou não – das adaptações ao treinamento. A intensidade do exercício físico também é um importante aspecto a ser identificado nos estudos experimentais. O volume tissular máximo de captação de oxigênio ($\dot{V}O_{2max}$) e o limiar de lactato são os indicadores de intensidade de exercício mais utilizados (Denadai, 2000).

As variáveis funcionais gerais do desempenho físico estão relacionadas com os biosistemas transformadores de energia química em energia mecânica e com as fontes energéticas que suprem a resíntese de ATP no músculo esquelético: vias aeróbias e glicolítica láctica e de fosfagênios de alta energia (fosfocreatina) (Korzeniewski e Zoladz, 2006; Shulman, 2005; Barnett et al, 2004). A participação destes diferentes tipos de metabolismo energético é um fenômeno contínuo e complexo, não dependendo apenas do que cada fibra muscular realiza e cada tipo de metabolismo energético, mas da integração muscular e sistêmica e, portanto, da simultaneidade das respostas dos diferentes sistemas e tecidos do organismo, todos dependentes da intensidade do exercício como anteriormente descrito. As comparações em relação às respostas agudas e crônicas ao exercício físico, dificilmente poderão ser caracterizadas, se não forem consideradas as cargas relativas de esforço máximo do indivíduo.

Muitas respostas fisiológicas causadas pelo treinamento físico são bem documentadas, ajustando as respostas metabólicas ao exercício físico e os índices basais de repouso, incluindo acréscimos no volume sistólico, no pico de $\dot{V}O_{2max}$, na taxa celular de intercâmbio de Oxigênio ($\dot{Q}O_2$) e dióxido de carbono ($\dot{Q}CO_2$) muscular (Plank et al, 2005; Volaklis e Tokmakidis, 2005; Zavorsky, 2000). A elevação da $\dot{Q}O_2$ e da $\dot{Q}CO_2$, por sua vez, exige complexos ajustes nos dois principais sistemas envolvidos na captação e transporte de gases: o sistema respiratório propriamente dito e o sistema cardiovascular (Barbanti, 2000). Recentemente, a expressão gênica dos músculos esqueléticos demonstrou reprogramação

nuclear com acréscimo nos processos de transcrição gênica e sinalização celular pós-exercício (Fluck e Hoppeler, 2003; Hargreaves e Cameron-Smith, 2002; Pilegaard et al, 2000). No fígado, a sinalização celular exercício-induzido nos hepatócitos estimula a oxidação e inibe a síntese de lipídios em pacientes com disfunção hepática (Lavoie e Gauthier, 2006) e geralmente aumenta a ação e sensibilidade da insulina no fígado (Katsanos, 2004; Bergasa e Mehlman, 2005; Kahn, 1990). Mas até recentemente, os efeitos do exercício físico no SNC tem sido amplamente inexplorados ou extrapolados de outros sistemas.

1.3. Exercício e Cérebro

A suspeita de que exercícios moderados aumentam a cognição é antiga, e recentemente, foi demonstrado que o cérebro é responsivo a atividade física (Arida et al, 2004; Cotman e Berchtold, 2002; Kramer et al, 1999; Fordyce e Farrar, 1991). Existem evidências dos benefícios da atividade física na prevenção e tratamento após dano cerebral (Mattson, 2000) e em doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (Scandalis et al, 2001; Reuter et al, 1999) e a Doença de Alzheimer (Wolf et al, 2006; Adlard et al, 2005). Estudos sugerem que muitas dessas mudanças ocorrem em áreas cerebrais específicas de funções importantes como a memória de longo termo (Huang et al, 2006; Van Praag et al, 1999a) e prevenção do declínio cognitivo durante o envelhecimento (Laurin et al, 2001). Estudos demonstraram neurogênese e plasticidade cerebral no hipocampo (Lee et al, 2006; Yu et al, 2003; Van Praag et al, 1999b) induzidas especificamente por famílias de moléculas neurotróficas (Briones, 2006; Redila e Christie 2006).

Como o exercício físico aumenta a atividade metabólica no organismo e conseqüentemente o consumo de oxigênio, o interesse pelos seus efeitos no SNC aumenta por uma série de características próprias deste tecido. A intensidade do exercício físico é regulada

continuamente com comandos *feedforward* do cérebro em respostas ao *feedback* da atividade sistêmica periférica e de fatores ambientais ao exercício físico (Gibson et al, 2005). O SNC é um órgão muito sensível ao estresse oxidativo, devido a fatores neuroanatômicos e neuroquímicos, um dos aspectos que contribuem na patogênese e na alta incidência de doenças neurodegenerativas (Infanger et al, 2006; Iczkiewicz et al, 2006; Johannesson et al, 2003). Aqui se cria um paradigma, por um lado o exercício físico aumenta a captação de oxigênio tissular de acordo com a intensidade do exercício e automaticamente sua produção de radicais livres, com forte potencial oxidativo a biomoléculas, principalmente em órgão mais suscetíveis, como o cérebro. Por outro lado, existem fortes evidências de acréscimos na função cerebral relacionadas à prática regular de atividade física (Huang et al, 2006; Van Praag et al, 1999a). Nossa hipótese é que o limite entre as adaptações anabólicas e a ocorrência de danos ao exercício físico no SNC seja estabelecida pela intensidade do estresse aplicada ao organismo induzido pelo exercício.

1.4. Cérebro e Estresse Oxidativo

O cérebro representa aproximadamente 2% da massa corporal, mas a Taxa Metabólica Cerebral (TMC) de O₂ (TMC_{O₂}: 5 ml/min/100g) e glicose (TMC_{glu}: 31 μMol/min/100g) representa respectivamente 20 e 25% do consumo total do organismo em repouso. O débito sanguíneo cerebral, conseqüentemente, é elevado: 14-20% do débito sanguíneo ao repouso (Ter-Minassian, 2006). Este metabolismo energético está bem evidenciado pela contínua atividade de comunicação intercelular neuronal, mantido pelo alto metabolismo glicêmico, através de pequenos estoques de carboidratos e fosfatos de alta energia, sem estoques de oxigênio (Calabrese et al, 2005).

Embora a principal função da mitocôndria seja a produção de energia nas células, mitocôndrias isoladas também geram espécies reativas de oxigênio (EROs) nos cinco complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial – Complexo I (NADH ubiquinona óxido-redutase), II (succinato ubiquinona óxido-redutase), III (ubiquinona-citocromo c redutase), IV (citocromo c oxidase), e V (ATP sintase). A liberação de EROs soma um estimado de 1 a 5% do oxigênio consumido durante a respiração (Leeuwenburgh e Heinecke, 2001). O SNC é mais suscetível a danos oxidativos, pois apresenta grande atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, associada à elevada concentração de ferro livre e lipídios poli-insaturados, e baixos níveis de glutatona e enzimas antioxidantes (Behl, 2005; Coskun et al, 2005; Özkaya et al, 2002; Sen and Packer, 2000). O cérebro tem 3% da glutatona peroxidase e 1% da catalase do fígado. A glutatona é precursora de enzima antioxidante glutatona peroxidase (Jain et al, 1991). Os gânglios da base, córtex frontal (Jellinger et al, 1990) e hipocampo (Nunez-Millacura et al, 2002; Vornov et al, 1998) têm alta concentração de ferro, o que se torna potencialmente tóxico ao SNC em situações de estresse oxidativo (Bostanci et al, 2006; Liu et al, 2003).

A principal forma de armazenamento de ferro no cérebro é na forma orgânica leve e não-reativa L-ferritina, que estabiliza o complexo oxidante ferro-catalizado, promovendo armazenamento duradouro de ferro (Kaur et al, 2003; Beard, 2001). Ferro no SNC é importante em processos metabólicos como a síntese protéica, de DNA e RNA, como co-fator de algumas enzimas heme e não-heme, na formação da mielina, e no desenvolvimento da árvore dendrítica neuronal (Gerlach et al, 1994). Os gânglios da base e os núcleos rubro e dentado têm alta concentração de ferro imunoreativo. O metabolismo alterado deste íon nas suas formas transicionais ferrosa (Fe^{+2}) e férrica (Fe^{+3}) tem forte potencial oxidante pela geração de radicais hidroxil (OH^*) com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de Fenton/Haber-Weiss (Kaur et al, 2003; Matarredona et al, 1997; Gerlach et al, 1994; Connor e

Benkovic, 1992). A administração de drogas neurotóxicas dopaminérgicas como 6-hidroxi-dopamina e 1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) induzem liberação de íons ferro e conseqüentemente a formação de oxirradicais que induzem neurodegeneração estriatal (Grunblatt et al, 2000; Gerlach et al, 1994).

A glutatona é um agente tiol antioxidante e potente scavenger de radicais livres (Hicdomez et al, 2006). Muitas enzimas requerem tióis essenciais à manutenção de seu estado redox. A oxidação de muitos tióis pode inativar de modo reversível ou irreversível estas enzimas. O acúmulo de GSSG (Glutaciona Oxidada) é tóxico para a célula, pois pode desencadear ligações cross-link dissulfidas a proteínas, enzima e DNA. (Banerjee et al, 2003).

Altas concentrações de espécies reativas podem inibir a cadeia transportadora de elétrons, gerando uma disfunção mitocondrial com decréscimo da produção de ATP, e também com oxidação de biomoléculas, alteração da homeostase do cálcio celular e das organelas intracelulares (Kadenbach et al, 2004; Turrens, 2003; Di Giovanni et al, 2001), e abertura dos poros de permeabilidade mitocondriais, um evento associado à disfunção mitocondrial e neurodegeneração (Calabrese et al, 2001; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001).

Um dos maiores consumidores de ATP nos neurônios são as bombas ativas de transporte ATPase Ca^{+2} -dependente envolvidas no transporte axonal, em vários mecanismos dependentes de fosforilação oxidativa, e de sinalização celular como liberação de neurotransmissores, dinâmica do citoesqueleto, e regulação da expressão gênica (Mattson e Liu, 2002). Liberação de cálcio, como as induzidas por neurodegeneração e estresse oxidativo, aumenta a permeabilidade mitocondrial interna pela formação e abertura de poros de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM). A abertura do PPTM dissipa gradientes protéicos entre citoplasma e matriz mitocondrial, causa diminuição do potencial eletroquímico e prejuízo à formação de ATP, e finalmente um inchaço mitocondrial osmótico que acaba provocando a ruptura da membrana externa mitocondrial. Esta ruptura mitocondrial libera no

citoplasma íons e moléculas pró-apoptose, como a citocromo-c-oxidase, Smac/DIABLO, apaf-1, e algumas caspases (Torneró et al, 2002).

A abordagem das desordens de transdução do sinal neuronal é difícil sem uma determinação seu metabolismo energético (Ter-Minassian, 2006) e de seu estado redox. Assim, muitos autores analisam as conseqüências deletérias das disfunções mitocondriais, possivelmente associadas a desequilíbrios do estado redox, no envelhecimento e na patogênese de doenças neurodegenerativas. Estudos demonstram que prejuízos ao metabolismo energético e produção de oxiradicais contribuem para processos neurodegenerativos (Mattson e Liu, 2002). Na Doença de Parkinson, incluem o estresse oxidativo (Adams et al, 2001; Halliwell, 1992, Jenner, 1991), o envolvimento da homeostase de metais (Chinta et al, 2005), alterações relacionadas ao envelhecimento (Floor, 2000) e ao suporte anabólico de neurotrofinas (Dluzen, 2004; Knott et al, 2002) que aumentem a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos. A hipótese patogênica mais aceita para a Doença de Alzheimer (AD) envolve neurotoxicidade à progressiva formação de proteína A β -amilóide condensada em placas (Mattson, 2000), produção de EROs e disfunção mitocondrial (Cash et al, 2002), também associada ao metabolismo férrico (Shoham e Youdim, 2000).

Estas evidências destacam a importância de um eficiente sistema antioxidante e neurotrófico para preservação da função mitocondrial do tecido nervoso. Como visto anteriormente, a atividade física melhora a atividade antioxidante cerebral e induz a produção e expressão de neurotrofinas e de seus receptores. Estes achados elegem a prática de atividade física como um potencial agente neuroprotetor/terapêutico para o envelhecimento e neurodegeneração. Evidências apontam que animais fisicamente ativos possuem melhores defesas antioxidantes e níveis de neurotrofinas no SNC do que animais inativos fisicamente (Jolita et al, 2006; Ogonovszky et al, 2005; Radák et al, 2001). Quando o exercício é realizado em intensidades mais altas, ele está associado a maior produção de radicais livres,

pelo maior consumo mitocondrial de oxigênio nos tecidos (Sastre et al, 1992; Davies et al, 1982). O estresse oxidativo pode ser corrigido hipoteticamente por suplementação, como quelantes para a supressão de EROs ferro-dependente do SNC, que desempenham um importante papel neuroprotetor além de promover ganhos funcionais cerebrais (Matarredona et al, 1997), e a administração de N-acetilcisteína que previne danos oxidativos e isquêmicos cerebrais assim como ameniza efeitos tardios dos mesmos (Hicdomez et al, 2006; Arakawa et al, 2006; Yi et al, 2006).

Existem evidências sobre a promoção da saúde e função do SNC pela atividade física leve e suplementação antioxidante. Mas geralmente a atividade física de alta intensidade é pró-oxidante nos tecidos, logo, neste estudo associamos suplementação antioxidante ou periodização intervalada. Como investigamos vias envolvidas na neuroproteção induzida pela BDNF e a via neurotóxica do estresse oxidativo, optamos por realizar dois experimentos distintos, para compreender os mecanismos de estresse oxidativo, atividade mitocondrial e produção de neurotrofinas no córtex cerebral, hipocampo e estriado de camundongos submetidos a um programa de exercícios de alta intensidade.

1.5. Objetivos

O objetivo deste estudo é investigar os efeitos do exercício físico, de frequência contínua e intervalada, de intensidade moderado-alta, versus suplementação de antioxidantes sobre o estresse oxidativo envolvendo espécies reativas de oxigênio, produção de neurotrofinas e metabolismo energético no córtex, hipocampo e estriado do cérebro de camundongos.

Os objetivos específicos são:

- Verificar os efeitos de doze semanas de treinamento físico em esteira, na atividade das enzimas Catalase e Superóxido Dismutase, e nos níveis de danos oxidativos, no estriado e hipocampo dos camundongos.
- Verificar os efeitos da n-acetilcisteína e deferoxamina como suplementação antioxidante, na atividade das enzimas Catalase e Superóxido Dismutase, e nos níveis de danos oxidativos, no estriado e hipocampo dos camundongos, após doze semanas de treinamento físico em esteira.
- Avaliar a atividades da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, no córtex cerebral dos camundongos, após oito semanas de treinamento físico em esteira.
- Avaliar os níveis de BDNF (fator de crescimento cérebro-derivado), no córtex cerebral dos camundongos, após oito semanas de treinamento físico em esteira.

PARTE II

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE NO ESTADO REDOX CEREBRAL

Aderbal S. Aguiar Jr¹, Ricardo A. Pinho^{1*}

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Medicina do Esporte

Resumo

A atividade física é conhecida por promover saúde e bem-estar. O exercício também é responsável por aumentar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) pelo acréscimo do consumo de oxigênio mitocondrial nos tecidos. O desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas oxidantes dos tecidos pode provocar danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA. O dano oxidativo cerebral é um mecanismo etiopatológico comum da apoptose e da neurodegeneração. O fator de crescimento cérebro-derivado desempenha um importante papel neste contexto. Nesta revisão, apresentamos os resultados de diferentes modelos de exercício físico no metabolismo oxidativo e neurotrófico do Sistema Nervoso Central (SNC). Nós também revisamos estudos que utilizaram suplementação antioxidante para prevenir danos oxidativos exercício-induzido ao SNC. Os modelos de exercício físico mais comuns foram: rodas de correr, a natação e a esteira com configurações de treinamento muito diferentes como a duração e a intensidade. Os resultados do treinamento físico no tecido cerebral são muito controversos, mas geralmente demonstram ganhos na plasticidade sináptica e na função cognitiva com exercícios de intensidade moderada e baixa.

Palavras-chave: atividade física, estresse oxidativo, antioxidantes, neurotrofinas, cérebro.

Abstract

Physical activity is known to improve health and well-being. Exercise is also responsible for increasing Reactive Oxygen Species (ROS) production by increased mitochondrial oxygen consumption causing tissue oxidative stress. The imbalance between ROS production and tissue antioxidant defenses can promote oxidative damage in proteins, lipids and DNA. Brain oxidative damage is a common etiopathology mechanism of apoptosis and neurodegeneration. The brain derived neurotrophic factor plays an important role in this context. In this review, we showed the results of different models and configurations of physical exercise in oxidative and neurotrophic metabolism of Central Nervous System (CNS). We also reviewed the

studies that utilized antioxidant supplementation to prevent oxidative damage exercise-induced to CNS. The physical exercise models more common were running wheel, swimming and treadmill with very different configurations of physical training such duration and intensity. The results of physical training on brain tissues are very controversial, but generally showed improves in synaptic plasticity and cognition function with exercise of low and moderate intensity.

Key-words: physical activity, oxidative stress, antioxidants, neurotrophin, brain.

Introdução

As neurociências introduziram uma variedade de novos conceitos neurológicos e novos métodos científicos de investigação do sistema nervoso associando à discussão de fatores de estresse físico e ambiental, como o exercício físico (Cotman et al, 2005). Mesmo com as evidências dos benefícios à saúde em geral da prática regular de exercício físico, em pessoas saudáveis e em diversas doenças como diabetes melitus, asma, obesidade, hipertensão, artroses e artrites (Warburton et al, 2006; Acikgoz et al, 2006; Monzillo, et al 2003); os efeitos do exercício no cérebro ainda apresentam resultados controversos.

Acredita-se que exercícios moderados aumentam a cognição, sendo que recentemente foi demonstrado que o cérebro é responsivo a atividade física (Arida et al, 2004; Cotman e Berchtold, 2002; Kramer et al, 1999; Fordyce e Farrar, 1991). Isso quer dizer que a atividade física apresenta potencial na prevenção e tratamento de dano cerebral (Mattson, 2000) e em doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (Scandalis et al, 2001; Reuter et al, 1999) e a Doença de Alzheimer (Wolf et al, 2006; Adlard et al, 2005). Estudos apóiam que muitas dessas mudanças ocorrem em áreas específicas de funções cerebrais importantes como a memória de longo termo (Huang et al, 2006; Van Praag et al, 1999a) e prevenção do

declínio cognitivo durante o envelhecimento (Laurin et al, 2001). Estudos demonstram evidências sobre neurogênese e plasticidade cerebral (Lee et al, 2006; Yu et al, 2003; Van Praag et al, 1999b) induzidas especificamente por famílias de moléculas neurotróficas (Briones, 2006; Redila e Christie 2006), mas os mecanismos destas modificações permanecem desconhecidos.

A maioria das pesquisas com o objetivo de estudar os mecanismos de adaptação neurológica ao exercício envolve pesquisas com modelos animais, pela possibilidade de avaliação in vivo do tecido nervoso (Dietrich et al, 2005; Carmichael et al, 2005; Kaspar et al, 2005; Che et al, 2005). Estudos envolvendo seres humanos avaliam de modo indireto a função cerebral principalmente por ressonância nuclear magnética (Caglar et al, 2005; Ito et al, 2005), eletrofisiologia (Crabbe e Dishman, 2004), neuroendocrinologia (Lanfranco et al, 2003) e escalas de função cerebrais (Hatta et al, 2005).

Modelos de Exercício Físico para Estudo do SNC

Os roedores são os principais modelos animais de estudo para os paradigmas do exercício físico nas funções cerebrais e seus mecanismos, e os dois principais modelos de atividade física são: (1) atividades voluntárias como atividades em rodas de correr (Pang et al, 2006; Zheng et al, 2006; Tong et al, 2001; Brown et al, 1973) e ambientes enriquecidos (Lewis, 2004; Burghardt et al 2004; Kleim et al 2003; Kempermann et al, 1997), e (2) exercícios forçados como natação (Ding et al, 2006; Albeck et al, 2006; Inal et al, 2001; Ostman e Nyback, 1976) e esteira (Ploughman et al, 2005; Carro et al, 2001; Kishorchandra et al, 1987; McRae et al, 1987; Brown et al, 1979). Estes modelos geralmente visam estimular respostas a um treinamento com predominância do metabolismo aeróbico, pois este tipo de exercício está associado a benefícios a saúde em geral.

Os ambientes enriquecidos são uma referência às gaiolas padrão, sendo uma série de diferentes estímulos aos animais, como acessos a rodas de correr, vivência em grupos, e ambientes complexos contendo brinquedos, túneis, e freqüentes mudanças na localização da comida, sendo geralmente acompanhado de ganhos na função cerebral, principalmente os associados à aprendizagem e à memória (Will et al, 2004). A roda de correr é uma atividade física intermitente circadiana (Arida et al, 2004), voluntária, de livre acesso (Cotman et al, 2005) que permite a corrida a uma velocidade auto-determinada. A velocidade espontaneamente escolhida corresponde ao nível de eficiência bioenergética ideal no plano do metabolismo oxidativo (Casillas, 2001).

As atividades forçadas obrigam os animais a realizarem o exercício físico em maiores intensidades, ou seja, maiores solicitações energéticas. A natação forçada permite selecionar sobrecargas de exercício através de percentual da massa corporal do corpo do animal como 3% ou 6%, e impõe menor estresse mecânico devido à pressão da água, recrutando diferentes grupos musculares e reduzindo os efeitos da gravidade (Jolitha et al, 2006).

A corrida em esteira ativa as respostas neuroendócrinas de estresse e obriga o animal a correr em uma velocidade constante, de acordo com as configurações de treinamento físico do experimento: tempo, duração, velocidade (Arida et al, 2004) e inclinação (Dohm et al, 2001; Lighfoot et al, 2001). A corrida em esteira é geralmente selecionada devido às maiores respostas do metabolismo aeróbio do que a natação (Liu et al, 2000), pois esta é caracterizada por relativa inatividade das patas traseiras (Kaplan et al, 1994). O treinamento de intensidade controlada em esteira induz alguns dos maiores e mais consistentes efeitos do treinamento físico (Kemi et al, 2002; Wisløff et al, 2001).

Exercício Físico e Neurotrofinas

As neurotrofinas são uma família de citocinas essenciais para a diferenciação, crescimento e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, colinérgicos e noradrenérgicos do SNC e de neurônios simpáticos e sensoriais do Sistema Nervoso Periférico (SNP) durante a vida adulta (Mattson et al, 2004; Schuman, 1999; Neeper et al, 1996). Até o momento, são representadas por cinco proteínas de estruturas relacionadas que constituem a família das neurotrofinas, incluindo o fator de crescimento nervoso (*NGF – Nerve Growth Factor*), o fator de crescimento derivado do cérebro (*BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor*), e as neurotrofinas 3, 4/5 e 6 (NT 3, NT 4/5 e NT 6 – Neurotrophic Factor) (Lorigados-Pedre e Bergado-Rosado, 2004; Serrano-Sánchez e Díaz-Armesto, 1988).

Evidências demonstram o papel da BDNF como modulador crítico na plasticidade sináptica no hipocampo (Poo, 2001). A deleção ou inibição do gene BDNF (Figurov et al, 1996) produz uma deficiência na memória de longo termo (LTP). Esta deficiência na função sináptica pode ser corrigida por aplicações exógenas (Patterson et al, 1996) ou over-expressão (Korte et al, 1995) da BDNF. Vários genes associados à ação da BDNF na sinapse aumentam sua expressão como resultado do exercício e podem apoiar a função sináptica ou neuroplasticidade (Molteni et al, 1992).

O exercício aumenta a expressão de muitos genes associados à função sináptica (Molteni et al, 1992). Em adição a sinapsina I, o exercício aumenta os níveis de mRNA para syntaxina e sinaptogamina. A sinapsina I é aumentada predominantemente em curtos períodos de exercício (3 e 7 dias), consistente com seu papel na liberação de vesículas sinápticas (Vaynman et al, 2004). A sinaptogamina aumenta progressivamente após longos períodos de exercício, consistente com seu papel de formação de vesículas sinápticas (Augustine et al, 2001). A deleção do gene BDNF em camundongos resulta em redução das proteínas

sinápticas e de suas vesículas resultando em prejuízos na liberação de neurotransmissores (Pozzo-Miller et al, 1999). A BDNF promove a fosforilação da sinapsina I via ativação dos receptores TrkB no terminal pré-sináptico, resultando em liberação de neurotransmissores (Jovanovic et al, 2000). O exercício aumenta os níveis de mRNA e proteína TrkB e sinapsina I na sinapse via BDNF (Bertchold et al, 2005; Klintsova et al, 2004; Kim et al, 2005; Widenfalk et al, 1999). É possível que níveis elevados de BDNF exercício-induzido possam facilitar a formação e mobilização de vesículas sinápticas, e o prolongamento destes eventos podem se traduzir em longas alterações na plasticidade sináptica (Molteni et al, 1992).

Estes aumentos na concentração e expressão gênica das neurotrofinas e de seus receptores apresentam um comportamento distinto aos diferentes treinamentos físicos estudados. Após duas semanas de livre acesso a rodas de correr, ratos desenvolveram maiores concentrações de BDNF no hipocampo, persistindo até uma semana após a interrupção do exercício (Berchtold et al, 2005). Os níveis de BDNF, TrkB, NT-3 mRNA hipocampais voltaram às concentrações normais com a interrupção total do exercício, significando que estes acréscimos são dependentes da continuidade do exercício e reversíveis (Windenfalk et al, 1999). Quanto maior o volume de exercício, tanto natação quanto corrida, maiores foram os níveis de BDNF no cérebro dos camundongos (Russo-Neustadt et al, 2001; Johnson et al, 2003; Johnson e Mitchell, 2003). Existe uma forte evidência que o exercício desenvolva alterações neurológicas via BDNF, pois o aumento nos níveis de neurotrofinas e de sua expressão gênica em rodas de correr foi anulado na área CA3 e giro denteado do hipocampo de ratos, quando administrados bloqueadores dos receptores neuronais de neurotrofinas, como o K252a que inibe o receptor Trk do BDNF (Vaynman et al, 2004). Efeitos semelhantes foram encontrados com o uso dos antagonistas KN-62, um inibidor dos canais de nicotinodiamida (NMDA) ou PD98059 que inibe a MAPK (Vaynman et al, 2003).

O exercício aumenta a expressão gênica de muitos componentes da cascata MAP-K como a MAP-KI e MAP-KII. A via MAP-K é a maior cascata sinalizadora dos receptores Trk (Segal e Greenberg, 1996). A MAP-K está envolvida na plasticidade sináptica, formação de memória e integração de múltiplos sinais extracelulares (Selcher et al, 2001; Sweatt, 2001). Parece que as vias MAP-K coordenam muitos eventos sinápticos em conjunção com as vias CaM-K. Por exemplo, a sinapsina I é fosforilada pelos sistemas MAP-K e CaM-KII (Matsubara et al, 1996). A CaM-KII afeta o Ca^{+2} pós-sináptico importante para a função sináptica (Soderling, 2000), e está envolvido na formação de memória hipocampo-dependente (Fukunaga e Miyamoto, 2000). A expressão de PKC-d aumentou após 7 dias de exercício (Molteni et al, 1992). PKC-d é necessária para a ativação da cascata MAP-K e para o crescimento de nervos (Corbit et al, 1999). Membros da família CaM-K aumentaram sua atividade após curtos períodos de exercício enquanto membros da via MAP-K aumentaram sua atividade conforme o tempo de exercício, principalmente após 7 dias (Molteni et al, 1992).

O exercício eleva a expressão do fator de transcrição CREB (Molteni et al, 1992). O CREB pode regular a transcrição do gene BDNF no mecanismo cálcio-dependente (Finkbeiner, 2000 a, b). Assim, através da cascata MAP-K, o BDNF causa a fosforilação do CREB resultando em ativação do CREB e transcrição gênica (Finkbeiner et al, 1997). O CREB é necessário para várias formas de memória (Silva et al, 1998; Bourchuladze et al, 1994), e parece desempenhar um importante papel na resistência neuronal a insultos (Walton et al, 1999). O hipocampo de camundongos com baixos níveis de CREB apresentou prejuízos na manutenção de LTP (Bourchuladze et al, 1994). Os maiores acréscimos nos níveis de mRNA de CREB foram observados após 7 dias de exercício, consistente com a indução dos membros da MAP-K (Molteni et al, 1992).

Existem muitas evidências demonstrando aumento das concentrações das proteínas neurotróficas e de seus fatores de transcrição associadas à prática regular de atividade física (Johnson et al, 2003; Zhua et al, 2006; Oliff et al, 1998). Corrida em esteira e rodas de correr aumentaram os níveis de proteína e mRNA de BDNF (Huang et al, 2006; Oliff et al, 1998) assim como NT-3 (Johnson e Mitchell, 2003) no hipocampo de ratos, em córtex e cerebelo (Neeper et al, 1996) e também após natação (Radák et al, 2006). Adicionalmente, o exercício protege neurônios de vários tipos de insultos (Larsson et al, 1999), pois o BDNF promove neurogênese em adultos (Pencea et al, 2001) e aumenta a eficácia sináptica (Poo, 2001). Doze semanas de corrida em esteira diminuiu o volume isquêmico cerebral induzido por oclusão da artéria cerebral média de ratos, sendo acompanhada por aumento das concentrações de mRNA de NGF e de seu receptor p75 GAPDH, ou seja, o exercício induziu aumento da expressão gênica de neurotrofinas causando neuroproteção à isquemia neuronal (Ang et al, 2003).

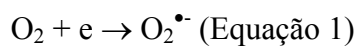
Existem estudos demonstrando que o exercício aumenta a memória e o aprendizado espacial. O aumento da LTP ocorre com o aumento dos fatores neurotróficos endógenos ao exercício (Van Praag et al, 1999b). A LTP também pode ser moderada por alterações em citocinas endógenas como TNF- α (Fator de transcrição de necrose α) e a IL-1 β (Interleuquina 1 β) (Cunningham et al, 1996; Butler et al, 2004) como consequência direta do exercício (Ang et al, 2004).

Exercício e Estresse Oxidativo

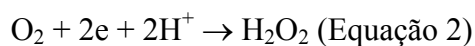
O oxigênio molecular em seu estado diatômico ($^3\Sigma_g-O_2$) é uma espécie altamente oxidante essencial para a produção de energia durante a fosforilação mitocondrial oxidativa (Leeuwenburg e Heineck, 2001). O oxigênio sobressalente reativo tem um forte potencial oxidativo: de acordo com o princípio de exclusão de Pauli, o O_2 oxida outra molécula por

aceitar um par eletrônico, somente se ambos os elétrons do par possuir spins antiparalelos aos seus próprios elétrons não-emparelhados (Leeuwenburg e Heineck, 2001). Devido a este critério raramente ser encontrado, o O₂ reage lentamente na ausência de catalisadores e tende a aceitar um simples elétron durante sua química redox (Bowling e Beal, 1995; Choi, 1993).

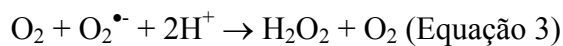
In vivo, enzimas geralmente usam um elétron no período que realizam reduções multi-elétrônicas de O₂. Sem um simples elétron é aceito, ele deve entrar numa orbital e produzir ânion superóxido (O₂^{•-}) (Bayir, 2005).



A redução de dois elétrons do O₂ mais a adição de 2 prótons (H⁺) gera H₂O₂.



Muitas oxidases usam este mecanismo para reduzir o O₂ diretamente para H₂O₂. A dismutação espontânea ou catalisada do O₂^{•-} pela superóxido dismutase também produz H₂O₂ (Bayir, 2005).



O peróxido é um intermediário não-radical que oxida uma ampla variedade de meios biológicos, apesar de ser uma espécie não-reativa.

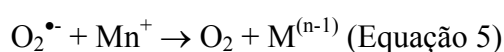
Na reação de Haber-Weiss (também conhecida como química de Fenton superóxido-dirigida), quelantes de metais de transição, livres ou de baixo peso molecular, como o Fe³⁺ é reduzido pelo O₂^{•-} para Fe²⁺. O íon metálico reduzido que reage com o H₂O₂ geram o extremamente reativo radical hidroxila HO[•].



Esta espécie tem sido amplamente postulada como sendo a maior causa de dano a proteínas, lipídios, carboidratos, e DNA, mas existe uma pequena evidência direta que o HO[•] seja gerado em sistemas biológicos (Bayir, 2005). A maior questão não resolvida em relação à relevância biológica da reação de Haber-Weiss é sua necessidade de Fe³⁺ livre ou Cu²⁺ devido

a grande variedade de proteínas metal-transportadoras e metais-ligantes mantendo a concentração de íons metálicos livres redox-ativos a níveis baixos nos tecidos normais. Entretanto, a destruição tissular pode liberar íons metálicos redox-ativos (Banerjee et al, 2003; Leeuwenburg e Heineck, 2001).

Muita atenção tem sido dirigida na produção de espécies oxidativas pelo $O_2^{\bullet-}$. Entretanto, é importante ressaltar que o $O_2^{\bullet-}$ é um forte agente redutor. Suas propriedades somam-se para a fácil habilidade de reagir rapidamente com íons metálicos (Mn^+) (Bayir, 2005).



Esta reação tem sido proposta para gerar os metais reduzidos necessários para a produção de HO^{\bullet} pela reação de Haber-Weiss (equação 4) (Bayir, 2005). Recentes estudos sugerem que proteínas contendo metais de transição, como a aconitase, um enzima do ciclo do ácido tricarboxílico, são vulneráveis ao dano de redução por $O_2^{\bullet-}$, que pode ser um fator contribuinte na fadiga muscular durante o exercício (Banerjee et al, 2003; Leeuwenburg e Heineck, 2001).

A fosforilação oxidativa gera a maior parte do ATP celular, e disfunções mitocondriais causam prejuízos ao metabolismo energético, sendo que 1% do fluxo eletrônico mitocondrial gera $O_2^{\bullet-}$, a primeira espécie reativa de oxigênio (ERO) mitocondrial, demonstrando a importância de um eficiente sistema antioxidante para preservação da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Mattson e Liu, 2002). Assim, existe um crítico balanço entre o suprimento contínuo de nutrientes do sangue e metabolismo energético oxidativo das mitocôndrias cerebrais (Calabrese et al, 2005), regulado também por mecanismos adicionais como a dinâmica do cálcio mitocondrial, potencial de membrana, e proteínas membrana-acopladoras (Mattson e Liu, 2002). Uma disfunção na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons pode ser a maior fonte de oxidantes tóxicos, incluindo oxidação de DNA mitocondrial, proteínas e lipídios, e abertura dos poros de permeabilidade mitocondriais, um

evento associado e neurodegeneração e morte (Calabrese et al, 2005; Leeuwenburg e Heineck, 2001).

O cérebro representa aproximadamente 2% da massa corporal, mas seu consumo de O₂ (CMRO₂: 5 ml/min/100g) e glicose (CMRglu: 31 μMol/min/100g) representa respectivamente 20 e 25% do consumo total do organismo em repouso. O débito sanguíneo cerebral, conseqüentemente, é elevado: 14-20% do débito sanguíneo ao repouso. Este metabolismo energético está bem evidenciado pela contínua atividade de comunicação intercelular neuronal (Ter-Minassian, 2006), mantido pelo alto metabolismo glicêmico, através de pequenos estoques de carboidratos e fosfatos de alta energia, sem estoques de oxigênio (Calabrese et al, 2005).

O SNC é mais suscetível a danos oxidativos, pois apresenta grande atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, associada à elevada concentração de ferro livre e lipídios polinsaturados, e baixos níveis de enzimas antioxidantes (Rodríguez-Capote et al, 1998). O cérebro tem 3% da glutathione peroxidase e 1% da catalase do fígado. A glutathione é precursora de enzima antioxidante glutathione peroxidase (Jain et al, 1991). Os gânglios da base têm alta concentração de ferro e um metabolismo alterado do ferro tem forte potencial oxidante pela reação de Haber-Weiss.

Quando ácidos graxos polinsaturados nas biomembranas são atacados por radicais livres na presença de oxigênio molecular, uma cadeia de reações de peroxidação ocorre, eventualmente levando a formação de gases hidrocarbonos (p.ex.: metano, etano e pentano) e aldeídos (p.ex.: malonaldeído, MDA). Bioprodutos da peroxidação lipídica são os marcadores mais estudados da lesão tissular oxidativa durante o exercício. Assim como as modificações oxidativas causadas às proteínas (incluindo enzimas) e ácidos nucléicos (Banerjee et al, 2003; Leeuwenburg e Heineck, 2001).

Ratos jovens e velhos após treinamento de natação aprimoraram o aprendizado e a memória (Radák et al, 2001a) além de diminuir a carbonilação de proteínas (Jolitha et al, 2006; Ogonovszky et al, 2005; Radák et al, 2001b) e lipoperoxidação em cerebelo (Radák et al, 2006), hipocampo e córtex cerebral (Jolitha et al, 2006). Estas adaptações persistiram mesmo após o mesmo período de ausência do exercício (Radák et al, 2006). Estes resultados de natação foram bem evidenciados com uma intensidade forte de exercício (Ogonovszky et al, 2005).

Após 8 semanas de corrida em esteira, ratos diabéticos apresentaram maiores concentrações de lipoperoxidação cerebral (Özkaya et al, 2002). Em ratos normais, a lipoperoxidação no cérebro ocorreu com a suplementação de vitamina C (Coskun et al, 2005). A oxidação de lipídios no SNC demonstra geralmente diferentes concentrações em diferentes regiões do cérebro, sendo que isto pode ser atribuído a diferenças regionais no consumo de O₂ (Floyd e Carney, 1991; Zhang et al., 1993).

Uma série aguda de exercícios pode aumentar a atividade de algumas enzimas antioxidantes sem nova síntese protéica. Esta atividade de proteção é limitada a características enzimáticas individuais e o tecido envolvido. Como estratégia a longo prazo, as células podem aumentar a síntese protéica de enzimas antioxidantes para controlar o estresse oxidativo.

Foi demonstrado que o exercício intenso não altera a atividades das enzimas SOD e GPx no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal 24 horas após o exercício (Acikgoz et al, 2006).

Os efeitos agudos do exercício sobre as enzimas antioxidantes do cérebro também não mostraram diferenças na atividade da SOD na medula espinal e hipotálamo (Somani et al, 1996), cerebelo (Radák et al, 1995b), córtex cerebral e hipocampo (Jolitha et al, 2006). O acréscimo da atividade de enzimas antioxidantes no cérebro como resposta ao exercício físico

regular está mais provavelmente ligado ao excesso de formação de radicais livres (Radák et al, 1995a, 1995b; Somani et al 1995).

As espécies reativas de oxigênio e danos associados são um dos possíveis fatores associados na regulação da função cerebral (Carney et al, 1991; Radák et al, 2001a,b). A atividade da enzima superóxido dismutase elevou no tronco cerebral e estriado de ratos após treinamento de corrida em esteira, acompanhada de acréscimo na concentração de glutathione no córtex e tronco cerebral (Ogonovszky et al, 2005).

Os benefícios à saúde em geral e na prevenção de doenças pelo exercício são bem conhecidos. Entretanto, o exercício crônico também representa uma forma de estresse oxidativo para o organismo e pode alterar o balanço entre oxidantes e antioxidantes. Os antioxidantes biológicos desempenham um importante papel na proteção celular do estresse oxidativo induzido pelo exercício. Não somente uma grande produção de radicais livres, mas também a deficiência ou depleção de vários sistemas antioxidantes podem revelar exacerbação da lesão celular oxidativa, enquanto a suplementação de vários antioxidantes geral resultados diversos (Banerjee et al, 2003; Leeuwenburg e Heineck, 2001).

A vitamina E (α -tocoferol) é um importante lipídio solúvel, varrendo radicais livres de cadeia aberta. Sua localização única na membrana celular encarece sua eficiência em atuar nos radicais livres originados da membrana mitocondrial interna e outras biomembranas (Banerjee et al, 2003; Leeuwenburg e Heineck, 2001). O exercício físico moderado aumenta o dano oxidativo mitocondrial no cérebro de ratos velhos (Navarro et al, 2003). Foi demonstrada uma integração entre o treinamento físico e a suplementação de vitamina E causando neuroproteção contra o declínio relacionado à idade na atividade das enzimas antioxidantes e no acréscimo da peroxidação lipídica no cérebro (Jolitha et al, 2006; Devi e Kiran, 2004).

Enquanto o papel antioxidante da vitamina E está bem estabelecido, a importância da vitamina C na proteção contra estresse induzido pelo exercício não está clara. Sugere-se que a vitamina C desempenhe sua função reciclando radical de vitamina E novamente à vitamina E (Banerjee et al, 2003). A suplementação isolada de vitamina C não foi benéfica ao tecido nervoso, pois aumentou a oxidação de lipídios do cérebro de ratos treinados (Coskun et al, 2005).

Conclusão

Apresentamos várias evidências dos efeitos do exercício na função cognitiva e plasticidade sináptica nos mecanismos neurotróficos e oxidativos cerebrais. As respostas cerebrais seguem o modelo e a configuração do exercício, e pode ser influenciada pela administração de antioxidantes. Outro fator é a responsividade diferenciada das regiões cerebrais ao exercício agudo e crônico. Mas como são poucos estudos envolvendo exercício e cérebro, estes variam muito desde o modelo e configuração do exercício até as variáveis e metodologias adotadas, o que diminui a capacidade de comparação entre os resultados. Assim, certamente existe a necessidade de compreender melhor os efeitos e mecanismos de ação do exercício físico no sistema nervoso central.

Referências

1. Cotman CW, Berchtold NC, Adlard PA, Perreau VM. Exercise and the Brain. In: Mooren FC, Völker K, editors. Molecular and Cellular Exercise Physiology. Champaign, IL, USA: 2005; 331–341.

2. Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 2006; 6: 801–9.
3. Acikgoz O, Aksu I, Topcu A, Kayatekin BM. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neuroscience Letters* 2006; 406: 148–151
4. Monzillo Lu, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, et al. Effect of Lifestyle Modification on Adipokine Levels in Obese Subjects with Insulin Resistance. *Obes Res* 2003; 11: 1048–1054.
5. Arida RM, Scorza CA, Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EP. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett* 2004; 364: 135–138.
6. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 2002; 25: 295–301.
7. Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, et al. Ageing, Fitness and neurocognitive function. *Nature* 1999; 400: 418–419.
8. Fordyce DE, Farrar RP. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav Brain Res* 1991; 46: 123–133.
9. Mattson MP. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 2000; 886: 47–53.
10. Scandalis TA, Bosak A, Berliner JC, Helman LL, Wells MR. Resistance Training and Gait Function in Patients with Parkinson's Disease. *Am J Phys Med Rehabil* 2001; 80: 38–43.
11. Reuter I, Engelhardt M, Stecker K, Baas H. Therapeutic value of exercise training in Parkinson's disease. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 1544–1549.

12. Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, et al. Cognitive and Physical Activity Differently Modulate Disease Progression in the Amyloid Precursor Protein (APP)–23 Model of Alzheimer’s Disease. *Biol Psychiatry* 2006 “in press”.
13. Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary Exercise Decreases Amyloid Load in a Transgenic Model of Alzheimer’s Disease. *J Neurosci* 2005; 17: 4217–4221.
14. Huang AM, Jen CJ, Chen HF, Yu L, Kuo YM, Chen HI. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain–derived neurotrophic factor. *J Neural Transm* 2006; 113: 803–811.
15. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999a; 2: 266–270.
16. Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol* 2001; 58: 498–504.
17. Lee H, Kim H, Lee J, Kim Y, Yang H, Chang H, et al. Maternal swimming during pregnancy enhances short–term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain & Development* 2006; 28: 147–154.
18. Yu BK; Yoon BC; Kim SS; Chun SL. Treadmill exercise increases cell proliferation in hippocampal dentate gyrus in alcohol intoxicated rats. *J Sports Med Phys Fitness* 2003; 43: 393–397.
19. Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long–term potentiation in mice. *Proc Nat Ac Sci USA* 1999b; 96: 13427–13431.

20. Briones TL. Environment, physical activity, and neurogenesis: implications for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2006; 1: 49–54.
21. Redila VA, Christie BR. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neurosci* 2006; 4:1299–307.
22. Dietrich MO, Mantese CE, Porciuncula LO, Ghisleni G, Vinade L, Souza DO, et al. Exercise affects glutamate receptors in postsynaptic densities from cortical mice brain. *Brain Res* 2005; 1–2: 20–25.
23. Carmichael MD, Davis JM, Murphy EA, Brown AS, Carson JA, Mayer E, et al. Recovery of running performance following muscle-damaging exercise: relationship to brain IL-1beta. *Brain Behav Immun* 2005; 5: 445–52.
24. Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umapathi P, Gage FH. Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005; 5: 649–55.
25. Che FY, Yuan Q, Kalinina E, Fricker LD. Peptidomics of Cpe fat/fat mouse hypothalamus: effect of food deprivation and exercise on peptide levels. *J Biol Chem* 2005; 6: 4451–4461.
26. Caglar E, Sabuncuoglu H, Keskin T, Isikli S, Keskil S, Korkusuz F. In vivo human brain biochemistry after aerobic exercise: preliminary report on functional magnetic resonance spectroscopy. *Surg Neurol* 2005; 64: S53–56.
27. Ito H, Shidahara M, Inoue K, Goto R, Kinomura S, Taki Y, et al. Effects of tissue heterogeneity on cerebral vascular response to acetazolamide stress measured by an I-123-IMP autoradiographic method with single-photon emission computed tomography. *Ann Nucl Med* 2005; 4: 251–60.
28. Crabbe JB, Dishman RK. Brain electrocortical activity during and after exercise: a quantitative synthesis. *Psychophysiology* 2004; 4: 563–574.

29. Lanfranco F, Gianotti L, Giordano R, Pellegrino M, Maccario M, Arvat E. Ageing, growth hormone and physical performance. *J Endocrinol Invest* 2003; 9: 861–72.
30. Hatta A, Nishihira Y, Kim SR, Kaneda T, Kida T, Kamijo K, et al. Effects of habitual moderate exercise on response processing and cognitive processing in older adults. *Jap J Physiol* 2005; 1: 29–36.
31. Pang TYC, Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Hannan AJ. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neurosci* 2006; 141: 569–584.
32. Zheng H, Liu Y, Li W, Yang B, Chen D, Wang X, et al. Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behav Brain Res* 2006; 168: 47–55.
33. Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R, Cotman CW. Effects of Exercise on Gene-Expression Profile in the Rat Hippocampus. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 1046–1056.
34. Brown BS, Van Huss W. Exercise and rat brain catecholamines. *J Appl Physiol* 1973; 34: 665–669.
35. Lewis MH. Environmental complexity and central nervous system development and function. *Ment Retard Dev Disabil Res Ver* 2004; 2: 91–5.
36. Burghardt PR, Fulk LJ, Hand GA, Wilson MA. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res* 2004; 1019: 84–96.
37. Kleim JA, Jones TA, Schallert T. Motor Enrichment and the Induction of Plasticity before or after Brain Injury. *Neuroch Res* 2002; 28: 1757–1769.
38. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997; 386: 493–495.

39. Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Insulin-Like Growth Factor I Interfaces With Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Synaptic Plasticity To Modulate Aspects Of Exercise-Induced Cognitive Function. *Neuroscience* 2006; 140: 823-833.
40. Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behavioural Brain Research* 2006; 168: 345-348.
41. Inal M, Akyüz F, Turgut A, Getsfrid WM. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 564-567.
42. Ostman HN. Adaptive changes in central and peripheral no-adrenergic neurons in rats following chronic exercise. *Neurosci* 1976; 1: 41-47.
43. Ploughman M, Granter-Button S, Chernenko G, Tucker BA, Mearow KM, Corbett D. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neurosci* 2005; 136: 991-1001.
44. Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates the Protective Effects of Physical Exercise against Brain Insults of Different Etiology and Anatomy. *J Neurosci* 2001; 15: 5678-5684.
45. Kishorchandra G, Rothfuss L, Lang J, Packer L. Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. *J Appl Physiol* 1987; 4: 1638- 1641.
46. MacRae PG, Spirduso WW, Cartee GD, Farrar RP, Wilcox RE. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolite levels. *Neurosci Lett* 1987; 79: 138-144.
47. Brown BS, Payne T, Kim C, Moore G, Krebs P, Martin W. Chronic response of rat brain norepinephrine and serotonin levels to endurance training. *J Appl Physiol* 1979; 46: 19-23.

48. Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002). *Progress Neurobiol* 2004; 72: 167–182.
49. Casillas J. Custo energético da marcha. In: Viel E, editor. *A marcha humana, a corrida e o salto*. São Paulo: Manole, 2001; 141–155.
50. Jolitha AB, Subramanyam MVV, Devi S. Asha. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Experimental Gerontology* 2006 “in press”
51. Dohm MR, Hayes JP, Garland T Jr. The quantitative genetics of maximal and basal rates of oxygen consumption in mice. *Genetics* 2001; 159: 267–277.
52. Lighfoot JT, Turner MJ, Debate KA, Kleeberger SR. Interstrain variation in murine aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 2053–2057.
53. Liu J, Yeo HC, Övervik-Douk E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 2000; 89: 21-28.
54. Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A, et al. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 273: H1167-H1173.
55. Kemi OJ, Loennechen JP, Wisløff, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2002; 93: 1301-1309.
56. Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Intensity controlled treadmill in rats: VO₂max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1301-H1310.

57. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *TRENDS in Neurosci* 2004; 27: 589-594.
58. Schuman EM. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 1: 105-109.
59. Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Cotman C. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* 1996; 726: 49-56.
60. Lorigados-Pedre L, Bergado-Rosado J. El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurador. *Rev Neurol* 2004; 10: 957-971.
61. Serrano-Sánchez T, Díaz-Armesto I. Factor de crecimiento derivado del cerebro: aspectos de actualidad. *Rev Neurol* 1998; 154: 1027-1032.
62. Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Rev Neurosci* 2001; 2: 24-32.
63. Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 1996; 381: 706-709.
64. Patterson SL, Abel T, Deuel TAS, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knock-out mice. *Neuron* 1996; 16: 1137-1145.
65. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8856-8860.
66. Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *European Journal of Neuroscience* 2002; 16: 1107-1116.

67. Vaynman S, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Exercise Induces BDNF and Synapsin I to Specific Hippocampal Subfields. *J Neurosci Res* 2004; 76: 356–362.
68. Augustine GJ. How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 320–326.
69. Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, Du McDermott KJ, Gopalakrishnan R, Oho C, et al. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 1999; 19: 4972–4983.
70. Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neurosci* 2000; 3: 323–329.
71. Bertchold NC, Chinn G, Chou M, Kessler JP, Cotman CW. Exercise primes a molecular memory for brain-derived Neurotrophic factor protein induction in the rat Hippocampus. *Neurosci* 2005; 133: 853–861.
72. Klintsova AY, Dickson E, Yoshida R, Greenough WT. Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. *Brain Res* 2004; 1028: 92–104.
73. Kim M, Bang M, Han T, Ko Y, Yoon B, Kim J, et al. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res* 2005; 1052: 16 – 21.
74. Widenfalk J, Olson L, Thorén P. Deprived of habitual running, rats downregulate BDNF and TrkB messages in the brain. *Neurosci Res* 1999; 34: 125–132.
75. Russo-Neustadt A, Ha T, Ramirez R, Kessler JP. Physical activity–antidepressant treatment combination: impact on brain–derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behav Brain Res* 2001; 120: 87–95.

76. Johnson RA, Rhodes JS, Jeffrey SL, Garland T, Mitchel GS. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 increases more in mice selected for increased voluntary wheel running. *Neurosci* 2003; 121: 1–7.
77. Johnson RA, Mitchell GS. Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. *Brain Res* 2003; 983: 108–114.
78. Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Interplay Between Brain-Derived Neurotrophic Factor And Signal Transduction Modulators In The Regulation Of The Effects Of Exercise On Synaptic-Plasticity. *Neurosci* 2003; 122: 647–657.
79. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19; 463–489.
80. Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt J. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn Mem* 2001; 8: 11–19.
81. Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 2001; 76: 1–10.
82. Matsubara M, Kusubata M, Ishiguro K, Uchida T, Titani K, Taniguchi H. Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *J Biol Chem* 1996; 271: 21108–21113.
83. Soderling TR. CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 375–380.
84. Fukunaga K, Miyamoto E. A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory. *Neurosci Res* 2000; 38: 3–17.

85. Corbit KC, Foster DA, Rosner MR. Protein Kinase C- δ mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4209–4218.
86. Finkbeiner S. Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol Life Sci* 2000a; 57: 394–401.
87. Finkbeiner S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 2000b; 25: 11–14.
88. Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg, ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 1997; 19: 1031–1047.
89. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21: 127–148.
90. Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Ciof D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 1994; 79: 59–68.
91. Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman, et al. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Rev* 1999; 29: 137–168.
92. Zhua SW, Phamb TM, Aberg E, Brené S, Winblad B, Mohammeda AW, et al. Neurotrophin levels and behaviour in BALB/c mice: Impact of intermittent exposure to individual housing and wheel running. *Behav Brain Res* 2006; 167: 1–8.
93. Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor BDNF transcripts in the rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1998; 61: 147–153.

94. Radák Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neuroch Int* 2006 “in press”.
95. Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 11: 1220–8.
96. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 2001; 21: 6706–6717.
97. Ang ET, Wong PTH, Moochhala S, Ng YK. Neuroprotection Associated With Running: Is It A Result Of Increased Endogenous Neurotrophic Factors? *Neurosci* 2003; 118: 335–345.
98. Cunningham AJ, Murray CA, O'Neill LA, Lynch MA, O'Connor JJ. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett* 1996; 203: 17–20.
99. Butler MP, O'Connor JJ, Moynagh PN. Dissection of tumor-necrosis factor-alpha inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. *Neurosci* 2004; 124: 319–326.
100. Ang ET, Wong PTH, Moochhala S, Ng YK. Cytokine changes in the horizontal diagonal band of Broca in the septum after running and stroke: a correlation to glial activation. *Neurosci* 2004; 129: 337–347.
101. Leeuwenburg C, Heinecke JW. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Curr Med Chem* 2001; 8: 829–838.

102. Bowling AC, Beal MF. Bioenergetics and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 1995; 56: 1151-1171.
103. Choi BH. Oxygen, antioxidants and brain function. *Yonsei Medical J* 1993; 34: 1-10.
104. Bayir H. Reactive Oxygen Species. *Crit Care Med* 2005; 33: 498–501.
105. Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; 253: 307–312.
106. Mattson MP, Liu D. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2002; 2: 215–31.
107. Calabrese V, Lodi TR, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 2005; 233: 145–162.
108. Ter-Minassian A. Cerebral metabolism and brain injury. *Ann Fr Anesth Reanim* 2006; 7: 714–21.
109. Jain SK, McVie R, Smith T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care* 2000; 9: 1389–1394.
110. Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok, J., Sasvari, M., et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 2001a; 38: 17–23.
111. Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, et al. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neuroch Int* 2005; 46: 635–640.
112. Radák Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 2001b; 7: 90–107.

113. Özkaya YG, Agar A, Yargicoglu P, Hacıoglu G, Bilmen–Sarıkcioglu S, Özen I, Alicigüzel Y. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab* 2002; 5: 377–84.
114. Coskun S, Gonul B, Guzel NA, Balabanli B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Mol Cell Biochem* 2005; 1–2: 135–138.
115. Floyd KA, Carney JM. Age influence on oxidative events during brain ischemia/reperfusion. *Arch Gerontol Geriatr* 1991; 12: 155–177.
116. Zhang JR, Andrus PK, Hall ED. Age-related regional changes in hydroxyl radical stress and antioxidants in gerbil brain. *J Neurochem* 1993; 61: 1640–1647.
117. Somani SM, Husain K, Diaz–Phillips L, Lanzotti DJ, Kareti KR, Trammell GL. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol* 1996; 13: 603–610.
118. Radák Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh–Ishi S, Suzuki K, et al. Acute bout of exercise does not alter the antioxidant enzyme status and lipid peroxidation of rat hippocampus and cerebellum. *Pathophysiology* 1995b; 2: 243–245.
119. Radák Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh–Ishi S, Suzuki K, et al. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1995a; 79: 129–135.
120. Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharm Bioch Behav* 1995; 50: 635–639.
121. Carney JM. Oxidative stress leading to loss of critical proteases in Alzheimer's disease. An alternative view of the etiology of AD. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 924: 160–163.

122. Navarro A, Gomez C, Lopez–Cepero JM, 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* 2003; 286: R505–R511.
123. Devi SA, Kiran TR. Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain, *Neu Neurobiol Aging* 2001; 25: 501–508.

CAPÍTULO 3

N-ACETYLCYSTEINE AND DEFEROXAMINE PREVENT BRAIN OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY MODERATE-INTENSE PHYSICAL EXERCISE IN ADULT MICE

Aderbal S. Aguiar Jr¹, Talita Tuon¹, Luís Gustavo Costa da Rocha¹, Paulo César Silveira¹,
Ricardo A. Pinho¹

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC,
Brazil.

Artigo submetido a Brain Research

Abstract

The increased consumption of oxygen induced by exercise induces a high reactive oxygen species production in tissues. This represents a potential risk to oxidizable brain that has poor antioxidant defenses and rich iron content. The aim of this study was to analyze the effects of moderate-intense exercise on brain redox status, associated to supplementation of the N-acetylcysteine (NAC), deferoxamine (DFX) or a combination of both. 45 C57BL-6F adult male mice were randomly assigned to 5 groups designated: control untrained and not supplemented, exercise not supplemented, exercise with NAC supplementation, exercise with DFX supplementation, and exercise with NAC plus DFX supplementation. They were given exercise training on a treadmill for 12 weeks and sacrificed after 48h after the last exercise session. The supplementation was performed on the same period of training. Blood lactate levels were determined on the first and the last session of exercise. Soleus muscle was isolated to citrate synthase activity determination, striatum and hippocampus were isolated and the lipid (TBARS) and protein (carbonyl) oxidation, and catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were performed. Exercise increased the oxidation of proteins and lipids in striatum and carbonyl. This was inhibited by NAC and DFX administration. Twelve weeks of moderate-intense induced exercise increases in striatal CAT and hippocampal SOD. NAC and DFX supplementation improved CAT activity on striatum. These results indicate that moderate-intense exercise cause oxidative damage in hippocampus and striatum. Our data suggest that administration of NAC and DFX could represent an interesting approach to prevention of brain oxidative damage.

Section: Cognitive and Behavioral Neuroscience.

Keywords: physical exercise; oxidative stress; striatum; hippocampus; n-acetylcysteine; deferoxamine.

1. Introduction

Improvements in the brain redox status are well influenced by physical activity experiences (Vaynman and Gomez-Pinilla, 2005; Itoh et al, 1998; Somani et al, 1995). Generally, these exercise models do not discriminate the effort intensity. However, there is a relation between the oxygen consumption (Coskun et al, 2005; Oztasan et al, 2004; Inal et al, 2001) and the Reactive Oxygen Species (ROS) production (Pinho et al, 2006; Sureda et al, 2005, Schneider et al, 2005) according to exercise intensity. Exercise produces high ROS levels when it is exhaustive (Sastre et al, 1992; Davies et al, 1982). If these ROS production overwhelm the antioxidant system, we have oxidative stress affecting lipids, proteins, and nucleic acids (Banerjee et al, 2003; Leeuwenburgh and Heinecke, 2001). Previous studies suggest that lipoperoxidation exercise-induced is greater in maximal oxygen consumption (i.e., $VO_2\max$) (Viguie et al, 1993; Ebbeling and Clarkson, 1989; Lovlin et al, 1987) but also in submaximal exercise intensities (50% $VO_2\max$) (Leaf et al, 1997; Dillard et al, 1987).

The Central Nervous System (CNS) has a large potential oxidative capacity and high oxygen consumption (Calabrese et al, 2005). The brain antioxidant capacity is limited by a high content of easily oxidizable fatty acids (Özkaya et al, 2002; Somani et al, 1995) and free iron (Behl, 2005; Fauchex et al., 2003; Kress et al., 2002), and low levels of antioxidants enzymes and substrates, respectively: catalase and superoxide dismutase (Coskun et al, 2005; Floyd, 1999) and glutathione (Calabrese et al, 2005; Sen and Packer, 2000). Neuronal oxidative damage decreases mice neuromuscular and exploratory functions (Navarro et al, 2004) and promotes apoptosis and neurodegeneration (Fasano et al, 2006; Adam-Vizi, 2005; Kiraly and Kiraly, 2005).

The extent of brain oxidative damage can be modified by antioxidant supplementation (Yi et al, 2006; Hicdonmez et al, 2006; Guelman et al, 2004). The N-Acetylcysteine (NAC), a precursor for glutathione synthesis, has been describing such an antioxidant and free radical scavenger in neurological disorders (Arakawa et al, 2006; Pinho et al., 2005; Yi and Hazel, 2005). Deferoxamine (DFX) is the most potent iron chelator with antioxidant properties in neurodegeneration and apoptosis (Freret et al, 2006; Zhang et al, 2005). There is the hypothesis that the use of NAC alone may have limitations and present pro-oxidant effects, due to the facility with which it interacts with iron (Ritter et al, 2004). Given this, the use of DFX may improve response to the NAC administration (Pinho et al, 2005). The isolated administration of NAC may contribute to the production and release of other oxidative mediators, probably due to the facility with which it integrates with iron (Ritter et al., 2004), thus, the use of DFX, can contribute to assuaging these effects.

Thus, these facts increase the interest in the intense exercise and assessing antioxidant supplementation in the oxidizable CNS. The aim of this study was to analyze the role of NAC and/or DFX on oxidative damage and catalase and superoxide dismutase activities on striatum and hippocampus after moderate-intense aerobic exercise.

2. Results

Citrate synthase activity (CS): The results indicate that the treadmill-training program used was sufficient to increase the oxidative metabolism in skeletal muscle. CS activity in soleus muscle in Exercise group was significantly higher than in Control group (Table 3).

Lactate: lactate level was defined as the indicator of intensity of exercise. The results from exercise group showed that after the first exercise session the blood lactate levels

reached 6.9 ± 0.7 mmol/l and after the last session the exercise produced a blood lactate level of 4.2 ± 0.4 mmol/l (Table 3).

Lipid peroxidation: Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) levels were significantly higher ($p < 0.05$) in Exercise group than Control group striatum (Fig. 1) and hippocampus (Fig. 2). The antioxidant supplementation of NAC, DFX and NAC plus DFX showed significant decrease ($p < 0.05$) of TBARS levels in striatum (Fig. 1) and hippocampus (Fig. 2) when compared to Exercise unsupplemented (Table 1 and 2).

Protein oxidation: the Exercise group showed significantly ($p < 0.05$) increased in carbonyl levels of striatum (Fig. 3) and hippocampus (Fig. 4) than Control group (Table 2). The content mice striatum (Fig. 3) and hippocampus (Fig. 4) of oxidized protein were significantly ($p < 0.05$) lower in Exercise group when supplemented with NAC or DFX (Table 1 and 2). The NAC and DFX associated supplementation in Exercise group presented significantly ($p < 0.05$) lower carbonyl levels in striatum mice (Table 2) in relation to Exercise group.

Catalase (CAT) activity: Exercise alone or associated to DFX increase significantly ($p < 0.05$) the striatum CAT activity (Fig. 5) when compared to observed control group levels (Table 1). The Exercise groups supplemented with NAC or NAC plus DFX showed significantly ($p < 0.05$) lower CAT activity in striatum of mice control group (Table 1). In hippocampus (Fig. 6), Exercise and supplementation of NAC or DFX improved significantly ($p < 0.05$) the CAT activity in relation to control and exercise groups (Table 2).

Superoxide Dismutase (SOD) activity: the results indicate that the treadmill-training program used was sufficient to increase significantly ($p < 0.05$) the SOD activity in mice hippocampus. The supplementation of NAC, DFX or NAC plus DFX did not show significant ($p < 0.05$) changes in hippocampal SOD activity to control group (Table 2).

3. Discussion

Several studies have been carried out to determine the influence of physical training in the mitochondrial enzyme adaptation in skeletal muscle of rats (Siu et al., 2003; Pinho et al., 2006). We observed after a training program increase in the soleus CS activity in exercise group. Also, the blood lactate levels decreased since the training beginning. These data suggest that twelve weeks of training improve the skeletal muscle oxidative response (table 3).

We also observed that the blood lactate level remained with high levels after the last training session meaning anaerobic threshold, suggesting that the intensity of the exercise was moderate to intense. The anaerobic threshold is a term that refers to the oxygen consumption during exercise above which the rate of lactate production exceeds the rate of lactate removal, thus causing increased in tissues blood lactate levels (Voltarelli et al, 2002). The mice of our study performed the exercise near the anaerobic threshold interval (Mader and Heck, 1986). This occurs in submaximal exercises intensities, in general between 50-80% of the maximal load and at a blood lactate concentration of approximately 4.0 mmol/l in humans (Denadai, 2000; Mader and Heck, 1986) and 4.2 mmol/l for rats (Özkaya et al, 2002).

Evidences in humans suggest that intense exercise, such as endurance exercise, is associated with accelerated oxygen radical generation that results in acute (Aguiló et al, 2005; Sureda et al, 2005; Oztasan et al, 2004) and chronic (Tsai et al, 2001; Hessel et al, 2000) blood oxidative stress. In rat brains, endurance training increase striatal D₂ dopamine receptor (McRae et al, 1987), improve Brain Derived Neurotrophic Factor-1, Insulin Growth Factor-1 and synapsin-1 in hippocampus and cortex of brain damaged stroke-induced and undamaged

hemisphere (Ploughman et al, 2005), and decrease the hydroxyl radical levels (Itoh et al, 1998).

The beneficial effects of endurance training on redox status of rodents nervous system have been reported to occur in swimming (Jolitha et al, 2006), treadmill (Coskun et al, 2005; Somani et al, 1998) and running wheel (Suzuki et al, 1983). On the other hand, there are also studies where swimming (Radák et al, 2006) and treadmill (Özkaya et al, 2002) training was found not to affect the antioxidant defenses of the brain. Rats that performed severe and overtraining swimming did not show brain oxidative damage (Ogonovszky et al, 2005), and interesting improved memory (Ogonovszky et al, 2005). We observed that physical exercise can promote brain oxidative damage (Tables 1 and 2), probably by moderate-intense intensity of exercise according to the lactate threshold and the long duration of mice training (Table 4).

It is well known that different forms of exercise result in different levels of tissues stress (Arida et al, 2004). Treadmill running generally is chosen over swimming because swimming causes other forms of stress and aerobic responses are highly variable (Liu et al, 2000). Swimming imposes less mechanical stress due to water pressure, recruitment of different muscles and reduced effects of gravity (Jolitha et al, 2006). Treadmill forces the animal to run according to the exercise demands: time, duration and intensity (Arida et al, 2004). But incomplete corresponding treadmill designs, especially concerning exercise duration and intensity, as well as the exercise responses of trained and non-trained subjects, may be responsible for the inconsistent results (Hessel et al, 2000).

Thus, the moderate-intense treadmill training induces on striatum increases in oxidized lipids (Fig. 1) and proteins (Fig. 3) with increased catalase activity (Fig. 5). There is an increased lipoperoxidation in hippocampus (Fig. 2). These data suggest that striatum is more responsive to oxidative damage exercise-induced than hippocampus in high levels of exercise intensity. Lipid peroxides, being the main precursors of MDA in the nerve cells (Monji et al,

1994) showed region-specific differences in the concentration of these products and perhaps could be attributed to the differences in the regional O₂ consumption (Floyd and Carney, 1991; Zhang et al, 1993).

Exercising is associated to oxidative stress and can induce adverse effects on health and well-being, including brain aging and neurodegeneration. However, exercising may be combined with antioxidant supplementation such N-acetylcysteine (Banerjee et al, 2003; Viña et al, 2000) and it can have beneficial effects on health (Aguiló et al, 2005).

Exercise training increased SOD activity in hippocampus in response to superoxides formed as a result of excess consumption of O₂ during exercise (Somani et al, 1995). Increased brain SOD was observed after Vitamin E dietary supplementation to scavenge ROS that is generated with age and exercise (Jolitha et al, 2006; Devi and Kiran, 2004). Also, treatment with NAC increased frontal brain SOD on head trauma of rats (Hicdonmez et al, 2006). We observed that exercise enhanced hippocampus SOD activity (Fig. 7) and the supplementation of NAC, DFX or both did not change when compared to control.

The neuroprotective effect of NAC has been identified to reduce the oxidative process and inflammation after closed head trauma (Hicdomez et al, 2006). NAC treatment results in a rapid recovery of levels of reduced glutathione in brain and a reduction of oxidative stress following trauma brain injury (Hyuk and Hazell, 2005). We found that NAC supplementation prevented oxidative damage exercise-induced to lipids and protein on striatum and hippocampus during twelve weeks of moderate-intense running. The striatal and hippocampal TBARS (Fig. 1 and 2) and carbonyl (Fig. 3 and 4) production after exercise were inhibited in striatum and hippocampus of NAC supplemented group. The NAC supplementation also promotes the hippocampal (Fig. 6) antioxidant defenses with increase in CAT activity.

However, neuronal oxidative damage can also lead to iron release and more free radical reactions. Brain has high free iron levels. Free iron has been assumed to potentiate

oxygen toxicity by generating ROS via the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction, leading to oxidative stress (Connor et al, 1992; Stadtman, 1990). ROS-mediated iron cytotoxicity may trigger apoptotic cell death (Liu et al, 2003). Iron chelators such as deferoxamine (DFX) are able to block striatal neuronal death by neurotoxins (Chuang and Chiueh, 2001; Matarredona et al, 1997). DFX has been described to scavenge directly the hydroxyl radical at high concentrations (Freret et al, 2006; Lin et al, 2005; Guelman et al, 2004; Nakamura et al, 2003). We observed that DFX supplementation reduces the lipid and protein oxidation exercise-induced in striatum (Fig. 1 and 3) and hippocampus (Fig. 2 and 4). DFX also improves CAT activity in striatum (Fig. 5) and hippocampus (Fig. 6) above untrained and DFX unsupplemented levels. Striatum (Fig. 5) also showed increased CAT activity than trained and DFX unsupplemented group.

In summary, the physical training performed in moderate-high intensity and long duration induced brain lipoperoxidation on adult mice striatum and hippocampus and striatal protein oxidation. These neurological aggressions may be protected by administration of antioxidant n-acetylcysteine and iron chelator deferoxamine that reduces oxidative stress and promotes antioxidant enzyme activity in adult brain mice.

4. Experimental Procedure

4.1. Animals

Forty-five male C57BL-6F mice, weighing 30-35 g, 3-4 month old, were used and cared according to the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Food (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) and water were available ad libitum. The room was maintained at 70% humidity/20±2°C on a 12 h light/dark cycle with

lights on at 06.00 h. The mice were periodically checked to verify their pathogen-free condition.

The mice were randomly assigned to 5 groups designated (n = 9 each group): control untrained and not supplemented (C), exercise not supplemented (Ex), exercise with NAC supplementation (Ex+NAC), exercise with DFX supplementation (Ex+DFX), and exercise with NAC plus DFX supplementation (Ex+NAC+DFX).

4.2. Exercise protocol, supplementation and sacrifice

The animals were habituated by treadmill over 1-wk period but only for 10 min at 10m/min for 5 days, with 0% grade. All exercised groups were given running treadmill training for 5 days/wk over 12 weeks using an incremental running speed program to obtain progressive levels of exercise (Table 4). Someone's stimuli were used to promote this exercise protocol.

The supplementation was performed at the same time of the training and before running session. The NAC administration (Zambon Group S.p.A., Brazil) was 3 dosis/wk with 20 mg NAC/kg weight body dissolved on 30µl saline solution 0.9% (s.c). DFX administration (Novartis Pharma AG, Brazil) was 1 dose/wk (20 mg DFX/kg weight body) dissolved on 10µl saline solution 0.9% (s.c)

The exercise training protocol was stopped 48 h before sacrifice. The mice were sacrificed by cervical dislocation. The soleus muscle and the brain were immediately removed and free from blood; and the striatum and hippocampus were dissected on ice, stored and frozen at -80°C until analysis.

4.3. Physical exercise intensity

Blood Lactate levels were measured from 15 to 50 μ l of tail capillary blood, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Roche, Germany). This blood sample was put into a glass fibre fleece where the erythrocytes were retained. Lactate was determined by reflectance photometry at a wave length of 657 nm via colorimetric lactate-oxidase mediator reaction.

4.4. Muscle oxidative capacity.

Due to collaborative tissue requirements and dissection time limitations, Citrate Synthase (CS) analysis was performed only on the soleus according to Alp et al (1976). The tissue was weighed and homogenized with a glass homogenizer on ice in 100 mM Tris-HCl at a constant weight-to-volume ratio. Sample homogenate was then added to a reaction mix of 100 mM Tris-HCl, 1.0 mM dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), and 3.9 mM acetyl coenzyme A. After addition of 1.0 mM oxaloacetate, absorbance at 412 nm was recorded for a 2-min period. Mean absorbance change per minute was recorded for each sample, and CS activity in millimole per minute per gram was then calculated by using an extinction coefficient of 13.6.

4.5. Lipid peroxidation assay

The 2-thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) levels were measured by method of Draper and Hadley (1990) and expressed like Malondialdehyde (MDA) equivalent. Briefly, the samples were mixed with 1 ml 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.67% thiobarbituric acid, subsequently; they were heated in a boiling water bath for 15 min. The TBARS were determined by 535 nm absorbance and the results are given as nmol MDA/mg protein.

4.6. Carbonyl assay

The protein concentration of the soluble protein fractions was determined according to Levine et al (1990). The protein carbonyl content was measured by first forming labeled protein hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenylhydrazide (DNPH). These derivatives were sequentially extracted with 10% (vol/vol) trichloroacetic acid followed by treatment with ethanol/ethylacetate, 1:1 (vol/vol) and reextraction with 10% trichloroacetic acid. The resulting precipitate was dissolved in 6 M urea hydrochloride. The difference spectrum between a 2,4-dinitrophenylhydrazide-protein blank was used to calculate nmol of 2,4-dinitrophenylhydrazide incorporated per mg of protein. Results are reported for each sample read at 370 nm in a spectrophotometer.

4.7. CAT activity assay

In order to determine CAT activity, organ systems were sonicated in a 50mM phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 3000g for 10 minutes. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm (Aebi, 1984). Enzyme activity was expressed as U/mg protein.

4.8. SOD activity assay

SOD activity was determined according method of Bannister and Calabrese (1987). The enzymatic activity estimation occurs by adrenaline auto-oxidation inhibition read at 480 nm in a spectrophotometer. Enzyme activity was expressed as U/mg protein.

4.9. Measurement of protein

Protein concentration was estimated by the method of Lowry et al (1951), using bovine serum albumin as standard.

4.10. Statistical analyses

Means \pm S.E.M were calculated, and multiple comparisons were performed by using one-way ANOVA with Duncan post hoc tests. A P value <0.05 was considered significant. The software used for data analysis was Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 12.0 for Microsoft Windows.

5. Literature References

- Adam-Vizi, V., 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid. Redox Signal.* 9-10, 1140-9.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J.A., Córdova, A., Pons, A., 2005. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol. Behav.* 84, 1-7.
- Alp, P.R., Newsholme, E.A., Zammit, V.A., 1976. Activities of Citrate Synthase and NAD⁺-Linked and NADP⁺-Linked Isocitrate Dehydrogenase in Muscle from Vertebrates and Invertebrates. *Biochem. J.* 154, 689-700.
- Arakawa, M., Ushimaru, N., Osada, N., Oda, T., Ishige, .K, Ito, Y., 2006. N-acetylcysteine selectively protects cerebellar granule cells from 4-hydroxynonenal-induced cell death. *Neurosci Res.* 3, 255-63
- Arida, R.M., Scorza, C.A., Silva, A.V., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.P., 2004. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosc. Lett.* 364, 135-138.
- Banerjee, A.K., Mandal, A., Chanda, D., Chakraborti, S., 2003. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol. and Cell. Biochem.* 253, 307-312.

- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for SOD. *Meth. Biochem. Anal.* 32, 279-312.
- Behl, C., 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. *Subcell Biochem.* 38, 65-78.
- Calabrese, V., Lodi, T.R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., Mangiameli, D., Butterfield, D.A., 2005. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 233, 145-162.
- Chiueh, C.C., 2001. Iron overload, oxidative stress and axonal dystrophy in brain disorders. *Pediatr. Neurol.* 25, 138-147.
- Christen, S., Schaper, M., Lykkesfeldt, J., Siegenthaler, C., Bifrare, Y, Banič, S, Leib, S.L., Tauber, M.G., 2001. Oxidative stress in brain during experimental bacterial meningitis: differential effects of a-phenyl-tert-butyl nitron and n-acetylcysteine treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 754–762.
- Connor, J.R., Snyder, B.S., Beard, J.L., Fine, R.E., Mufson, E.J., 1992. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2, 327-35.
- Coskun, S., Gonul, B., Guzel, N.A., Balabanli, B., 2005. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Mol. Cell Biochem.* 1-2, 135-8.

- Davies, K.J.A., Quintanilha, A.J., Packer, L., 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1198–1205.
- Denadai, B.S., 2000. Avaliação aeróbia. In: Avaliação aeróbia, vol.1 Denadai B.S. ed. Motrix, Rio Claro-Brazil, pp 22-24.
- Dillard, C.J.R.E., Litor, W.M., Savin, E.E., Dumelin, A.L., 1987. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* 45, 927-932.
- Ebbeling, C.B., and Clarkson, P.M., 1989. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med.* 7, 207-234.
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 186, 421-431.
- Fasano, M., Bergamasco, B., Lopiano, L., 2006. Modifications of the iron-neuromelanin system in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 4, 909-16.
- Fauchex, B.A., Martin, M.E., Beaumont, C., Hauw, J.J., Agid, Y., Hirsch, E.C., 2003. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 5, 1142-1148.
- Floyd, R.A., 1999. Antioxidants, Oxidative Stress, and Neurological Disorders. *Experimental Biology and Medicine.* 222, 236-245.

- Floyd, K.A., Carney, J.M., 1991. Age influence on oxidative events during brain ischemia/reperfusion. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12, 155–177.
- Freret, T., Valable, S., Chazalviel, L., Saulnier, R., Mackenzie, E.T., Petit, E., Bernaudin, M., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., 2006. Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1757-65.
- Guelman, L.R., Pagotto, R.M., Di Toro, C.G., Zieher, L.M., 2004. Deferoxamine antioxidant activity on cerebellar granule cells gamma-irradiated in vitro. *Neurotoxicol. Teratol.* 3, 477-83.
- Hessel, E., Haberland, A., Muller, M., Lerche, D., Schimke, I., 2000. Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running? *Clin. Chim. Acta.* 1-2, 145-56.
- Hicdonmez, T., Kanter, M., Tiryaki, M., Parsak, T., Cobanoglu, S., 2006. Neuroprotective effects of N-acetylcysteine on experimental closed head trauma in rats. *Neurochem Res.* 2006 4, 473-81.
- Inal, M., Akyuz, F., Turgut, A., Getsfrid, W.M., 2001. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 4, 564-7.

- Itoh, H., Ohkuwa, T., Yamamoto, T., Sato, Y., Miyamura, M., Naoi, M., 1998. Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci* 21, 1921-9.
- Jae-Hyuk, Y., Hazell, A.S., 2005. N-acetylcysteine attenuates early induction of heme oxygenase-1 following traumatic brain injury. *Brain Res.* 1033, 13– 19.
- Jolitha, A.B., Subramanyam, M.V.V., Asha Devi, S., 2006. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Experimental Gerontology* 41, 753–763
- Kiraly, M.A., Kiraly, S.J., 2005. The effect of exercise on hippocampal integrity: review of recent research. *Int. J. Psychiatry Med.* 1, 75-89.
- Kress, J., Dineley, K.E., Reynolds, I.J., 2002. The Relationship between Intracellular Free Iron and Cell Injury in Cultured Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience.* 14, 5848–5855.
- Leaf, D.A., Kleinman, M.T., Hamilton, M., Barstow, T.J., 1997. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29, 1036-1039.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 186, 464-478.

- Leeuwenburgh, C., Heinecke, J.W., 2001. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Curr. Med. Chem.* 8, 829-838.
- Lin, A.M., Chen, K.B., Chao, P.L., 2005. Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1053, 319-29.
- Liu, R., Liu, W., Doctrow, S.R., Baudry, M., 2003. Iron toxicity in organotypic cultures of hippocampal slices: role of reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 2, 492-502.
- Liu, J., Yeo, H.C., Övervik-Douk E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chu, D.W., Brooks, G.A., Ames, B.N., 2000. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* 89, 21-28.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., and Belcastro, A.N., 1987. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol.* 56, 312-316.
- Lowry, O.H., Rosebough, N.G., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MacRae, P.G., Spirduso, W.W., Cartee, G.D., Farrar, R.P., Wilcox, R.E., 1987. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolite levels. *Neurosci. Lett.* 79, 138-144
- Mader, A., Heck, H., 1986. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. *Int. J. Sports Med.* 7, 45-65.

- Matarredona, E.R., Santiago, M., Cano, J., Machado, A., 1997. Involvement of iron in MPP+ toxicity in substantia nigra: protection by desferrioxamine. *Brain Res.* 773, 76–81.
- Monji, A., Morimoto, N., Okayama, I., Yamashita, N., Tashiro, N., 1994. Effect of dietary vitamin E on lipofuscin accumulation with age in the rat brain. *Brain Res.* 634, 62–68.
- Nakamura, T., Keep, R.F., Hua, Y., Schallert, T., Hoff, J.T., Xi, G., 2003. Deferoxamine-induced attenuation of brain edema and neurological deficits in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Neurosurg. Focus.* 4, ECP4.
- Navarro, A., Gomez, C., Lopez-Cepero, J.M., Boveris, A., 2004. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 3, R505-11.
- Ogonovszky, H., Berkes, I., Kumagai, S., Kaneko, T., Tahara, S., Goto, S., Radák, Z., 2005. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochemistry International* 46, 635–640.
- Özkaya, Y.G., Agar, A., Yargicoglu, P., Hacıoglu, G., Bilmen-Sarikcioglu, S., Özen, I., Alicigüzel, Y., 2002. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab* 5, 377-84.

- Oztasan, N., Taysi, S., Gumustekin, K., Altinkaynak, K., Aktas, O., Timur, H., Siktar, E., Keles, S., Akar, S., Akcay, F., Dane, S., Gul, M., 2004. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 5-6, 622-7.
- Pinho, R.A., Andrades, M.E., Oliveira, M.R., Pirola, A.C., Zago, M., Silveira, P.C., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rats skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol. Intern.* "in press".
- Pinho, R.A., Silveira, P.C.L., Silva, L.A., Streck, E.L., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., 2005. N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environmental Research.* 99, 355-360.
- Ploughman, M., Granter-Button, S., Chernenko, G., Tucker, B.A., Mearow, K.M., Corbett, D., 2005. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-1 and insulin-like growth factor 1 after focal ischemia. *Neurosci.* 136, 991–1001.
- Radák, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., Goto, S., 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem. Int.* 4, 387-92.
- Ritter, C., Andrades, M.E., Reinke, A., Menna-Barreto, S., Moreira, J.C.F., Dal-Pizzol, F., 2004. Treatment with n-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit. Care Med.* 32, 342-349.

- Sastre, J., Gascó, A.M.E., Ferrero, J.A., Furukawa, T., Viña, J., 1992. Exhaustive physical exercise causes and oxidation of glutathione status in blood. Prevention by antioxidant administration. *Am. J. Physiol.* 263, R992–R995.
- Schneider, C.D., Barp, J., Ribeiro J.L., Belló-Klein, A., Oliveira, A.R., 2005. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can. J. Appl. Physiol.* 6, 723-734.
- Sen, C.K., Packer, L., 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Nutr.* 72, 653-669.
- Siu, P.M., Donley, D.A., Bryner, R.W., Always, S.E., 2003. Citrate Synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 94, 555-560.
- Somani, S.M., Ravi, R., Rybak, L.P., 1995. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4, 635-9.
- Stadtman, E.R., 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. & Med.* 9, 315-325.
- Sureda, A., Tauler, P., Aguiló, A., Cases, N., Fuentespina, E., Cordova, A., Tur, J. A., Pons, A., 2005. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res* 12, 1317-24.

- Suzuki, M., Katamine, S., Tatsumi, S., 1983. Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2, 141-51.
- Tsai, K., Hsu, T.G., Hsu, K.M., Cheng, H., Liu, T.Y., Hsu, C.F., Kong, C.W., 2001. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 1465-72.
- Vaynman, S., Gomez-Pinilla, F., 2005. License to Run: Exercise Impacts Functional Plasticity in the Intact and Injured Central Nervous System by Using Neurotrophins. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 4, 283-95.
- Viguie, C.A., Frei, B., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., Packer, L., Brooks, G.A., 1993. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J. Appl. Physiol.* 2, 566-72.
- Viña, J., Gomez-Cabrera, M.C., Lloret, A., Marquez, R., Miñana, J.B., Pallardó, F.V., Sastre, J., 2000. Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. *IUBMB Life.* 50, 271–277.
- Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 35:1389-94.

Zhang, X., Xie, W., Qu, S., Pan, T., Wang, X., Le, W., 2005. Neuroprotection by iron chelator against Proteasome inhibitor-induced nigral degeneration. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 333, 544-549.

Zhang, J.R., Andrus, P.K., Hall, E.D., 1993. Age-related regional changes in hydroxyl radical stress and antioxidants in gerbil brain. *J. Neurochem.* 61, 1640–1647.

Yi, J.H., Hoover, R., McIntosh, T.K., Hazell, A.S., 2006. Early, transient increase in complexin I and complexin II in the cerebral cortex following traumatic brain injury is attenuated by N-acetylcysteine. *J. Neurotrauma.* 1, 86-96.

Yi, J.H., Hazell, A.S., 2005. N-acetylcysteine attenuates early induction of heme oxygenase-1 following traumatic brain injury. *Brain Res.* 1, 13-9.

Tables

Table 1

Variable	Control	Exercise	Exercise +		
			NAC	DFX	NAC+DFX
TBARS levels ^a	0.24±0.01	0.46±0.09*	0.22±0.03 [#]	0.29±0.04 [#]	0.28±0.01 [#]
Carbonyl levels ^b	2.78±1.1	12.02±2.93*	1.3±0.24 [#]	2.06±0.43 [#]	2.05±0.43 [#]
CAT activity ^c	2.9±0.6	9.1±1.5*	3.8±0.3 [#]	6.5±0.7*	4.3±0.1 [#]

Table 2

Variable	Control	Exercise	Exercise +		
			NAC	DFX	NAC+DFX
TBARS levels ^a	0.23±0.02	0.52±0.11*	0.28±0.02 [#]	0.28±0.02 [#]	0.18±0.01 [#]
Carbonyl levels ^b	5.07±1.23	9.41±2.62	1.48±0.38 [#]	2.24±0.79 [#]	6.88±1.21
CAT activity ^c	1.6±0.03	2.8±0.4	8.6±0.2* [#]	7.4±0.5* [#]	2.3±0.3
SOD activity ^d	0.83±0.19	2.81±0.49*	0.56±0.07 [#]	0.56±0.04 [#]	0.96±0.07 [#]

Table 3

	Control	Exercise
CS (U CS/mg protein)	0.327±0.042	0.589±0.010*
Lactate (mmol/l)	6.9±0.7	4.2±0.4*

Table 4

wk	Belt speed (m/min)	Duration (min)
1	10.0	10
2	13.5	10
3	13.5	20
4	13.5	30
5	13.5	40
6	16.5	30
7	16.5	40
8	16.5	50
9	16.5	50
10	16.5	60
11	16.5	60
12	16.5	60

Table Legends

Table 1. Effects of twelve weeks of running treadmill on oxidative biomarkers of C57BL-6F mice striatum. Lipid peroxidation (TBARS). Protein oxidation (Carbonyl). Catalase activity (CAT). Values are mean \pm standard deviation for nine animals per group. * $P < 0.05$ vs. Control, # $P < 0.05$ vs. Exercise. ANOVA, Duncan post hoc. ^a. mmol MDA/mg protein. ^b. mol carbonyl/mg protein. ^c. U CAT/mg protein.

Table 2. Effects of twelve weeks of running treadmill on oxidative biomarkers of C57BL-6F mice hippocampus. Lipid peroxidation (TBARS). Protein oxidation (Carbonyl). Catalase activity (CAT). Superoxide dismutase activity (SOD). Values are mean \pm standard deviation for nine animals per group. * $P < 0.05$ vs. Control, # $P < 0.05$ vs. Exercise. ANOVA, Duncan post hoc. ^a. mmol MDA/mg protein. ^b. mol carbonyl/mg protein. ^c. U CAT/mg protein.

Table 3. The activity of soleus citrate synthase and lactate blood levels of C57BL-6F mice. Values are mean \pm standard deviation for nine animals per group. * $P < 0.05$ vs. Control.

ANOVA, Duncan post hoc. ^a mmol MDA/mg protein. ^b mol carbonyl/mg protein. ^c U CAT/mg protein.

Table 4. Treadmill program of C57BL-6F mice

Figures

Figure 1

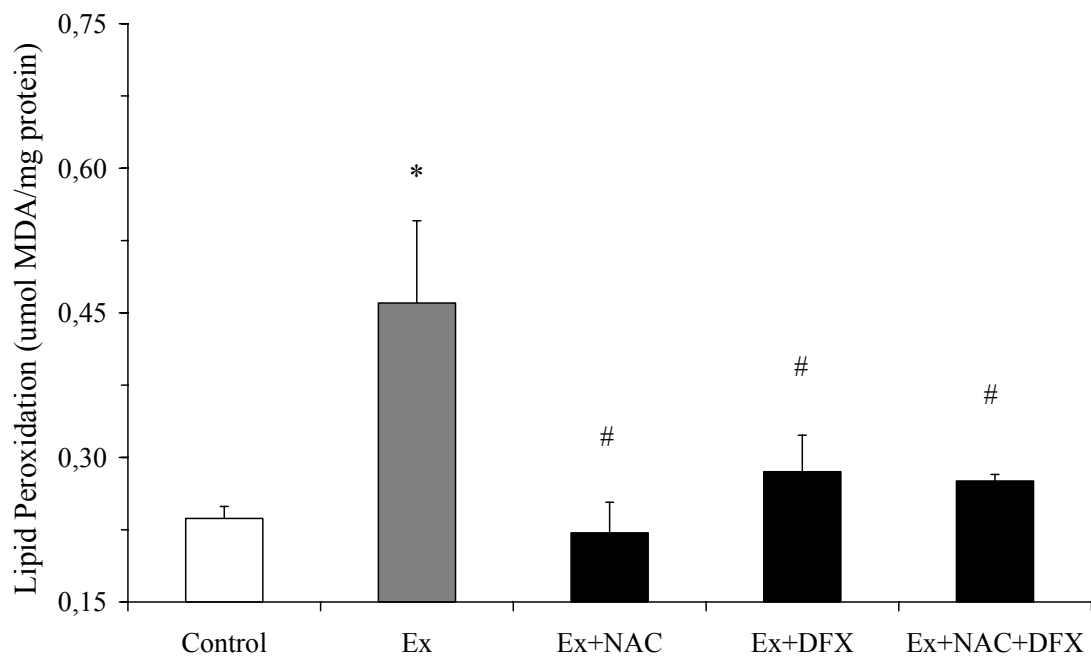


Figure 2

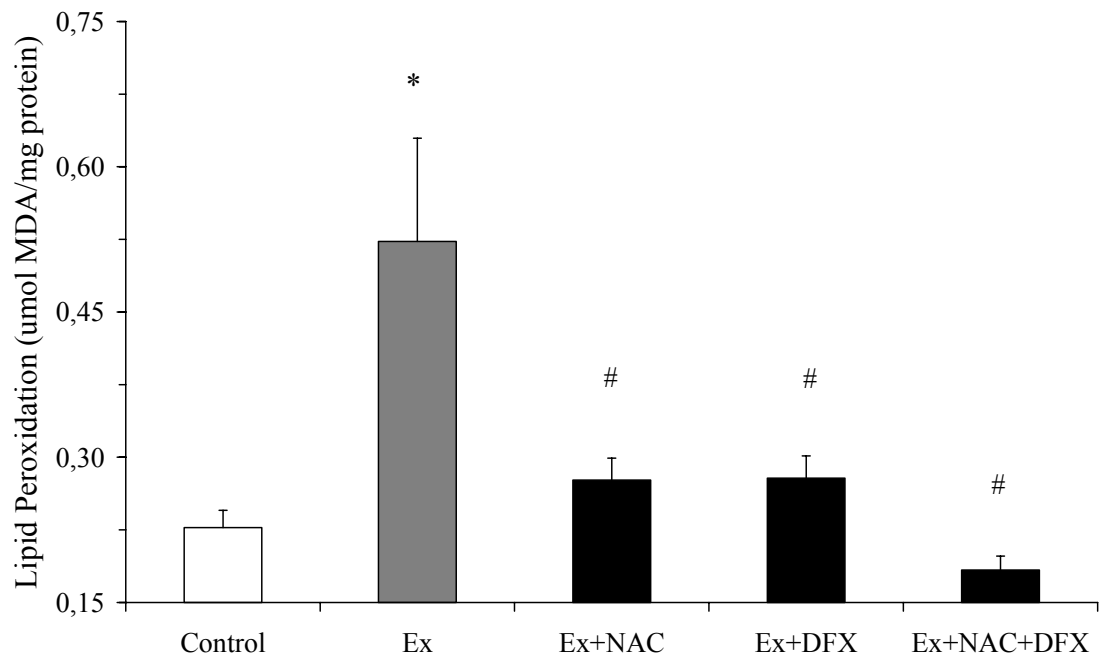


Figure 3

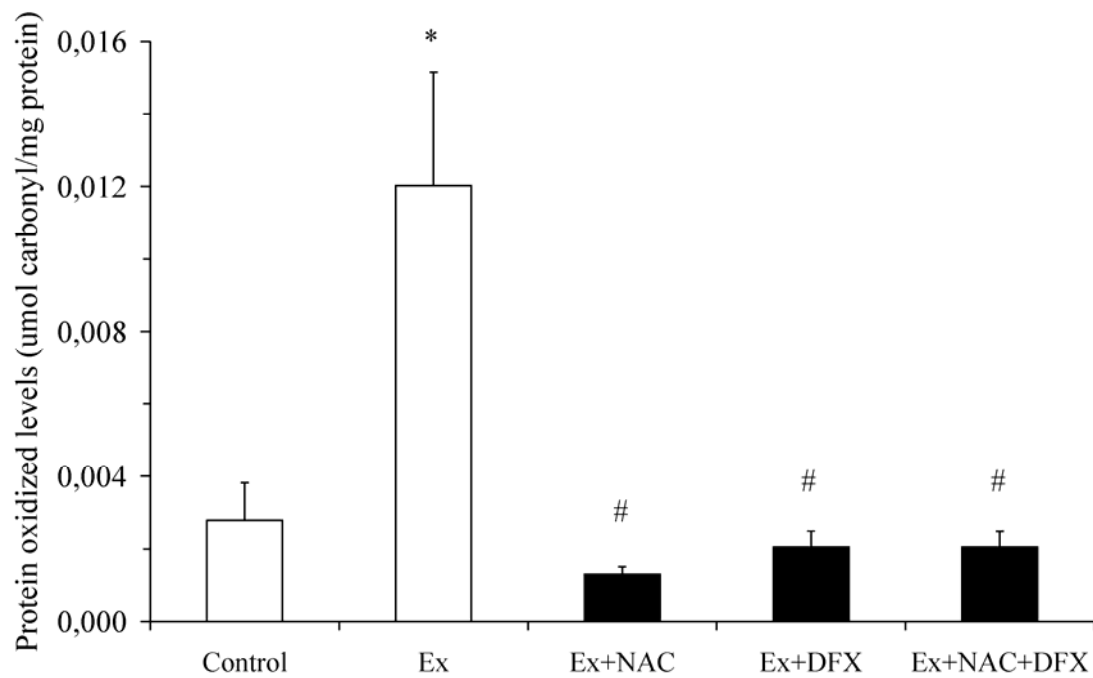


Figure 4

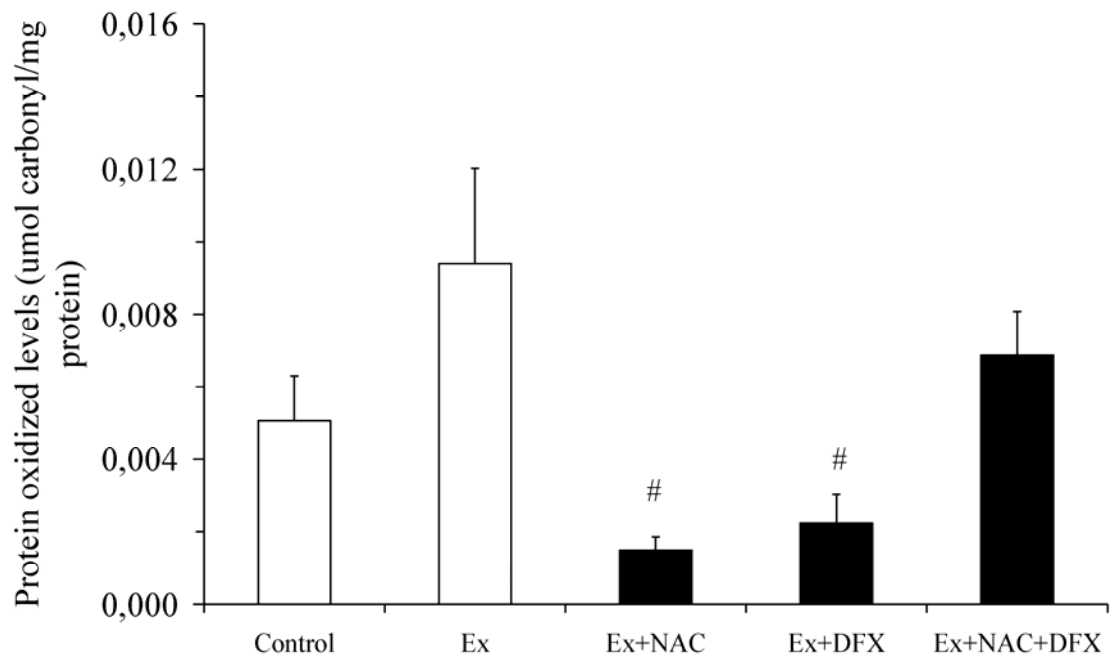


Figure 5

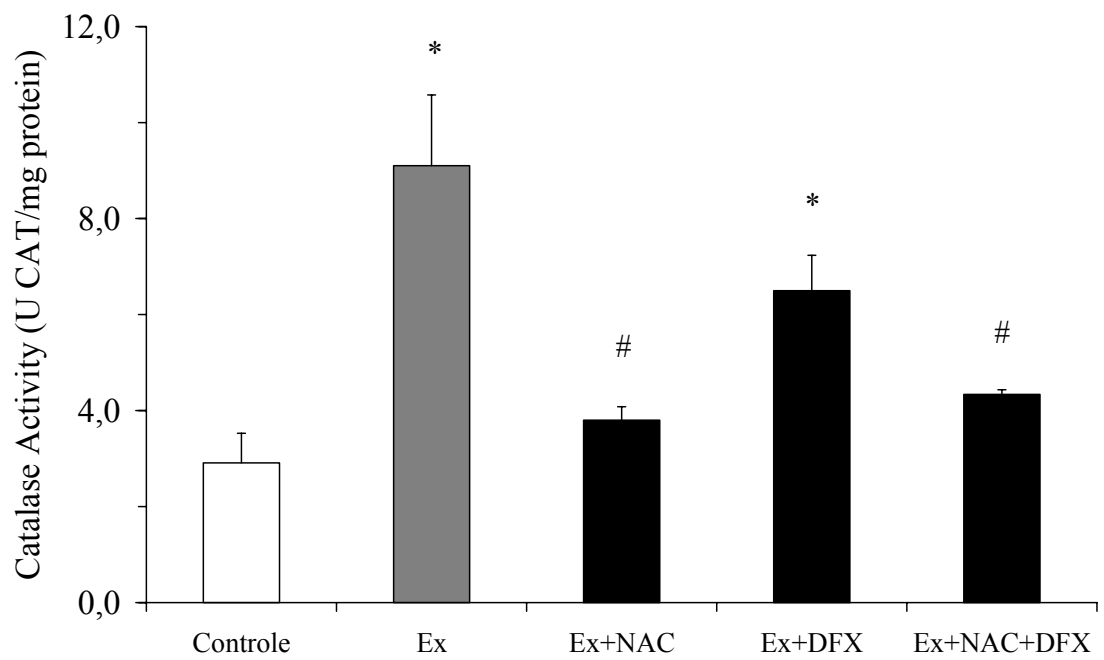


Figure 6

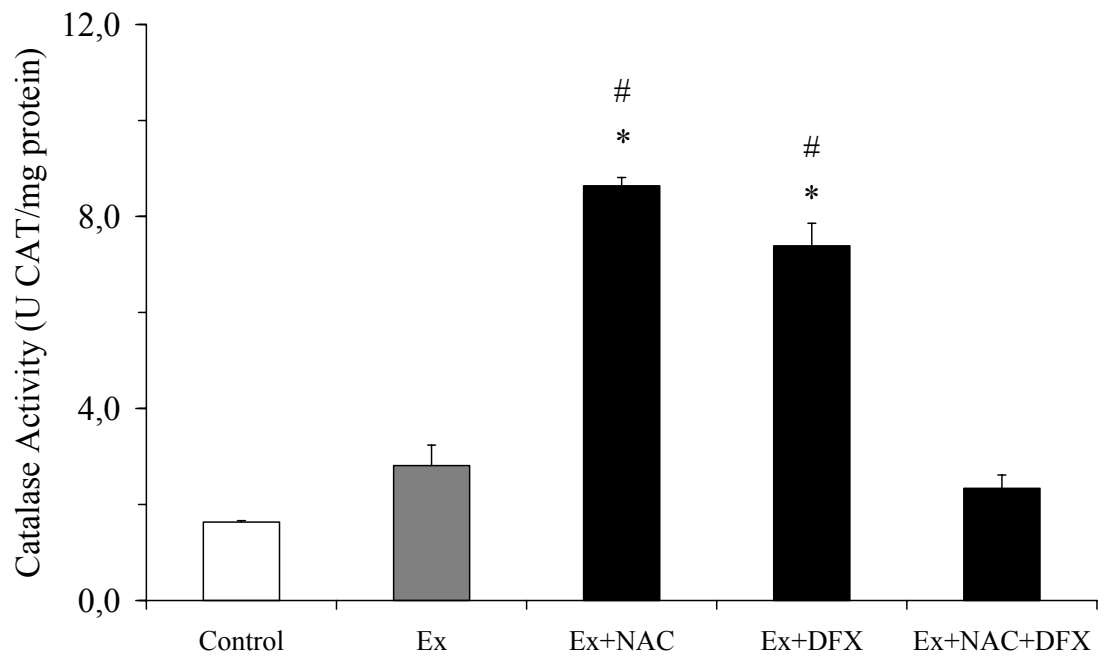


Figure 7

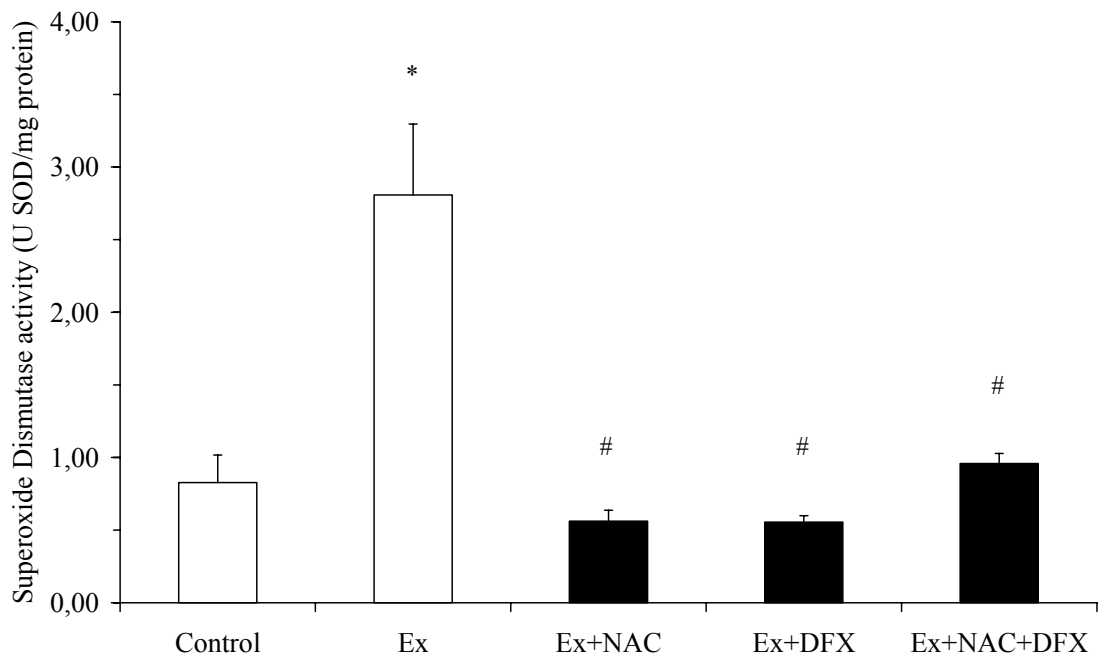


Figure Legends

Fig. 1 – Lipoperoxidation in striatum of rats after twelve weeks of exercise and NAC, DFX or NAC plus DFX supplementation. Values are mean \pm S.E.M. for nine animals per group. Ex – exercise, NAC – N-Acetylcysteine, DFX – Deferoxamine. * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. exercise, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 2 – Lipoperoxidation parameters in hippocampus of mice after training and NAC, DFX or NAC plus DFX supplementation. Values are mean \pm S.E.M. for nine animals per group. Ex – exercise, NAC – N-Acetylcysteine, DFX – Deferoxamine. * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. exercise, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 3 – The levels of oxidized proteins (carbonyl) in mice striatum afterwards treadmill-program exercise with NAC, DFX or NAC plus DFX supplementation. Values are mean \pm S.E.M. for nine animals per group. Ex – exercise, NAC – N-Acetylcysteine, DFX – Deferoxamine. * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. exercise, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 4 – Hippocampal carbonyl levels increased after intense exercise training and decreased with the supplementation of NAC, DFX or NAC plus DFX supplementation. Values are mean \pm S.E.M. for nine animals per group. Ex – exercise, NAC – N-Acetylcysteine, DFX – Deferoxamine. * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. exercise, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 5 – Catalase activity in mice striatum after treadmill program and NAC, DFX or NAC plus DFX supplementation. Values are mean \pm S.E.M. for nine animals per group. Ex –

exercise, NAC – N-Acetylcysteine, DFX – Deferoxamine. * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. exercise, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 6 – Values of hippocampal catalase activity after treadmill program and NAC, DFX or NAC plus DFX supplementation. Values are mean \pm S.E.M. for nine animals per group. Ex – exercise, NAC – N-Acetylcysteine, DFX – Deferoxamine. * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. exercise, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 7 – Treadmill training enhance SOD activity in mice hippocampus prevented by NAC, DFX or NAC plus DFX supplementation. Values are mean \pm S.E.M. for nine animals per group. Ex – exercise, NAC – N-Acetylcysteine, DFX – Deferoxamine. * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. exercise, ANOVA, Duncan post hoc.

CAPÍTULO 4

MODERATE-INTENSE PHYSICAL EXERCISE INDUCES MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND DECREASES BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR LEVELS IN MICE BRAIN

Aderbal S. Aguiar Jr¹, Talita Tuon¹, Cléber A. Pinho¹, Luciano A. Silva¹, Ana C. Andreazza²,
Flávio Kapczinski³ João Quevedo⁴, Emílio L. Streck⁵, and Ricardo A. Pinho¹

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Laboratório Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

⁵Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

Artigo submetido a Neuroscience

Abstract – Mitochondrial dysfunction and decreased BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) levels are common pathological mechanisms of brain aging and neurodegeneration. Physical activity enhances synaptic plasticity and cognitive function by protection against neuronal oxidative stress and improves neuroprotection induced by BDNF. However, there are conflicts between the beneficial effects of free radical overproduction induced by intense exercise in neurotrophins and brain oxidative metabolism. The objective of this study was to investigate the effects of intense physical training on BDNF levels, cytochrome c oxidase activity, and lipoperoxidation levels on mice brain cortex. Twenty-seven albino adult male CF1 mice were assigned to 3 groups: control untrained, intermittent exercised (3 x 15 min) and continuous exercised (45 min). The training was accomplished in treadmill, 5 days/wk, during 8 weeks using an incremental speed program: 13.5 m/min (1st to 4th week) and 16.5 m/min (5th to 8th week). Blood lactate analysis was performed in the first and last exercise session. Mice were sacrificed 48h after last exercise session and their soleus (citrate synthase activity) and brain cortex (BDNF levels, lipoperoxidation-TBARS levels and cytochrome c oxidase activity) were surgically removed and immediately stored at -80°C for posterior analyses. Training increases significantly ($P<0.05$) citrate synthase activity when compared to untrained control. Blood lactate levels classified the exercise such moderate-high intensity. The intermittent exercise training significantly ($P<0.05$) reduced brain cortex cytochrome c oxidase activity when compared to control. BDNF levels decreased significantly in both exercise groups. Besides, continuous and intermittent exercise groups increase significantly ($P<0.05$) TBARS levels in brain cortex, an oxidative stress biomarker. These data are compatible with neuronal aging and neurodegeneration induced by exercise. In summary, moderate-intense exercise

promotes brain mitochondrial dysfunction and decreases neuroprotection induced by BDNF.

Key words: cytochrome c oxidase, citrate synthase, oxidative stress, BDNF, physical exercise.

INTRODUCTION

Neurological functions and plasticity are well influenced by experiences that intrinsically affect the brain bioenergetics status, such as physical activity (Pang et al, 1985; Ding et al, 2006; Albeck et al, 2005), dietary restriction (Maswood et al, 2004; Mattson, 2003; Luchsinger, 2002) and enriched environment (Lewis, 2004). The physical activity affects the synaptic and cognitive plasticity with upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA (Vaynman et al, 2006b; Adlard et al, 2004; Zhu et al, 2006). BDNF signaling at synapses enhances long-term potentiation, a process of synaptic strengthening associated with learning and memory (Vaynman et al, 2006b). BDNF is also involved in controlling energy metabolism with increases in mitochondrial activity (Vaynman et al, 2006a). Physical activity decreased the aging-associated development of oxidative stress by preventing the decrease in mitochondrial cytochrome c oxidase (complex IV) activity observed in old mice brains (Navarro et al, 2004).

The most of these studies utilized the running wheel model of physical activity (Colcombe et al, 2004; Cotman et al, 2002; Russo-Neustadt et al, 1999; Young et al, 1999), with unknown exercise intensity markers how VO_2 max or lactate threshold. The intensity of exercise should be considered when design programs to optimize physical performance (Cronin et al, 2002; Billat et al, 2005) or health benefits

because their effects are dosis-dependent (Nied and Franklin, 2002). So, these experimental procedures should determine the relative work load applied to biologic system (Denadai, 2000). The running wheel probably performed a low level intensity exercise and the effect of high level exercise remains unknown. Moderate-intense physical exercise may cause deleterious biologic adjusts and adaptations like exhaustion and overtraining, respectively. Exhaustion and training lack (Tauler et al, 2005; Sureda et al, 2005; Aguiló et al, 2005) showed high free radical formation during training and competition. Exercise produces high reactive oxygen species (ROS) levels only when it is exhaustive (Sastre et al, 1992). High reactive oxygen species levels induces oxidative damage near the radical production sites, mainly in tissues with high mitochondrial energy metabolism and poor antioxidant defenses, like brain.

Mitochondrial oxidative phosphorylation generates most of the reactive oxygen species in the neuron increased by inhibition of the electron transport chain. Additionally, the oxidative phosphorylation system itself is vulnerable to damage by ROS (Rizzardini et al, 2006; Shang et al, 2004; Sullivan et al, 2004; France-Lanord et al, 1997). Impaired electron transport chain, in turn, leads to decreased ATP production, increased formation of toxic oxygen species, and altered calcium homeostasis, leading to neuron degeneration and death (Keeney et al, 2006; Ellis et al, 2005; Casademont et al, 2005). These situations are associated to low brain function. A inhibition of 75% on electron transport chain complexes II-IV and 25% on electron transport chain complex I induces oxidative stress by decreasing BDNF levels (Mattson and Liu, 2002). The importance of BDNF in impacting energy metabolism is seen in disorders of energy balance, evidenced by mitochondrial involvement in aging and neurodegenerative diseases (Duncan and Heales, 2005;

Zhu et al, 2004; Vitte et al, 2004; Ogawa et al, 2002). Also, cytochrome c oxidase is used as marker of neurological function in aged mice (Navarro, 2004). Cytochrome c oxidase was selectively inhibited by beta amyloid protein in Alzheimer Disease (Parks et al, 2001; Canevari et al, 1999).

Free access to running wheels showed increases in rodents' cerebral functions (Gómez-Pinilla et al, 1998; Vaynman et al, 2005; Vaynman et al, 2006; Briones et al, 2006; Olson et al, 2006; Redila et al, 2006). However, humans mostly engage in regimental physical training instead and remains unclear the neurological mechanisms of adaptations to moderate-intense exercise. On the treadmill, performance model and aerobic capacity in mice are generally assessed by total exercise time during and incremental speed (Dohm et al, 2001; Lightfoot et al, 2001). In the present study, we employ a forced treadmill running regimen with intensity control. The aim was to analyze the lipid peroxidation and BDNF levels, and cytochrome c oxidase activity on brain cortex after exposure to moderate-intense aerobic exercise.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Twenty seven albino male CF1 mice, weighing 30-35g, 3-4 month old were used. Nuvilab CR1 food (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba/PR, Brazil) and water were available ad libitum. The room was maintained at 70% humidity/20±2°C on a 12 h light/dark cycle with lights on at 06.00 h.

Mice were randomly assigned to 3 groups designated (n = 9 each group): control, intermittent exercised and continuous exercised.

All procedures are in agreement with European Communities Council Directive of 24 november 1986 (86/609/EEC) and were approved by Ethics Committee of Universidade do Extremo Sul Catarinense, Brazil.

Exercise protocol and sacrifice

All groups were habituated on a motor-drive treadmill 8 m/min without inclination for 10 min during 5 days. Exercise groups were given running treadmill training for 5 days/wk over 8 weeks using an incremental running speed program to obtain progressive levels of exercise (Table 1). Intermittent exercise group performed the exercise 3 times of 15 minutes/day (morning, evening and night) and continuous group once of 45 minutes at night. Anyone stimuli were used to promote this exercise protocol.

The exercise training protocol was stopped 48 h before sacrifice. The mice were anesthetized with CO₂ and sacrificed by cervical dislocation. The soleus muscle and the brain were immediately removed and free from blood; and the tissues were dissected on ice, stored and frozen at -80°C until analysis.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF levels were measured with sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Chemicon, USA). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:2 in

sample diluents and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of BDNF. Plates were then washed four times with wash buffer, added monoclonal anti-BDNF rabbit antibody (diluted 1:1000 with sample diluents), and incubated for 3 h at room temperature. After washing, a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated (diluted 1:1000) for 1 h at room temperature was carried out. After addition of streptavidin-enzyme, substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set in 450 nm). The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density and BDNF concentration.

Cytochrome c oxidase activity (COX)

Brain cortex was homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/ml heparin). The homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 min and the supernatants kept at -70°C until used for enzyme activity determination. The maximal period between homogenate preparation and enzyme analysis was always less than 5 days.

The cytochrome c oxidase (COX, complex IV) was measured (Rustin et al, 1994) by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm with 580 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The reaction buffer contained 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM n-dodecyl-d-maltoside, 2–4 μg homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7 μg reduced cytochrome c. The activity of COX was measured at 25°C for 10 min.

Lipid peroxidation assay

The 2-thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) levels were measured (Draper and Hadley, 1990) and expressed like Malondialdehyde (MDA) equivalent. Briefly, the samples were mixed with 1 ml 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.67% thiobarbituric acid, subsequently; they were heated in a boiling water bath for 15 min. The TBARS were determined by 535 nm absorbance and the results are given as nmol MDA/mg protein.

Muscle oxidative capacity

Due to collaborative tissue requirements and dissection time limitations, citrate synthase (CS) analysis (Alp et al, 1976) was performed only on the soleus. The tissue was weighed and homogenized with a glass homogenizer on ice in 100 mM Tris-HCl at a constant weight-to-volume ratio. Sample homogenate was then added to a reaction mix of 100 mM Tris-HCl, 1.0 mM dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), and 3.9 mM acetyl coenzyme A. After addition of 1.0 mM oxaloacetate, absorbance at 412 nm was recorded for a 2-min period. Mean absorbance change per minute was recorded for each sample, and CS activity in millimole per minute per gram was then calculated by using an extinction coefficient of 13.6.

Physical exercise intensity

After the first and last exercise session, blood Lactate levels were measured from 15 to 50 μ l of tail capillary blood, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Roche, Germany). This blood sample was put into a

glass fibre fleece where the erythrocytes were retained. Lactate was determined by reflectance photometry at a wave length of 657 nm via colorimetric lactate-oxidase mediator reaction.

Measurement of protein

Protein concentration was estimated with bovine serum albumin as standard (Lowry et al, 1951).

Statistical analysis

Comparison between means was performed by ANOVA followed by the Duncan post hoc test. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a compatible computer. A $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF): the moderate-intense running treadmill program induced significantly ($P < 0.05$) changes in neurotrophic factors (Fig. 1), with decrease in BDNF levels of intermittent (189.2 ± 21.0 pg BDNF/ μ g protein) and continuous (152.7 ± 16.0 pg BDNF/ μ g protein) exercised groups in relation to control (264.5 ± 14.4 pg BDNF/ μ g protein).

Cytochrome oxidase activity (COX): the COX in intermittent exercise (122.9 ± 3.9 nmol/min.mg protein) decreased significantly ($P < 0.05$) when compared to observed brain control levels (139.5 ± 6.4 nmol/min.mg protein). COX activity of continuous

exercised group (131.4 ± 3.8 nmol/min.mg protein) doesn't alter with the moderate-intense training (Fig. 2).

Lipid Peroxidation: In the cortex, the lipid peroxidation level (Fig. 3) increased significantly ($P < 0.05$) as a result of exercise training in intermittent (0.24 ± 0.04 μ g MDA/mg protein) and continuous (0.27 ± 0.05 μ g MDA/mg protein) exercised group in relation to control (0.11 ± 0.02 μ g MDA/mg protein).

Citrate synthase activity (CS): The results indicate that the treadmill-training program used was sufficient to increase the oxidative metabolism in skeletal muscle. CS activity in soleus muscle in continuous exercise groups was significantly higher than in Control group (Continuous = 0.589 ± 0.050 U CS/mg protein, Control = 0.327 ± 0.042 U CS/mg protein). In intermittent training the CS activity it was not altered (Table 2).

Lactate: lactate level was defined as the indicator of intensity of exercise. The results show that after the first exercise session the blood lactate levels reached 7.3 ± 0.8 mmol/l and after the last session the exercise produced a blood lactate level of 4.3 ± 0.4 mmol/l in continuous exercise group (Table 2).

DISCUSSION

Several studies have been carried out to determine the influence of exercise training in the mitochondrial enzyme adaptation in skeletal muscle of rats (Siu et al., 2003; Pinho et al., 2006). We observed increase in the CS activity in soleus muscle after training program in continuous group. The data suggest that eight weeks of training altered oxidative response in skeletal muscle (table 2).

We also observed that anaerobic threshold, determined for the level lactato remained with high levels after the last training session, suggesting that the intensity

of the exercise was moderate to intense. The anaerobic threshold is a term that refers to the oxygen consumption during exercise above which the rate of lactate production exceeds the rate of lactate removal, thus causing increased in tissues blood lactate levels (Voltarelli et al, 2002). In this study (table 2), the mice trained aerobic metabolism fail to remove lactate from anaerobic metabolism in exercise (Denadai, 2000). The mice of our study performed the exercise near the anaerobic threshold interval (Mader and Heck, 1986). This occurs in submaximal exercises intensities, in general between 50-80% of the maximal load and at a blood lactate concentration of approximately 4.0 mmol/l (Denadai, 2000; Mader and Heck, 1986) and 4.2 mmol/l for rats (Özkaya et al, 2002).

Afterwards this exercise program, brain show a significantly increase content of oxidation products (Fig. 3) in continuous and intermittent exercised groups and diminished mitochondrial functional activity (Fig. 2) in intermittent exercised group; mitochondria in the described condition are called dysfunctional mitochondria, common to aging and neurodegenerative diseases. Many signals can initiate or 'trigger' apoptosis in neurons. Exhaustive exercise is associated with accelerated generation of ROS that results in oxidative stress (Aguiló et al, 2005; Viña et al, 2000; Itoh et al 1998) and appears to be related to high exercise intensity (Alessio, 1993; Suzuki et al, 1983). COX (complex IV) is the most vulnerable to peroxidative stress, but complexes I and II are also affected (Cleeter et al, 1994; Benzi et al, 1991). This vulnerability of the electron transport chain complexes to repeatable peroxidative stress may generate additional free radicals that may damage mainly mitochondrial macromolecules and membrane-associated proteins: (i) NADH-cytochrome c reductase, (ii) cytochrome c oxidase and (iii) mitochondrial nitric oxide synthase

(Allen et al, 2005; Navarro, 2004; Benzi et al, 1991). Impaired electron transport, in turn, leads to impairment in ATP production (Ojaimi et al, 1999).

COX is of interest since it is tightly coupled to mitochondrial ATP production. This enzyme is composed of 13 mtDNA encoded polypeptide: the subunits I, II, and III. The subunits I and II incorporate copper atoms and hemes which are the redox centers for electron transport chain. Subunit II binds cytochrome c, while subunit III plays a role in proton translocation. Subunits II and III are within a deletion hot-spot region, with subunit II being lost with the common 4977 bp mtDNA deletion, that has been reported at increased levels in the ageing brain (Ojaimi et al, 1999; Corral-Debrinski et al., 1992).

Oxidative stress can decrease COX activity by free radical attack to iron-linkage COX subunits via Fenton reaction. The relation between oxidative stress and respiratory complex deficiencies occurs on aging and neurodegeneration (Calabrese et al, 2005; Navarro et al, 2002; Markesbery, 1997). Impairment of cytochrome oxidase activity was found in Huntington Disease caudate nucleus, hippocampus Alzheimer Disease (Sullivan and Brown, 2005; Cassarino and Bennett, 1999), and can lead to a parkinsonian syndrome in basal ganglia by neurotoxins azide or N-methylpyridinium ion (MPP+) (Cassarino and Bennett, 1999; Cooper and Schapira, 1997).

Neuron death may not derive simply from inhibition of energy metabolism, but also release of pro-apoptosis signals including Ca^{+2} and membrane cytochrome c release (Yan et al, 2006; Jackson and Tayer, 2006; Cristofanon et al, 2006). Cytochrome oxidase defects determined impaired intracellular calcium buffering (Sheehan et al, 1997). In this study, we found oxidative stress and mitochondria failure exercise-induced, these findings establish a relationship between oxidative

stress and bioenergy degradation as a key feature of the early aging process induced by regular and moderate-intense physical exercise.

The best-studied signal is lack of neurotrophic factor support present on both exercise groups (Fig. 1), which may trigger apoptosis during development of the nervous system and possibly in neurodegenerative disorders. There are mechanisms by related to the maintenance of energy balance of the neuron, such as oxidative stress, which interact with molecular events that modulate neuronal and behavioral plasticity, such as BDNF. Generally physical activity is associated to BDNF improvement. BDNF can prevent neurodegeneration and neuronal death, in part by stimulating resistance to oxidative stress and regulation of calcium homeostasis (Radák et al, 2006; Smith and Zigmond, 2003; Mattson, 2000). Neurotrophic factors have been identified that can protect neurons against apoptosis by activating receptors linked through kinase cascades to production of cell survival-promoting proteins. Oxidative damage exercise-induced occurs only when exercise is exhaustive (Aguiló et al, 2005; Viña et al, 2000). In turn, heightened oxidative stress, the harmful by-product of mitochondrial dysfunction, interrelates with decreased BDNF protein levels to affect synaptic plasticity and cognitive function (Wu et al., 2004). Our results showed that moderate-intense exercise decrease neuroprotection BDNF-induced and consequently energy metabolism in CNS, with increased brain oxidative stress. This is other important factor to development of early brain aging exercise-induced.

In summary, the practice of physical exercise in anaerobic threshold intensity decrease COX activity and increase TBARS levels in brain cortex, similar to the one induced by mitochondrial dysfunction. The brain oxidative damage induced by exercise decreases BDNF levels and consequently leads impairment to

neuroprotection. The present study provides an evidence of early brain aging afterwards regular practice of moderate-intense physical exercise that is physiologically different from that observed for physical activity of light intensity, like synaptic plasticity and cognitive improvement.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from CNPq/MCT (Brazil), CAPES/MEC (Brazil), UNESCO (Brazil) and FAPESC (Brazil).

REFERENCES

Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A, Pons A (2005) Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior* 84:1-7.

Alessio HM (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25:218-224.

Alp PR, Newsholme EA, Zammit, VA (1976) Activities of Citrate Synthase and NAD⁺-Linked and NADP⁺-Linked Isocitrate Dehydrogenase in Muscle from Vertebrates and Invertebrates. *Biochem J* 154:689-700.

Adlard PA, Cotman CW (2004). Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience* 4:985-92.

Albeck DS, Beck KD, Kung LH, Sano K, Brennan FX (2005) Leverpress escape/avoidance training increases neurotrophin levels in rat brain. *Integr Physiol Behav Sci* 1:28-34.

Allen C. Bowling and M. Flint Beal (1995) Bioenergetic and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Life Sciences* 56:1151-1171.

Benzi G, Curti D, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F (1991) Sequential damage in mitochondrial complexes by peroxidative stress. *Neurochem Res* 12:1295-302.

Billat VL, Mouisel E, Roblot N, Melki J (2005) Inter- and intrastrain variation in mouse critical running speed. *J Appl Physiol* 4:1258-63.

Briones TL (2006) Environment, physical activity, and neurogenesis: implications for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* (1):49-54.

Calabrese V, Lodi TR, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, D Butterfield (2005) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 233:145 – 162

Canevari L, Clark JB, Bates TE (1999) Beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett* (1):131-4.

Casademont J, Rodriguez-Santiago B, Miro O, Beato A, Lopez S, Nunes V, Cardellach F (2005) Mitochondrial respiratory chain in brain homogenates: activities in different brain areas in patients with Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res* 1:1-7.

Cassarino DS, Bennett JP (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Research Reviews* 29):1–25.

Cleeter MWJ, Coopfib JM, Darley-Usmard VM, Moncadad S, Schapira AHV (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Letters* 345:50-54.

Colcombe SJ, Kramer AF, Erickson KI, Scalf P, McAuley E, Cohen NJ, Webb A, Jerome GJ, Marquez DX, Elavsky S (2004) Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3316–3321.

Cooper JM, Schapira AHV (1997) Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29:175-183.

Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC (1992) Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 2:324–328.

Cotman CW, Berchtold NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25:295–301.

Cristofanon S, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M (2006) Glutathione as a mediator of apoptotic cell signaling pathways. *Biochem Pharmacol* “in press”.

Cronin JB, McNair PJ, Marshall RN (2002) Is velocity-specific strength training important in improving functional performance? *J Sports Med Phys Fitness* 3:267-73.

Denadai BS (2000) Avaliação aeróbia. In: *Avaliação aeróbia*, vol.1 (Denadai BS, ed), pp 22-24 Rio Claro-Brazil: Motrix.

Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2006) Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 3:823-33.

Dohm MR, Hayes JP, Garland T Jr (2001) The quantitative genetics of maximal and basal rates of oxygen consumption in mice. *Genetics* 159: 267–277.

Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 186:421-431.

Duncan AJ, Heales SJ (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* 1-2:67-96.

Ellis CE, Murphy EJ, Mitchell DC, Golovko MY, Scaglia F, Barcelo-Coblijn GC, Nussbaum RL (2005) Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. *Mol Cell Biol* 22:10190-201.

France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M (1997) Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem* 4:1612-21.

Gómez-Pinilla F, Kesslak P (1998) Spatial learning and physical activity contributes to induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognitive association with exercise. *Neuroscience* 85:53-61.

Itoh H, Ohkuwa T, Yamamoto T, Sato Y, Miyamura M, Naoi M (1998) Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci* 21:1921-9.

Jackson JG, Thayer SA (2006) Mitochondrial Modulation of Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} -Release in Rat Sensory Neurons. *J Neurophysiol.* 3:1093-104.

Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 19:5256-64.

Lewis MH (2004) Environmental complexity and central nervous system development and function. *Ment Retard Dev Disabil Res Ver* 2:91-5.

Lightfoot JT, Turner MJ, Debate KA, and Kleeberger SR. (2001) Interstrain variation in murine aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc* 33:2053–2057.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R (2002) Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1258–1263.

Mader A, Heck (1986) A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. *Int J Sports Med* 7:45-65.

Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1:134-47.

Maswood N, Young J, Tilmont E, Zhang Z, Gash DM, Gerhardt GA, Grondin R, Roth GS, Mattison J, Lane MA, Carson RE, Cohen RM, Mouton PR, Quigley C, Mattson MP, Ingram DK (2004) Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *PNAS* 101:18171–18176.

Mattson MP, Liu D (2002) Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2:215-31.

Mattson MP (2003) Gene–diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med* 139:441–444.

Mattson MP (2000) Apoptosis in Neurodegenerative disorders. *Nature Reviews* 1:120-129.

Navarro A (2004) Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Molecular Aspects of Medicine* 25:37–48.

Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM, Boveris A (2004) Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 3:R505-11.

Navarro A, Del Pino MJS, Gomez C, Peralta JL, Boveris A (2002) Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 282:985–992.

Nied RJ, Franklin B (2002) Promoting and prescribing exercise for the elderly. *Am Fam Physician* 3:419-26.

Ogawa O, Zhu X, Perry G, Smith MA (2002) Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in neurodegenerative disease. *Sci Aging Knowledge Environ* 41:pe16.

Ojaimi J, Masters CL, Opeskin K, McKelvie P, Byrne E (1999) Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age. *Mechanisms of Ageing and Development* 1999 111:39-47.

Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR (2006) Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 3:250-60.

Özkaya YG, Agar A, Yargicoglu P, Hacioglu G, Bilmen-Sarikcioglu S, Özen I, Alicigüzel Y (2002) The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab* 5:377-84.

Pang TY, Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Hannan AJ (2006) Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience* 2:569-84.

Parks JK, Smith TS, Trimmer PA, Bennett JP Jr, Parker WD Jr (2001) Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. *J Neurochem* 4:1050-6.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago M, Silveira PC, Dal-Pizzol F, Moreira JCF (2006) Imbalance in SOD/CAT activities in rats skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Intern* "in press".

Radák Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S (2006) The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochemistry International* 4:387-92.

Redila VA, Christie BR (2006) Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience* 4:1299-307.

Rizzardini M, Lupi M, Mangolini A, Babetto E, Ubezio P, Cantoni L (2006) Neurodegeneration induced by complex I inhibition in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 4:465-74.

Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW (1999) Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology* 21:679–682.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51.

Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, Vina J (1992) Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 5 Pt 2:992-5.

Shang T, Kotamraju S, Kalivendi SV, Hillard CJ, Kalyanaraman B (2004) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons is mediated by transferrin receptor iron-dependent depletion of tetrahydrobiopterin and neuronal nitric-oxide synthase-derived superoxide. *J Biol Chem* 18:19099-112.

Sheehan JP, Swerdlow RH, Miller SW, Davis RE, Parks JK, Parker WD, Tuttle WD (1997) Calcium homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci* 12:4612-22.

Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Always SE (2003) Citrate Synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 94:555-560.

Smith AD, Zigmond MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism? (2003) *Experimental Neurology* 184:31–39.

Sullivan PG, Brown MR (2005) Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29:407–410.

Sullivan PG, Dragicevic NB, Deng JH, Bai Y, Dimayuga E, Ding Q, Chen Q, Bruce-Keller AJ, Keller JN (2004) Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. *J Biol Chem* 20:20699-707.

Sureda A, Tauler P, Aguiló A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, Pons A (2005) Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res* 12:1317-24.

Suzuki M, Katamine S, Tatsumi S (1983) Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 2:141-51.

Tauler P, Aguiló A, Gimeno I, Fuentespina E, Tur JA, Pons A (2006) Response of blood cell antioxidant enzyme defences to antioxidant diet supplementation and to intense exercise. *Eur J Nutr* 4:187-195.

Vaynman S, Ying Z, Wu A, Gomez-Pinilla F (2006a) Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience* 4:1221-34.

Vaynman S, Yinga Z, Yina D, Gomez-Pinilla F (2006b) Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Research* 1070:124-130.

Vaynman S, Gomez-Pinilla F (2005) License to Run: Exercise Impacts Functional Plasticity in the Intact and Injured Central Nervous System by Using Neurotrophins. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 4:283-95.

Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2003) Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 3:647-57.

Viña J, Gomez-Cabrera M, Lloret A, Marquez R, Miñana JB, Pallardó FV, Sastre J (2000) Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. *IUBMB Life* 50:271–277.

Vitte J, Michel BF, Bongrand P, Gastaut JL (2004) Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative diseases. *J Clin Immunol* 6:683-92.

Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 35:1389-94.

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5:448–453.

Zhu SW, Pham TM, Aberg E, Brene S, Winblad B, Mohammed AH, Baumans V (2006) Neurotrophin levels and behaviour in BALB/c mice: impact of intermittent exposure to individual housing and wheel running. *Behav Brain Res* 1:1-8.

Zhu X, Smith MA, Perry G, Aliev G (2004) Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 6:345-52.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 19:1699–1707.

Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J (2006) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin* 7):821-6.

Tables

Table 1

Wk	Belt speed (m/min)	Total Duration (minutes)
1	13.5	45
2	13.5	45
3	13.5	45
4	13.5	45
5	16.5	45
6	16.5	45
7	16.5	45
8	16.5	45

Table 2

	Control	Continuous Exercise
CS (U CS/mg protein)	0.327±0.042	0.589±0.050*
Lactate (mmol/l)	7.3±0.8	4.3±0.4*

Table Legends

Table 1. The treadmill program performed by CF1 mice.

Table 2. The activity of soleus citrate synthase and lactate blood levels of CF1 mice. The values are expressed on means \pm standard deviation (nine animals per group).

* Significantly different from control, $P < 0.05$, ANOVA, Duncan post hoc.

Figures

Figure 1

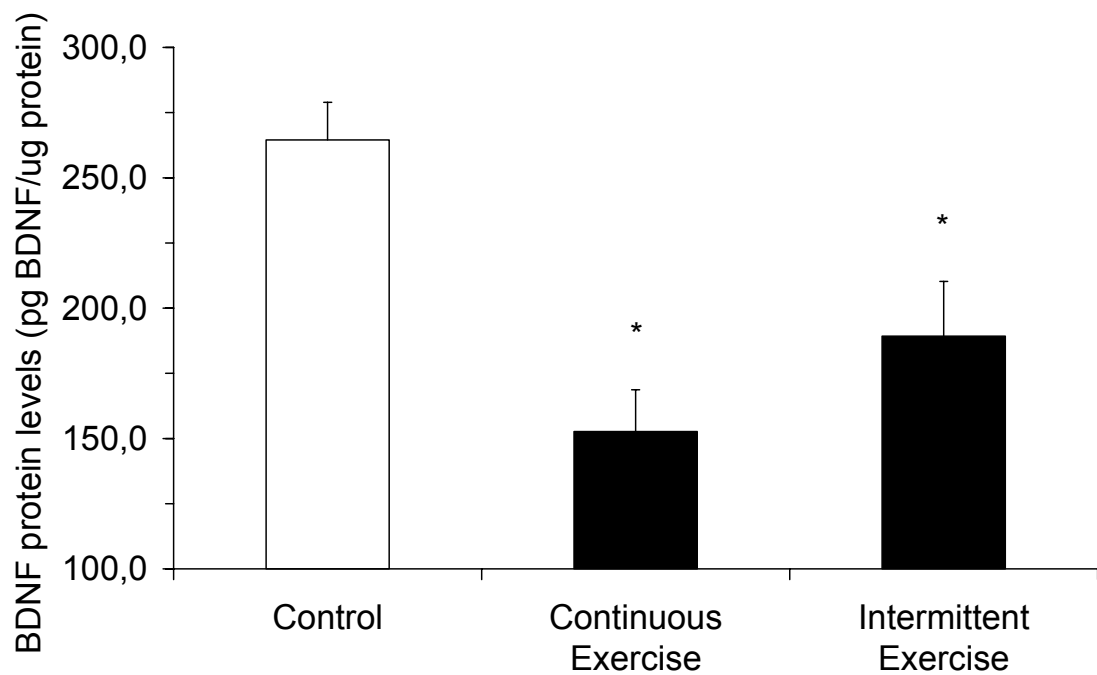


Figure 2

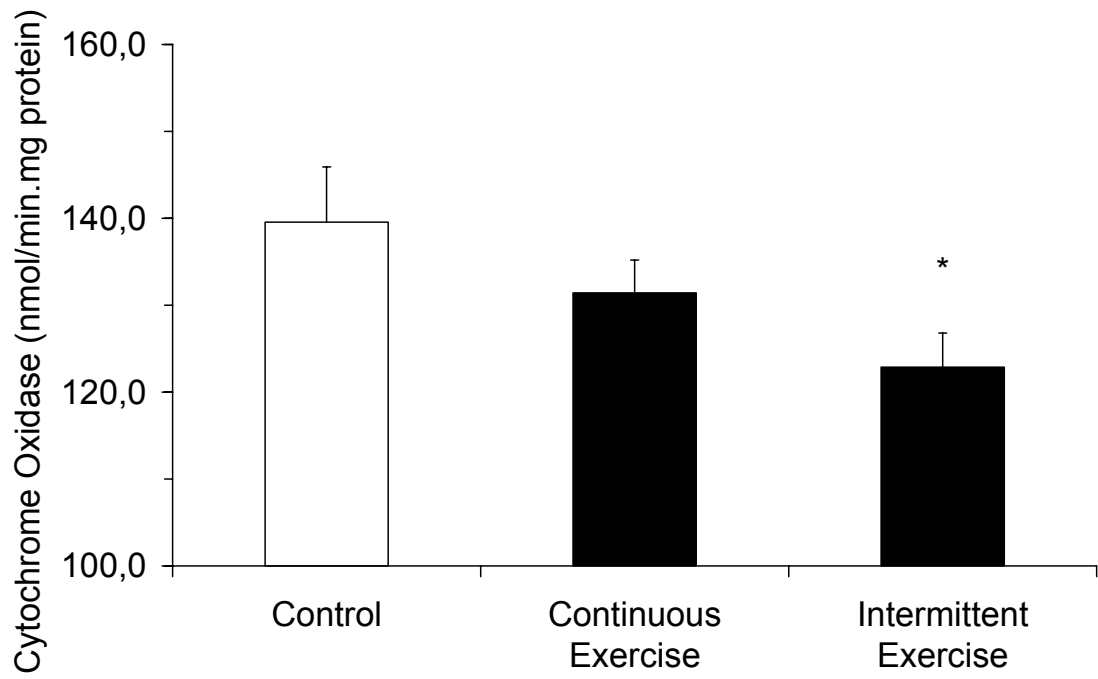


Figure 3

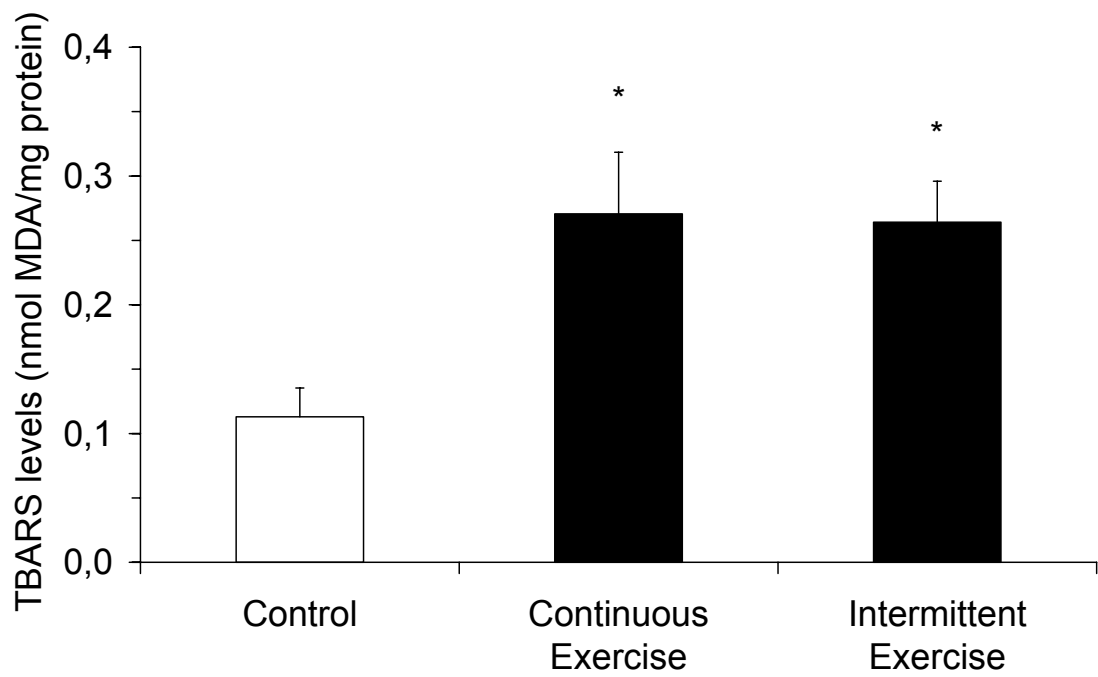


Figure legends

Fig. 1. Effect of exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels. Eight weeks of intense running decreased BDNF protein levels in the brain cortex significantly above the sedentary controls. Values are mean \pm standard deviation for nine animals per group. * $P < 0.05$ vs. control, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 2. Cytochrome c oxidase activity decreased significantly above the sedentary controls by intense intermittent exercise training, meaning impairment brain energy metabolism. Values are mean \pm standard deviation for nine animals per group. * $P < 0.05$ vs. control, ANOVA, Duncan post hoc.

Fig. 3. The Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) data – an oxidative stress biomarker – revealed that the lipid peroxidation concentration was increased by eight wks of intense exercise training in the cortex of the continuous and intermittent exercised group. Values are mean \pm standard deviation for nine animals per group. * $P < 0.05$ vs. control, ANOVA, Duncan post hoc.

PARTE III

CAPÍTULO 5
DISCUSSÃO GERAL

A adaptação de enzimas mitocondriais da musculatura esquelética de ratos ao treinamento físico são bem postulados na literatura (Siu et al., 2003; Pinho et al., 2006). Nossos resultados demonstraram um acréscimo da atividade da enzima citrato sintase do músculo sóleo dos camundongos no grupo exercício do primeiro experimento, e exercício contínuo do segundo experimento, quando comparados aos seus controles não treinados. Também observamos que os níveis séricos de lactato diminuíram desde o início do treinamento nos dois experimentos. Estes dados sugerem que tanto 12 quanto 8 semanas de treinamento físico melhoraram a resposta oxidativa muscular.

Após a última sessão de treinamento dos dois experimentos, o nível de lactato sanguíneo permaneceu superior ao limiar anaeróbico de 4.2 mmol/l em ratos (Özkaya et al, 2002). O limiar anaeróbico é um termo referente ao consumo de oxigênio durante o exercício no qual a produção excede a taxa de remoção de lactato, causando seu acréscimo no sangue (Voltarelli et al, 2002). Isto só ocorre em intensidades mais altas de exercício com alto consumo de oxigênio, entre 50-80% da carga máxima (Özkaya et al, 2002), demonstrando que os camundongos dos dois experimentos realizaram o treinamento físico em uma intensidade de moderada a forte, próxima ao limiar anaeróbico (Mader and Heck, 1986).

Em seres humanos, evidências sugerem que exercícios intensos ou de longa duração, como o endurance, são associados a grandes acréscimos no consumo de oxigênio e acelerada produção de radicais de oxigênio que resultam em estresse oxidativo agudo (Aguiló et al, 2005; Sureda et al, 2005; Oztasan et al, 2004) e crônico (Tsai et al, 2001) no sangue. O exercício exaustivo está associado a maior produção de EROs resultante em estresse oxidativo (Aguiló et al, 2005; Viña et al, 2000; Itoh et al 1998) e parece estar associado a maiores intensidades de exercício (Alessio, 1993; Suzuki et al, 1983).

O treinamento de endurance melhorou o estado redox cerebral de roedores após natação (Jolitha et al, 2006), corrida em esteira (Coskun et al, 2005; Somani et al, 1995), e

atividades em rodas de correr (Suzuki et al, 1983). Embora alguns estudos não tenham encontrado alterações nas defesas antioxidantes do cérebro após treinamento de natação (Radák et al, 2006) e corrida em esteira (Özkaya et al, 2002). E de modo interessante, ratos que realizaram treinamento de intensidade considerada forte e *overtraining* em natação não apresentaram danos oxidativos no cérebro e até melhoraram a memória (Ogonovszky et al, 2005). Os resultados de nossos dois experimentos sugerem que o exercício físico induz danos oxidativos como lipoperoxidação no estriado, hipocampo e córtex cerebral e carbonilação de proteínas no estriado, provavelmente devido ao exercício de intensidade moderada a alta, de longa duração e realizada em esteira.

Os resultados controversos dos níveis de estresse oxidativo cerebral provavelmente resultam dos diferentes modelos de exercício adotados (Arida et al, 2004) e das diferentes configurações de treinamento (Hessel et al, 2000). A roda de correr é uma atividade física intermitente circadiana, voluntária, de livre acesso (Cotman et al, 2005) que permite a corrida a uma velocidade auto-determinada, correspondente ao nível de eficiência bioenergética ideal no plano do metabolismo oxidativo (Casillas, 2001). A natação impõe menor estresse mecânico devido à pressão da água, recrutando diferentes grupos musculares e reduzindo os efeitos da gravidade (Jolitha et al, 2006), além de relativa inatividade das patas traseiras (Kaplan et al, 1994). A corrida em esteira ativa as respostas neuroendócrinas de estresse e obriga o animal a correr de acordo com as configurações de treinamento físico do experimento: tempo, duração, velocidade (Arida et al, 2004), sendo dependente da ação da gravidade, com alterações na intensidade do exercício por alterações na inclinação da esteira (Dohm et al, 2001; Lightfoot et al, 2001). O treinamento de intensidade controlada em esteira induz algumas dos maiores e mais consistentes efeitos do treinamento físico (Kemi et al, 2002; Wisløff et al, 2001). Logo, nossos resultados sugerem que a corrida em esteira, quando

realizada numa intensidade de moderada a alta, por períodos prolongados, pode induzir danos oxidativos em regiões específicas do cérebro.

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante não enzimático ou enzimático, representado, principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona-redutase (GR) (Bonney et al, 2002). A SOD é uma metaloenzima abundante em células aeróbicas como os neurônios que dismuta o radical superóxido a peróxido de hidrogênio. A CAT é uma ferrihemoenzima cuja função principal é dismutar peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular (Fridovich, 1998). Nossos resultados sugerem que as enzimas antioxidantes não foram suficientes para prevenir danos oxidativos induzidos pelo exercício ao cérebro.

Os antioxidantes não enzimáticos também fazem parte do complexo antioxidante de manutenção do estado redox (Halliwell e Gutteridge, 2000), como a N-acetilcisteína (NAC) (Banerjee et al, 2003; Viña et al, 2000). A suplementação de NAC aumentou a atividade da SOD no córtex frontal após trauma craniano de ratos (Hicdonmez et al, 2006). O tratamento com NAC também resultou em rápida recuperação dos níveis de glutaciona reduzida cerebral e redução de estresse oxidativo após traumatismo craniano em ratos (Jae-Hyuk and Hazell, 2005). O treinamento físico aumentou a atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) produzidos pelo excesso de consumo de oxigênio durante o exercício (Somani et al, 1995). O acréscimo da atividade da SOD foi observado após suplementação na dieta de vitamina E para combater as EROs formadas pelo envelhecimento e pelo exercício (Jolitha et al, 2006; Devi and Kiran, 2004).

Verificamos aumento na atividade das enzimas antioxidantes CAT no estriado e SOD no hipocampo dos animais treinados e não suplementados, mas insuficiente para proteger do estresse oxidativo induzido pelo mesmo exercício, ocasionado danos oxidativos a lipídios e proteínas, como visto anteriormente. Esta proteção antioxidante ocorreu com a suplementação

de NAC, prevenindo a ocorrência dos danos oxidativos induzidos pelo exercício, sendo os níveis de TBARS e carbonil menores no estriado e hipocampo dos camundongos treinados e suplementados com NAC. A suplementação de NAC aumentou a atividade da CAT no hipocampo dos camundongos treinados, em valores superiores aos níveis basais. Nossos resultados sugerem que a NAC promove neuroproteção contra estresse oxidativo em estriado e hipocampo.

Entretanto, danos oxidativo cerebrais podem ser causados pela liberação de ferro que aumenta a produção de radicais livres. A formação de radicais hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio pode ser catalisada pela presença de íons ferro pela Reação de Fenton (Connor et al, 1992; Stadtman, 1990). O cérebro apresenta grande concentração de ferro (Nunez-Millacura et al, 2002; Vornov et al, 1998; Jellinger et al, 1990) na forma de L-ferritina, que estabiliza o complexo oxidante ferro-catalizado, promovendo armazenamento duradouro de ferro (Kaur et al, 2003; Beard, 2001).

Quando o exercício é intenso existe acréscimo na produção de espécies reativas que resultam em estresse oxidativo aos tecidos (Aguiló et al, 2005; Viña et al, 2000; Itoh et al 1998), que podem mobilizar íons ferro ligados à ferritina e catalisar a formação de radical hidroxila, assim como outras espécies reativas como o ferril (FeO_2^+) e o perferril (FeO_2^-) (Aruoma, 1994), e mediar morte celular por apoptose (Liu et al, 2003). Este metabolismo alterado do ferro é bem observado em doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer (Gerlach et al, 1994). O papel do ferro na neurodegeneração é bem estabelecido, pois seu quelante deferoxamina (DFX) interrompe a morte neuronal estriatal induzida por neurotoxinas (Matarredona et al, 1997) e diminui a produção de radical hidroxil cerebral (Freret et al, 2006; Lin et al, 2005; Guelman et al, 2004; Nakamura et al, 2003). Nós verificamos que a suplementação com DFX simultaneamente ao treinamento de intensidade moderada a forte diminuiu os danos oxidativos a lipídios e

proteínas induzidos pelo exercício no estriado e hipocampo dos camundongos; assim como aumentou a atividade da CAT no estriado e hipocampo dos camundongos treinados. Logo, a DFX também promoveu neuroproteção contra estresse oxidativo induzido pelo exercício no SNC.

O estresse oxidativo pode também diminuir a atividade de enzimas da cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial, o que pode aumentar a produção de radicais livres adicionais e danificar macromoléculas mitocondriais e proteínas associadas à membrana mitocondrial (Navarro, 2004; Bowling e Beal, 1995; Benzi et al, 1991). Prejuízos à CTE causam prejuízos na formação de ATP e um desequilíbrio energético celular (Ojaimi et al, 1999). A enzima Citocromo C Oxidase (COX) está intimamente ligada à produção de ATP, sendo composta por 13 polipeptídeos originados do DNA mitocondrial que formam as subunidades I, II e III. As subunidades I e II incorporam átomos de cobre e ferro e são os centros redox da CTE (Ojaimi et al, 1999; Corral-Debrinski et al., 1992).

Prejuízos na atividade da COX foram encontrados no núcleo caudado da Doença de Huntington e no hipocampo da Doença de Alzheimer (Sullivan and Brown, 2005; Cassarino and Bennett, 1999). Neurotoxinas como a azida ou o íon N-metilpiridina (MPP⁺) diminuem a atividade da COX nos núcleos da base e induzem síndromes parkinsonianas (Cassarino and Bennett, 1999; Cooper and Schapira, 1997). A morte neuronal não deriva somente da inibição do metabolismo energético, mas também da liberação de sinalizadores pró-apoptose como o Ca⁺² e o citocromo c da membrana mitocondrial (Yan et al, 2006; Jackson and Tayer, 2006; Cristofanon et al, 2006). Nós verificamos que 8 semanas de treinamento de intensidade moderada a forte diminuiu a atividade da COX no córtex de camundongos. Isto pode explicar os danos oxidativos aos lipídios encontrados no córtex cerebral. Estes achados, estresse oxidativo associado à diminuição da atividade mitocondrial, caracterizam uma condição

conhecida como disfunção mitocondrial, presente no envelhecimento cerebral e na neurodegeneração (Calabrese et al, 2005; Navarro et al, 2002; Markesbery, 1997).

O sinal mais estudado do envelhecimento precoce e da neurodegeneração é a diminuição dos níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF), como observamos após o programa de treinamento de oito semanas no córtex dos camundongos. Geralmente, a atividade física aumenta o conteúdo de BDNF (Zhu et al, 2006). O BDNF pode prevenir neurodegeneração e morte neuronal, em parte pela estimulação à resistência contra o estresse oxidativo e pela regulação da homeostase do cálcio (Radák et al, 2006; Smith and Zigmond, 2003; Mattson, 2000). Os fatores neurotróficos protegem neurônios contra apoptose pelo aumento da ativação de receptores ligados à tirosinaquinase (Trk) ligados ao crescimento neuronal (Widenfalk et al, 1999). O exercício também aumenta a expressão gênica de muitos componentes da cascata MAP-K como a MAP-KI e MAP-KII (Molteni et al, 1992). A via MAP-K é a maior cascata sinalizadora dos receptores Trk (Segal e Greenberg, 1996). A MAP-K está envolvida na plasticidade sináptica, formação de memória e integração de múltiplos sinais extracelulares (Selcher et al, 2001; Sweatt, 2001).

Verificamos que 8 semanas de treinamento físico intenso e de longa duração diminuíram os níveis de BDNF no córtex de camundongos. Isto pode ser explicado pela disfunção mitocondrial induzida pelo exercício, que tem relação com baixos níveis de BDNF (Wu et al., 2004).

Os resultados apresentados em nosso primeiro experimento apontam evidências de que o exercício físico regular de intensidade moderada a intensa promove danos oxidativos a estriado e hipocampo, sendo estes revertidos pela administração de antioxidantes exógenos como a NAC e o DFX. Nosso segundo experimento demonstra que o exercício físico intenso causa disfunção mitocondrial no córtex cerebral de camundongos, além de diminuição dos

níveis de BDNF com conseqüente diminuição dos fatores de proteção, sendo dados compatíveis com envelhecimento cerebral precoce.

CAPÍTULO 6
CONCLUSÕES

Atentos aos objetivos iniciais desta dissertação, chegamos às seguintes conclusões:

- O exercício físico intenso aumenta a atividade da enzima catalase no estriado e da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos treinados e não-suplementados.
- O exercício físico intenso provoca danos oxidativos a lipídios no estriado e hipocampo e a proteínas no estriado de camundongos treinados e não-suplementados.
- A suplementação antioxidante induz neuroproteção no estriado e hipocampo contra danos oxidativos induzidos pelo exercício físico intenso.
- O exercício físico intenso diminui a atividade da enzima citocromo c oxidase no córtex cerebral de camundongos treinados.
- O exercício físico intenso diminui os níveis de fator de crescimento cérebro-derivado no córtex cerebral de camundongos treinados.
- O exercício físico intenso causa disfunção mitocondrial no córtex cerebral de camundongos treinados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JD Jr, Chang ML, Klaidman L. Parkinson's disease--redox mechanisms. *Curr. Med. Chem.* 2001; 7: 809-14.

Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary Exercise Decreases Amyloid Load in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 2005; 17: 4217– 4221.

Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior* 2005; 84: 1-7.

Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1993; 25: 218-224.

Arakawa M, Ushimaru N, Osada N, Oda T, Ishige K, Ito Y. N-acetylcysteine selectively protects cerebellar granule cells from 4-hydroxynonenal-induced cell death. *Neurosci. Res.* 2006; 3: 255-63

Arida RM, Scorza CA, Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EP. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosc. Lett.* 2004; 364: 135-138.

Aruoma ED. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Tox.* 1994; 7: 671-683.

Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol. Cel. Bioch.* 2003; 253: 307–312.

Barbanti JV. Adaptações produzidas pelo treinamento físico. In: A Biodinâmica do Movimento Humano e Suas Relações Interdisciplinares, vol. 1 (Amadio AC, Barbanti VJ, ed), pp. 163-174 São Paulo-Brasil: Estação Liberdade.

Barnett C, Carey M, Proietto J, Cerin E, Febbraio MA, Jenkins D. Muscle metabolism during sprint exercise in man: influence of sprint training. *J. Sci. Med. Sport.* 2004; 3: 314-22.

Beard JL. Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *J. Nutr.* 2001; 131: 568S–580S.

Behl C. Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. *Subcell. Biochem.* 2005; 38: 65-78.

Bergasa NV, Mehlman J, Bir K. Aerobic exercise: a potential therapeutic intervention for patients with liver disease. *Med. Hypotheses.* 2004; 6: 935-41.

Bonnefoy M, Draï J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse. Med.* 2002; 25: 1174-1184.

Bostanci MO, Bagirici F, Canan S. A calcium channel blocker flunarizine attenuates the neurotoxic effects of iron. *Cell. Biol. Toxicol.* 2006; 2:119-25.

Bowling AC, Beal MF. Bioenergetic and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Life Sciences* 1995; 56: 1151-1171.

Briones TL. Environment, physical activity, and neurogenesis: implications for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2006; 1: 49–54.

Calabrese V, Lodi TR, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, D Butterfield. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* 2005; 233: 145 – 162.

Calabrese V, Scapagnini G, Stella AMG, Bates TR, Clark JB. Mitochondrial Involvement in Brain Function and Dysfunction: Relevance to Aging, Neurodegenerative Disorders and Longevity. *Neurochemi. Res.* 2001; 6: 739–764.

Campbell A, Mutrie N, White F, McGuire F, Kearney N. A pilot study of a supervised group exercise programme as a rehabilitation treatment for women with breast cancer receiving adjuvant treatment. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 2005; 1: 56-63.

Carlsson S, Andersson T, Wolk A, Ahlbom A. Low physical activity and mortality in women: Baseline lifestyle and health as alternative explanations. *Scand. J. Public Health.* 2006; 5: 480-7.

Cash AD, Perry G, Ogawa O, Raina AK, Zhu X, Smith MA. Is Alzheimer's disease a mitochondrial disorder? *Neuroscientist.* 2002; 5: 489-96.

Casillas J. Custo energético da marcha. In: Viel E, editor. *A marcha humana, a corrida e o salto.* São Paulo: Manole, 2001; 141–155.

Cassarino DS, Bennett JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Reviews.* 1999; 29: 1–25.

Chan SY, Mancini GB, Burns S, Johnson FF, Brozic AP, Kingsbury K, Barr S, Kuramoto L, Schulzer M, Frohlich J, Ignaszewski A. Dietary Measures and Exercise Training Contribute to Improvement of Endothelial Function and Atherosclerosis Even in Patients Given Intensive Pharmacologic Therapy. *J. Cardiopulm. Rehabil.* 2006; 5: 288-293.

Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005; 5: 942-946.

Connor JR, Benkovic AS. Iron regulation in the Brain: Histochemical, Biochemical, and Molecular Considerations. *Ann. Neurol.* 1992; 32: 51-61.

Cooper C, Balamurali TB, Selwood A, Livingston G. A systematic review of intervention studies about anxiety in caregivers of people with dementia. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2006
“in press”

Cooper JM, Schapira AHV. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration. *J. Bioenergetics and Biomembranes* 1997; 29: 175-183.

Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat. Genet.* 1992; 2: 324–328.

Coskun S, Gonul B, Guzel NA, Balabanli B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2005; 1-2: 135-8.

Cote CG. Surrogates of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med.* 2006; 119: 54-62.

Cotman CW, Berchtold NC, Adlard PA, Perreau VM. Exercise and the Brain. In: Mooren FC, Völker K, editors. *Molecular and Cellular Exercise Physiology*. Champaign, IL, USA: 2005; 331–341.

Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 295–301.

Cristofanon S, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. Glutathione as a mediator of apoptotic cell signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 2006 “in press”.

Davies KJA, Quintanilha AJ, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982; 107: 1198–1205.

Denadai BS (2000) Avaliação aeróbia. In: *Avaliação aeróbia*, vol.1 (Denadai BS, ed), pp 22-24 Rio Claro-Brazil: Motrix.

DeRuiter W, Faulkner G. Tobacco harm reduction strategies: the case for physical activity. *Nicotine Tob. Res.* 2006; 2: 157-68.

Devi SA, Kiran TR. Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol. Aging.* 2001; 25: 501–508.

Di Giovanni S, Mirabella M, Papacci M, Odoardi F, Silvestri G, Servidei S. Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome c oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001; 4: 696-705.

Dluzen DE. The effect of gender and the neurotrophin, BDNF, upon methamphetamine-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. *Neurosci. Lett.* 2004; 3: 135-8.

Dohm MR, Hayes JP, Garland T Jr. The quantitative genetics of maximal and basal rates of oxygen consumption in mice. *Genetics.* 2001; 159: 267–277.

Duman RS. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiol. Aging.* 2005; 1: 88-93.

Ernst C, Olson AK, Pinel JP, Lam RW, Christie BR. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *J. Psychiatry Neurosci.* 2006; 2: 84-92.

Floor E. Iron as a vulnerability factor in nigrostriatal degeneration in aging and Parkinson's disease. *Cell. Mol. Biol.* 2000; 4: 709-20.

Fluck M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003; 146: 159-216.

Fordyce DE, Farrar RP. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav. Brain Res.* 1991; 46: 123-133.

Freret T, Valable S, Chazalviel L, Saulnier R, Mackenzie ET, Petit E, Bernaudin M, Boulouard M, Schumann-Bard P. Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 7: 1757-65.

Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 1998; 201: 1203-1209.

Gerlach M, Ben-Schachar D, Riederer P, Youdim MBH. Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative diseases? *J Neuroch* 1994; 3: 793-807.

Gibson ASC, Goedecke JH, Harley YX, Myers LJ, Lambert MI, Noakes TD, Lambert EV. Metabolic setpoint control mechanisms in different physiological systems at rest and during exercise. *J. Theoretical Biol.* 2005; 236: 60–72.

Grunblatt E, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 899: 262-73.

Guelman LR, Pagotto RM, Di Toro CG, Zieher LM. Deferoxamine antioxidant activity on cerebellar granule cells gamma-irradiated in vitro. *Neurotoxicol. Teratol.* 2004; 3: 477-83.

Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radic Biol Méd.* 3^a ed. Claredon, Oxford, pp. 105-150.

Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 1992; 5: 1609-23.

Hargreaves M, Cameron-Smith D. Exercise, diet, and skeletal muscle gene expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2002; 9: 1505-8.

Hauswirth C, Lehenaff D. Physiological demands of running during long distance runs and triathlons. *Sports Med.* 2001; 9: 679-89.

Hennessy EM, Stevinson C, Fox KR. Preliminary study of the lived experience of exercise for cancer survivors. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 2005; 2: 155-66.

Hessel E, Haberland A, Muller M, Lerche D, Schimke I. Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running? *Clin. Chim. Acta.* 2000; 1-2: 145-56.

Hicdonmez T, Kanter M, Tiryaki M, Parsak T, Cobanoglu S. Neuroprotective effects of N-acetylcysteine on experimental closed head trauma in rats. *Neurochem. Res.* 2006; 4: 473-81.

Huang AM, Jen CJ, Chen HF, Yu L, Kuo YM, Chen HI. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J. Neural. Transm.* 2006; 113: 803–811.

Iczkiewicz J, Jackson MJ, Smith LA, Rose S, Jenner P. Osteopontin expression in substantia nigra in MPTP-treated primates and in Parkinson's disease. *Brain Res.* 2006 “in press”

Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 9-10: 1583-96.

Itoh H, Ohkuwa T, Yamamoto T, Sato Y, Miyamura M, Naoi M. Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci.* 1998; 21: 1921-1929.

Jackson JG, Thayer SA. Mitochondrial Modulation of Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} -Release in Rat Sensory Neurons. *J. Neurophysiol.* 2006; 3: 1093-104.

Jae-Hyuk Y, Hazell AS. N-acetylcysteine attenuates early induction of heme oxygenase-1 following traumatic brain injury. *Brain Res.* 2005; 1033: 13– 19.

Jain SK, McVie R, Smith T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care* 2000; 9: 1389–1394.

Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement Sect.* 1990; 4: 327-40.

Jenner P. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 1991; 136: 6-15.

Jimenez CC. Diabetes and Exercise: The Role of the Athletic Trainer. *J. Athl. Train.* 1997; 4: 339-343.

Jolitha AB, Subramanyam MVV, Devi S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Exp. Geront.* 2006; 41: 753–763

Johannesson T, Kristinsson J, Snaedal J. Neurodegenerative diseases, antioxidative enzymes and copper. A review of experimental research. *Laeknabladid.* 2003; 9: 659-671.

Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1-3: 400-8.

Kahn SE, Larson VG, Beard JC, Cain KC, Fellingham GW, Schwartz RS, Veith RC, Stratton JR, Cerqueira MD, Abrass IB. Effect of exercise on insulin action, glucose tolerance, and insulin secretion in aging. *Am. J. Physiol.* 1990; 6 Pt 1: E937-43.

Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A, et al. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1994; 273: H1167-H1173.

Katsanos CS. Lipid-induced insulin resistance in the liver: role of exercise. *Sports Med.* 2004; 14: 955-65.

Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, Viswanath V, Jacobs R, Yang L, Beal MF, DiMonte D, Volitaskis I, Ellerby L, Cherny RA, Bush AI, Andersen JK. Genetic or Pharmacological Iron Chelation Prevents MPTP-Induced Neurotoxicity In Vivo. *Neuron.* 2003; 37: 899-909.

Kemi OJ, Loennechen JP, Wisløff, Ellisngsen O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 2002; 93: 1301-1309.

Klieman L, Hyde S, Berra K. Cardiovascular disease risk reduction in older adults. *J. Cardiovasc .Nurs.* 2006; 5 Suppl 1:S27-39.

Knott C, Stern G, Kingsbury A, Welcher AA, Wilkin GP. Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002; 5: 329-41.

Korzeniewski B, Zoladz JA. Biochemical background of the VO₂ on-kinetics in skeletal muscles. *J. Physiol. Sci.* 2006; 1: 1-12.

Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A. Ageing, Fitness and neurocognitive function. *Nature*. 1999; 400: 418-419.

Kraemer WJ, Duncan ND, Volek JS. Resistance training and elite athletes: adaptations and program considerations. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 1998; 2: 110-119.

Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch. Neurol.* 2001; 58: 498–504.

Lavoie JM, Gauthier MS. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 12: 1393-409.

Lee H, Kim H, Lee J, Kim Y, Yang H, Chang H. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Develop.* 2006; 28: 147–154.

Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Current Med. Chem.* 2001; 8: 829-838 829.

Lightfoot JT, Turner MJ, Debate KA, and Kleeberger SR. Interstrain variation in murine aerobic capacity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2001; 33: 2053–2057.

Lin AM, Chen KB, Chao PL. Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 1053: 319-29.

Liu R, Liu W, Doctrow SR, Baudry M. Iron toxicity in organotypic cultures of hippocampal slices: role of reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 2003; 2: 492-502.

Mader A, Heck H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. *Int. J. Sports Med.* 1986; 7: 45-65.

Makrilakis K, Katsilambros N. Prediction and prevention of type 2 diabetes. *Hormones.* 2003; 1: 22-34.

Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 1: 134-147.

Mazzeo RS, Tanaka H. Exercise prescription for the elderly: current recommendations. *Sports Med.* 2001; 11: 809-818.

Matarredona ER, Santiago M, Cano J, Machado A. Involvement of iron in MPP⁺ toxicity in substantia nigra: protection by desferrioxamine. *Brain Res.* 1997; 773: 76–81.

Mattson MP, Liu D. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* 2002; 2: 215–31.

Mattson MP. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res.* 2000; 886: 47–53.

Miche E, Herrmann G, Nowak M, Wirtz U, Tietz M, Hurst M, Zoller B, Radzewitz A. Effect of an exercise training program on endothelial dysfunction in diabetic and non-diabetic patients with severe chronic heart failure. *Clin. Res. Cardiol.* 2006; 95: 117-124.

Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Europ. J. Neurosci.* 2002; 16: 1107-1116.

Nakamura T, Keep RF, Hua Y, Schallert T, Hoff JT, Xi G. Deferoxamine-induced attenuation of brain edema and neurological deficits in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Neurosurg. Focus.* 203; 4: ECP4.

Navarro A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Mol. Aspects Med.* 2004; 25: 37-48.

Navarro A, Del Pino MJS, Gomez C, Peralta JL, Boveris A. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2002; 282: 985-992.

Neary JP. Application of near infrared spectroscopy to exercise sports science. *Can. J. Appl. Physiol.* 2004; 4: 488-503.

Nied RJ, Franklin B. Promoting and prescribing exercise for the elderly. *Am. Fam. Physician.* 2002; 3: 419-26.

Nunez-Millacura C, Tapia V, Munoz P, Maccioni RB, Nunez MT. An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. *Neurochem.* 2002; 2; 240-248.

Ojaimi J, Masters CL, Opekin K, McKelvie P, Byrne E. Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age. *Mech. Ageing Develop.* 1999; 111: 39-47.

Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radák Z. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem. Int.* 2005; 46: 635–640.

Özkaya YG, Agar A, Yargicoglu P, Hacioglu G, Bilmen-Sarikcioglu S, Özen I, Alicigüzel Y. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab.* 2002; 5: 377-84.

Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, Siktar E, Keles S, Akar S, Akcay F, Dane S, Gul M. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2004; 5-6: 622-627.

Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B, Neufer PD. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 4: 806-14.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago M, Silveira PC, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. Imbalance in SOD/CAT activities in rats skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Intern* 2006 “in press”.

Poehlman ET, Melby C. Resistance training and energy balance. *Int. J. Sport Nutr.* 1998; 2: 143-59.

Radák Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem. Int.* 2006; 4: 387-92.

Radák Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 2001b; 7: 90–107.

Redila VA, Christie BR. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neurosci.* 2006; 4: 1299–307.

Reuter I, Engelhardt M, Stecker K, Baas H. Therapeutic value of exercise training in Parkinson's disease. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1999; 31: 1544–1549.

Ricciardi R. Sedentarism: a concept analysis. *Nurs Forum.* 2005; 3: 79-87.

Sastre J, Gascó AME, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J. Exhaustive physical exercise causes and oxidation of glutathione status in blood. Prevention by antioxidant administration. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: R992–R995.

Scandalis TA, Bosak A, Berliner JC, Helman LL, Wells MR. Resistance Training and Gait Function in Patients with Parkinson's Disease. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2001; 80: 38–43.

Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 1996; 19: 463–489.

Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt J. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn. Mem.* 2001; 8: 11–19.

Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Nutr.* 2000; 72: 653-669.

Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 2001; 76: 1–10.

Sengupta N, Maji D. Exercise in prediabetes. *J. Indian Med. Assoc.* 2005; 11: 600, 602.

Shoham S, Youdim MB. Iron involvement in neural damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol.* 2000; 4: 743-60.

Shulman RG. Glycogen turnover forms lactate during exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2005; 4: 157-62.

Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Always SE. Citrate Synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 2003; 94: 555-560.

Smith AD, Zigmond MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism? *Exp. Neur.* 2003; 184: 31–39.

Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995; 4: 635-9.

Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 1990; 9: 315-325.

Stepito NK, Martin DT, Fallon KE, Hawley JA. Metabolic demands of intense aerobic interval training in competitive cyclists. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2001; 2: 303-10.

Sullivan PG, Brown MR. Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 2005; 29: 407– 410.

Sureda A, Tauler P, Aguiló A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, Pons A. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic. Res.* 2005; 12: 1317-1324.

Suzuki M, Katamine S, Tatsumi S. Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1983; 2: 141-151.

Swenson KK, Henly SJ, Shapiro AC, Schroeder LM. Interventions to prevent loss of bone mineral density in women receiving chemotherapy for breast cancer. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 2005; 2: 177-84.

Ter-Minassian A. Cerebral metabolism and brain injury. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 2006; 7: 714-721.

Tornero D, Cena V, González-García C, Jordán J. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Rev. Neurol.* 2002; 4: 354-361.

Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY, Hsu CF, Kong CW. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 11: 1465-72.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 2003; 552: 335-44.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 1999a; 2: 266–270.

Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA.* 1999b; 96: 13427–13431.

Viña J, Gomez-Cabrera M, Lloret A, Marquez R, Miñana JB, Pallardó FV, Sastre J. Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. *IUBMB Life* 2000; 50: 271–277.

Volaklis KA, Tokmakidis SP. Resistance exercise training in patients with heart failure. *Sports Med.* 2005; 12: 1085-103.

Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35: 1389-1394.

Vornov JJ, Park J, Thomas AG. Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidative stress in organotypic hippocampal culture. *Exp. Neurol.* 1998; 1: 109-122.

Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 2006; 6: 801–9.

Widenfalk J, Olson L, Thorén P. Deprived of habitual running, rats downregulate BDNF and TrkB messages in the brain. *Neurosci. Res.* 1999; 34: 125–132.

Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Intensity controlled treadmill in rats: VO₂max and cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2001; 280: H1301-H1310.

Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, et al. Cognitive and Physical Activity Differently Modulate Disease Progression in the Amyloid Precursor Protein (APP)–23 Model of Alzheimer’s Disease. *Biol. Psychiatry* 2006 “in press”.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19: 1699–1707.

Zaryski C, Smith DJ. Training principles and issues for ultra-endurance athletes. *Curr. Sports Med. Rep.* 2005; 3: 165-70.

Zhu SW, Pham TM, Aberg E, Brene S, Winblad B, Mohammed AH, Baumans V. Neurotrophin levels and behaviour in BALB/c mice: impact of intermittent exposure to individual housing and wheel running. *Behav. Brain Res.* 2006; 1: 1-8.

Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 7: 821-826.

Yi JH, Hoover R, McIntosh TK, Hazell AS. Early, transient increase in complexin I and complexin II in the cerebral cortex following traumatic brain injury is attenuated by N-acetylcysteine. *J. Neurotrauma.* 2006; 1: 86-96.

Yu BK, Yoon BC, Kim SS, Chun SL. Treadmill exercise increases cell proliferation in hippocampal dentate gyrus in alcohol intoxicated rats. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 2003; 43: 393–397.

ANEXOS



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

Resolução

Comitê de Ética em Pesquisa, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/Ministério da Saúde analisou o projeto abaixo.

Projeto: 373/2006

Pesquisador:

Ricardo Pinho

Aderbal Aguiar

Título: "O efeito do exercício físico e a suplementação de antioxidante sobre marcadores de estresse oxidativo no mesencéfalo de camundongos".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEP. Os membros do CEP não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Criciúma, 14 de junho de 2006.

Emilio Luiz Streck

Coordenador do CEP

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)