

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MÔNICA SILVIA RODRIGUES DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO E CRÔNICO
NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES
OPIÓIDES NA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE RATOS

Mogi das Cruzes, SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MÔNICA SILVIA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO E CRÔNICO
NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES
OPIÓIDES NA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE RATOS**

**Tese apresentada à Universidade de
Mogi das Cruzes, como pré-requisito
para obtenção do Título de Doutor no
Programa de Pós-Graduação Integrado
em Engenharia Biomédica.**

Orientador: Profa. Dra. Marly de Albuquerque
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Mário Arida

Mogi das Cruzes, SP
2010

FINANCIAMENTO



FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Oliveira, Mônica Silvia Rodrigues de

Influência do exercício físico agudo e crônico na modulação da expressão de receptores opióides na formação hipocampal de ratos / Mônica Silvia Rodrigues de Oliveira. – 2010.

85 f.

Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2010

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Profª Drª Marly de Albuquerque

1. Receptores opióides 2. Exercício físico 3.
Formação hipocampal 4. Medicina experimental I.
Albuquerque, Marly de

CDD 619.93

**DEFESA DE TESE DO DOUTORADO
EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

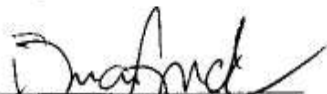
No dia 31/03/10 a candidata *Monica Silvia Rodrigues de Oliveira*, após realizar os créditos exigidos, ser aprovada no exame de Proficiência em Inglês, e no exame de Qualificação, apresentou o trabalho: "Influência do exercício físico agudo e crônico na modulação de receptores opióides na formação hipocampal de ratos" para obtenção do Título de Doutora em Engenharia Biomédica.

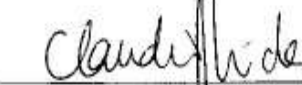
Os membros da banca consideram a candidata: ✓

Conceito

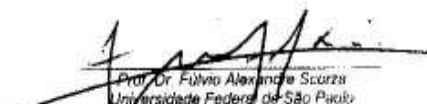
Dr. Ricardo Mario Arida
Dr. Fúlvio Alexandre Scorza
Dr. Claudio Saburo Shida
Dr. Miguel Luiz Batista Junior
Dr. Marly de Albuquerque

APROVADA
APROVADA
Aprovada
APROVADA
Aprovada


Prof. Dr. Ricardo Mario Arida
Universidade Federal de São Paulo


Prof. Dr. Claudio Saburo Shida
Universidade de Mogi das Cruzes


Prof. Dr. Marly de Albuquerque
Universidade de Mogi das Cruzes


Prof. Dr. Fúlvio Alexandre Scorza
Universidade Federal de São Paulo


Prof. Dr. Miguel Luiz Batista Junior
Universidade de Mogi das Cruzes

*“And beside this, giving all diligence, add to your faith virtue; and to
virtue knowledge; and to knowledge temperance; and to temperance
patience; and to patience godliness; and to godliness brotherly kindness;
and to brotherly kindness charity.”*

Holy Bible (Ed. King James)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, pois, reconheço que tudo que tenho e que sou vêm dele.

Ao meu marido Cleber e minhas filhas Rafaela e Daniela, minhas maiores motivações.

À minha mãe Manoelina e minha irmã Marly, pois sempre se empenharam com dificuldades para que eu tivesse uma boa formação.

E a todos aqueles que desejam uma melhor qualidade de vida e que buscam através do exercício físico obter saúde.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me dar ânimo e forças pra continuar.

Ao meu querido Cleber e minhas fofinhas Rafa e Dani; que acompanharam de perto cada momento deste trabalho; rindo, chorando, vibrando, orando... juntos; obrigada meus amores, amo demais vocês!!!

À minha irmã Márcia, por ter me ajudado e me apoiado em todo este tempo (tenho uma dívida de gratidão com você, minha maninha!!!); às minhas sobrinhas Flá e Rê e toda minha querida família.

À minha mãe e à Marly, pelas orações, incentivo e carinho.

Ao Ap. Estevam e à Bpa Sônia, por me ensinarem a perseverar na Palavra de Deus e em tudo ter um coração grato a Ele.

À querida amiga Jaque, companheira em todos os momentos.

A todos os amigos do NPT.

Aos amigos da UNIFESP.

À Profa. Maria José, pela colaboração, carinho e atenção.

Aos Professores Fúlvio e Marly.

Ao Prof. Ricardo Arida, pela atenção, incentivo, orientação e consideração.

RESUMO

O exercício físico estimula a liberação de beta-endorfinas e outros peptídeos opióides endógenos que podem ser responsáveis por mudanças de humor, percepção da dor e desempenho físico. Embora a grande maioria dos dados da literatura indica que o exercício físico induz ao aumento dos níveis de beta-endorfina, medidas indiretas como o aumento dos níveis de endorfinas na circulação plasmática, não reflete os níveis de opióides no sistema nervoso central. O objetivo do presente estudo foi verificar a expressão dos receptores μ e κ na formação hipocampal de ratos após o exercício agudo e crônico, em atividade voluntária e forçada, por meio dos métodos de imuno-histoquímica e de imunoblot. Um número maior de células μ -positivas foi observado nos grupos de exercício agudo forçado e voluntário nas regiões de CA1, CA3, hilo e giro dentado em relação ao grupo controle. Já a análise da expressão do receptor κ mostrou um aumento de fibras κ -positivas apenas na região de CA3 nos grupos de exercício agudo forçado e voluntário com uma diminuição no período crônico. A análise de imunoblot mostrou um aumento significativo na expressão dos receptores μ na formação hipocampal nos grupos de exercício agudo forçado e voluntário quando comparados ao grupo controle. Inversamente, uma redução significativa na expressão dos receptores μ foi observada nos grupos de exercício crônico forçado e exercício crônico voluntário em comparação com os grupos de exercício agudo forçado e voluntário, respectivamente. A expressão do receptor μ em ratos treinados, não foi significativamente diferente entre o exercício voluntário e forçado, agudo ou cronicamente. Já na análise de imunoblot para o receptor κ não foram observadas alterações significantes. Nossos resultados indicam que o exercício agudo e crônico modula a expressão de receptores μ na formação do hipocampo de ratos. As alterações observadas na expressão do receptor κ após os dois tipos de exercício físico, tanto agudo quanto cronicamente, não permitem concluir que o exercício físico modula a expressão deste receptor.

Palavras-chave: receptores opióides, exercício físico e formação hipocampal.

ABSTRACT

Physical exercise stimulates the release of beta endorphin and other endogenous opioid peptides that are believed to be responsible for changes in mood, perception of pain and also performance. Although the vast majority data from literature support the role of physical exercise in increasing endorphin levels, indirect measures such as increased endorphin levels in peripheral blood do not reflect the opioid levels in central nervous system. The purpose of the present study was to verify whether acute and chronic exercise using voluntary and forced exercise procedures could modify the expression of mu and kappa receptor in the rat hippocampal formation. A higher number of mu-positive cells were observed for acute forced and voluntary exercise groups in the CA1, CA3, hilus and dentate gyrus regions compared to the control group. The analysis of kappa expression in hippocampal formation showed a higher number of kappa-positive fibers for acute forced and voluntary exercise groups only in the CA3 region compared to the control group. A significant reduction of kappa receptor expression was noted in chronic forced and voluntary groups. Immunoblotting analysis showed a significantly enhance of mu expression in hippocampal formation to acute forced and voluntary groups when compared to the control group. Conversely, a significant reduction of mu receptor expression was noted in chronic forced exercise and chronic voluntary exercise compared to acute forced and voluntary groups respectively. Mu receptor expression was not significantly different among voluntary and forced exercise, both in rats trained acute or chronically. On the other hand, the immunoblotting analysis to the kappa receptor showed no significant changes. Our findings indicate that acute and chronic exercise modulates mu receptor expression in the hippocampal formation of rats. The changes observed in kappa receptor expression after forced and voluntary exercise, acute or chronically, do not allow us to conclude that physical exercise modulates kappa receptor expression.

Keywords: opioid receptors, physical exercise and hippocampal formation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Modelo proposto para a topografia do receptor mu em ratos.	17
Figura 2:	Representação esquemática da sinalização intracelular decorrente da ativação do receptor opióide	18
Figura 3:	Representação simplificada das camadas celulares da formação hipocampal.....	25
Figura 4:	Vias de entrada e saída da formação hipocampal.....	27
Figura 5:	Esteira rolante utilizada para o programa de treinamento físico forçado	31
Figura 6:	Roda utilizada para o programa de treinamento físico em atividade voluntária	32
Figura 7:	Fotomicrografias mostrando marcação de células mu-positivas na região de CA1 da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias.....	38
Figura 8:	Fotomicrografias mostrando marcação das células mu-positivas na região de CA3 da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias	39
Figura 9:	Fotomicrografias mostrando marcação das células mu-positivas na região do hilo da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias	39
Figura 10:	Fotomicrografias mostrando marcação das células mu-positivas na região do GD da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias	39
Figura 11:	Fotomicrografias mostrando marcação das fibras kappa-positivas na região de CA3 da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Contagem de células mu-positivas por mm ² nas regiões de CA1, CA3, hilo e GD, em animais do grupos controle, esteira 7 dias, roda 7 dias, esteira 45 dias e roda 45 dias ...	40
Gráfico 2:	Valores expressando a relação entre a densidade óptica dos receptores mu e da beta-actina na formação hipocampal de ratos	41
Gráfico 3:	Análise da densidade óptica da imunomarcção para o receptor kappa nas fibras musgosas das regiões de CA3 da formação hipocampal	42
Gráfico 4:	Análise da densidade óptica da imunomarcção do receptor kappa nas fibras musgosas da região do hilo da formação hipocampal em animais dos grupos controle, esteira 7 dias, roda 7 dias, esteira 45 dias e roda 45 dias....	43
Gráfico 5:	Valores expressando a relação entre a densidade óptica dos receptores kappa e da beta-actina na formação hipocampal de ratos	44

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Características de afinidade dos ligantes e receptores opióides	16
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Opióide Endógenos	12
1.2 Receptores Opióides.....	14
1.3 Exercício Físico e Sistema Nervoso Central (SNC)	19
1.4 Opióide e Exercício Físico	22
1.5 Formação Hipocampal	24
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVO	29
3.1 Objetivo Específico	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Animais	30
4.1.1 Formação dos Grupos	30
4.2 Programa de Treinamento Físico	30
4.3 Imuno-histoquímica: Receptores mu e kappa	32
4.4 Immunoblot (análise quantitativa)	34
4.4.1 Homogeneização do Tecido Cerebral	34
4.4.2 Eletroforese	35
4.5 Análise Estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Imuno-histoquímica: receptor mu	38
5.2 Immunoblot: receptor mu	41
5.3 Immunohistoquímica: receptor kappa	42
5.4 Immunoblot: receptor kappa	44
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A	71
ANEXO A	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Opióides Endógenos

Os opióides são substâncias endógenas com ação similar a de opiáceos derivados do alcalóide morfina capazes de produzir efeitos em várias partes do corpo e no Sistema Nervoso Central (SNC). Estas substâncias têm atraído a atenção de pesquisadores ao longo dos anos (GROSSMAN; SUTTON, 1985), por seus efeitos de analgesia, euforia e de dependência psíquica que ocorrem em resposta a situações de estresse, depressão, ansiedade e exercício físico (THORÉN *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 2003; McLEAN *et al.*, 1987).

A primeira referência sobre a utilização do ópio, substância extraída do suco da papoula do oriente (*Papaver somniferum*), foi encontrada nos escritos de Theophrastes no século 3 a.C. Em 1806, Sertuner conseguiu isolar a primeira substância pura isolada do ópio, a morfina, assim denominada em homenagem a Morpheus, deus grego dos sonhos. Pelo fato dos opióides apresentarem quadros de dependência, estes eram consumidos como drogas de abuso. Com isso, houve necessidade da busca de novas moléculas que apresentassem as mesmas propriedades exceto o potencial de gerar dependência, o que acarretou em grande avanço no descobrimento de novos compostos sintéticos (REISINE; PASTERNAK, 1996; GERRITS; LESSCHER; REE, 2003).

Em meio às pesquisas foi relatado que os opióides influenciam várias funções do organismo como: função cardíaca (FEUERSTEIN; SIREN, 1987), função linfática e imune (INOSOTROZA; TESCHEMACHER; MUELLER-ECKHARDT, 1987), desenvolvimento e crescimento (ZAGON; MCLAUGHLIN, 1985), metabolismo (GIUGLIANO *et al.*, 1988), função reprodutiva (BLANKSTEIN *et al.*, 1981), respiração (MOSS; SCARPELLI, 1981), percepção dolorosa (AKIL *et al.*, 1986), distúrbios afetivos (BRAMBILLA *et al.*, 1984), fome e sede (OLSON; OLSON; KASTIN, 1987), regulação da temperatura (GELLER;

ROWAN; ADLER, 1986), atividade gastrointestinal (COUPAR, 1987), e o aprendizado e memória (MARTINEZ; WEINBERGER; SCHULTEIS, 1988).

Na década de 70, Solomon Snyder da Universidade Johns Hopkins juntamente com sua equipe, interessados em descobrir como os opióides exerciam seus efeitos no SNC, aplicaram substâncias opiáceas marcadas radioativamente em várias partes do encéfalo que se ligavam aos receptores da morfina. Logo após esta descoberta, as pesquisas focalizaram a identificação dos opiáceos naturais que agiam nestes receptores (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2006). Sendo assim, em 1975, Hughes e seus colaboradores conseguiram isolar em tecido cerebral, os primeiros peptídeos opióides endógenos, a metionina e a leucina-encefalina (do grego, encefalinas: no cérebro); dois pentapeptídeos com atividade naloxona-reversível, porém com ação pouco potente devido à rápida degradação enzimática. Outros pesquisadores isolaram peptídeos secretados da hipófise anterior e observaram que a metionina estava contida nesta sequência de peptídeos. No entanto, outra substância foi identificada, porém, com ação mais potente que as encefalinas devido à maior resistência à degradação enzimática e denominaram-na de beta-endorfina, também chamada de morfina-endógena por apresentar propriedade de ligação com os mesmos receptores dos opióides derivados da morfina. Vale ressaltar, que a liberação desta segunda classe de opióide ocorre concomitantemente com o hormônio do crescimento, o ACTH. Por último, uma terceira classe também foi descrita, as dinorfinas (do grego, dynos: poder) e embora encontrada em quantidades pequenas no SNC, caracterizou-se por ter ação analgésica muito potente, chegando a 200 vezes mais que a morfina (GROSSMAN; SUTTON, 1985; GUYTON, 1993; MANSOUR *et al.*, 1995; MANSOUR *et al.*, 1987; SFORZO, 1988; GERRITS; LESSCHER; REE, 2003).

Estas três classes de peptídeos opióides são geradas do produto do metabolismo de três grandes moléculas precursoras. As encefalinas são geradas pela *pró-encefalina*, as beta-endorfinas da *pró-opiomelanocortina (POMC)*, e as dinorfinas da *pró-dinorfina*. Utilizando técnicas de medição como a imunohistoquímica, analisou-se que a quantidade de beta-endorfina circulante é relativamente pequena, no entanto, esta concentração é maior no

SNC do que na periferia. Elas estão presentes no líquido cefalorraquidiano e possuem pequena penetração na barreira hemato-encefálica. Os neurônios endorfinérgicos se encontram no hipotálamo e possuem terminações através do cérebro, incluindo importantes estruturas do sistema de analgesia endógena. As encefalinas possuem altas concentrações na circulação e baixa quantidade no líquido cefalorraquidiano. Os neurônios encefalinérgicos estão distribuídos em interneurônios do hipotálamo, sistema límbico, gânglios da base e medula espinhal. Já as dinorfinas estão presentes em quantidades muito baixas na circulação sendo que os neurônios dinorfinérgicos localizam-se também no hipotálamo e hipófise posterior (GROSSMAN; SUTTON, 1985; SFORZO, 1988; THORÉN *et al.*, 1990; WERME *et al.*, 2000; GESTREAU; LE GUEN; BESSON, 2000).

1.2 Receptores Opióides

A existência dos sítios de ligação dos opióides no SNC foi proposta primeiramente por Beckett e Casy (1954) em estudos sobre a atividade antinociceptiva em uma série de opióides sintéticos e em seguida por Portoghesse (1965) que sugeriu a existência de mais de um tipo de receptor opióide e modos de interação demonstrados no tecido cerebral humano por ensaios realizados com radioligantes em tecido isolado (PERT; SNYDER, 1973; SIMON, 1973). Estes receptores foram denominados “receptores opióides”, devido ao entendimento que seus ligantes endógenos eram peptídeos com efeitos similares às drogas opiáceas (PORTOGHESE, 1965).

Na década seguinte, vários estudos farmacológicos se intensificaram trazendo importantes descobertas sobre uma variedade de receptores de opióides e seus subtipos, observando-se que estes receptores atuavam de forma a mediar a ligação específica dos ligantes opióides quando liberados exogenamente ou endogenamente (MOLLEREAU *et al.*, 1994; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2006). Os trabalhos de Gilbert e Martin (1976) foram os primeiros a relatar evidências farmacológicas definitivas que sustentaram a existência de receptores opióides endógenos, os quais relataram a existência de alguns tipos de receptores opióides com base nas ações farmacológicas

observadas. Sendo assim, estudos sugerem a existência de três categorias principais de receptores opióides: mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) (BLALOCK, 1999), também intitulados na literatura pelas siglas (*do inglês*) MOR (mu opioid receptor), DOR (delta opioid receptor) e KOR (kappa opioid receptor) respectivamente, estão presentes em várias regiões do encéfalo, medula espinhal e órgãos periféricos (GOLDSTEIN, 1987) representando os sítios de ação funcional primária destas substâncias (SFORZO, 1988).

As beta-endorfinas são mais ativas sobre os receptores mu e delta e as encefalinas sobre o receptor delta, enquanto que as dinorfinas agem sobre o receptor kappa (CORBETT; PATERSON; KOSTERLITZ, 1993) assim como ilustra a tabela 1. Assim sendo, a intensidade de ligação dos opióides endógenos com seus receptores tem sido frequentemente comparados com a ação de fármacos agonistas e antagonistas (GOLDSTEIN; NAIDU, 1989; RAYNOR *et al.*, 1993). Os subtipos desses receptores descritos foram denominados mu1 e mu2 no caso dos receptores mu (PASTERNAK *et al.*, 1983) e kappa1 e kappa2 para os receptores kappa (ATTALI *et al.*, 1982). Além disso, estudos têm verificado a existência de outros subtipos de receptores, como por exemplo: epsilon e lambda-opióides seletivos para beta-endorfinas e naloxona, respectivamente (SCHULZ *et al.*, 1981; GARZON; SCHULZ; HERZ, 1984; GREVEL; YU; SADEE; 1985).

A ativação dos receptores opióides tanto por ligantes endógenos ou exógenos resulta em uma infinidade de efeitos fisiológicos e comportamentais. Vários estudos sobre os efeitos bioquímico-moleculares e localização neuroquímica do sistema opióide, tem mostrado o papel mediado pelos receptores opióides na dor e analgesia, euforia, estresse e *status* social, tolerância e dependência, aprendizado e memória, ingestão alimentar, álcool e abuso de drogas, desenvolvimento do sistema nervoso central e função endócrina, doença mental e humor, crises epiléticas e distúrbios neurológicos, atividade elétrica e neurofisiológica, atividade geral e locomoção, gastrointestinal, funções hepática e renal, respostas cardiovasculares, respiração e termoregulação e resposta imunológica (VAN REE; GERRITS; VANDERSCHUREN, 1999; LAW; WONG; LOH, 2000; WILLIAMS; CHRISTIE; MANZONI, 2001). Geralmente os efeitos dos receptores mu e delta estão

relacionados à analgesia e euforia, enquanto que o receptor kappa está relacionado à disforia (WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004).

Tabela 1. Características de afinidade dos ligantes e receptores opióides (adaptada de SFORZO, 1988).

Ligante	mu	delta	kappa
Agonistas			
Beta-endorfina	Alta	Alta	Baixa
Leu-encefalina	Baixa	Alta	Baixa
Met-encefalina	Baixa	Alta	Baixa
Dinorfina	Baixa	Baixa	Alta
Morfina	Alta	Baixa	Baixa
Antagonistas			
Naloxona	Alta	Baixa	Baixa
Diprenorfina	Moderada	Moderada	Baixa

Estudos têm mostrado que os receptores opióides estão amplamente distribuídos no SNC e periférico e localizados na superfície das membranas celulares (BLALOCK, 1999). A análise da seqüência de aminoácidos de receptores opióides clonados indica que estes receptores possuem sete domínios transmembranais (conforme modelo proposto para o receptor mu, mas que se aplica aos demais receptores - Figura 1 e 2), o que é característico de receptores que se acoplam à proteína G, do inglês chamados *GPCRs*, (PASTERNAK; STANDIFER, 1995).

A proteína G consiste em uma família de proteínas de membrana, acopladas a sistemas efetores que se unem a GDP-GTP (GDP: guanosina difosfato e GTP: guanosina trifosfato). Uma vez ativada, a proteína G intermedia o processo de sinalização que é iniciado com a ativação do respectivo GPCR e termina com a resposta mediada pela ação das moléculas efetoras que incluem canais iônicos como cálcio e potássio, e enzimas que geram segundos mensageiros, como por exemplo, a adenilato ciclase: a

enzima que gera o segundo mensageiro AMP cíclico (adenosina monofosfato cíclico); e quando se unem à GTP, as proteínas G interagem com o sistema receptor podendo inibir ou ativar esta enzima (HAUACHE, 2001).

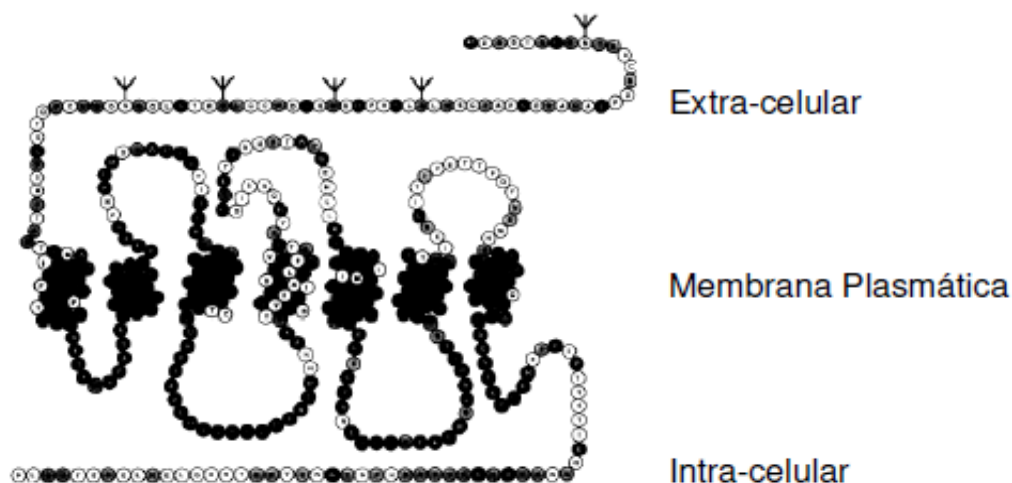


Figura 1: Modelo proposto para a topografia do receptor mu em ratos. Adaptado de Pasternak; Standifer (1995).

No caso dos receptores opióides, a interação com as proteínas G acarreta em inibição da adenilato ciclase. Em linhas gerais, as proteínas G (G_i/G_o) são compostas de três subunidades (α, β, γ), sendo a subunidade α ligada ao nucleotídeo GDP. Alterações conformacionais nos receptores opióides geradas pela ligação do agonista, promovem a troca do GDP para o GTP na subunidade α levando a dissociação do trímero às subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. A subunidade $G\alpha_i$ inibe a enzima adenilato ciclase que, por sua vez, reduz a promoção do AMPc, levando à diminuição da liberação de neurotransmissores, por redução da atividade da via AMPc – PKA (proteína quinase A) (Figura 2) (CLAPHAM; NEER, 1997; SIGGINS *et al.*, 1986; WAGNER *et al.*, 1993; SIMMONS; CHAVKIN, 1996).

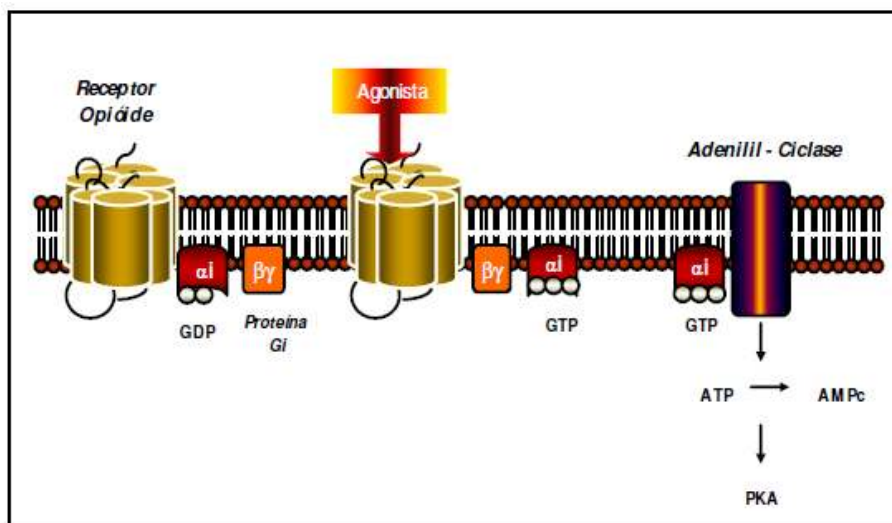


Figura 2: Representação esquemática da sinalização intracelular decorrente da ativação do receptor opióide (Adaptado de Katzung, 2006).

Neste sentido, neurotransmissores tais como glutamato e substância P podem ter suas liberações inibidas tanto em nível espínhal quanto supra-espínhal. Assim sendo, esta ação inibitória da atividade neural parece ser gerada de potenciais pré ou pós-sinápticos por hiperpolarização via canais de potássio ou redução do influxo de cálcio (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003; MADISON; NICOLL, 1988; SFORZO, 1988). Por outro lado, tem sido observado também que os opióides atuam indiretamente na excitação neuronal através da inibição pré-sináptica do GABA, denominado de desinibição, ou podem causar ações excitatórias diretas tais como aumento do disparo do potencial de ação e ou da concentração de cálcio intracelular (HENRIKSEN; WILLOCH, 2008). Estudos têm mostrado que os receptores opióides mu e delta promovem aumento da dopamina no núcleo acumbens enquanto que o receptor kappa produz ação inversa produz diminuição da mesma no núcleo acumbens via ativação pré-sináptica desses receptores.

A distribuição dos receptores opióides é ampla no SNC. Um estudo imunohistoquímico no cérebro de ratos mostrou uma alta densidade do receptor opióide mu no neocórtex, estriado, septo medial, núcleo endopiriforme, globo pálido, amígdala, hipocampo, núcleos talâmicos e hipotalâmicos, pré-subículo, colículos inferior e superior, substância negra, área tegmental ventral, núcleo interpeduncular, núcleo terminal medial do trato óptico acessório, núcleo

da rafe, núcleo do trato solitário, núcleo trigeminal espinhal, núcleo motor dorsal do vago, medula espinhal e gânglio da raiz dorsal (MANSOUR *et al.*, 1995). Devido a esta ampla distribuição, os receptores μ podem exercer várias funções como controle da dor, controle cardiovascular, funções gustativas, controle hormonal, comportamentos neuroendócrinos, efeito analgésico e sedativo (NICOLL *et al.*, 1977; NICOLL; ALGER; JAHR, 1980; ZIEGLGANSBERGER *et al.*, 1979, MADISON; NICOLL, 1988).

O receptor opióide kappa possui uma distribuição variando de acordo com a espécie. No rato o receptor kappa tem sido localizado no córtex frontal, parietal e temporal (camadas II, III, V e VI). Este receptor está densamente distribuído na porção ventromedial do estriado, núcleo acumbens e tubérculo olfatório. No hipotálamo localiza-se na área pré-óptica, eminência média, núcleos para-ventricular, dorsomedial e ventromedial, núcleos supra-óptico e arqueado. Moderada densidade é encontrada no núcleo da rafe, substância negra e matéria cinzenta periaqueductal (MANSOUR; WATSON, 1993)

A distribuição descrita dos sítios de ligação dos receptores opióides na formação hipocampal de ratos, mostra que os sítios de ligação do receptor μ é mais prevalente que o delta e o kappa (ZAMIR; QUIRION; SEGAL, 1985), no entanto, todos estão presentes no *stratum pyramidale* e *granulosum*, *stratum oriens* e *moleculare* (GOODMAN *et al.*, 1980; CRAIN; CHANG; McNAMARA, *et al.*, 1986; McLEAN *et al.*, 1987).

1.3 Exercício Físico e Sistema Nervoso Central (SNC)

O exercício físico contribui com mudanças positivas no estilo de vida como a melhora do humor, qualidade de vida (FOLKINS; SIME, 1981), redução da ansiedade, depressão (MARTINSEN; MEDHUS; SANDVIK, 1985) e da percepção dolorosa (JANAL *et al.*, 1984). Além disso, existem relatos de melhora da auto-estima, sensação de bem-estar global e satisfação com a aparência física.

Nas últimas décadas, os efeitos do exercício físico no SNC ganharam importância e tem sido foco de pesquisas tanto em humanos

(DUSTMAN *et al.*, 1990; LUPINACCI *et al.*, 1993; KRAMER *et al.*, 1999) como em modelos animais (GÓMEZ-PINILLA *et al.*, 2002; MOLTENI *et al.*, 2002; MARIN *et al.*, 2003; VAYNMAN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2004; YING *et al.*, 2005).

Os mecanismos relacionados aos efeitos benéficos do exercício físico compreendem uma série de eventos, entre os quais, a alteração da expressão e concentração de vários fatores neurotróficos (COTMAN; BERCHTOLD, 2002). Outro aspecto importante tem sido o fato de que os progenitores neurais presentes no hipocampo de diversos mamíferos, inclusive em humanos, tenham a capacidade de renovar e produzir novos neurônios (neurogênese) (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999; ERIKSSON *et al.*, 1998). A neurogênese é induzida por diferentes condições, como no aprendizado e memória, insultos cerebrais e pelo exercício físico (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999). O aumento da proliferação celular no hipocampo tem sido também associado à diminuição da depressão. (BJORNEBEKK; MATHÉ; BRENÉ, 2005). Alguns estudos utilizando vários tipos de tratamentos antidepressivos através de fármacos e exercício físico mostram um aumento da proliferação celular e neurogênese no hipocampo, especificamente na zona subgranular (FABEL *et al.*, 2003; MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003). Desta forma, é importante enfatizar a importante interação entre neurogênese e o sistema opióide. Por exemplo, recentemente, um estudo experimental verificou o efeito do exercício físico na neurogênese de camundongos adultos geneticamente deficientes de beta-endorfina. Os resultados obtidos mostraram que a deficiência de beta-endorfina não teve qualquer efeito nos animais sedentários, no entanto nos animais treinados ocorreu um aumento da neurogênese, concluindo-se que a beta-endorfina liberada durante o exercício físico pode ser um fator chave para a proliferação celular induzida pelo exercício (KOEHL *et al.*, 2008).

Neste sentido, é importante analisar o efeito de diferentes tipos de exercício físico na plasticidade cerebral. Um estudo experimental realizado pelo nosso grupo de pesquisadores mostrou um aumento da expressão da proteína ligante de cálcio, a parvalbumina, na formação hipocampal de ratos após exercício físico voluntário ou forçado (ARIDA *et al.*, 2004). Outros estudos

confirmam estes achados mostrando resultados similares na plasticidade cerebral utilizando diferentes protocolos de exercícios físicos (KIM *et al.*, 2002; TREJO; CARRO; TORRES-ALEMAN, 2001, BRUEL-JUNGERMAN *et al.*, 2009).

O exercício tem capacidade de aumentar a resistência a lesões do SNC (GENTILI; BEHESHTI; HELD, 1987; COTMAN; BERCHTOLD, 2002), facilitando a recuperação funcional pós-lesão (EDGERTON *et al.*, 2004), revertendo quadros de inibição da proliferação celular no hipocampo provocado pelo etanol (CREWS; NIXON; WILKIE, 2004), assim como em outras situações como na Esclerose Múltipla (BENEDETTI *et al.*, 2009), Doença de Huntington (KOHL *et al.*, 2007), Doença de Parkinson (TILLERSON *et al.*, 2003) e riscos de dano cognitivo relacionados à idade e à doença de Alzheimer (LAURIN *et al.*, 2001; FARMER *et al.*, 2004; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2003; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004).

Embora estudos mostrem os efeitos benéficos do exercício físico na função e saúde cerebral (COTMAN; BERCHTOLD, 2002), ainda está pouco esclarecido o mecanismo pelo qual o exercício desempenha tal função (THÓREN *et al.*, 1990; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2003). Portanto, os benefícios fisiológicos e psicológicos observados após a prática de exercícios físicos podem estar relacionados às alterações na bioquímica cerebral envolvidas com a liberação de neurotransmissores e ativação de receptores específicos (SONENREICH; KERR-CORRÊA; ESTEVÃO, 1991; HERHOLZ *et al.*, 1987; PETRUZZELLO *et al.*, 1991). Desta forma, trabalhos recentes revelaram alterações na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica (FARMER *et al.*, 2004; DISHMAN *et al.*, 2006), os quais parecem ser responsáveis por alterações na estrutura e função dos neurônios (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE *et al.*, 1999).

Estes relatos têm sido sustentados por estudos que mostram mudanças de bem-estar emocional com apenas poucas sessões de exercício físico (YEUNG, 1996; PETRUZZELLO *et al.*, 1991; NORTH; MCCULLAGH; TRAN, 1990; GRIEST *et al.*, 1979; MELLION, 1985; GLENISTER, 1996) assim como redução da depressão e ansiedade após um programa de exercício físico (FARMER *et al.*, 1988; PALUSKA; SCHWENK, 2000). Por exemplo, estudos

realizados em indivíduos com quadro clínico de depressão mostram que após nove semanas de programa de treinamento aeróbio, ocorre significativa redução dos sintomas depressivos nestes indivíduos (NORTH; MCCULLAGH; TRAN, 1990; CRAFT; LANDERS, 1998). Da mesma maneira, estudos em indivíduos com sintomas de ansiedade mostram que um programa de exercício físico de dez semanas, com intensidade moderada, provoca uma significativa redução destes sintomas (MOSES *et al.*, 1989; PETRUZZELLO *et al.*, 1991; OSEI-TUTU; CAMPAGNA, 1998). Ainda existe uma grande dificuldade em estabelecer modelos de exercício ou treinamento físico que proporcionem benefícios à saúde mental.

1.4 Sistema Opióide e Exercício Físico

Dentre os opióides endógenos, as beta-endorfinas são as que mais se destacam por apresentarem-se aumentadas na circulação sanguínea durante o exercício físico (ANGELOPOULOS, 2001; SGHERZA *et al.*, 2002). Tem sido relatado na literatura que a principal hipótese da ativação do sistema opióide central pelo exercício físico ocorre através do exercício prolongado (± 1 hora). O aumento na concentração de beta-endorfina plasmática ocorre com o exercício físico submáximo de intensidade maior ou igual a 70% do pico de VO_2 , que ocorre em torno de 15 minutos após o exercício físico, retornando ao valor pré-exercício 1 hora após seu término (CARR *et al.*, 1981; FONTANA *et al.*, 1994; ALLEN, 1983; DE MEIRLEIR *et al.*, 1986). No entanto, existem evidências da elevação das concentrações circulantes de outros opióides com o exercício físico, assim como a encefalina e a dinorfina (HOWLETT *et al.*, 1984; BOONE JR *et al.*, 1992; FONTANA *et al.*, 1994; DEBRUILLE *et al.*, 1999).

Embora a maioria das pesquisas tenha investigado os efeitos periféricos dos opióides durante o exercício físico, poucos estudos relataram que o exercício físico alterasse a função dos opióides no sistema nervoso central (SFORZO, 1988). Nesse sentido, pesquisas experimentais iniciaram a busca de respostas sobre este envolvimento.

Em um estudo realizado por Wardlaw e Frantz (1980), mostram que 20 a 30 minutos de natação em água a 20°C resultou numa significativa diminuição da imunoreatividade de beta-endorfina hipotalâmica em ratos. Entretanto este achado não foi sustentado em estudo com corrida de velocidade (sprint running) (METZGER; STEIN, 1984), sendo provável que o estresse da água fria possa ter influenciado a discrepância dos resultados (SFORZO, 1988). O efeito agudo (uma sessão) e crônico (treinamento) do exercício físico foi também analisado. Heitkamp *et al.*, (1998) mostraram um aumento da concentração de beta-endorfina no cérebro após uma sessão de exercício prolongado. Ainda, um programa de treinamento físico de 8 semanas provocou um aumento na concentração de beta-endorfina especificamente no núcleo acumbens e da leu-encefalina na amígdala. O aumento nestas áreas do cérebro pode indicar um aumento na síntese do opióide ou diminuição em sua liberação, já que a atividade funcional opióide se encontrou diminuída após o exercício físico (BLAKE; STEIN; VOMACHKA, 1984).

A ativação do sistema opióide central pelo exercício físico foi também observada por Boone Jr e Corry (1996) que mostraram alteração dos níveis de encefalinas em diferentes regiões do cérebro de ratos hipertensos após uma semana de exercício físico em esteira e por Debruille *et al.*, (1999) demonstrando um significativo aumento da atividade dos opióides no cérebro de ratos após três semanas de exercício físico.

Apesar de estes estudos mostrarem a influência do exercício físico no sistema opióide endógeno, poucos estudos mostram a modulação da expressão dos seus receptores no cérebro após o exercício físico. Inicialmente, um estudo verificou um aumento na ocupação do receptor de encefalina no cérebro de ratos após 15 minutos de exercício físico forçado (PERT; BOWIE, 1979). Sforzo *et al.*, (1986), em estudo experimental *in vivo* com injeção de ligante opióide diprenorfina (ver tabela 1), observou-se uma alteração na ocupação de receptores opióides no cérebro de ratos após 2 horas de natação, o que levou a uma maior disponibilidade desses receptores sugerindo que este efeito poderia ser dependente do tempo de duração do exercício.

Recentemente, um estudo realizado com atletas de alto nível, por meio de tomografia por emissão de pósitrons, buscando identificar a relação do

estado de euforia nestes atletas depois de corrida de longa distância, observou uma redução na disponibilidade dos receptores opióides nas estruturas do córtex pré-frontal e límbico, enquanto o nível de euforia foi significativamente aumentado após a corrida. Estes dados reforçam o papel do sistema opióide em processos de estados afetivos e de humor induzido pelo exercício físico (BOECKER *et al.*, 2008).

1.5 Formação Hipocampal

O hipocampo é uma região do lobo temporal do cérebro, responsável por aspectos da neurobiologia da memória emocional e declarativa (fatos e eventos). O hipocampo processa a informação recentemente adquirida por um período de dias, semanas ou até meses, e depois a transfere para áreas importantes do córtex cerebral para um armazenamento mais prolongado (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003; KEMPERMANN; VAN PRAAG; GAGE, 2000). Sua nomenclatura deriva de sua morfologia apresentado em secções coronais do cérebro humano, assemelhando-se a um cavalo-marinho (grego: hippos = cavalo; kampi = curva).

É composto de duas áreas principais: corno de Ammon (subdividido em 4 regiões (CA1, CA2, CA3, HILO) e o giro dentado (GD) (BROWN; ZADOR, 1990). A região de CA2 é pequena e indistinta em algumas espécies, por este motivo é frequentemente incluída em CA1 (BLACKSTAD *et al.*, 1956; VAN GROEN; MIETTINEN; KADISH, 2003). O termo *formação hipocampal* inclui o GD, o subículo, o hipocampo propriamente dito, além dos córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal (BROWN; ZADOR, 1990).

As subdivisões CA1 a CA3 são constituídas por camadas, sendo elas: *stratum alveus* (camada mais superficial), *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum lucidum* (apenas em CA3), *stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculares* (contínuo com o GD). O GD consiste em camada molecular (*stratum moleculare*), camada granular (*stratum granulosum*) e camada polimórfica do GD ou HILO (BROWNE; ZADOR, 1990; FUJISE *et al.*, 1998).

O *stratum pyramidale* abriga as principais células do hipocampo, as células piramidais, que estão muito próximas umas às outras, formando uma

região compacta, e enviando dendritos basais para o *stratum oriens* e dendritos apicais em direção à fissura hipocampal. No *stratum oriens*, há dendritos basais de células piramidais e diferentes classes de células e interneurônios. Após a camada piramidal, apenas em CA3, encontramos o *stratum lucidum* ocupado por fibras musgosas das células granulares, responsáveis em enviar as informações do GD para o hipocampo (MATYAS et al., 2004). O *stratum radiatum* (TILLERSON et al., 2003) em CA1 e CA2 está logo após a camada piramidal e em CA3 após o *stratum lucidum*, podendo ser definido como supra-piramidal. No *stratum oriens* e *stratum radiatum* encontram-se conexões associativas CA3/CA3 ou as projeções de CA3 para CA1, chamadas de colaterais de Schaffer. A última camada é contínua com o giro dentado, chamada de *stratum lacunosum-moleculare*. Nesta camada chegam as fibras do córtex entorrinal e aferências de outras regiões, como por exemplo, da região mediana do tálamo. O *stratum radiatum* e *lacunosum-moleculare* abrigam vários tipos de interneurônios. Os interneurônios estão localizados em todas as camadas. Entre eles, temos as células em cesto, piramidais ou células axo-axônicas, que estão bem próximas às células piramidais, sendo a maioria células gabaérgicas (ANDERSEN et al., 2007).

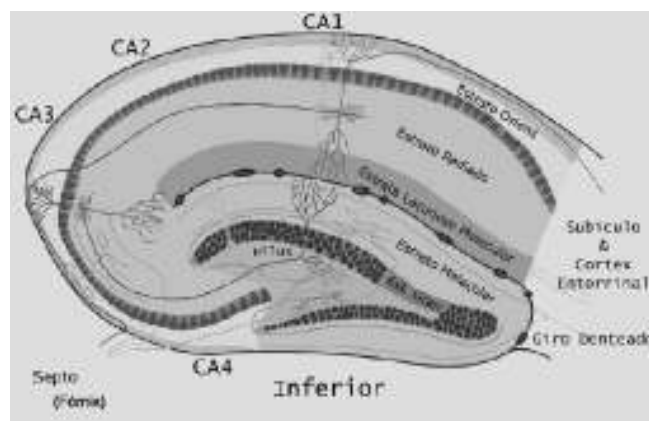


Figura 3: Representação simplificada das camadas celulares da formação hipocampal. Adaptado Kandel; Schwartz, Jessel (2003).

No GD, as principais células são as células granulares (CG) localizadas na camada granular. Outro tipo celular na camada granular são os

interneurônios, sendo os principais as células em cesto que se localizam na superfície mais profunda a camada. Estas projetam axônios que fazem sinapse com o corpo das CG, além de seus dendritos se comunicarem com a camada molecular e as células polimórficas. A maioria destas células apresenta características de neurônios inibitórios (gabaérgicos) (CLAIBORNE; AMARAL; COWAN, 1990). Em 1996, Freund e Buzsáki descreveram em uma revisão outros tipos de interneurônios presentes no hipocampo, que também fazem sinapse com corpos celulares, axônios e fibras serotoninérgicas provenientes do núcleo da rafe.

Na camada de células polimórficas encontram-se diferentes tipos celulares, porém as mais comuns são as células musgosas. Estas células possuem dendritos que se bifurcam e chegam às outras camadas do giro, porém não fazem conexões com áreas que não pertencem ao giro. São células imunorreativas para o glutamato, sendo assim a maior fonte de excitação associativa no GD (ANDERSEN *et al.*, 2007). A comunicação eferente do GD ocorre unicamente com a região CA3 do hipocampo, através das fibras musgosas das CG que terminam nos dendritos apicais das células piramidais de CA3, *stratum lucidum* (nome dado devido à aparência clara dada ao tecido fresco pela falta de mielina nas fibras musgosas) (BLACKSTAD *et al.*, 1956).

Os axônios corticais fazem sinapse com neurônios do córtex entorrinal, iniciando uma sequência de sinapses glutamatérgicas. Assim, toda informação que chega ao hipocampo provém do córtex entorrinal, e esta informação é encaminhada às diversas vias hipocampais que envolvem o GD e o corno de Amon; a saída do sinal ocorre pelo subículo, que devolve a informação ao córtex entorrinal, e este envia fibras para os córtices parahipocampal e perirrinal, voltando então a informação modificada às áreas do córtex cerebral (ANDERSEN *et al.*, 2007).

O circuito tri-sináptico é o mais conhecido, sendo responsável por propagar a informação no interior do hipocampo. A informação do córtex entorrinal é enviada aos dendritos das células granulares do GD, constituindo a via perforante. As células granulares do GD enviam axônios, chamados de fibras musgosas, para fazer a segunda sinapse com as células piramidais de

CA3. Os neurônios de CA3 projetam colaterais axônicos excitatórios que se ramificam formando os colaterais de Schaffer. A via colateral de Schaffer faz a terceira sinapse com células piramidais de CA1, fechando o circuito tri-sináptico básico do hipocampo (SUTULA *et al.*, 1998; LEITE; CAVALHEIRO, 1998) e consolidando a memória declarativa (KANDEL; SCHUARTZ; JESSEL, 2003; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2006).

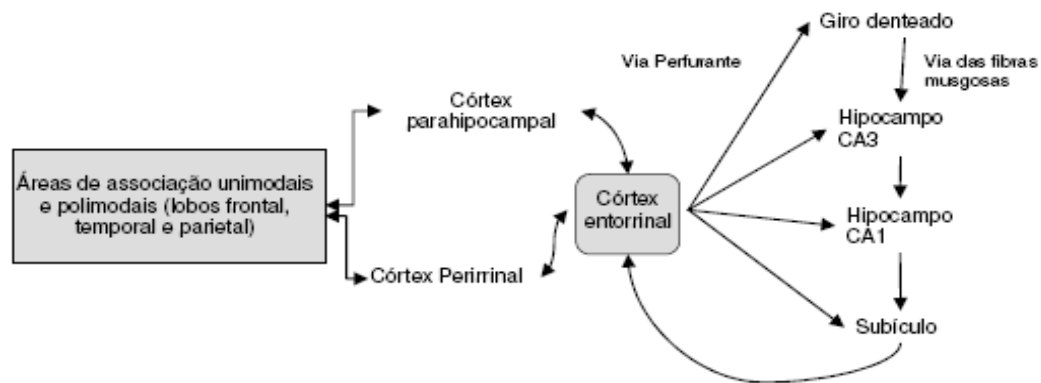


Figura 4: Vias de entrada e saída da formação hipocampal. Adaptado de Kandel; Schuartz, Jessel (2003).

2 JUSTIFICATIVA

Os efeitos benéficos do exercício físico na função e saúde cerebral (COTMAN; BERCHTOLD, 2002) podem estar relacionados às alterações na bioquímica cerebral envolvidas com a liberação de neurotransmissores e ativação de receptores específicos (SONENREICH; KERR-CORRÊA; ESTEVÃO, 1991; HERHOLZ *et al.*, 1987; PETRUZZELLO *et al.*, 1991). Todavia, tem sido demonstrado que estes efeitos estão amplamente envolvidos com o sistema opióide endógeno, no entanto, este mecanismo não está totalmente esclarecido (THÓREN *et al.*, 1990; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004).

Como comentado anteriormente, apesar de vários estudos mostrarem a influência do exercício físico no sistema opióide endógeno, poucos estudos tem avaliado esta influência sob os receptores dos opióides no cérebro (PERT; BOWIE, 1979; SFORZO *et al.*, 1986; BOECKER *et al.*, 2008). Por outro lado, não está bem esclarecido qual o tipo de exercício físico que pode exercer maior influência nos receptores opióides no cérebro. Ainda, estudos que avaliam a influência do exercício físico na plasticidade neuronal apresentam resultados diferentes em relação ao tipo de exercício físico utilizado (KEMPERMANN; VAN PRAAG; GAGE, 2000; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999). Portanto o estudo da modulação dos receptores opióides na formação hipocampal de ratos submetidos ao exercício físico agudo e crônico, em atividade voluntária e forçada, pode fornecer mais informações para o entendimento do mecanismo pelo qual o sistema opióide endógeno central atua frente ao esforço físico.

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como principal objetivo investigar a modulação da expressão dos receptores opióides mu e kappa, na formação hipocampal após diferentes programas de exercício físico aeróbio.

3.1 Objetivo Específico

Analisar a expressão dos receptores opióides mu e kappa nas regiões do hipocampo de rato por imunohistoquímica, após um programa de exercício físico aeróbio agudo (7 dias) e de exercício físico aeróbio crônico (45 dias), em atividade voluntária (em roda) e forçada (em esteira), e a densidade da expressão desses receptores por imunoblot sob as mesmas condições do programa de treinamento físico na formação hipocampal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos machos albinos da raça Wistar, adultos, pesando entre 200 e 280g no início dos experimentos foram utilizados. Os animais utilizados foram provenientes do biotério central da UNIFESP (Escola Paulista de Medicina), e mantidos no biotério do laboratório de Neurologia Experimental da mesma durante todo o estudo. Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e comida.

4.1.1 Formação dos Grupos

- **Grupo controle** (n=10)
- **Grupo esteira 7 dias:** animais submetidos ao exercício físico em esteira rolante (exercício forçado) por 7 dias consecutivos (n=10)
- **Grupo roda 7 dias:** animais submetidos ao exercício físico em roda (atividade voluntária) por 7 dias consecutivos (n=10)
- **Grupo esteira 45 dias:** animais submetidos ao exercício físico em esteira rolante por 45 dias consecutivos (n=10).
- **Grupo roda 45 dias:** animais submetidos ao exercício físico em roda por 45 dias consecutivos (n=10).

4.2 Programa de Treinamento Físico

Os animais foram submetidos ao efeito agudo (7 dias) e crônico (45 dias) do exercício físico em atividade voluntária e forçada e divididos aleatoriamente em 5 grupos como citado anteriormente. O programa de treinamento físico forçado foi realizado em esteira rolante (Columbus Instruments) (Figura 5). Para determinar uma medida de treinabilidade nos animais, uma escala de desempenho na esteira de 1 a 5, classificada por Dishman *et al.* (1988), foi realizada: 1= o animal se recusa a correr, 2= corrida

sem constância (corre e para ou corre em direção errada), 3= corrida regular, 4= corrida boa (ocasionalmente corre na parte de trás da esteira), 5= corrida excelente (corre permanentemente na parte da frente da esteira). Os animais com uma classificação média de 3 ou mais foram incluídos nos grupos de treinamento físico. Este procedimento foi usado para excluir possíveis níveis diferentes de estresse entre os animais. Os animais foram familiarizados com a esteira rolante por 3 dias durante 10 min/dia. O programa de treinamento aeróbio consistiu de 7 e/ou 45 sessões em esteira rolante, em dias consecutivos com duração de 60 minutos cada sessão. A intensidade do exercício físico (60% VO_{2max}) foi determinada para cada animal de acordo com parâmetros prévios utilizados em estudo anterior (ARIDA *et al.*, 1999). Cada sessão de treinamento se iniciou com um aquecimento de 5 min a 12-15 m/min. O tempo e a velocidade de corrida foram aumentados gradativamente durante os dias subseqüentes até a velocidade de 18 a 22 m/min.



Figura 5: Esteira rolante utilizada para o programa de treinamento físico forçado.

Na atividade voluntária, cada animal permaneceu durante 7 e ou 45 dias consecutivos numa caixa contendo uma roda que possui um eixo com um odômetro para aferir o número de rotações realizadas (Panlab Harvard Apparatus). Os animais recebiam água e comida a vontade (Figura 6).



Figura 6: Roda utilizada para o programa de treinamento físico em atividade voluntária

4.3 Imunohistoquímica: Receptores mu e kappa

Metade dos animais treinados de cada grupo ($n=5$) foram separados para a análise imunohistológica, os quais foram perfundidos e os cérebros retirados. Para a perfusão, os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral a 4% (0,3 mg/kg, i.p.). Após a anestesia, foi feita a abertura da caixa torácica do animal e exposição do coração. O ventrículo esquerdo foi puncionado com uma agulha e as soluções aí infundidas foram drenadas através de uma secção do átrio direito. Na primeira fase da perfusão os animais receberam uma solução de tampão fosfato contendo 0,9% de cloreto de sódio (PBS), e em seguida uma solução fixadora de paraformaldeído 4%, a um fluxo controlado de 7 ml/min. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato e o pH mantido em 7.4. A infusão foi feita automaticamente por uma Bomba de Perfusão (Masterflex). Em seguida, os cérebros foram retirados da caixa craniana com o auxílio da goiva, e colocados na solução crioprotetora de sacarose 30%. Os cérebros foram então, cortados de forma seriada em secções de 40 μ m de espessura em criostato.

As fatias foram embebidas em solução de peróxido de hidrogênio 0,1% por 30 minutos, para o bloqueio da atividade das peroxidases endógenas do tecido, que seria responsável por uma marcação inespecífica. A seguir, as fatias foram lavadas em tampão Tris HCl, objetivando-se a permeabilização celular. As fatias foram então incubadas em solução de soro-albumina bovina

0,1% durante 90 minutos à temperatura ambiente, a fim de neutralizar pontos eletricamente carregados no tecido que poderiam atrair os anticorpos, bloqueando assim, reações inespecíficas. Posteriormente, os cortes foram incubados em solução contendo o anticorpo primário policlonal anti-mu e anti-kappa da Oncogene (USA), na diluição de 1:1000 e 1:500 respectivamente, à temperatura de 4°C ao longo da noite. A seguir, as fatias foram colocadas na solução contendo o anticorpo secundário biotinilado na diluição de 1:500 em PBS, por um período de 90 minutos à temperatura ambiente, permitindo a ligação do anticorpo secundário ao primário. O complexo biotina-avidina-peroxidase foi usado para indicar a ligação específica do anticorpo primário (Kit ABC). Sendo assim, as fatias foram colocadas em uma solução do Kit ABC (Vector USA) por 90 minutos. Posteriormente, as fatias foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) 0,06% em Tris-HCl 0,05M pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 1µl/ml. O DAB é um substrato cromógeno da enzima peroxidase e a cor acastanhada resultante da reação indica a presença do anticorpo primário, permitindo a visualização da imunomarcação. Por fim, as fatias foram montadas em lâminas desidratadas, diafanizadas e cobertas com lamínulas, usando-se Entellam (MERCK). Após montagem dos cortes, estas lâminas foram levadas ao microscópio de luz acoplado a um computador que capturou as imagens por uma câmera NIKON HD, SONY-USA (NIH). Estas lâminas foram analisadas por meio da contagem das células imunopositivas para o receptor mu e pela análise densitométrica das fibras imunopositivas para o receptor kappa.

A contagem de células imunopositivas para o receptor mu foi feita de acordo com estudos prévios (ARIDA *et al.*, 2004; 2007), com auxílio do Atlas de Estereotaxia Cerebral (PAXINOS; WATSON, 1998) que permitiu localizar as diferentes áreas dos hemisférios direito e esquerdo a partir de diferentes bregmas. Para o nível 2.8 mm e 3.8 mm foram examinadas as subáreas CA1, CA3, hilo e giro dentado (GD) do hipocampo.

Para esta contagem celular, utilizou-se uma grade quadriculada com tamanho de 1mm² posicionada na objetiva do microscópio. A grade era subdividida em quadrados de 0,05 x 0,05 mm². A calibração dos quadrados da grade, para cada aumento, foi feita utilizando-se uma régua de 5 mm com

subdivisões de 100µm. A contagem celular foi feita utilizando-se um aumento de 200 x onde eram contadas as células presentes em cinco quadrados de 4 x 4, não consecutivos e com maior celularidade, determinando um campo de contagem. Para que se evitasse repetição na contagem foram consideradas as células que se encontravam no interior dos quadrados da grade e que tocavam as margens superior ou lateral esquerda das mesmas. As células que tocavam as margens inferior ou lateral direita não eram contadas, assim como as células que tinham mais da metade de seus pericários fora dos quadrados. Os resultados foram expressos como número de células por mm².

Todavia a análise densitométrica da marcação das fibras imunopositivas para o receptor kappa foi feita através do programa Densirag, acoplado a um sistema de análise de imagem da marca Biocom (França). Os valores específicos foram obtidos subtraindo-se o background de cada corte histológico, ou seja, fazendo-se a leitura de parte do corte onde não haviam fibras coradas.

4.4 Imunoblot (análise quantitativa)

4.4.1 Homogeneização do Tecido Cerebral

Para este procedimento foram utilizados os 50% restantes dos animais de cada grupo (n=5), sendo que após a decaptação destes, os hipocampus foram rapidamente retirados e congelados em gelo seco e armazenados a -80°C para posterior processamento. Neste processamento os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise Tris-HCl (10 mM, pH 7,6) contendo: 0,1 M de NaCl, 10% de Glicerol, 1% de NP-40, 0,001 M de EDTA contendo uma solução com diferentes inibidores de proteases (10 µM de PMSF, 1mM de metavanadato de sódio, 2 nM de ácido okadaico, 2 g de NaF, 10 mg/ml de aprotinina e 20 µM de leupeptina - Protease Inhibitor Cocktail – Sigma, P-8340, -20° C) por meio de um aparelho homogenizador. Após as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm em um aparelho centrifugador de marca Eppendorf, modelo 5415 R durante 15 minutos a -4° C. Uma alíquota de

100 mg de cada amostra do homogeneizado foi usada para a dosagem de proteína pelo Método de Bradford (Bradford, 1976). Uma curva de calibração de proteína foi realizada com BSA 1%. A mistura (1:1) do homogeneizado com tampão de amostra (Tris-HCl 115 mM pH 6,8, SDS 15%, glicerol 10%, 2-beta-mercaptoetanol 100 mM e azul de bromofenol 0,1%) foi fervida a 100 °C por 5 minutos.

4.4.2 Eletroforese

Volumes de amostras contendo 20 µg de proteína (receptor mu) e/ou 25 µg de proteína (receptor kappa) foram aplicados ao gel de eletroforese SDS-PAGE (acrilamida/bis-acrilamida 30% e SDS 10%), montado com o gel de separação a 10%, preparado com tampão Tris (base) 1,5 M, pH 8,8 (acertar pH com HCl), e o gel de empilhamento ("stacking gel") a 4%, preparado com tampão Tris (base) 0,5 M, pH 6,8 (acertar pH com HCl). A montagem do gel foi realizada no módulo Gel Casting System (Owl Separation System-NY-USA).

Uma solução padrão contendo proteínas com diferentes pesos moleculares (Rainbow, GE) foi aplicada ao gel para identificação das bandas de interesse. O tampão de corrida foi composto de 25 mM Tris base (pH 8,3 com HCl), 190 mM de glicina e 0,1% de SDS. O sistema de eletroforese (Wolverine Minigel Protein Electrophoresis System - Owl Separation System, Model P82 Dual Gel, NY-USA, 10 X 10 cm) foi ajustado com parâmetro de amperagem fixa de 30mA (receptor mu) e/ou voltagem fixa de 120 V (receptor kappa) e o experimento teve duração de aproximadamente três horas.

Ao término da corrida eletroforética, as bandas protéicas contidas nos géis foram transferidas para membranas de PVDF utilizando-se um tampão de transferência contendo 48 mM de Tris base, 39 mM de glicina e 20% de metanol. Durante a transferência, as membranas e os géis foram mantidos em um suporte do sistema de transferência em disposição como forma de

“sanduíche” entre papéis filtro e esponjas sintéticas. A transferência propriamente dita, foi realizada sob parâmetro de amperagem fixa a 200 mA (receptor μ), com duração de 2 horas e 30 minutos em tanque de transferência - The Bandit Tank Electroblotting System, Modelo VEP2 (Owl Separation System, NY, USA) e para o receptor kappa ocorreu sob parâmetro de voltagem fixado em 20 V durante a noite (overnight).

Após a transferência, as membranas de PVDF para o receptor μ foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente em uma solução de tampão TBST (50 mM Tris base pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) contendo leite 5% mantida sob agitação leve, para bloqueio dos sítios inespecíficos e da mesma maneira para o receptor kappa, porém em solução de tampão fosfato PBS 0,1 M, pH 7,4 contendo BSA 1%. Em seguida, tais membranas foram incubadas por 24 horas a 4°C com os respectivos anticorpos primários, o monoclonal, anti- μ (Abcam, 45 KDa, 1:2000) e o policlonal anti-kappa (Proteimax, 58 KDa, 1:2000) diluídos nos tampões respectivos, no entanto, com leite a 2% e BSA a 0,25%, com titulações determinadas por estudo piloto para cada anticorpo. Após incubação, as membranas foram lavadas (sete vezes de 10 minutos) nos mesmos tampões citados anteriormente, e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit HRP (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) durante 2 horas, a temperatura ambiente e sob leve agitação. Ao final, as membranas foram novamente lavadas da mesma maneira anteriormente citada com os tampões acrescidos de Tween-20 (0,1%) nas últimas lavagens, e em seguida estas membranas foram submetidas ao procedimento para imunodeteção das bandas empregando o kit de quimioluminescência ECL (GE) e os filmes de raios-X (Hyperfilm-GE) cujo tempo de exposição variava entre 1 e 3 minutos. A revelação dos filmes foi feita através de soluções reveladora e fixadora da marca Kodak.

Todo procedimento foi realizado com o anticorpo anti-beta-actina, utilizado como controle da reação. As membranas foram novamente submetidas ao bloqueio de sítios inespecíficos e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-beta-actina (Sigma, 42-45 KDa, 1:1000) por 1 hora, em seguida

lavadas com solução tampão fosfato 0,1 M (PBS) e reveladas com o kit ECL, seguindo os mesmos protocolos já descritos.

As respectivas bandas identificadas nos filmes foram quantificadas por densitometria óptica, através do sistema de análise de imagem contendo uma câmera acoplada a um computador por meio do programa Densirag (Biocom, França). Os dados plotados fazendo-se a relação entre a densidade óptica (D.O.) de cada receptor com a D.O. da beta-actina correspondente, para corrigir possíveis erros durante o procedimento. E por final, os valores específicos foram obtidos com a subtração do background de cada banda revelada.

4.5 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi obtida pela aplicação do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Valores para $p < 0,05$ na comparação entre os grupos controle e experimentais foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Imunohistoquímica: receptor mu

A imunoreatividade para o mu foi extensa na formação hipocampal. As áreas que mostram esta marcação incluem as regiões de CA1, CA3, hilo do giro denteado e giro denteado tanto no grupo controle quanto nos grupos submetidos ao exercício físico.

Por meio de contagem celular foi possível verificar um aumento significativo no número de células por mm^2 mu-positivas no grupo de exercício em esteira 7 dias, nas regiões de CA1 ($92,7 \pm 26,4$) (Figura 7), CA3 ($108,0 \pm 30,4$) (Figura 8), hilo ($82,0 \pm 21,2$) (Figura 9) e GD ($119,7 \pm 37,9$) (Figura 10) quando comparado com o grupo controle ($46,5 \pm 6,5$; $46,1 \pm 14,0$; $36,6 \pm 9,1$; $61,7 \pm 14,6$) conforme mostram o gráfico 1.

Um aumento significativo também foi observado no grupo de exercício em roda 7 dias nas regiões de CA1 ($90,0 \pm 26,0$) (Figura 7), CA3 ($112,7 \pm 49,6$) (Figura 8), hilo ($83,7 \pm 33,4$) (Figura 9) e GD ($115,5 \pm 30,9$) (Figura 10) em relação ao grupo controle ($46,6 \pm 6,5$; $46,1 \pm 14,0$; $36,6 \pm 9,1$; $61,6 \pm 14,6$) (Gráfico 1). No entanto, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos submetidos ao exercício físico em esteira e em roda nos animais treinados tanto aguda quanto cronicamente.

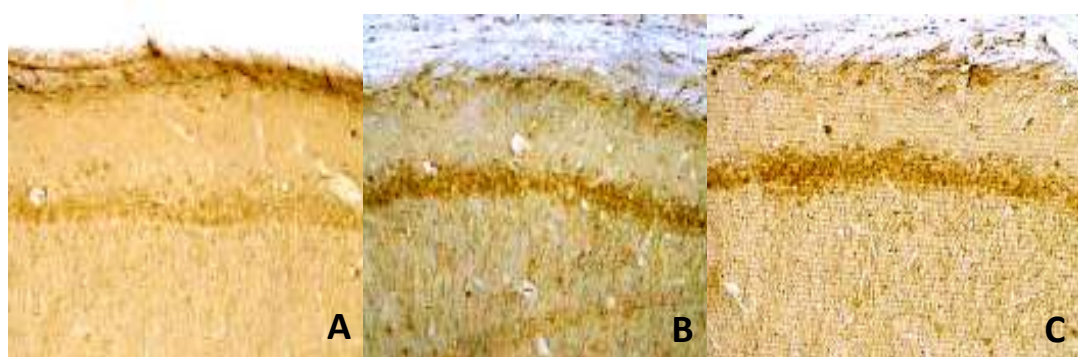


Figura 7: Fotomicrografias mostrando marcação de células mu-positivas na região de CA1 da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias.

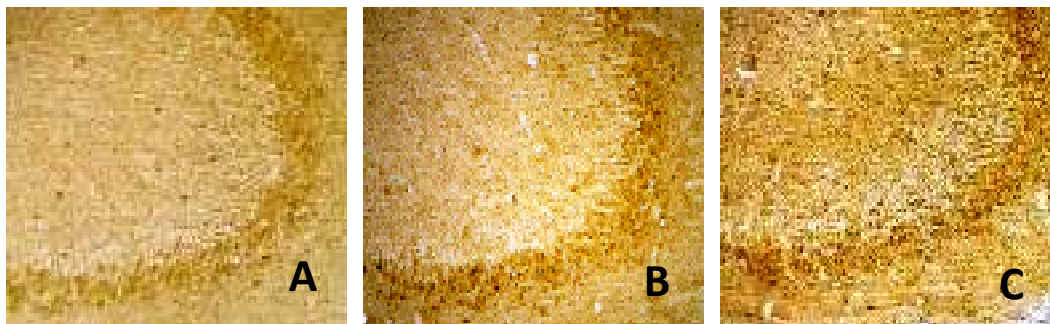


Figura 8: Fotomicrografias mostrando marcação das células mu-positivas na região de CA3 da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias.



Figura 9: Fotomicrografias mostrando marcação das células mu-positivas na região do hilo da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias.

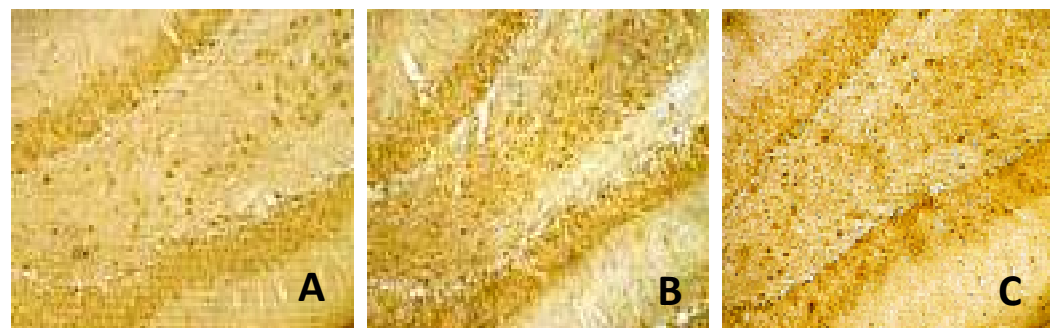


Figura 10: Fotomicrografias mostrando marcação das células mu-positivas na região de GD da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias.

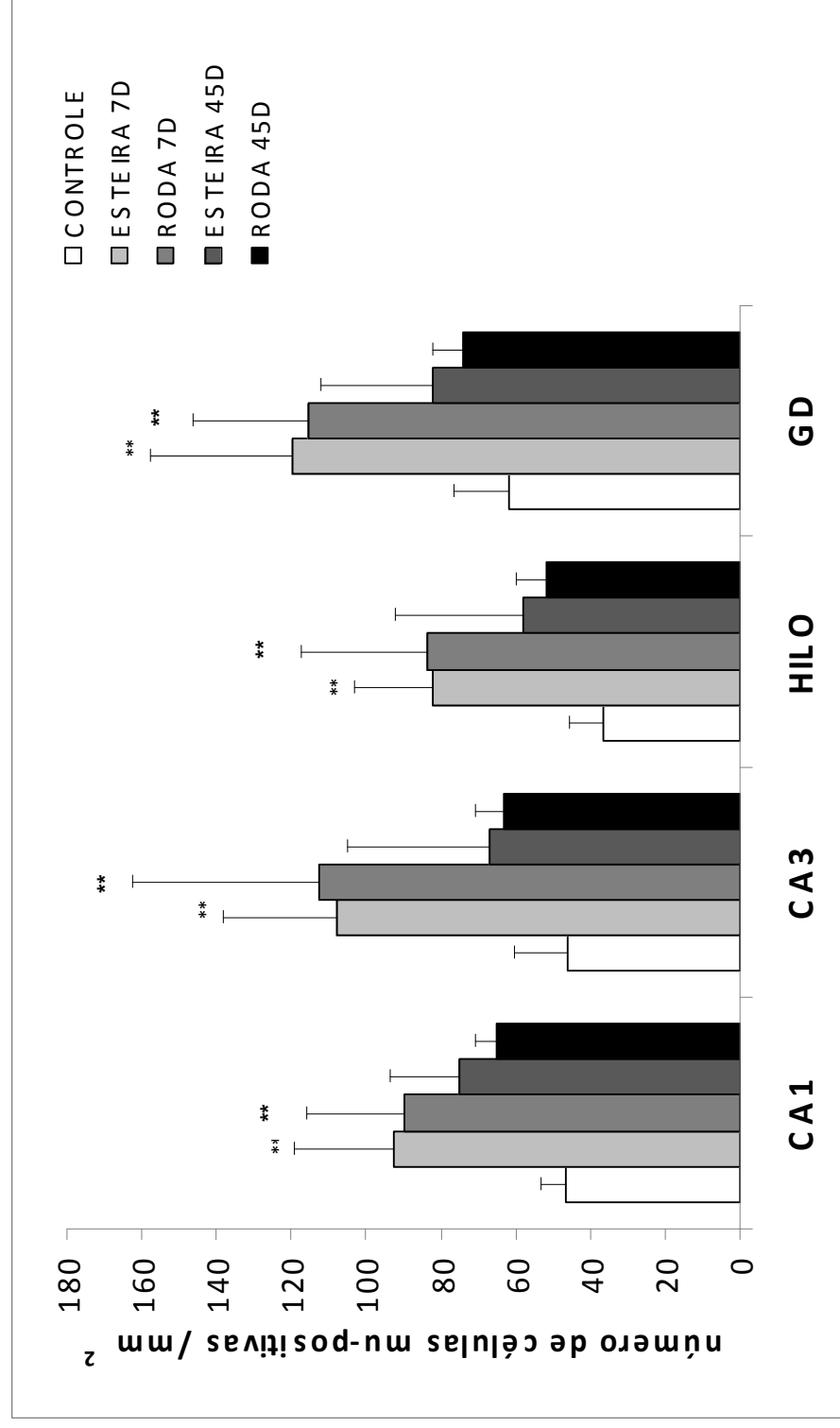


Gráfico 1: Contagem de células mu-positivas por mm² nas regiões de CA1, CA3, hilo e GD, em animais dos grupos controle, esteira 7 dias, roda 7 dias, esteira 45 dias e roda 45 dias. Significante aumento no número de células mu-positivas na região de CA1, CA3, hilo e GD do grupo de exercício em esteira 7 dias (** p<0,01) e grupo de exercício em roda 7 dias (**p<0,01) quando comparados com ratos do grupo controle. Análise de variância (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey. Valores expressos em média ± desvio padrão.

5.2 Imunoblot: receptor mu

A quantificação da densidade das bandas protéicas reveladas nos filmes mostra um aumento significativo na densidade de receptores mu na formação hipocampal do grupo submetido ao exercício esteira 7 dias ($0,56 \pm 0,11$) e grupo roda 7 dias ($0,54 \pm 0,08$) em relação ao grupo controle ($0,39 \pm 0,08$). Todavia, foi observada uma significativa redução dos receptores mu no grupo esteira 45 dias ($0,43 \pm 0,02$) e roda 45 dias ($0,29 \pm 0,04$) comparado ao grupo esteira 7 dias e roda 7 dias respectivamente. Nenhuma variação significativa foi observada na quantificação da beta-actina entre os grupos experimentais e controles ($p > 0,05$) (Gráfico 2).

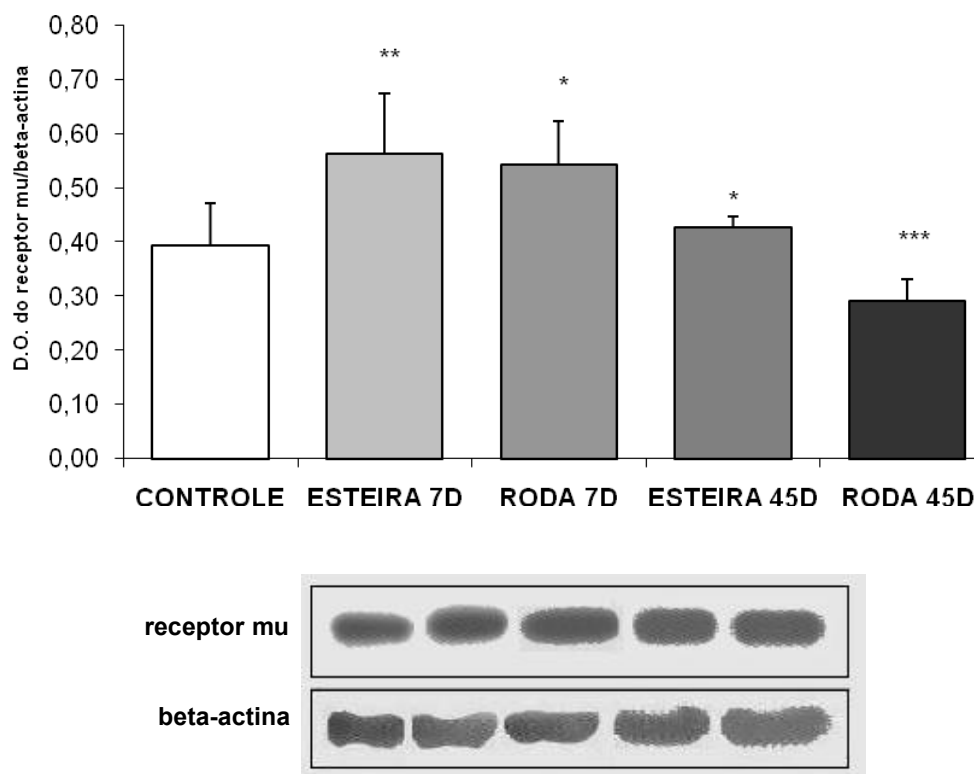


Gráfico 2: Valores expressando a relação entre a densidade óptica dos receptores mu e da beta-actina na formação hipocampal de ratos. Observou-se um significativo aumento dos receptores nos animais submetidos ao exercício físico em esteira 7 dias (** $p < 0,01$) e em roda 7 dias (* $p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle e uma significativa redução destes receptores no grupo esteira 45 dias e roda 45 dias quando comparado ao grupo esteira 7 dias (* $p < 0,05$) e roda 7 dias (***) $p < 0,001$) respectivamente. Análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos submetidos ao exercício físico em esteira e em roda nos animais treinados tanto agudo quanto cronicamente.

5.3 Imunohistoquímica: receptor kappa

Por meio da análise por densidade óptica, foi possível analisar a imunomarcção do receptor kappa na formação hipocampal nas regiões de CA3 e HILO do giro dentado, visto que nestas regiões ocorreu uma maior expressão deste receptor.

Um aumento significativo do receptor kappa foi observado nas fibras musgosas da região de CA3 no grupo esteira 7 dias ($0,15 \pm 0,05$) e no grupo roda 7 dias ($0,16 \pm 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($0,09 \pm 0,04$), conforme mostra o gráfico 3 e a Figura 11. Por outro lado, foi observada uma redução significativa do receptor kappa no grupo esteira 45 dias ($0,09 \pm 0,006$) quando comparado ao grupo esteira 7 dias e no grupo roda 45 dias ($0,09 \pm 0,02$) quando comparado ao grupo de exercício em roda 7 dias (Gráfico 3).

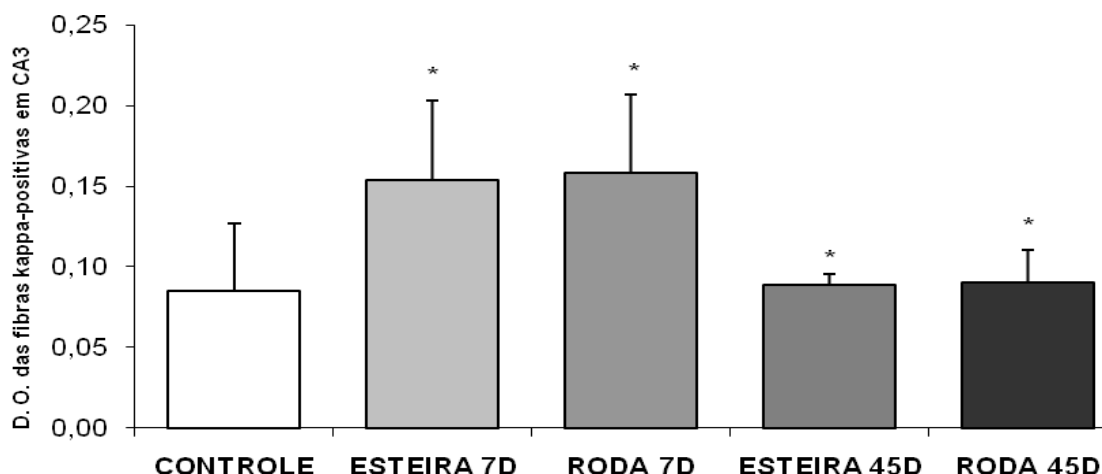


Gráfico 3: Análise da densidade óptica da imunomarcção para o receptor kappa nas fibras musgosas das regiões de CA3 da formação hipocampal. Observou-se significativo aumento nas fibras kappa-positivas na região de CA3 do grupo esteira 7 dias (* $p < 0,05$) e grupo roda 7 dias (* $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Observou-se também uma significativa redução no grupo esteira 45 dias (* $p < 0,05$) quando comparado ao grupo esteira 7 dias e no grupo roda 45 dias (* $p < 0,05$) quando comparado ao grupo roda 7 dias. Análise de variância (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

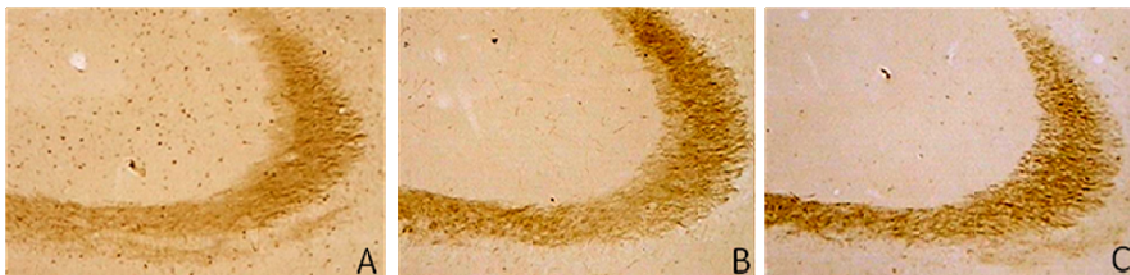


Figura 11: Fotomicrografias mostrando marcação de fibras musgosas kappa-positivas na região de CA3 da formação hipocampal. (A) grupo controle, (B) grupo esteira 7 dias, (C) grupo roda 7 dias.

Não houveram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos submetidos ao exercício físico em esteira e em roda nos animais treinados tanto agudo quanto cronicamente.

Apesar da região do hilo também ter ocorrido uma maior expressão dos receptores kappa, não foram observadas alterações estatisticamente significantes deste receptor nesta região entre os grupos experimentais e controle (Gráfico 4).

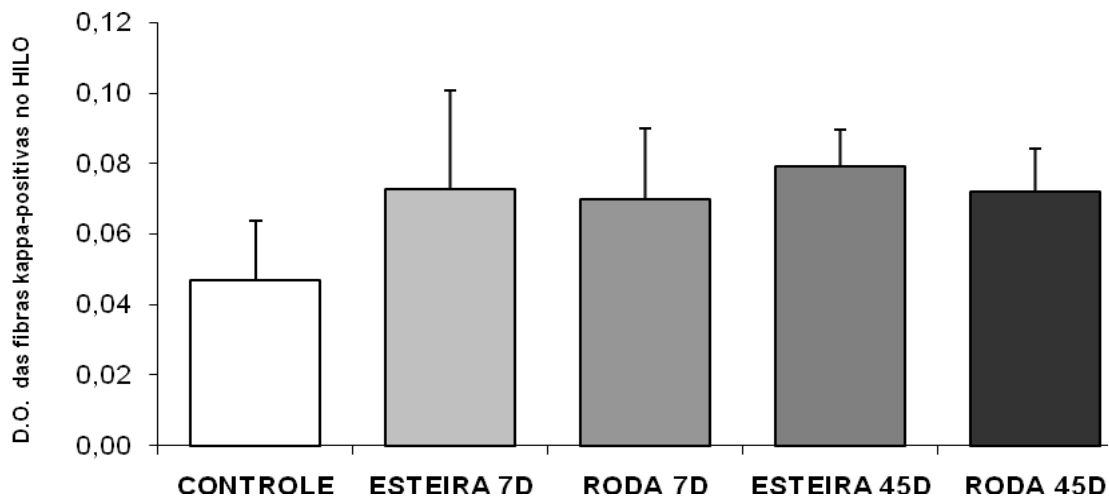


Gráfico 4: Análise por densidade óptica da imunomarcação do receptor kappa nas fibras musgosas da região do hilo da formação hipocampal em animais dos grupos controle, esteira 7 dias, roda 7 dias, esteira 45 dias e roda 45 dias. Não foram observadas alterações estatisticamente significantes do receptor nesta região entre os grupos experimentais e controle. Análise de variância (ANOVA) seguido do pós teste de Tukey. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

5.4 Imunoblot - receptores kappa

A análise quantitativa para o receptor kappa na formação hipocampal dos grupos de animais estudados não demonstrou alteração estatisticamente significativa na quantificação da densidade das bandas de proteínas comparando os grupos experimentais ao grupo controle e também quando comparados os grupos entre si ($p > 0,05$). Nenhuma variação significativa foi observada na quantificação da beta-actina entre os grupos experimentais e controle ($p > 0,05$) (Gráfico 5).

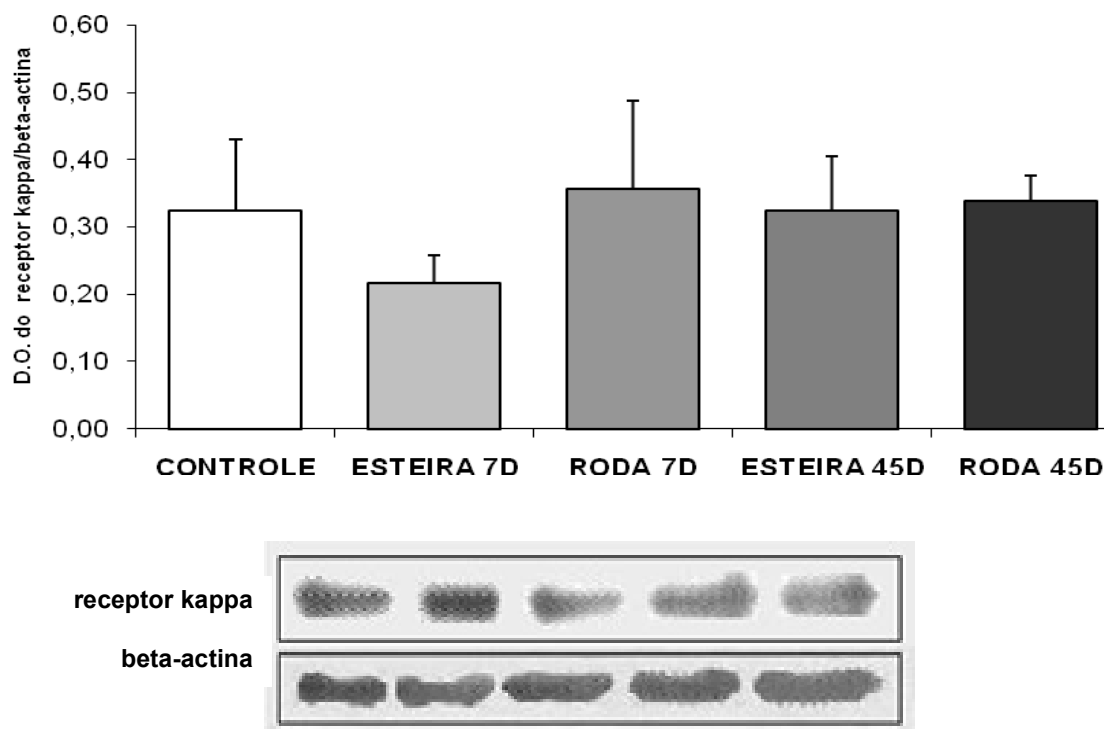


Gráfico 5: Valores expressando a relação entre a densidade óptica dos receptores kappa e da beta-actina na formação hipocampal de ratos. Não foi observada alteração estatisticamente significativa deste receptor nos grupos de animais estudados quando comparados ao grupo controle e quando comparados entre si. Análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

Em humanos, o exercício físico induz benefícios psicológicos, tais como mudanças positivas no humor e diminuição dos níveis de ansiedade (BAHRKE, 1979). Estes efeitos são mediados por receptores opióides (JÄRVEKÜLG; VIRU, 2002), sugerindo uma relação entre efeitos cerebrais induzido pelo exercício físico e sistema de opióides endógenos. No entanto, não existem informações consistentes sobre a expressão de receptores opióides após o exercício físico. Para este propósito, foram verificadas as consequências do exercício agudo e crônico, bem como o tipo de exercício físico que pode exercer uma maior influência na expressão de receptores opióides. Nossos resultados demonstraram que o exercício agudo e crônico induz alterações significantes em curto prazo na densidade do receptor mu opióide.

Poucos estudos têm demonstrado alterações da expressão de receptores opióides no cérebro, após curtos períodos de corrida (PERT; BOWIE, 1979) ou natação (SFORZO *et al.*, 1986). Nosso estudo mostrou pelas técnicas de imunohistoquímica e imunoblot que algumas sessões de exercício (exercício agudo) foram capazes de aumentar a expressão dos receptores mu na formação hipocampal e este efeito foi revertido pelo exercício de longa duração (exercício crônico). Nossos resultados estão coerentes com trabalhos anteriores que demonstraram que o exercício crônico leva ao desenvolvimento da tolerância ao receptor mu e à dependência física (SMITH; YANCEY, 2003). Neste sentido, outras pesquisas relataram que altas doses de morfina produzem maiores reduções no número e na sensibilidade dos receptores opióides (BAUMHAKER *et al.*, 1994; BELCHEVA *et al.*, 1993).

Alguns pesquisadores têm sugerido que se o exercício físico é aplicado por longos períodos de tempo, a sensibilidade aos efeitos dos opióides administrados

exogenamente é reduzida. Kanarek e colaboradores demonstraram que o exercício voluntário em roda diminuiu a sensibilidade aos efeitos antinociceptivos da morfina (KANAREK *et al.*, 1998; MATHES; KANAREK, 2001), refletindo um efeito compensatório suposto de *down-regulation* dos receptores opióides durante o exercício físico. Diferenças na densidade dos receptores de opióides de ratos treinados e sedentários (HOUGHTEN *et al.*, 1986) também sugerem que o exercício produz efeitos semelhantes aos produzidos pela administração crônica dos opióides. Se considerarmos que a manutenção de altas doses de morfina e outros agonistas dos receptores mu produzem maiores reduções no número e na sensibilidade dos receptores de opióides (BAUMHAKER *et al.*, 1994; BELCHEVA *et al.*, 1993), consequentemente, maiores níveis de exercício podem produzir maiores respostas compensatórias com o sistema do receptor opióide.

De acordo com dados da literatura, o estresse é um potente indutor da liberação de beta-endorfina. Durante a reação de estresse, o hormônio liberador da corticotropina ativa a pró-opiomelanocortina que libera o hormônio adrenocorticotrófico que conseqüentemente, mobiliza glicocorticóide e beta-endorfina (PRZEWLOCKI; PRZEWŁOCKA, 2001). Estudos anteriores mostraram que a intensidade do exercício aeróbio está relacionada com a liberação de beta-endorfina (MOUGIN *et al.*, 1988; GOLDFARB *et al.*, 1990). Estratégias têm sido utilizadas em nosso estudo para minimizar o estresse do exercício em esteira rolante como descrito anteriormente na metodologia. O exercício voluntário em roda e forçado em esteira foram escolhidos para verificar se diferentes protocolos de esforço físico poderiam influenciar a expressão dos receptores de opióides na formação hipocampal e evitar o fator de estresse inerente aos procedimentos do exercício forçado. Não foram observadas alterações significativas entre os grupos de exercício voluntário e forçado em ratos treinados agudo ou cronicamente, sugerindo

que ambos os tipos de exercícios podem modular a expressão dos receptores mu na formação hipocampal.

Um ponto importante está relacionado se as alterações periféricas refletem os níveis de opióides no SNC. Neste raciocínio, vários estudos têm relatado que a concentração plasmática de circulação de beta-endorfina aumenta várias vezes em resposta ao exercício de intensidade e duração suficiente (COLT *et al.*, 1981; DE MEIRLEIR *et al.*, 1986; GOLDFARB *et al.*, 1987; RAHKILA *et al.*, 1988). Por exemplo, Kraemer *et al.*, (1989) demonstrou que exercício de baixa intensidade não induziu aumento do nível de beta-endorfina, apesar do longo tempo da atividade. Eles também mostraram que as concentrações de beta-endorfinas aumentavam em resposta ao exercício prolongado, se a intensidade é superior a 50% do VO₂ máximo e durante o exercício máximo, se este é realizado por um mínimo de 3 minutos. Enquanto que a maioria dos dados da literatura demonstra o papel do exercício físico no aumento dos níveis sanguíneos de beta-endorfina, achados controversos também têm sido relatados. Um estudo não mostrou aumento de beta-endorfina plasmáticas após o exercício (bicicleta ergométrica e esteira), a 60% do VO₂ max. (LANGENFELD; HART; KAO, 1987) ou após 20 ou 60 minutos em outro estudo (ELIAS *et al.*, 1986).

Embora o aumento no nível de endorfina na circulação sanguínea seja observado na maioria dos tipos de exercícios físicos, não está bem esclarecido se este aumento reflete os níveis de opióides no SNC. Nesse sentido, nosso trabalho demonstrou que o exercício de intensidade moderada altera a expressão do receptor mu no cérebro. Poderíamos que, o bem-estar e outros efeitos psicológicos observados após exercício de curta duração, a uma intensidade moderada, podem ser atribuídos à modulação do sistema opióide central. Além disso, o envolvimento do sistema opióide com o exercício tem sido associado à plasticidade neuronal. Estudos têm mostrado que o aumento nos níveis de beta-endorfinas no cérebro

após o exercício aumenta a neurogênese hipocampal através da ativação dos receptores mu (PERSSON *et al.*, 2003a e b; HOLMES; GALEA, 2002). Portanto, a modulação da expressão dos receptores mu pelo exercício agudo e crônico pode estar diretamente ligada a estes processos, já que alterações do receptor foram observadas em todas as regiões do hipocampo.

Nosso estudo também verificou o efeito do exercício físico agudo e crônico sobre os receptores kappa no exercício forçado e voluntário. As dinorfinas se expressam na formação hipocampal principalmente na camada de células granulares e GD e seu papel sobre o controle do humor tem sido sugerido (FILLIOL *et al.*, 2000; SHIRAYAMA *et al.*, 2004). No nosso estudo, a análise da imunohistoquímica mostrou um aumento da expressão do receptor kappa apenas na região de CA3 após o exercício agudo forçado e voluntário e uma redução significativa deste receptor após o exercício crônico para os dois tipos de exercício. Estudos experimentais têm mostrado que a diminuição da atividade dos receptores kappa pode ser efetiva no tratamento da depressão e dependência de drogas (SHIPPENBERG; ZAPATA; CHEFER, *et al.*, 2007). O exercício de longo prazo pode causar mudanças nos níveis de dinorfina no cérebro causando aumento deste opióide (HURD; HERKENHAM, 1993; WERME *et al.*, 2000). Neste sentido, nosso estudo poderia sugerir que o exercício físico agudo e crônico poderia estar envolvido com o efeito antidepressivo do exercício por modulação dos receptores kappa. Por outro lado, a análise por imunoblot não mostrou alteração do receptor kappa tanto no exercício agudo como no exercício crônico em animais treinados em atividade forçada e voluntária. Portanto, nossos achados não permitem concluir que o exercício físico exerce uma participação efetiva na expressão do receptor kappa. Mais estudos são necessários para podermos definir a associação entre o exercício físico e expressão do receptor kappa.

7 CONCLUSÕES

1 - o exercício agudo e crônico modula a expressão de receptor mu na formação hipocampal de ratos. O exercício físico agudo provocou um aumento e o exercício físico crônico uma diminuição da expressão do receptor mu na formação hipocampal.

2 - não houve diferenças quanto aos tipos de exercícios físicos utilizados, forçado e voluntário, na modulação da expressão do receptor mu.

3 – as alterações observadas na expressão do receptor kappa após os dois tipos de exercício físico, tanto agudo quanto cronicamente, não permitem concluir que o exercício físico modula a expressão do receptor kappa.

4 – nosso estudo apoia a hipótese das endorfinas com o exercício, tendo em vista as alterações ocorridas no receptor mu, principal agonista das beta-endorfinas.

REFERÊNCIAS

AKIL H.; YOUNG E.; WALKER, J. M., *et al.* The many possible roles of opioids and related peptides in stress-induced analgesia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 467, p. 140-153, 1986.

ALBRECHT, H. Endorphins, sport and epilepsy: getting fit or having one? **N. Z. Med. J.**, p. 915, 1986.

ALLEN, M. Activity-generated endorphins: a review of their role in sports science. **Can. J. Appl. Sport Sci.**, p.115-33, 1983.

ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D., *et al.* **The Hippocampus Book**. Hardcover: Oxford University Press, p. 249-254, 2007.

ANDERSON, B.J.; RAPP, D.N.; BAEK, D.H. *et al.* Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. **Physiol. Behav.** , v. 70, p. 425-429, 2000.

ANGELOPOULOS, T. J. Beta-endorphin immunoreactivity during high-intensity exercise with and without opiate blockade. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 86, Pp. 92-6, 2001.

ARENTZ, T.; DE MEIRLEIR, K.; HOLLMANN, W. The role of peptides during cycle ergometry. **Dt. Z. Sportmed.**, p. 210, 1986.

ARIDA, R. M.; SCORZA, C. A.; DA SILVA, A. V., *et al.* Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neurosci. Lett.**, p.135-8, 2004.

ARIDA, R. M.; SCORZA, C. A.; SCORZA, F. A., *et al.* Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, p. 814-22, 2007.

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; SANTOS, M. F., *et al.* Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res.**, v. 37, p. 45-52, 1999.

ATTALI, B.; GOUARDERES C.; MAZARGUIL H., *et al.* Evidence for multiple "Kappa" binding sites by use of opioid peptides in the guinea-pig lumbo-sacral spinal cord. **Neuropeptides**, p. 53-64, 1982.

BAHRKE, M.S. Exercise, meditation and anxiety reduction: a review. **Am. Correct. Ther. J.**, v. 33, p.41-4., 1979.

BAUMHAKER, Y.; BEN-DOR, T.; BAR-HAMBURGER, R., *et al.* Characterization of a triple opioid system in the human neuroblastoma NMB cell line. **Brain Res.**, p. 94–100, 1994.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências**: Desvendando o Sistema Nervoso. 2ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2006.

BECKETT, A. H.; CASY, A. F. Synthetic analgesics: stereochemical considerations. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.6, p. 986-1001, 1954.

BELCHEVA, M. M.; BARG, J.; MCHALE, R. J., *et al.* Differential down- and up-regulation of rat brain opioid receptor types and subtypes by buprenorphine. **Mol Pharmacol.**, p.173–179, 1993.

BENEDETTI, M.G.; GASPARRONI, V.; STECCHI, S., *et al.* Treadmill exercise in early multiple sclerosis: a case series study. **Eur. J. Phys. Rehabil. Med.**, v. 45, p.53-9, 2009.

BERCHTOLD, N.C.; KESSLAK, J.P.; COTMAN, C.W. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. **J. Neurosci. Res.**, v. 68, p. 511-21, 2002.

BJORNEBEK, K. A.; MATHE A. A.; BRENE S. The antidepressant effect of running is associated with increased hippocampal cell proliferation. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 8, p.357-68, 2005.

BLACKSTAD, T.W. BRINK, K.; HEM, J., *et al.* Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J. Comp. Neurol.**, v. 105, p. 417-537, 1956.

BLAKE, M. J.; STEIN, E. A.; VOMACHKA, A. J. Effects of exercise training on brain opioid peptides and serum LH in female rats. **Peptides**, p.953-8, 1984.

BLALOCK, J. E. Proopiomelanocortin and the immune-neuroendocrine-connection. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, p.161-72, 1999.

BLANKSTEIN, J.; REYES, F. I.; WINTER, J. S., *et al.* Endorphins and the regulations of the human menstrual cycle. **Clin. Endocrinol.** (Oxf), v. 14, p. 287-94, 1981.

BOECKER, H.; SPRENGER, T.; SPILKER, M.E., *et al.* The runner's high: opioidergic mechanisms in the human brain. **Cereb. Cortex.**, v.18, p. 2523-2531, 2008.

BOONE JR, J. B.; CORRY, J. M. Proenkephalin gene expression in the brainstem regulates post-exercise hypotension. **Mol. Brain Res.**, v. 42, p. 31-38, 1996.

BOONE JR, J. B.; LEVINE M.; FLYNN M. G., *et al.* Opioid receptor modulation of postexercise hypotension. **Med. Sci. Sports Exerc.**, p. 1108-13, 1992.

BOUCHARD, C; LEON A. S.; RAO, P. C., *et al.* Fitness and risk factors for coronary disease. **J. Clin. Epidemiol.**, p.1005-12, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantition of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMBILLA F.; FACCHINETTI F.; PETRAGLIA F., *et al.* Secretion pattern of endogenous opioids in chronic schizophrenia. **Am. J. Psychiatry.**, v. 141, p. 1183-9, 1984.

BROWN, T.H.; ZADOR, A.M. The **synaptic organization of the brain**. New York: Oxford University Press, 1990.

BRUEL-JUNGGERMAN, E.; VEYRAC, A.; DUFOUR, F., *et al.* Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **PLoS One**, v.19, p. 7901, 2009.

CARR, D. B.; BULLEN, B. A.; SKRINAR, G. S., *et al.* Physical conditioning facilitates the exercise-induced secretion of beta-endorphin and beta-lipotropin in women. **N. Engl. J. Med.**, v. 305, p. 560-3, 1981.

CASTELLI, M.P.; MELIS, M.; MAMELI, M., *et al.* Chronic morphine and naltrexone fail to modify mu-opioid receptor mRNA levels in the rat brain. **Brain. Res. Mol. Brain. Res.**, v. 45, p.149-153, 1997.

CHAVKIN, C.; SHOEMAKER, W.J.; MCGINTY, J.F., *et al.* Characterization of the prodynorphin and proenkephalin neuropeptide systems in rat hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 5, p.808-16, 1985.

CHRISTIAN, E.P.; WEST, M.O.; DEADWYLER, S.A. Opiates and opioid peptides modify sensory evoked potentials and synaptic excitability in the rat dentate gyrus. **Neuropharmacology**, v. 24, p. 607-15, 1985.

CLAIBORNE, B.J.; AMARAL, D.G.; COWAN, W.M. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. **J. Comp. Neurol.**, v. 302, p. 206-19, 1990.

CLAPHAM, D.E.; NEER, E.J. G protein beta gamma subunits. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, p.167-203, 1997.

COLT, E.; WARDLAW, S.; FRANTZ, A. The effect of running on plasma beta-endorphin. **Life Sci.**, p. 1637–1640, 1981.

CORBETT, A. D.; PATERSON, S. J.; KOSTERLITZ, H. H. W. **Selectivity of ligands for opioid receptors**. In Opioids (A. Herz.), p. 645-679, 1993.

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

COUPAR, I. M. Opioid action of the intestine: the importance of the intestinal mucosa. **Life Sci.**, v. 24, p. 917-25, 1987.

CRAFT, L. L.; LANDERS, D. M. The effect of exercise on clinical depression: a meta-analysis. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, p. S117, 1998.

CRAIN, B.J.; CHANG, K.J.; McNAMARA, J.O. Quantitative autoradiographic analysis of mu and delta opioid binding sites in the rat hippocampal formation. **J. Comp. Neurol.**, v.246, p.170-180, 1986.

CREWS, F.T.; NIXON, K.; WILKIE, M.E. Exercise reverses ethanol inhibition of neural stem cell proliferation. **Alcohol**, v.33, p.63-71, 2004.

D'ANCI, K. E.; GERSTEIN, A. V.; KANAREK, R. B. Long-term voluntary access to running wheels decreases kappa-opioid antinociception. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 66, p.343-346, 2000.

DE MEIRLEIR, K.; NAAKTGEBOREN, N.; VAN STEIRTEGHEM, A., *et al.* Beta-endorphin and ACTH levels in peripheral blood during and after aerobic and anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, p. 5-8, 1986.

DEBRUILLE, C.; LUYCKX, M.; BALLESTER, L., *et al.* Serum opioid activity after physical exercise in rats. **Physiol. Res.**, v.48, p.129-33, 1999.

DING, Y. H.; LI, J.; ZHOU, Y., *et al.* Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. **Curr. Neurovasc. Res.**, v. 3, p. 15-23, 2006.

DISHMAN, R. K.; BERTHOUD, H. R.; BOOTH, F.W., *et al.* Neurobiology of exercise. **Obesity**, v.14, p.3, 2006.

DISHMAN, R. K.; ARMSTRONG, R. B.; DELP, M. D., *et al.* Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. **Physiol. Behav.**, p. 541-6. Erratum in: *Physiol Behav*, p. 156, 1988.

DUNN, A. L.; DISHMAN, R. K. Exercise and the neurobiology of depression. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 19, p. 41-98, 1991.

DUSTMAN, R. E.; EMERSON, R. Y.; RUSHLING, R. O., *et al.* Age and fitness effects on EEG, ERPs, visual sensitivity and cognition. **Neurobiol. Aging.**, v.11, p. 193-200, 1990.

EDGERTON, J. C.; TILLAKARATNE, N. J. T.; BIGBEE, A. J., *et al.* Plasticity of the spinal circuitry after injury. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.27, p. 145-67, 2004.

ELIAS, A. N.; IYER, K.; PANDIAN, M. R., *et al.* Beta-endorphin/beta-lipotropin release and gonadotropin secretion after acute exercise in normal males. **J. Appl. Physiol.**, p. 2045–2049, 1986.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJÖRK-ERIKSSON, T., *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat. Med.**, v. 4, p. 1313-1317, 1998.

FABEL, K.; FABEL, K.; TAM, B., *et al.* VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. **Eur. J. Neurosci**, v. 18, p. 2803-12, 2003.

FARMER, J.; ZHAO, X.; VAN PRAAG, H., *et al.* Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. **Neuroscience**, p. 71-9, 2004.

FARMER, M. E.; LOCKE B. Z.; MOSCICKI E. K., *et al.* Physical activity and depressive and depressive symptoms: the NHANES I epidemiologic follow-up study. **Am. J. Epidemiol**, v. 128, p. 1340-51, 1988.

FEUERSTEIN, G.; SIREN, A. L. The opioid peptides. A role in hypertension? **Hypertension**, v. 9, p. 561-5, 1987.

FILLIOL, D.; GHOZLAND, S.; CHLUBA, J., *et al.* Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. **Nat. Genet.**, p.195-200, 2000.

FOLKINS, C. H.; SIME, W. E. Physical fitness training and mental health. **Am. Psychol.**, p.373-389, 1981.

FONTANA, F.; BERNARDI, P.; MERLO-PICH, E., *et al.* Endogenous opioid system and atrial natriuretic factor in normotensive offspring of hypertensive parents at rest and during exercise test. **J. Hypertens.**, p.1285-90, 1994.

FORDYCE, D. E.; WEHNER, J. M. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Brain Res.**, v. 13, p. 111-9, 1993.

FREUND, T.F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**, v. 6, p. 347-470, 1996.

FUJISE, N.; LIU, N.Y.; HORI, N., *et al.* Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus : II Mossy cells, with special reference to their dorsoventral difference in calretinin immunoreactivity. **Neuroscience**, v. 82, p. 181-200, 1998.

GALL, C.; BRECHA, N.; KARTEN, H.J., *et al.* Localization of enkephalin-like immunoreactivity to identified axonal and neuronal populations of the rat hippocampus. **J. Comp. Neurol.**, v.198, p.335-50, 1981.

GARZON, J.; SCHULZ, R; HERZ, A. Application of receptor theory provides further evidence for the existence of the epsilon-opioid receptor in rat vas deferens. **Neuropeptides**, p.101-4, 1984.

GELLER, E. B.; ROWAN, C. H.; ADLER, M. W. Body temperature effects of opioids in rats: intracerebroventricular administration. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 1761-5, 1986.

GENTILI, A.M.; BEHESHTI, Z.; HELD, J.M. Enrichment versus exercise effects on motor impairments following cortical removals in rats. **Behav. Neural. Biol.**, v. 47, p. 321-32, 1987.

GERRITS, M. A. F. M.; LESSCHER, H. B. M.; REE, J. M. Drug dependence and the endogenous opioid system. **European Neuropsychopharmacology**, p.424-434, 2003.

GESTREAU, C.; LE GUEN, S.; BESSON, J. M. Is There Tonic Activity in the Endogenous Opioid Systems? **The Journal of Comparative Neurology**, p.285-301, 2000.

GILBERT, P.E.; MARTIN, W. R. Sigma effects of nalorphine in the chronic spinal dog. **Drug Alcohol Depend.**, p. 373-376, 1976.

GIUGLIANO, D.; TORELLA, R.; LEFEBVRE, P. J., *et al.* Opioid peptides and metabolic regulation. **Diabetologia**, v. 31, p.3-15, 1988.

GLENISTER, D. Exercise and mental health: a review. **J. R. Soc. Health**, p. 7-13, 1996.

GOLDFARB, A.; HATFIELD, B.; SFORZO, G. A., *et al.* Serum beta-endorphin levels during a graded exercise test to exhaustion. **Med. Sci. Sports Exerc.**, p. 78-82, 1987.

GOLDFARB, A. H.; HATFIELD, B. D.; ARMSTRONG, D., *et al.* Plasma beta-endorphin concentration: response to intensity and duration of exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, p. 241–244, 1990.

GOLDSTEIN, A. Binding selectivity profiles for ligands of multiple receptor types: focus on opioid receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, p. 456-459, 1987.

GOLDSTEIN, A.; NAIDU, A. Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. **Mol. Pharmacol.**, v.36, p.265-272, 1989.

GOMES-PINILLA, F.; YING, Z.; ROY, R. R., *et al.* Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J. Neurophysiol.**, v.88, p.2187-95, 2002.

GOODMAN, R. R.; SNYDER, S. H.; KUCHAR, M. J., *et al.* Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 6239-643, 1980.

GREVEL, J.; YU V.; SADEE, W. Characterization of a labile naloxone binding site (lambda site) in rat brain. **J. Neurochem.**, p.1647-56, 1985.

GRIEST, J. H.; KLEIN M. H.; EISCHEMS R. R., *et al.* Running as treatment for depression. **Comp. Psych.**, p. 41-54, 1979.

GROSSMAN, A.; SUTTON, J. R. Endorphins: What are they? How are they measured? What is their role in exercise? **American College of Sports Medicine**, p.74-80, 1985.

GUYTON, A. C. **Neurociência Básica: Anatomia e Fisiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

HAUACHE, O. M. Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, p. 577-84, 2001.

HEITKAMP, H. C.; SCHULZ H.; ROCKER K., *et al.* Endurance Training in Females: Changes in B-Endorphin and ACTH. **J. Sports Med.**, v.19, p.260-264, 1998.

HENDERSON, R.; BALDWIN, A.; CESKA, T. A. *et al.* Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryomicroscopy. **J. Mol. Bio.**, v. 213, p.899-929, 1990.

HENRIKSEN, G.; WILLOCH, F. Imaging of opioid receptors in the central nervous system. **Brain.**, v. 131, p. 1171-1196, 2008 .

HERHOLZ, K.; BUSKIES W.; RIST M., *et al.* Regional cerebral blood flow in man at rest and during exercise. **J. Neurol.**, p. 9, 1987.

HOLLMANN, W.; STRUDER, H. K. Brain function, mind, mood, nutrition, and physical exercise. **Nutrition**, v. 16, p. 516-9, 2000.

HOLMES, M. M.; GALEA, L. A. Defensive behavior and hippocampal cell proliferation: differential modulation by naltrexone during stress. **Behav. Neurosci.**, v. 116, p. 160-168, 2002.

HOLSCHNEIDER, D. P.; YANG, J.; GUO, Y., *et al.* Reorganization of functional brain maps after exercise training: Importance of cerebellar-thalamic-cortical pathway. **Brain Res.**, v. 1184, p. 96-107, 2007.

HOUGHTEN, R. A.; PRATT S. M.; YOUNG E. A., *et al.* Effect of chronic exercise on beta-endorphin receptor levels in rats. **NIDA Res. Monogr.**, v. 75, p. 505-8, 1986.

HOWLETT, T. A.; TOMLIN, S.; NGAHFOONG, L., *et al.* Release of beta endorphin and met-enkephalin during exercise in normal women: response to training. **Br. Med. J. (Clin Res Ed)**, v. 288, p.1950-2, 1984.

HUGHES J.; KOSTERLITZ H. W. Opioid Peptides: introduction. **Br. Med. Bull.**, p.1-3, 1983.

HURD, Y. L.; HERKENHAM, M. Molecular alterations in the neostriatum of human cocaine addicts. **Synapse**, p. 357-69, 1993.

INOSOTROZA, J.; TESCHEMACHER H. J., MUELLER-ECKHARDT, C. Opioid peptides and the immune system. **Immunologia**, v. 6, p. 17-24, 1987.

INTROINI-COLLISON, .IB.; FORD, L.; McGAUGH, J.L. Memory impairment induced by intraamygdala beta-endorphin is mediated by noradrenergic influences. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 63, p.200-205, 1995.

ISHIDE, T.; PREUSS, C. V.; MAHER, T. J., *et al.* Neurochemistry within ventrolateral medulla and cardiovascular effects during static exercise following eNOS antagonism. **Neurosci. Res.**, v. 52, p. 21-30, 2005.

JANAL, M. N.; COLT, E. W.; CLARK, W. C., *et al.* Pain sensitivity, mood and plasma endocrine levels in man following long-distance running: effects of naloxone. **Pain**, v.19, p.13-25, 1984.

JÄRVĖKULG A.; VIRU A. Opioid receptor blockade eliminates mood effects of aerobic gymnastics. **Int. J. Sports Med.**, v. 23, p. 155-7, 2002.

JONSDOTTIR, I. H. Neuropeptides and their interaction with exercise and immune function. **Immunology and Cell Biology**, p. 562-570, 2000.

KAJEKAR, R.; CHEN, C.Y.; MUTOH, T., *et al.* GABA (A) receptor activation at medullary sympathetic neurons contributes to postexercise hypotension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 282, p. 615-24, 2002.

KANAREK, R. B.; GERSTEIN, A. V.; WILDMAN, R. P., *et al.* Chronic running-wheel activity decreases sensitivity to morphine-induced analgesia in male and female rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, p. 19–27, 1998.

KANDEL, E. R.; SCHUARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 2003.

KAPPANBLUM, H.I.; HURLBULT, D.E.; LESLIE, F.M. Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain. **Brain Res.**, v. 465, p.21-41, 1987.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

KEMPERMANN, G.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F. H. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. **Prog. Brain Res.**, p.35-48, 2000.

KIM, S. H.; KIM, H. B.; JANG, M. H., *et al.* Treadmill exercise increases cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. **Life Sci.**, p. 1331-40, 2002.

KIM, Y. P.; KIM, H.; SHIN, M. S., *et al.* Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. **Neuroc. Let.**, v. 355, p. 152-154, 2004.

KOEHL, M.; MEERLO, P.; GONZALES, D., *et al.* Exercise-induced promotion of hippocampal cell proliferation requires beta-endorphin. **FASEB J.**, v. 22, p. 2253-62, 2008.

KOHL, Z.; KANDASAMY, M.; WINNER, B. *et al.* Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Brain Res.**, v. 1155, p. 24-33, 2007.

KRAEMER, W. J.; FLECK, S. J.; CALLISTER, R., *et al.* Training responses of plasma beta-endorphin, adrenocorticotropin, and cortisol. **Med. Sci. Sports Exerc.**, p. 146–153, 1989.

KRAMER, J. M.; PLOWEY, E. D.; BEATTY, J. A., *et al.* Hypothalamus, hypertension, and exercise. **Brain Res. Bull.**, v. 53, p. 77-85, 2000.

KRONENBERG, G.; BICK-SANDER, A.; BUNK, E., *et al.* Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. **Neurobiol. Aging.**, v. 27, p. 1505-13, 2006.

KUJALA, U. M.; KAPRIO J.; SARNA S., *et al.* Relationship of leisure-time physical activity and mortality: the Finnish twin cohort. **JAMA**, p. 440-4, 1998.

LANGENFELD, M. E.; HART, L. S.; KAO, P. C. Plasma beta-endorphin responses to one-hour bicycling and running at 60% VO₂max. **Med. Sci. Sports Exerc.**, p. 83–86, 1987.

LAURIN, D.; VERREAULT, R.; LINDSAY, J., *et al.* Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch. Neurol.**, p. 498-504, 2001.

LAW, P. Y.; LOH, H. H. Regulation of Opioid Receptor Activities. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, p. 607-624, 1999.

LAW, P. Y.; WONG, Y. H.; LOH, H. H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p.389-430, 2000.

LEE M. H.; KIM H.; LIM B.V., *et al.* Naloxone potentiates treadmill running-induced increase in c-Fos expression in rat hippocampus. **Life Sciences**, p. 3139-3147, 2003.

LEITE, J.P.; CAVALHEIRO, E.A. Neurobiologia da esclerose medial temporal. In Costa J.C., Palmini, A.; Yacubian, E.M.T.; Cavalheiro, E.A. **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos**. São Paulo: Lemos, p. 129-136, 1998.

LISTE, I.; GUERRA, M. J.; CARUNCHO, H. J., *et al.* Treadmill running induces striatal Fos expression via NMDA glutamate and dopamine receptors. **Exp. Brain Res.**, v.115, p.458-68, 1997.

LORD, J. A.; WATERFIELD, A. A.; HUGHES, J., *et al.* Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors. **Nature**, v. 267, p. 495-499, 1977.

LUPINACCI, N. S.; RIKLI, R. E.; JONES, C. J., *et al.* Age and physical activity effects on reaction time and digit symbol substitution performane in cognitively active adults. **Res. Quart. Exercise Sport.**, v. 64, p. 144-150, 1993.

MADANBLA, M.; KELLAWAY, L.; ST CLAIR, G. A., *et al.* Voluntary running provides neuroprotection in rats after 6-hydroxydopamine injection into the medial forebrain bundle. **Metab. Brain. Dis.**, v.19, p. 43-50, 2004.

MADISON D.V.; NICOLL R.A. Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus. **J. Physiol.**, p. 123-30, 1988.

MALBERG, J. E.; EISCH. A. J.; NESTLER, E. J., *et al.* Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 9104-10, 2000.

MANSOUR, A.; FOX, C. A.; AKIL, H., *et al.* Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. **Trends Neurosci.**, p.22-29, 1995.

MANSOUR, A.; KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M. E., *et al.* Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. **J. Neurosci.**, v. 7, p. 2445-64, 1987.

MANSOUR, A.; WATSON, S. J. **Anatomical distribution of opioid receptors in mammals: an overview.** In: Opioids I. A Herz. Springer-Verlag, p. 79-105, 1993.

MARIN R.; WILLIAMS, A.; HALE, S., *et al.* The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. **Physiol. Behav.**, v.80, p.167-75, 2003.

MARTINEZ, J. L. JR; WEINBERGER, S. B.; SCHULTEIS, G. Enkephalins and learning and memory: a review of evidence for a site of action outside the blood-brain barrier. **Behav. Neural. Biol. Review.**, v. 49, p. 192-221, 1988.

MARTINSEN, E. W.; MEDHUS, A.; SANDVIK, L. Effects of aerobic exercise on depression: a controlled study. **Br. Med. J.**, p. 109, 1985.

MATHES, W. F.; KANAREK, R. B. Wheel running attenuates the antinociceptive properties of morphine and its metabolite, morphine-6-glucuronide, in rats. **Physiol. Behav.**, p. 245–251, 2001.

MCDANIEL, K. L.; MUNDY, W. R.; TILSON, H. A. Microinjection of dynorphin into the hippocampus impairs spatial learning in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.35, p. 429-35, 1990.

MCGINTY, J.F.; HENRIKSEN, S.J.; GOLDSTEIN, A.; *et al.* Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.80, p.589-593, 1983.

MCLEAN, S.; ROTHMAN, R. B.; JACOBSON, A. E., *et al.* Distribution of Opiate Receptor Subtypes and Enkephalin and Dynorphin Immunoreactivity in the Hippocampus of Squirrel, Guinea Pig, Rat, and Hamster. **The Journal of Comparative Neurology**, p. 497-510, 1987.

MELLION, M. B. Exercise therapy for anxiety and depression. **Postgrad. Med.**, p. 59-66, 1985.

MELLION, M. B. The sports medicine content of family practice. **J. Fam. Pract.**, v. 21, p. 477-8, 1985.

METZGER, J. M.; STEIN, E. A. Beta-endorphin and sprint training. **Life Sci.**, p. 1541-7, 1984.

MOLLEREAU, C.; PARMENTIER, M.; MAILLEUX, P., *et al.* ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization., **FEBS Lett.**, v.341, p. 33-38, 1994.

MOLTENI, R.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Differential effects acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur. J. Neurosci.**, v. 16, p. 1107-16, 2002.

MOLTENI, R.; WU, A.; VAYNMAN, S., *et al.* Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v.123, p. 429-40, 2004.

MORGAN, W. P. Affective beneficence of vigorous physical activity. **Medicine and Science of Sports Exercise**, v.17, p. 94-100, 1985.

MOSES, J.; STEPTOE A.; MATHEWS A., *et al.* The effects of exercise training on mental well-being in the normal population: a controlled trial. **J. Psychosom. Res.**, p. 47-61, 1989.

MOSS, I. R.; SCARPELLI E. M. Beta-endorphin central depression of respiration and circulation. **J. Appl. Physiol.**, v. 50, p. 1011-6, 1981.

MOUGIN, C.; HENRIET, M. T.; BAULAY, A., *et al.* Plasma levels of beta-endorphin, prolactin and gonadotropins in male athletes after an international nordic ski race. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, p. 425-429, 1988.

MUELLER, P. J. Exercise training and sympathetic nervous system activity: evidence for physical activity dependent neural plasticity. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, p. 377-84, 2007.

NAULI, S. M.; MAHER, T. J.; PEARCE, W. J., *et al.* Effects of opioid receptor activation on cardiovascular responses and extracellular monoamines within the rostral ventrolateral medulla during static contraction of skeletal muscle. **Neurosci. Res.**, v.41, p. 373-83, 2001.

NEEPER, S. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J., *et al.* Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res.**, v. 8, p. 49-56, 1996.

NICOLL, R. A.; ALGER, B. E.; JAHR, C. E. Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. **Nature**, p.22-5, 1980.

NICOLL, R. A.; SIGGINS G. R.; LING N., *et al.* Neuronal actions of endorphins and enkephalins among brain regions: a comparative microiontophoretic study. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, p. 2584-8, 1977.

NORTH, T. C.; MCCULLAGH, P.; TRAN, Z. V. Effect of exercise on depression. **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, p. 379-415, 1990.

OLSON, G. A.; OLSON, R. D.; KASTIN, A. J. Endogenous opiates. **Peptides**, v. 8, p. 1135-64, 1987.

OSEI-TUTU, K. E. K.; CAMPAGNA, P. D. Psychological benefits of continuous vs. intermittent moderate-intensity exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, p. S117, 1998.

PAFFENBARGER, R. S. JR; HYDE R. T.; HSIEH C. C., *et al.* Physical activity, other life-style patterns, cardiovascular disease and longevity. **Acta Med. Scand. Suppl.**, p. 85-91, 1986.

PALUSKA, S. A.; SCHWENK, T. L. Physical Activity and Mental Health. **Sports Med.**, p. 167-180, 2000.

PASTERNAK, G. W.; GINTZLER A. R.; HOUGHTEN R. A., *et al.* Biochemical and pharmacological evidence for opioid receptor multiplicity in the central nervous system. **Life Sci.**, v. 33, p. 167-73, 1983.

PASTERNAK, G. W.; STANDIFER, K. M. Mapping of opioid receptors using antisense oligodeoxynucleotides: correlating their molecular biology and pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.16, p.344-350, 1995.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain: In stereotaxic coordinates.** 4^a ed. Academic Press, 1998.

PERSSON, A. L.; NAYLOR, A. S.; JONSDOTTIR, I. H., *et al.* Differential regulation of hippocampal progenitor proliferation by opioid receptor antagonists in running and non-running spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. Neurosci.**, v.19, p.1847-1855, 2004.

PERSSON, A. I.; THORLIN, T.; BULL, C. *et al.* Mu and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, p. 1159-1172, 2003.

PERSSON, A. I.; THORLIN, T.; BULL, C., *et al.* Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. **Mol. Cell. Neurosci.**, v.23, p. 360-372, 2003.

PERT, C. B.; SNYDER, S. H. Properties of opiate-receptor binding in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.70, p. 2243-2247, 1973.

PERT, C. N.; BOWIE, D. L. **Behavioural manipulation in rats causes alterations in opiate receptor occupancy.** In: Usdin E., Bunney W. E., Kline N. S., Endorphins in mental health. New York: OUP, p. 93-104, 1979.

PETRUZZELLO, S. J.; LANDERS D. M.; HATFIELD B. D., *et al.* A meta-analysis on the anxiety-reducing effects of acute and chronic exercise. Outcomes and mechanisms. **Sports Med.**, p. 143-182, 1991.

PORTOGUESE, P. S. A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. **J. Med. Chem.**, v. 8, p. 609-616, 1965.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício.** São Paulo: Manole, 2000.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, p. 79-91, 2001.

RAHKILA, P.; HAKALA, E.; ALLEN, M., *et al.* Beta-endorphin and corticotropin release is dependent on a threshold intensity of running exercise in male endurance athletes. **Life Sci.**, p. 551-558, 1988.

RANSFORD, C. P. A role for amines in the antidepressant effect of exercise: a review. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.14, p.1-10, 1982.

RAYNOR, K.; MURPHY, W. A.; COY, D. H., *et al.* Cloned somatostatin receptors: identification of subtype-selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides. **Mol. Pharmacol.**, v.43, p.838-44, 1993.

REISINE, T.; PASTERNAK, G. **Opioid analgesics and antagonist.** In: The Pharmacological basis of therapeutic. 9^o ed. Mc Graw Hill, 1996.

SANDIN, J.; NYLANDER, I.; GEORGIEVA, J., *et al.* Hippocampal dynorphin B injections impair spatial learning in rats: a kappa-opioid receptor-mediated effect. **Neuroscience**, v. 85, p.375-382, 1998.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C., *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, p. 805-9., 2003.

SCHULZ, R; WUSTER M.; RUBINI P., *et al.* Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum: their differentiation by means of selective tolerance development. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, p. 547-50, 1981.

SFORZO, G. A. Opioids and Exercise. **Sports Medicine**, v. 7, p. 109-124, 1988.

SFORZO, G. A.; SEEGER, T. F.; PERT, C. B., *et al.* In vivo opioid receptor occupation in the rat brain following exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, p. 380-4, 1986.

SGHERZA, A. L.; AXEN, K.; FAIN, R., *et al.* Effect of naloxone on perceived and exercise capacity during maximal cycle ergometry. **J. Appl. Physiol.**, v. 93, p. 2023-8, 2002.

SHIPPENBERG, T. S.; ZAPATA, A.; CHEFER, V.I. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. **Pharmacol. Ther.**, p. 306-21, 2007.

SHIRAYAMA, Y.; ISHIDA, H.; IWATA, M., *et al.* Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. **J. Neurochem.**, p.1258-68, 2004.

SIGGINS, G.R.; HENRIKSEN, S.J.; CHAVKIN, C., *et al.* Opioid peptides and epileptogenesis in the limbic system: cellular mechanisms. **Adv. Neurol.**, v. 44, p. 501-512, 1986.

SIMON, E. J. In search of the opiate receptor. **Am. J. Med. Sci.**, v. 266, p.160-168, 1973.

SIMMONS, M. L.; CHAVKIN, C. Endogenous opioid regulation of hippocampal function. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 39, p.145-196, 1996.

SIMONATO, M.; ROMUALDI, P. Dynorphin and epilepsy. **Prog. Neurobiol.**, 1996, v. 50, p. 557-83. Review. Erratum in: *Prog Neurobiol*, v.51, p. 223-4, 1997.

SMITH, M. A.; MCCLEAN, J. M.; BRYANT, P. A. Sensitivity to the effects of a kappa opioid in rats with free access to exercise wheels: differential effects across behavioral measures. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.77, p. 49-57, 2004.

SMITH, M. A.; YANCEY, D. L. Sensitivity to the effects of opioids in rats with free access to exercise wheels: u-opioid tolerance and physical dependence. **Psychopharmacology**, p. 426-434, 2003.

SONENREICH, C.; KERR-CORRÊA, F.; ESTEVÃO, G. **Doenças Afetivas**. São Paulo: Manole, 1991.

SONSTROEM, R. J.; MORGAN, W. P. Exercise and self-esteem: rationale and model. **Med. Sci. Sports Exerc.** Review., v. 21, p. 329-37, 1989.

SPIEGEL, A. M. Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v. 81, p. 2434-42, 1996.

STERNINI, C. Receptors and Transmission in the Brain-Gut Axis: Potential for Novel Therapies. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, p. G8-G15, 2001.

STRUDER, H. K.; HOLLMANN W.; PLATEN P., *et al.* Alterations in plasma free tryptophan and large neutral amino acids do not affect perceived exertion and prolactin during 90 min of treadmill exercise. **Int. J. Sports Med.**, p. 73, 1996.

SUMIC, A.; MICHAEL, Y. L.; CARLSON, N. E., *et al.* Physical activity and the risk of dementia in oldest old. **J. Aging Health.**, v.19, p.242-59, 2007.

SUTULA, T.; HE, X.X.; CAVAZOS, J., *et al.* Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. **Science**, v. 239, p. 1147-1150, 1998.

THORÉN, P.; FLORAS, J. S; HOFFMANN P., *et al.* Endorphins and exercise: physiological mechanisms and clinical implications. **American College of Sports Medicine.**, p. 417-428, 1990.

TILLERSON, J .L.; CAUDLE, W. M.; REVERÓN, M. E., *et al.* Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v.119, p. 899-911, 2003.

TREJO, J. L.; CARRO, E.; TORRES-ALEMAN, I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. **J. Neurosci.**, p. 1628-34, 2001.

VAN GROEN, T.; MIETTINEN, P.; KADISH, I. The entorhinal cortex of the Mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 13, p. 133-49, 2003.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat. Neurosci.**, p. 266-70, 1999.

VAN REE, J. M.; GERRITS, M. A.; VANDERSCHUREN, L. J. Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, p. 341-396, 1999.

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. **Neuroscience**, p. 647-657, 2003.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Eur. J. Neurosci.**, v. 20, p. 2580-90, 2004.

VISSING, J.; ANDERSEN, M.; DIEMER, N. H. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 16, p. 729-36, 1996.

WAGNER, R.; DeLEO, J. A.; COOMBS, D. W., *et al.* Spinal dynorphin immunoreactivity increases bilaterally in a neuropathic pain model. **Brain Res.**, v. 629, p. 323-326, 1993.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid Receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 953-990, 2004.

WAN, R. Q.; GIVENS, B. S.; OLTON, D. S. Opioid modulation of working memory: intraseptal, but not intraamygdaloid, infusions of beta-endorphin impair performance in spatial alternation. **Neurobiol. Learn Mem.**, v.63, p.74-86, 1995.

WARDLAW, S. L.; FRANTZ, A. Effects of swimming stress on brain beta-endorphin and ACTH. **Clinical Research**, v. 28, p.482A, 1980.

WERME, M; THOREN, P.; OLSON, L., *et al.* Running and cocaine both upregulate dynorphin mRNA in medial caudate putamen. **European Journal of Neuroscience.**, p. 2967-2974, 2000.

WIESNER, J.B.; HENRIKSEN, S.J. Enkephalin enhances responsiveness to perforant path input while decreasing spontaneous activity in the dentate gyrus. **Neurosci. Lett.**, v. 74, p. 95-101, 1987.

WILLIAMS, C. A.; GOPALAN, R.; NICHOLS, P. L., *et al.* Fatiguing isometric contraction of hind-limb muscles results in the release of immunoreactive neurokinins from sites in the rostral medulla in the anesthetized cat. **Neuropeptides.**, v.28, p. 209-18, 1995.

WILLIAMS, J. T.; CHRISTIE, M. J.; MANZONI, O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. **Physiol. Rev.**, v.81, p.299-343, 2001.

YEUNG, R.R. The acute effects of exercise on mood state. **J. Psychosom. Res.**, p. 123-41, 1996.

YING, Z.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R., *et al.* Exercise restore levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. **Exp. Neurol.**, v.193, p. 411-9, 2005.

ZAMIR, N.; QUIRION, R.; SEGAL, M. Ontogeny and regional distribution of proenkephalin- and prodynorphin-derived peptides and opioid receptors in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 15, p. 1025-34, 1985.

ZAGON, I. S.; MCLAUGHLIN, P. J. Opioid antagonist-induced regulation of organ development. **Physiol. Behav.**, v. 34, p. 507-11, 1985.

ZIEGLGANSBERGER, W.; FRENCH, E. D.; SIGGINS, G. R., *et al.* Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneuron's. **Science**, p. 415-417, 1979.

**APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO - ACUTE AND
CHRONIC EXERCISE MODULATE THE EXPRESSION OF
MU RECEPTOR IN THE HIPPOCAMPAL FORMATION OF
RATS**



Acute and chronic exercise modulate the expression of mu receptor in the hippocampal formation of rats

Journal:	<i>Psychopharmacology</i>
Manuscript ID:	Psych-2010-00140
Manuscript Type:	original investigation
Date Submitted by the Author:	05-Mar-2010
Complete List of Authors:	de Oliveira, Monica; . Universidade de Mogi das Cruzes, Nucleo de Pesquisas Tecnológicas Fernandes, Maria José; Universidade Federal de São Paulo, Neurology and Neurosurgery Scorza, Fulvio; Universidade Federal de São Paulo, Neurology and Neurosurgery Persike, Danielle; Universidade Federal de São Paulo, Neurology and Neurosurgery Cysneiros, Roberta; Universidade Presbiteriana Mackenzie, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde de Albuquerque, Marly; . Universidade de Mogi das Cruzes, Nucleo de Pesquisas Tecnológicas de Oliveira, Cleber; Universidade Camilo Castelo Branco Botelho da Ponte, Jaqueline; . Universidade de Mogi das Cruzes, Nucleo de Pesquisas Tecnológicas Cavalheiro, Esper; Universidade Federal de São Paulo, Neurology and Neurosurgery Arida, Ricardo; Universidade Federal de São Paulo, Physiology
Keywords:	EXERCISE, HIPPOCAMPUS, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, NEUROPEPTIDE, RAT, OPIOID RECEPTOR

Acute and chronic exercise modulate the expression of mu receptor in the hippocampal formation of rats

Mônica Sílvia Rodrigues de Oliveira¹, Maria José da Silva Fernandes², Fulvio Alexandre Scorza², Danielle Suzete Persike², Roberta Monterazzo Cysneiros³, Marly de Albuquerque¹, Cleber Alexandre de Oliveira⁴, Jaqueline Botelho da Ponte¹, Esper Abrão Cavalheiro², Ricardo Mario Arida².

1- Universidade de Mogi das Cruzes (NPT/UMC). São Paulo, Brasil.

2-Universidade Federal de São Paulo. /Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). São Paulo, Brasil.

3-Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, Brasil.

4-Universidade Camilo Castelo Branco, São Paulo, Brasil.

Corresponding address:

Ricardo Mario Arida

Departamento de Fisiologia

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Rua Botucatu 862, Ed. Ciências Biomédicas, 5º andar. Vila Clementino

04023-900. São Paulo (SP), Brasil

Tel: 55-11-55764513

Fax: 55-11-55739304

e-mail: arida.nexp@epm.br

Abstract

Exercise stimulates the release of beta endorphin and other endogenous opioid peptides that are believed to be responsible for changes in mood, perception of pain and also performance. Although the vast majority of literature data are in support of the role of physical exercise in increasing beta endorphin levels, indirect measures such as increased endorphin levels in peripheral blood do not reflect the opioid levels in central nervous system. The purpose of the present study was to verify whether acute and chronic exercise using voluntary and forced exercise procedures could modify the expression of mu receptor in the rat hippocampal formation. A higher number of mu-positive cells were observed for acute forced and voluntary exercise groups in the CA1, CA3, hilus and dentate gyrus regions compared to the control group. Immunoblotting analysis showed a significantly enhance of mu expression in hippocampal formation to acute forced and voluntary groups when compared to the control group. Conversely, a significant reduction of mu receptor expression was noted in chronic forced exercise and chronic voluntary exercise compared to acute forced and voluntary groups respectively. Mu receptor expression was not significantly different among voluntary and

forced exercise, both in rats trained acute or chronically. Our findings indicate that acute and chronic exercise modulates mu receptor expression in the hippocampal formation of rats.

Introduction

Physical exercise has been reported to induce several psychophysical effects, such as depression and stress reduction (Rosch 1985), mood elevation (Wildmann *et al.* 1986), and reduced pain perception (Janal *et al.* 1984). Several hypotheses have been raised to these effects including changes in several neurotransmitter systems. One commonly proposed theory, the beta-endorphin hypothesis (Morgan 1985), appoints these effects to changes in central opioidergic transmission. However, the beta-endorphin hypothesis is not well recognized because indirect measures such as increased beta-endorphin levels in peripheral blood (Carr *et al.* 1981; Farrell *et al.* 1982) and cerebrospinal fluid (Hoffmann *et al.* 1990) do not reflect the opioid levels in central nervous system (Rossier *et al.* 1977).

Few studies have examined central opioid activity with exercise. For instance, running has been shown to alter the levels of endogenous opioids in different regions of the rat brain (Boone and Corry 1996; Werme *et al.* 2000). Evidence for the role of opioid system on the effects above is also derived from studies demonstrating that the opioid antagonist naloxone prevents elevations in nociceptive threshold following exercise in normal subjects (Haier *et al.* 1981; Janal *et al.* 1984; Droste *et al.* 1991). Thus, alterations of these receptors after the physical exercise have been poorly explored. Pert and Bowie (1979) demonstrated an increase of opioid receptor for enkephaline in the brain of rats after 15 minutes of race. Sforzo *et al.* (1986) also verified alteration of opioid receptor in rats in a discrete brain area after swimming. Overall, there is a lack of information concerning the time course of opioid receptors expression and their role following physical exercise as well as the type of physical exercise that could exert major influence in opioid receptors expression. Therefore, the purpose of our study was to verify whether aerobic physical exercise could alter the opioid receptor expression in the rat hippocampal formation. In this study mu receptor was analyzed after acute and chronic exercise (aerobic training program) using voluntary and forced exercise.

Material and Methods

Animals

Adult Wistar rats weighing 200-280 g at the moment of the initial physical training protocol were used. They were housed under environmentally controlled conditions (7:00-19:00 hr light/dark cycle; 22-24 °C) and permitted free access to food and water throughout the experiment. The animals were divided randomly into 5 groups. Acute forced exercise (n=5): animals submitted to running exercise in a treadmill during 7 consecutive days. Acute voluntary exercise (n=5): animals submitted to a voluntary wheel running during 7 consecutive days. Chronic forced exercise (n=5): animals submitted to running exercise in a treadmill during 45 consecutive days. Chronic voluntary exercise (n=5): animals submitted to a voluntary wheel running during 45 consecutive days. The last group (n=5) served as control. All experimental protocols were approved by the ethics committee of the Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) and all efforts were made to minimize animal suffering in accordance with the proposals of International Ethical Guideline for Biomedical Research (CIOMS 1985).

Physical exercise procedure

Animals of the exercise group were familiarized with the apparatus for three days by placing them on a treadmill (Columbus instruments) for 10 min/day at a speed of 12 meters/min at 0% degree incline. To provide a measure of trainability, we rated each animal's treadmill performance on a scale of 1 - 5 according to the following anchors [1= refused to run, 2= below average runner (sporadic, stop and go, wrong direction), 3= average runner, 4= above average runner (consistent runner occasionally fell back on the treadmill), 5= good runner (consistently stayed at the front of the treadmill) (Dishman *et al.* 1988). Animals with a mean rating of 3 or higher were included to the exercise groups. This procedure was used to exclude possible different levels of stress between animals. Subsequently they were submitted to an aerobic exercise program of 45 sessions on a treadmill, 5 days per week. The intensity of exercise (60% $\text{VO}_{2\text{max}}$) was determined for each animal according to an established protocol (Arida *et al.* 1999). Each training session started with a 5 min warm-up at 12-15 m/min. Running time and speed gradually increased from 30 min at 18 m/min during the first 3 days to 60 min at 18-22 m/min during the subsequent days. Exercise intensity was similar for all animals. Animals submitted to the voluntary exercise were placed in a voluntary wheel running (Panlab Harvard Apparatus) with free access a food and water.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed to analyze the expression of mu in the hippocampal formation. Animals of exercise and control groups (five from each group) were deeply anesthetized (chloral hydrate, 0.3 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), followed by 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The brains were removed, briefly postfixed in 4% paraformaldehyde in PBS, cut coronally with a cryostat in 40 μ m-thick sections. A sequence of three sections per animal (Bregma, $-1.6/-3.6$ mm; Paxinos and Watson 1998) was selected for immunocytochemistry process. The immunoperoxidase procedure was performed on free-floating sections using antibody against mu (polyclonal, 1:1000, Oncogene, USA). Paired sections of each species were processed in the same vial in order to minimize the differences during the immunohistochemical procedure. The sections were pre-treated with 0,1% H₂O₂ for 30 min to block endogenous peroxidase activity, rinsed in Tris-HCl, preincubated for 90 min in 0.1% normal serum in PBS with 0.1%, and then incubated in primary antibodies at 4 °C overnight. Sections were then rinsed in PBS, incubated in biotinylated anti-rabbit IgG (Vector) at a dilution of 1:500 in PBS (90 min at room temperature), rinsed in PBS, incubated in avidin–biotin peroxidase complex (ABC; Vector) for 90 min, washed several times in PBS, and then incubated in 0.06% diaminobenzidine in 0.001% H₂O₂. Tissue sections were washed in PBS, mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, coverslipped with Entellam (Merck) and analyzed with a microscope NIKON HD, SONY-USA (NIH) under bright-field illumination. Cellular counts were quantified in subfields CA1-CA3 and dentate gyrus of dorsal hippocampus according to previous work (Arida *et al.* 2004; 2007). For each animal, the average number of neuronal cell bodies in a given region was obtained from the bilateral counts in 2-3 sections. Counts of mu-positive cells were performed using the magnification of 200 X and values were expressed as mean $\pm$ S.D. Briefly, images were acquired by software, a digital threshold was applied and the program calculated then the staining value.

Western-blot analysis

For western-blot analysis, rats hippocampi of exercise group and control group (five from each group) were homogenized in lysis buffer Tris-HCl (10 mM, pH 7.6) containing: 0,1 M NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 0.001 M EDTA and protease inhibitor cocktail (Sigma, P-8340, -20° C) containing: 10 μ M PMSF, 1mM sodium metavanadate, 2 nM okadaic acid, 2 g de NaF, 10 mg/ml aprotinin e 20 μ M leupeptin. Samples were sonicated and protein

concentration was determined by Bradford Method (1976). A standard curve was done to determine the linear range of the method. In this line, 20 µg of protein were separated by SDS/polyacrylamide gel electrophoresis (10 X 10 cm; 10% separating gel; 4% stacking gel). The gels were blotted on nitrocellulose sheets (GE Healthcare Bio-Sciences, NJ, U.S.A) in 25mM Tris, 192 mM glycine, 20% (by vol.) methanol, pH 8.3. The blots were incubated at 4°C overnight with a monoclonal anti-mu opioid antibody (1:2000, Abcam). Anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (Vectastain, U.S.A.) was used for visualization with enhanced luminescence (ECL kit, GE) after exposure to X-ray film (Hyperfilm and ECL kitm Healthcare Bio-Sciences). The reprobing of membranes was required for incubation with monoclonal anti-beta-actin immunoglobulins (Sigma-Aldrich, 1:1000). The blots were stripped by incubating with 0.1M NaOH solution for 5 min at room temperature.

The molecular weights of mu receptor and beta-actin (46 kDa, and 42-45 kDa, respectively) were determined by running a prestained protein ladder (Rainbow, Amersham-Pharmacia Biotech). Relative quantification of protein concentrations corresponding to the immunoreactive band was done by densitometric analysis using the image analysis system Densirag (Biocom, France). Protein expression of beta-actin was determined as internal control whose expression is supposed not to change under experimental conditions.

Statistical Analyses

Comparisons of the mean values for protein expression of mu receptors between exercises, as analyzed by Western-blot and immunohistochemistry, were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Mu receptor immunoreactivity for control group was seen in all the layers of the hippocampus and was similar to previously described distributions (Ding *et al.* 1996; Gioannini *et al.* 1993). In trained rats (both voluntary and forced exercise groups) the pattern of mu staining was similar to those observed in control rats. The analysis of mu staining showed a higher number of mu-positive cells in acute forced and voluntary exercise groups in CA1, CA3, hilus and dentate gyrus regions than the control group ($p < 0.001$) (figure 1). However, no significant differences were found in animals from chronic forced and voluntary groups when compared to the control group (figure 1). Although no statistical difference was observed among acute and chronic exercise groups, a tendency of reduction of mu-positive

cells was noted in chronic exercise groups. When mu receptor immunoreactivity was analyzed between voluntary and forced groups, no significant changes were found both in rats trained acute or chronically.

Quantitative immunoblotting analysis showed a significant increase of mu expression in hippocampal formation of rats submitted to acute forced (0.56 ± 0.11 , $p < 0.01$) and voluntary (0.54 ± 0.08 , $p < 0.05$) exercise when compared to the control group (0.39 ± 0.08) (figure 2). No difference in β -actin immunoreactivity was detected between groups ($p > 0.05$). Conversely, a significant reduction of mu receptor expression was noted in chronic forced exercise (0.43 ± 0.02 ; $p < 0.05$) and chronic voluntary exercise (0.29 ± 0.04 ; $p < 0.001$) compared to acute forced and voluntary groups respectively (figure 2). No significant alterations were observed between voluntary and forced groups, both in rats trained acute or chronically.

Discussion

In humans, physical exercise induces psychological benefits such as positive mood changes and decreased levels of anxiety (Bahrke 1979). These effects are mediated by opioid receptors (Järvekülg and Viru 2002), suggesting a relationship between exercise-induced effects on the brain and the endogenous opioid system. Nevertheless, there is no consistent information concerning the time course of opioid receptors expression following exercise. To this end, the consequences of acute and chronic exercise as well as the type of physical exercise that could exert major influence in opioid receptors expression were assessed. Our results demonstrated that both types of exercise induced significant short term changes in the opioid receptor density.

A small number of reports demonstrated an increase of opioid receptor expression in the brain after short periods of running (Bowie 1979) or swimming (Sforzo *et al.* 1986). We reported by immunohistochemical and immunoblotting approach that few sessions of exercise (acute exercise) were able to increase mu receptor expression in hippocampal formation and this effect was reverted by long term exercise (chronic exercise). Our findings are consistent with previous work which demonstrated that chronic exercise leads to the development of mu opioid tolerance and physical dependence (Smith and Yancey 2003). In this reasoning, other researches reported that higher doses of morphine produce greater reductions in the number and sensitivity of opioid receptors (Baumhaker *et al.* 1994; Belcheva *et al.* 1993).

Some researchers have hypothesized that if physical exercise is applied for extended periods of time, sensitivity to the effects of exogenously administered opioids is reduced (Kanarek *et al.* 1998; Mathes and Kanarek 2001). Kanarek group demonstrated that voluntary exercise in a wheel running decreased sensitivity to the antinociceptive effects of morphine (Kanarek *et al.* 1998; Mathes and Kanarek 2001), an effect supposed to reflect a compensatory down-regulation of opioid receptors during exercise. Differences in opioid receptor density in exercising and sedentary rats (Houghten *et al.* 1986) also suggest that exercise produces effects that are similar to those produced by chronic opioid administration. Considering that higher maintenance doses of morphine and other mu opioids produce greater reductions in the number and sensitivity of opioid receptors (Baumhaker *et al.* 1994; Belcheva *et al.* 1993), correspondingly, higher levels of exercise may produce greater compensatory responses within the opioid receptor system.

According to data from the literature, stress is a potent inducer of beta-endorphin release. During the stress reaction, corticotropin-releasing hormone cleaves pro-opiomelanocortin to release ACTH which consequently mobilizes glucocorticoids, and beta-endorphin (Przewlocki and Przewlocka 2001). Previous studies have shown that the intensity of aerobic exercise is correlated with beta-endorphin release (Mougin *et al.* 1988; Goldfarb *et al.* 1990). Strategies have been used in our study to minimize the stress of treadmill running as described above in methodology. The voluntary (wheel running) and forced (treadmill) exercise were chosen to verify whether different protocols of physical effort could influence hippocampal opioid receptor expression and to avoid the potential confound of stress inherent in forced exercise procedures. No significant alterations were observed between voluntary and forced groups in rats trained acute or chronically, suggesting that both types of exercise can modulate mu receptor expression in the hippocampal formation.

An important point concerns to whether changes in peripheral measures reflect the opioid levels in central nervous system. In this reasoning, numerous studies have reported that plasma concentration of circulating beta-endorphin increases several fold in response to exercise of sufficient intensity and duration (Colt *et al.* 1981; De Meirleir *et al.* 1986; Goldfarb *et al.* 1987; Rahkila *et al.* 1988). For instance, Kraemer *et al.* (1989b) demonstrated that low workloads did not induce rise in beta-endorphin level despite long exposure time. They also stated that beta-endorphins concentrations increase in response to prolonged exercise if the intensity is >50% of VO₂ max and during maximal exercise if this is performed for a minimum of 3 min. While the majority of literature data are in support of the

role of physical exercise in increasing beta-endorphin levels, controversial evidence has also been reported. One study showed no increase in beta-endorphin level after exercise (bicycle ergometer and treadmill) testing at 60% VO₂ max (Langenfeld *et al.* 1987) or after 20 or 60 min in another study (Elias *et al.* 1986). Although increased blood endorphin level is observed in most forms of exercise, it is not well clarified whether this increase reflect the opioid levels in central nervous system. In this regard, our work demonstrated that exercise at moderate intensity alter brain mu receptor expression. We could suppose that the well being and other psychological effect observed after short term exercise at moderate intensity could be attributed to modulation of central opioid system.

Concluding, there is no doubt that exercise induces psychological benefits such as positive mood changes and decreased levels of anxiety (Bahrke 1979; Hawkes 1992; Bender *et al.* 2007), but whether this is entirely endorphin-related is uncertain. Our preliminary findings suggest that acute and chronic exercise modulates mu receptor expression in the hippocampal formation of rats. The identification of other opioid receptors will be a future step toward a more accurate understanding of the relationship between physical exercise and opioid system.

References

- Arida RM, Scorza CA, da Silva AV et al (2004) Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett* 364:135-8
- Arida RM, Scorza CA, Scorza FA et al (2007) Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:814-22
- Arida RM, Scorza FA, Santos NF et al (1999) Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 37: 45-52
- Bahrke MS (1979) Exercise, meditation and anxiety reduction: a review. *Am Correct Ther J* 33:41-44
- Baumhaker Y, Ben-Dor T, Bar-Hamburger R et al (1994) Characterization of a triple opioid system in the human neuroblastoma NMB cell line. *Brain Res* 665:94-100
- Belcheva MM, Barg J, McHale RJ et al (1993) Differential down- and up-regulation of rat brain opioid receptor types and subtypes by buprenorphine. *Mol Pharmacol* 44:173-179
- Bender T, Nagy G, Barna I et al (2007) The effect of physical therapy on beta-endorphin levels. *Eur J Appl Physiol* 100:371-82

Boone, JB, Corry, JM (1996) Proenkephalin gene expression in the brainstem regulates post-exercise hypotension. *Brain Res Mol Brain Res* 42: 31–38

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–54

Carr DB, Bullen BA, Skrinar GS et al (1981) Physical conditioning facilitates the exercise-induced secretion of beta-endorphin and beta-lipotropin in women. *N Engl J Med* 305:560–563

Colt E, Wardlaw S, Frantz A (1981) The effect of running on plasma beta-endorphin. *Life Sci* 28:1637–1640

De Meirleir, K, Naaktgeboren N, Van Steirteghem A (1986) Beta-endorphin and ACTH levels in peripheral blood during and after aerobic and anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 55:5–8

Ding YQ, Kaneko T, Nomura S et al (1996) Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 367: 375–402

Dishman RK, Armstrong RB, Delp, MD et al (1988) Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. *Physiol Behav* 43: 541–546

Droste C, Greenlee MW, Schreck M et al (1991) Experimental pain thresholds and plasma beta-endorphin levels during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 23:334–342

Elias AN, Iyer K, Pandian MR et al (1986) Beta-endorphin/beta-lipotropin release and gonadotropin secretion after acute exercise in normal males. *J Appl Physiol* 61:2045–2049

Farrell PA, Gates WK, Maksud MG, et al (1982) Increases in plasma beta-endorphin/beta-lipotropin immunoreactivity after treadmill running in humans. *J Appl Physiol* 52:1245–1249

Gioannini TL, Yao YH, Hiller, JM et al (1993) Antisera against peptides derived from a purified mu-opioid binding protein recognize the protein as well as mu-opioid receptors in brain regions and a cell line. *Mol Pharmacol* 44: 796–801

Goldfarb A, Hatfield B, Sforzo GA et al (1987) Serum beta-endorphin levels during a graded exercise test to exhaustion. *Med Sci Sports Exerc* 19:78–82

Goldfarb AH, Hatfield BD, Armstrong D et al (1990) Plasma beta-endorphin concentration: response to intensity and duration of exercise. *Med Sci Sports Exerc* 22:241–244

Haier RJ, Quaid K, Mills JC (1981) Naloxone alters pain perception after jogging. *Psychiatry Res* 5:231–232

Hawkes CH (1992) Endorphins: the basis of pleasure? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:247–50

- Hoffmann P, Terenius L, Thoren P (1990) Cerebrospinal fluid immunoreactive beta-endorphin concentration is increased by voluntary exercise in the spontaneously hypertensive rat. *Regul Pept.* 28:233-239
- Houghten RA, Pratt SM, Young EA et al (1986) Effect of chronic exercise on beta-endorphin receptor levels in rats. *NIDA Res Monogr* 75:505-508
- Janal MN, Colt EW, Clark WC et al (1984) Pain sensitivity, mood and plasma endocrine levels in man following long-distance running: effects of naloxone. *Pain* 19:13-25
- Järvekülg A, Viru A (2002) Opioid receptor blockade eliminates mood effects of aerobic gymnastics. *Int J Sports Med* 23:155-7
- Kanarek RB, Gerstein AV, Wildman RP et al (1998) Chronic running-wheel activity decreases sensitivity to morphine-induced analgesia in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 61:19-27
- Kraemer WJ, Fleck SJ, Callister R et al (1989) Training responses of plasma beta-endorphin, adrenocorticotropin, and cortisol. *Med Sci Sports Exerc* 21:146-153
- Langenfeld ME, Hart LS, Kao PC (1987) Plasma beta-endorphin responses to one-hour bicycling and running at 60% VO₂max. *Med Sci Sports Exerc* 19:83-86
- Mathes WF, Kanarek RB (2001) Wheel running attenuates the antinociceptive properties of morphine and its metabolite, morphine-6-glucuronide, in rats. *Physiol Behav* 74:245-251
- Morgan WP (1985) Affective beneficence of vigorous physical activity. *Med Sci Sports Exerc* 17:94-100
- Mougin C, Henriët MT, Baulay A et al (1988) Plasma levels of beta-endorphin, prolactin and gonadotropins in male athletes after an international nordic ski race. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57:425-429
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press Spiral Bound, New York
- Pert CN, Bowie DL (1979) Behavioural manipulation in rats causes alterations in opiate receptor occupancy. In: Usdin E, Bunney WE, Kline NS *Endorphins in mental health*. OUP, New York, pp 93-104
- Przewlocki R, Przewlocka B (2001) Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 429:79-91
- Rahkila P, Hakala E, Alen M et al (1988) Beta-endorphin and corticotropin release is dependent on a threshold intensity of running exercise in male endurance athletes. *Life Sci* 43:551-558
- Rosch PJ (1985) Exercise and stress reduction. *Compr Ther* 11:10-15

Rossier J, French ED, Rivier C et al (1977) Foot-shock induced stress increases beta-endorphin levels in blood but not brain. *Nature* 270:618-620

Sforzo GA, Seeger TF, Pert CB et al (1986) In vivo opioid receptor occupation in the rat brain following exercise. *Med Sci Sports Exerc* 18:380-384

Smith MA, Yancey DL (2003) Sensitivity to the effects of opioids in rats with free access to exercise wheels: u-opioid tolerance and physical dependence. *Psychopharmacology* 168:426-434

Werme M, Thorén P, Olson L et al (2000) Running and cocaine both upregulate dynorphin mRNA in medial caudate putamen. *Eur J Neurosci* 12: 2967-2974

Wildmann J, Kruger A, Schmöle M et al (1986) Increase of circulating beta-endorphin-like immunoreactivity correlates with the change in feeling of pleasantness after running. *LifeSci* 38:997-1003

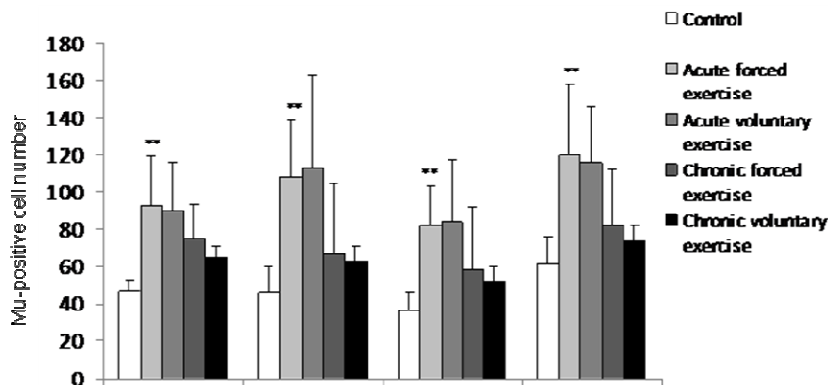


Figure 1. mu-positive cell number in the CA1, CA3, hilus and dentate gyrus (DG) from control and exercise groups (wheel running and treadmill). Significantly more mu cells were labeled in all regions of acute forced and voluntary groups as compared to the control group. *** $p < 0.001$. No significant differences were found in animals from chronic forced and voluntary groups when compared to the control group. One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's method. Values are expressed as mean $\pm$ SD.

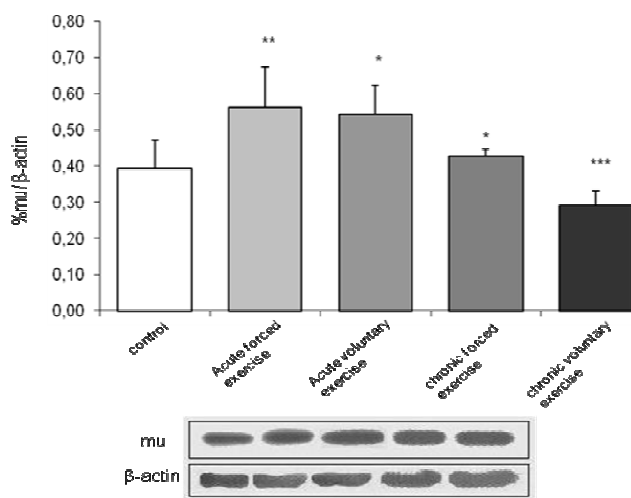


Figure 2. Immunoblot study of mu receptor in the hippocampal formation of rats from control and exercise groups. A significant increase of mu receptor expression was detected in rats submitted to acute forced (** $p < 0.01$) and voluntary exercise (* $p < 0.05$) when compared to the control group. Significant reduction of mu receptor expression was noted in chronic forced exercise (* $p < 0.05$) and chronic voluntary exercise (*** $p < 0.001$) compared to acute forced and voluntary groups respectively.

**ANEXO A - COMISSÃO DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E
EXPERIMENTAÇÃO DE ANIMAIS / CEMEA - UMC**

**COMISSÃO DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CEMEA/UMC**

À Acadêmica
MÔNICA SÍLVIA RODRIGUES DE OLIVEIRA

PARECER

O trabalho intitulado: "MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES NO CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO" de autoria da mestranda MÔNICA SÍLVIA RODRIGUES DE OLIVEIRA, sob orientação do Prof. Dr. RICARDO MÁRIO ARIDA, foi considerado APROVADO por esta comissão. Consideramos a seleção, alojamento, manipulação e número de sujeitos experimentais adequados aos princípios bioéticos da utilização de animais em experimentação.

Sem mais no momento, despedimo-nos.

Mogi das Cruzes, 18 de maio de 2005.



**MAURÍCIO MARQUES DE OLIVEIRA
PRESIDENTE DA CEMEA/UMC**

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](#)