

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

ADRIANO FORTES MAIA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE RATOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
NEUROTRÓFICOS, ESTADO OXIDATIVO E DESEMPENHO COMPORTAMENTAL**

VITÓRIA-ES

2020

ADRIANO FORTES MAIA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE RATOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
NEUROTRÓFICOS, ESTADO OXIDATIVO E DESEMPENHO COMPORTAMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a Qualificação de Tese de Doutorado em Educação Física - Linha de Pesquisa: Fisiologia, Bioquímica e Exercício em Modelos Experimentais.

Orientador: Prof.Dr. Danilo Sales Bocalini

VITÓRIA-ES

2020

ADRIANO FORTES MAIA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE RATOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
NEUROTRÓFICOS, ESTADO OXIDATIVO E DESEMPENHO COMPORTAMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a Qualificação de Tese de Doutorado em Educação Física - Linha de Pesquisa: Fisiologia, Bioquímica e Exercício em Modelos Experimentais.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Danilo Sales Bocalini (Orientador)
PPGEF-CEFD-Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Lucas Guimarães Ferreira
PPGEF-CEFD-Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Vancini
PPGEF-CEFD-Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Edson Castardeli
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Fabian Tadeu do Amaral
Universidade Federal do Espírito Santo

FICHA CATALOGRÁFICA
DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M217e Maia, Adriano Fortes, 1966-
 Efeitos do Exercício Físico sobre a Formação Hipocampal de
 Ratos Expostos à Fumaça de Cigarro: Avaliação de Parâmetros
 Neurotróficos, Estado Oxidativo e Desempenho Comportamental
 / Adriano Fortes Maia. - 2020.
 78 f. : il.

Orientador: Danilo Sales Bocalini.
Tese (Doutorado em Educação Física) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Educação Física e Desportos.

1. Exercício Físico. 2. Fumaça de cigarro. 3. Hipocampo. 4.
BDNF. 5. Estresse oxidativo.. I. Bocalini, Danilo Sales. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Educação Física
e Desportos. III. Título.

CDU: 796

FOLHA EM BRANCO

DEDICAÇÃO

In memoriam ao meu pai – “*Seu*” *Maia* - que me ensinou em vida que inteligente é ser íntegro.

In memoriam ao meu irmão *Humberto* que, sem saber, me ensinou a ser como ele: alegre, forte e solidário. Descansem em paz!

Ao meu filho *Levi* e às minhas filhas *Liara*, *Luma* e, agora, *Laura*, para quem tanto busco fazer o melhor.

À *Lorena*, esposa, pelo amor, compreensão e presença constante.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo compartilhamento de experiências, conhecimentos e contribuições.

Ao Laboratório do Prof. Dr. Ricardo Mário Arida, ligado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de São Paulo, pelas contribuições e auxílio.

Ao Laboratório da Profa. Dra. Vânia D'Almeida, ligado ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo, em especial ao doutorando Lisandro Lungato, pelos expressivos auxílios.

Ao Laboratório de Fisiopatologia Vascular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo apoio estrutural.

Ao Prof. Dr. Danilo Sales Bocalini pelos ensinamentos, orientação, incentivo e amizade.

Aos Profs. Drs. Lucas Guimarães Ferreira e Edson Castardeli, pelas contribuições fundamentais em importantes fases da Tese.

Aos Professores e colegas de diversos laboratórios, onde aprendi muito durante minha trajetória acadêmica: Laboratório de Metabolismo ICB/USP- Luiz Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa (*in memoriam*); Laboratório de Fisiologia Endócrina, Regulação Hormonal e Expressão Gênica ICB/USP- Maria Tereza Nunes; Laboratório de Animais Transgênicos/UNIFESP- João Bosco Pesquero e Laboratório de Neurofisiologia do Exercício/UNIFESP- Ricardo Mário Árida.

Aos colegas do Departamento de Desportos do Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo, pela amizade e confiança em anos de trabalho.

À minha família, pelo suporte e amor.

À Deus, por me conceder o tempo certo para todas as coisas.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do exercício físico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos expostos à fumaça de cigarro. Para tal, ratos wistar machos (180-230g) foram distribuídos nos seguintes grupos: sedentário (-*CS Sedentário*), exercício (-*CS Exercício*), sedentários expostos à fumaça de cigarro (+*CS Sedentário*) e exercício e expostos à fumaça do cigarro (+*CS Exercício*). A exposição à fumaça de cigarro foi realizada por 60 dias consecutivos, 2 vezes por dia, e o exercício de natação ocorreu por 8 semanas, 5 dias por semana. Para a avaliação do comportamento, os ratos foram testados no teste de campo aberto (TCA) e tarefa de reconhecimento de objetos (TRO). Usamos como marcadores de estresse oxidativo nos hipocampus dos ratos, as medidas da concentração de superóxido-dismutase total (SOD TOTAL), citosólica (CuZnSOD) e mitocondrial (MnSOD), catalase (CAT) e as concentrações dos peptídeos glutationa nas formas totais, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Foram medidos os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o receptor tropomiosina receptor kinase (TrkB), sinapsina e PSD-95 e as proteínas de sinalização intracelular ligadas a neurogênese, plasticidade sináptica e sobrevivência/morte celular (CREB, AKT, P70S6k, p38, ERK 1/2, JNK, NF-KB, STAT3 e STA5) em amostras da formação hipocampal. O grupo -*CS Exercício* teve um maior tempo de atividade locomotora em comparação aos demais grupos. Os grupos que receberam exercício (-*CS exercício e +CS Exercício*) apresentaram melhor desempenho nas atividades exploratórias de memória e reconhecimento de objetos. Houve uma elevação significativa nos níveis de superóxido-dismutase, catalase e glutationa nos animais do grupo +*CS Exercício*, contudo, sem afetar a relação GSH/GSSG. O exercício foi fundamental para a elevação dos níveis de BDNF e TrkB no hipocampo dos ratos, bem como alterou as proteínas de sinalização celular p38, STAT3 e STAT5. Em conclusão, nossos achados indicam que os efeitos benéficos do exercício físico na atividade motora, exploratória e da memória podem estar em parte relacionados às alterações da neurotrofina hipocampal BDNF/TrkB. Observamos ainda que o exercício físico intensifica mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo na formação hipocampal em animais expostos à fumaça de cigarro.

Palavras-chave: Exercício Físico; Fumaça de cigarro; Hipocampo; BDNF; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of physical exercise on behavioral and neurochemical parameters in rats exposed to cigarette smoke. For this purpose, male wistar rats (180-230g) were distributed in groups: Sedentary without exposure to cigarette smoke (-CS Sedentary), Exercise without exposure to cigarette smoke (-CS Exercise), Sedentary with exposure to cigarette smoke (+CS Sedentary) and Exercise with exposure to cigarette smoke (+CS Exercise). Exposure to cigarette smoke (60 min) was done for 60 consecutive days, 2 times a day, 7 days a week and swimming exercise (60 min) was done for 8 weeks, 5 days a week. For behavior evaluation, the rats were tested in the open field test (OFT) and object recognition test (ORT). We used as markers of oxidative stress in the rat hippocampi the measurements of the total superoxide-dismutase (SOD), cytosolic (CuZnSOD) and mitochondrial (MnSOD) concentrations, catalase (CAT) and the concentrations of glutathione peptides, in reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms. The levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), kinase receptor tropomyosin (TrkB), synapsin, Postsynaptic Density 95 and intracellular signaling proteins linked to neurogenesis, synaptic plasticity, inflammation and cell survival/death (CREB, AKT, P70S6k, p38, ERK 1/2, JNK, NF-KB, STAT3 and STAT5) were measured in samples of hippocampal formation. The group exercised only had a longer time of locomotor activity compared to the other groups. The groups that performed the exercise (-CS exercise and +CS exercise) had a better performance in the exploratory activities of object recognition. There was a significant elevation in the levels of the different forms of superoxide-dismutase and catalase, as well as in the glutathione of the exercised animals exposed to cigarette smoke, however without affecting the GSH/GSSG ratio. The exercise was fundamental for the elevation of the levels of BDNF and TrkB in the rat hippocampus and altered the p38, STAT3 and STAT5 cellular signaling proteins. In conclusion, our findings indicate that the beneficial effects of exercise on motor, exploratory and memory activity may be partly related to changes in the BDNF-TrkB hippocampus proteins. We also observed that physical exercise intensifies changes in oxidative stress parameters in the formation of hippocampal in animals exposed to cigarette smoke.

Keywords: Exercise; Cigarette smoke; Hippocampus; BDNF; Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1- Constituintes básicos do cigarro	16
Figura 2- As zonas componentes do cigarro	17
Figura 3- Cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e a geração de espécies reativas de oxigênio	19
Figura 4- O cigarro na formação de ROS na geração do estresse oxidativo e as principais estruturas celulares danificadas	20
Figura 5- Interconversão entre formas reduzida e oxidada pela ação de enzimas que fazem parte do ciclo catalítico da glutathiona	21
Figura 6- Representação das ações celulares das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathiona-Peroxidase para a manutenção do estado oxidativo nas células	22
Figura 7- Imagens das estruturas componentes da formação hipocampal de ratos	25
Figura 8- Imagem das vias de sinalização intracelular mediadas pelo BDNF com seus receptores: tropomiosina quinase B (TrkB) e neurotrófico p75	26
Figura 9- Efeito do exercício físico sobre a expressão hipocampal de BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro	27
Figura 10- Os diversos tipos de memória e a memória de reconhecimento	28
Figura 11- Esquema do período de adaptação da Exposição à Fumaça de Cigarro	35
Figura 12- Esquema ilustrativo do período de adaptação e treinamento propriamente dito	36
Figura 13- Esquema ilustrativo das fases do TRO: 13a. Habituação; 13b. Treino. 13c. Teste	39
Figura 14- Evolução do ganho ponderal nos grupos experimentais de ratos adultos	42
Figura 15- Efeito do exercício sobre a expressão do Brain-Derived Neuronal Factor (A) hipocampal e (C) cortical e do (B) Tropomyosin Receptor Kinase- type B na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	43
Figura 16- Efeito do exercício sobre a expressão de (A) Sinapsina e (B) Postsynaptic Density 95 na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	44
Figura 17- Efeito do exercício sobre a intensidade da fluorescência de proteínas da via de sinalização intracelular (A) CREB, (B) P38, (C) ERK 1/2, (D) JNK, (E) AKT, (F) P70S6K, (G) NFkB, (H) STAT3 e (I) STAT5 na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	45
Figura 18- Efeito do exercício sobre a (A) Locomoção horizontal, (B) Locomoção vertical e o (C) Tempo total de locomoção de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	46

Figura 19- Efeito do exercício sobre atividade exploratória (A) Índice de discriminação e (B) Tempo de exploração total de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	47
Figura 20- Correlação das concentrações hipocâmpais de BDNF com a (A) Locomoção Horizontal e (B) Índice de Discriminação. Os Valores são apresentados em Média das variáveis	48
Figura 21- Efeito do exercício sobre a quantificação do peptídeo glutathiona em suas formas (A) reduzida, (B) oxidada, (C) total e (D) relação reduzida/oxidada, na formação hipocâmpal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	49
Figura 22- Efeito do exercício sobre a quantificação da enzima Catalase na formação hipocâmpal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	51
Figura 23- Efeito do exercício sobre a quantificação do peptídeo glutathiona em suas formas (A) reduzida, (B) oxidada, (C) total e (D) relação reduzida/oxidada, na formação hipocâmpal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro	52
Tabela 1. Valores de glutathiona reduzida, oxidada e razão GSH/GSSG no hipocampo dos grupos experimentais	50
Tabela 2. Medidas de enzimas e peptídeos do sistema antioxidante e interação da exposição à fumaça de cigarro e do exercício	52

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografias 1a e 1b - Aparatos de exposição à fumaça de cigarro	35
Fotografia 1c - equipamento de proteção individual	35
Fotografia 2 - Piscina para a realização do protocolo de treinamento de natação	37
Fotografia 3 - Experimentação real do teste de reconhecimento de objetos	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT - proteína quinase B
ANOVA - Análise de variância
AMPc- Adenosina monofosfato cíclica
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA1, CA2 e CA3: Corno de Ammon em regiões hipocâmpais
CAT - Catalase
CREB - Proteína de ligação ao fator de transcrição do AMPc.
CS - Exposição à Fumaça de Cigarro
-CS - Não exposição à Fumaça de Cigarro
Cu⁺ -Íons de cobre, cuproso
CuZnSOD - Cobre-zinco superóxido dismutase, SOD citosólica
DAG - Diacilglicerol
DG - Giro dentado
DI - Índice de discriminação
EC - Córtex entorrinal
ERK ½ - Quinase regulada por sinalização extracelular 1 e 2
Fe⁺² -Íons de ferro, ferroso
GSH – Glutathiona reduzida
GSSG – Glutathiona dissulfeto
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HO - Radical hidroxila
HOO - Radical hidroperoxila
IP₃ - Fosfoinositol 3
JNK - Proteína c-Jun N-terminal quinase
LTP - Potenciação de longa duração.
MAPK - Proteína quinases ativadas por mitógenos
MnSOD - Manganês superóxido dismutase, SOD mitocondrial
mRNA- Ácido Ribonucleico tipo mensageiro
NF-KB - Fator de transcrição nuclear kappa B
O₂ - Oxigênio molecular
O₂⁻ - Superóxido
P38 - Proteína ativada por mitógenos p38
P70S6k - Proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA
Pre-ProBDNF- Predecessor inicial do Fator neurotrófico derivado do cérebro
ProBDNF- Precursor do Fator neurotrófico derivado do cérebro
PSD-95 - Proteína de densidade pós-sináptica 95
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SB - Subículo
SOD - Superóxido dismutase
SOD TOTAL - Superóxido dismutase total (MnSOD + CuZnSOD)
STAT3 - Proteína sinalizadora ativadora da transcrição nuclear 3
STAT5 - Proteína sinalizadora ativadora da transcrição nuclear 5
SYNAP - Sinapsina
TrkB –Receptor tropomiosina receptor quinase B
WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Exposição à Fumaça de Cigarro, Estresse Oxidativo e Exercício Físico	15
2.2. Exercício Físico, Fatores Neurotróficos e Memória	23
3. QUESTÕES REFLEXIVAS	29
4. OBJETIVOS	31
5. METODOLOGIA	32
5.1. Animais e Grupos	32
5.2. Procedimentos Éticos	32
5.3. Procedimentos Cirúrgicos e Coleta de Tecido	33
5.4. Determinação do Consumo de Dieta e Monitoramento do Ganho de Peso	33
5.5. Protocolo de Exposição à Fumaça de Cigarro	33
5.6. Protocolo de Treinamento	35
5.7. Teste de Campo Aberto e Tarefa de Reconhecimento de Objetos	36
5.8. Espectrofotometria: Catalase e Superóxido Dismutase	39
5.9. Quantificação da Glutathiona Total, Reduzida e Oxidada	39
5.10. Dosagem dos Níveis de Fatores Neurotróficos e Proteínas Intracelulares	39
5.11. Procedimentos Estatísticos	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Peso dos Animais	41
6.2. Fatores Neurotróficos e Proteínas envolvidas na Sinalização Intracelular	42
6.3. Parâmetros Comportamentais no Teste do Campo Aberto (TCA) e na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO)	45
6.4. Estresse Oxidativo	48
7. DISCUSSÃO	54
8. CONCLUSÃO	60
9. REFERÊNCIAS	61

I.INTRODUÇÃO

Entre o conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, o tabagismo e o comportamento sedentário, além de consumo alimentar inadequado e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, respondem pela grande maioria das mortes em adultos, provocadas por doenças como câncer e patologias cardiovasculares, sendo assim, líderes globais entre as causas de mortes evitáveis (WHO, 2014; Peacock, 2018). De acordo com o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico-VIGITEL, 9,3% dos brasileiros afirmaram ter o hábito de fumar. Este quantitativo de fumantes na população do Brasil torna-se ainda mais preocupante, quando somado aos 38% da população brasileira que não praticam exercício físico (Vigitel- Brasil, 2019).

O exercício físico é considerado uma intervenção/comportamento saudável associado com a redução de inúmeros agravos à saúde e com efeitos benéficos na função cerebral, como o observado em relação a proteção contra os processos neurodegenerativos (Smith, 2003; Goodwin, 2008; Hillman, 2008, Erickson, 2012; De Souto Barreto, 2017) e na melhoria das funções cognitivas (van Praag, 1999; Kashihara, 2009; Da Costa Daniele, 2020). Esses efeitos benéficos relacionados à prática de exercício físico, podem estar diretamente associados a vários mecanismos capazes de modular a liberação e utilização de neurotransmissores e fatores neurotróficos (Vaynman, 2003; Triviño-Paredes, 2016).

O exercício físico pode ativar cascatas moleculares nos neurônios, que aumentam e mantém a plasticidade cerebral, via a indução da expressão gênica associada à plasticidade, sinaptogênese, neurogênese e a vascularização e o metabolismo cerebral (Dishman, 2006; Ding, 2011; Cassilhas, 2016). Por outro lado, o tabagismo apresenta evidências que apontam a exposição à fumaça de cigarro como fator de risco para a doenças neurológicas (Chang, 2013; Smilin Bell, 2017; Valentine, 2018; Alkam, 2019). Assim, não se sabe como o exercício pode impactar frente os agravos que possam ocorrer a partir da exposição à fumaça do cigarro. Destarte, torna-se fundamental identificar como e quais os fatores e mecanismos envolvidos nessa relação entre o ato de se exercitar e o hábito de fumar.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Exposição à Fumaça de Cigarro, Estresse Oxidativo e Exercício Físico

A epidemia do consumo e exposição à fumaça de cigarro (tabaco) é uma das maiores ameaças à saúde pública que o mundo já enfrentou, matando mais de 8 milhões de pessoas por ano em todo o mundo. Mais de 7 milhões dessas mortes são resultado do uso direto de cigarro (e outras fontes de tabaco), enquanto cerca de 1,2 milhão é o resultado de pessoas expostos à fumaça de cigarro de forma passiva (não-fumantes). Cerca de 80% dos 1 bilhão de fumantes em todo o mundo, vivem em países de baixa e média renda, onde o ônus das doenças e mortes relacionadas ao consumo e exposição à fumaça de cigarro é mais oneroso (WHO, 2019). O consumo e exposição à fumaça de cigarro impacta fortemente para a pobreza das famílias, desviando os limitados recursos das necessidades básicas, como alimentação e moradia. Os custos econômicos do uso de cigarro são enormes e incluem gastos significativos de assistência para o tratamento de doenças causadas pela exposição à fumaça de cigarro, além das perdas de vidas humanas resultante da morbimortalidade. Quando falamos do uso e da exposição à fumaça de cigarro estamos falando de uma epidemia que, em escala mundial, apresenta anualmente cerca de 5.8×10^{12} cigarros entre produção, venda e consumo (Zemann, 2011; Barnett, 2017). É uma epidemia com caracterização de um vício, dado o produto apresentar inúmeros componentes psicoativos com mecanismos de dependência semelhantes aos da cocaína, heroína ou outras drogas de abuso (Meirelles, 2009).



Figura 1 - Constituintes básicos do cigarro: 1. Bastão de tabaco; 2. Papel circular do tabaco; 3. Filtro; 4. Papel do filtro; 5. Envoltório (papel de embalagem). (Adaptado de Zemman, 2011).

De acordo com Halliwell (2007), quando o indivíduo acende um cigarro, a temperatura interna no centro da combustão, pode exceder 900 °C. Esta alta temperatura no centro da combustão, promove a queima de vários constituintes do cigarro (Figura 1). Durante a aspiração (“trago”), ocorre um aumento da viscosidade de oxigênio, que atravessa, com certa resistência, o centro da combustão. O fluxo do ar é forçado a fluir do centro da combustão em direção à parte subsequente e resulta na formação da fumaça, ao invés de somente atravessar as laterais de um cigarro. A

combustão do bastão de tabaco e a depleção do oxigênio no ponto central da brasa, gera uma região imediatamente atrás da zona de combustão, também reduzida de oxigênio e altas temperaturas - que promovem a decomposição térmica do tabaco. Essa área atrás da brasa é conhecida como zona de pirólise. Grandes quantidades de componentes voláteis e semivoláteis da fumaça são gerados nessa zona, através de processos chamados de pirolegradação e pirosíntese (Czegeny, 2009). Estes componentes resultam tanto dessas reações de combustão quanto da destilação destrutiva dos constituintes nativos do tabaco. Os componentes do cigarro vão então constituir a fumaça principal - conhecida como “*mainstream smoke*” - na medida em que ocorre a combustão na área central, a formação de gases e a sua aspiração pelos fumantes. Entre os períodos de ausência de aspiração - logo não constituinte da fumaça principal - é formada (e classificada) outra fumaça, resultante da difusão periférica do oxigênio e que se dispersa no ambiente, denominada fumaça lateral, fumaça secundária ou “*sidestream smoke*” (Figura 2).

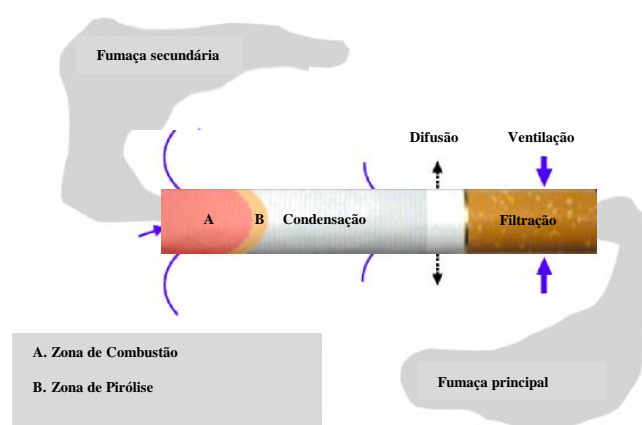


Figura 2 - As zonas componentes do cigarro (Adaptado de Kibet, 2013).

A fumaça do cigarro pode exercer seus efeitos nocivos através de seus diversos componentes. Enquanto aerossol altamente complexo, carrega mais de 5.000 substâncias químicas¹ distribuídas entre a fase de vapor e de partículas. Algumas dessas substâncias componentes da fumaça de cigarro são cancerígenas, tal como o benzopireno; outras são toxinas, como, por exemplo, o monóxido de carbono e a nicotina; e ainda tem as partículas reativas, como os íons metálicos; ou oxidantes, tais como, o alcatrão, o óxido nítrico e o ânion superóxido (Faux, 2009; Willis, 2012).

¹ Existe uma longa e rica história de descobertas dos componentes do tabaco e da fumaça de cigarro. O certo é que o total atual representa um aumento de mais de 200 componentes em relação a última classificação que listou 4994 componentes presentes no catálogo de Rodgman e Perfetti (2013). Apresenta enorme avanço na identificação e listagem total desses componentes em comparação com o número de componentes do tabaco anteriormente relatados por outros autores, no qual podemos citar alguns: Frankenburg (1946), que listou próximo de uma dezena de componentes, Dube (1982) listaram 2549 componentes e Roberts (1988), com 3044 componentes (para mais detalhes de todas as listagens consultar a obra de Rodgman A, Perfetti TA, 2013).

Os componentes encontrados na fumaça de cigarro podem ser provenientes do tabaco, do papel ou dos aditivos químicos usados no processo de industrialização. Durante a combustão dos gases no fumo, são observadas quatro partes principais dos constituintes do complexo aerossol, sendo na fase de vapor, o monóxido de carbono e dióxido de carbono e na fase de partículas, a nicotina e o alcatrão. Na fase vapor do tabaco, estudos relacionam a presença de várias substâncias como acetona, acrileno, ácido acético, ácido fórmico, amônia, cloreto de metila, benzeno, cianeto de hidrogênio, dimetilamina formaldeído, piridina, 3-vinilpiridina, tolueno, 3-metilpiridina, metilamina, monóxido de carbono, dióxido de carbono e óxidos de nitrogênio. Já na fase de partículas, predominam outras substâncias como a nicotina, os fitoesteróis, ácido glicólico, ácido succínico, ácido láctico, ácido benzóico, anabatina, fenol, catecol, colesterol, hidroquinona, quinolina e partículas metálicas (Ma, 2019).

No que se trata dos oxidantes, precisaremos retornar a questão das fases, de partícula e de vapor, dado que, segundo Rodgman (2013), as ROS geradas nessas duas fases são quantitativamente diferentes. Na fase de partículas contêm mais de 10^{17} espécies radicais de longa duração por grama de matéria particulada total, enquanto na fase de vapor, a fumaça contém mais de 10^{15} radicais de vida curta por aspirada (“*trago*”). A fumaça de cigarro induz o estresse oxidativo diretamente através dos oxidantes presentes na fumaça, mas também por compostos oxidantes resultantes da interação dos constituintes da fumaça com componentes de estruturas celulares, ou ainda indiretamente, através da modulação de reações enzimáticas e vias de sinalização no controle do estado metabólico e do equilíbrio oxidativo na célula (Zemann, 2011). Os resultantes podem induzir danos em diferentes estruturas celulares se estas espécies não forem neutralizadas por determinadas biomoléculas (Stampfli, 2009). Se as ROS podem alterar o estado oxidativo, é importante que lembremos que elas se somam as concentrações existentes advindos de outros fatores exógenos (ambientais) e mesmo de processos metabólicos em órgãos e tecidos (Drougard, 2015). Os processos metabólicos são essenciais para a respiração celular, como os da cadeia transportadora de elétrons nas membranas mitocondriais, demonstrado abaixo na Figura 3, mas que também podem ser fortemente geradas em outras situações metabólicas, como exercício, inflamação, formação de ácido úrico e oxidação de catecolaminas (Koning, 2002). O exercício eleva o fluxo sanguíneo para o cérebro de 40 a 70% cerebral para atender a demanda metabólica por O_2 (Chalimoniuk, 2015).

E mais, além da existência de componentes oxidantes presentes na fumaça de cigarro, existem componentes tóxicos que o impulsionam a geração de ROS por serem reconhecidamente indutores de inflamação sistêmica, no qual reforça o estresse oxidativo (Arnson, 2010). As alterações advindas dos processos inflamatórios, caracterizam-se, de um lado, por elevação dos

níveis sanguíneos e teciduais de citocinas pró-inflamatórias, e por outro lado, uma redução nos níveis de citocinas anti-inflamatórias. Por essa lógica, os componentes tóxicos e químicos presentes na fumaça de cigarro, poderiam desencadear a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias por diferentes células do sistema imune, através de inúmeras vias moleculares, entre eles o NF-KB, ERK, JNK e CREB.

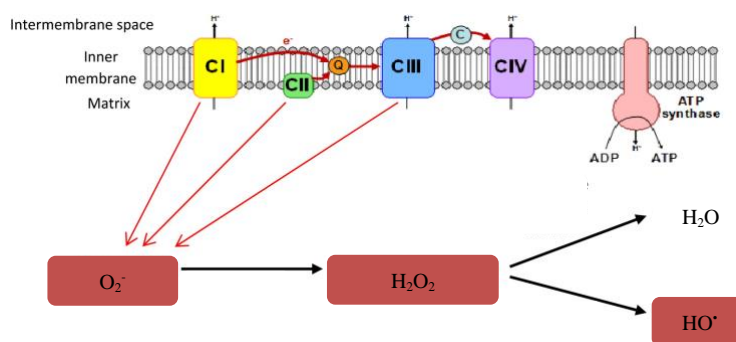


Figura 3 - Cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e a geração de espécies reativas de oxigênio. (Adaptado de Kandola, 2015)

Conceitualmente, o desequilíbrio pró-oxidante e antioxidante, em favor do primeiro, elevando os riscos de possíveis danos aos componentes celulares, é um termo definido como estresse oxidativo² (Halliwell, 2007). Embora as espécies reativas de oxigênio sejam fisiológica e ininterruptamente geradas no organismo, os níveis destas são regulados por enzimas antioxidantes e biomoléculas para manter o estado de equilíbrio oxidativo celular. Assim, a elevação dessas ROS, seja por fontes exógenas ou endógenas, ocorrendo juntas ou separadamente, eventualmente poderão induzir modificações deletérias das biomoléculas e estruturas celulares (Elsayed, 2001; Gochman, 2007). O estresse oxidativo está implicado em uma vasta gama de condições fisiopatológicas – incluindo os distúrbios neurodegenerativos – dado que as ROS podem oxidar biomoléculas proteicas, estruturas lipídicas, organelas celulares e mesmo o DNA nuclear e mitocondrial (Figura 4).

As ROS, contém oxigênio que apresentam propriedades químicas reativas - por possuir elétrons não pareados em sua órbita externa – e dentre eles temos os radicais ânion superóxido (O_2^-) e hidroxila (HO^\bullet), bem como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Pelicano, 2004).

² Weindruch (1995) buscou matematizar a definição de estresse oxidativo relacionando ao nível real de exposição das células, organelas ou proteínas de um dado animal às moléculas “radicais”, e a sua capacidade de remover essas moléculas e/ou reparar os danos causados por elas, ilustrado na seguinte equação:
Oxidative Stress = Free Radical Production – (Removal + Repair).

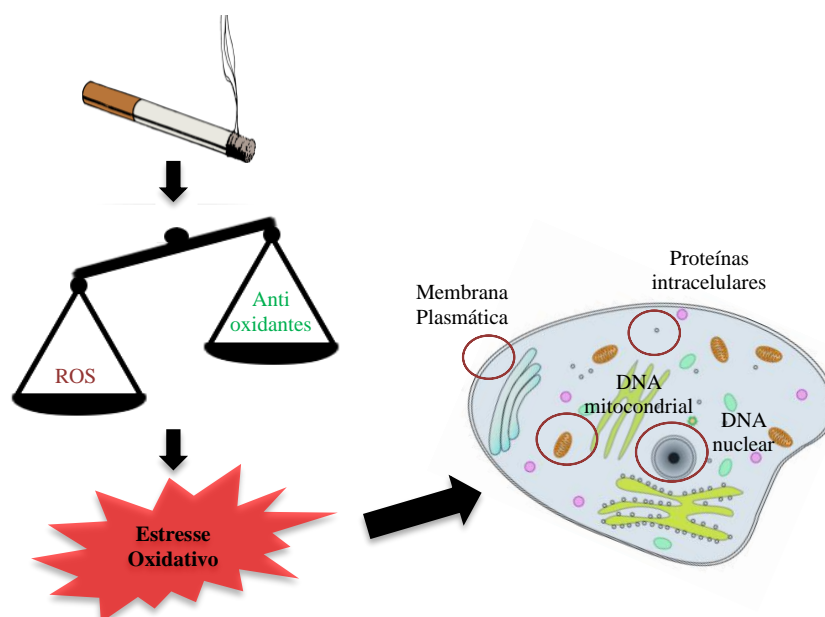
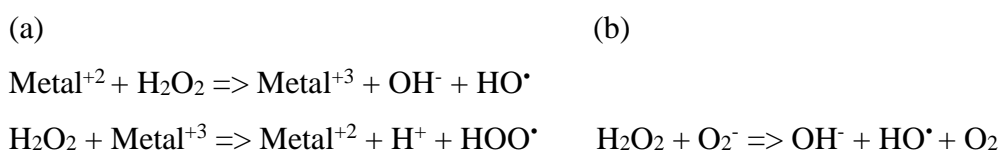


Figura 4 - O cigarro na formação de ROS na geração do estresse oxidativo e as principais estruturas celulares danificadas (figura do autor).

O ânion superóxido é formado pela redução do oxigênio molecular na cadeia de transporte de elétrons. Embora a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria seja altamente eficiente, elétrons podem escapar e reduzir o oxigênio molecular para formar superóxido sendo posteriormente convertido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular por ação enzimática. Tanto O_2^- quanto H_2O_2 podem também causar danos em biomoléculas, apesar de poucos reativas em soluções aquosas (Kamata, 1999). A geração do radical hidroxila (HO^\bullet) a partir de O_2^- e H_2O_2 , caracteriza a presença de ROS mais reativa e mais potente. O peróxido de hidrogênio na presença de metais Cu^+ ou Fe^{+2} sofre a conhecida Reação de Fenton (Equação a) e, na presença de superóxido - conhecida como Reação de Haber-Weiss (Equação b) - resulta na formação do radical hidroxila (Kehrer, 2000).



Do outro lado da “trincheira” estão inúmeras enzimas. A Superóxido Dismutase (SOD) é uma das enzimas mais pesquisadas. Ela converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio e apresenta duas principais isoformas, a Zinco-Cobre-Superóxido Dismutase (CuZn SOD), localizada no citosol, e a Manganês-Superóxido Dismutase (MnSOD), localizada na mitocôndria. A importância da SOD nas atividades antioxidantes, surgiram a partir de experimentos

que demonstraram a remoção do radical superóxido e a geração do peróxido de hidrogênio (Boveris, 2016).

A Glutathione peroxidase (GPx) reduz o peróxido de hidrogênio usando glutathione como doador de elétrons. Diferentemente da SOD, a GPx apresenta o mineral Selênio na sua constituição (Miyamoto, 2003). A Glutathione redutase (GR) é uma enzima do complexo antioxidante que age sobre a glutathione oxidada (GSSG) para sua forma reduzida (GSH), e esta será utilizada pela GPx, junto com peróxido de hidrogênio, formando água. A relação GSH/GSSG é um importante parâmetro global na determinação do potencial redox celular dado que a glutathione atua como tampão e sua quantificação pode indicar uma possível correlação entre a diminuição das atividades de enzimas antioxidantes. Assim, a glutathione e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico deste peptídeo (Figura 5), apresentam associações com alterações dos estados antioxidantes e o estresse oxidativo (Rover Júnior, 2001). A Catalase (CAT) é uma enzima antioxidante potente e realiza o trabalho de remoção do peróxido de hidrogênio. Está localizada principalmente nos peroxissomos e tem como produto final Oxigênio e água. CAT e GPx tem a mesma ação sobre H_2O_2 , mas GPx é mais efetiva sob altas concentrações, enquanto CAT tem importante ação com baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (Finaud, 2006). Na Figura 6 apresentamos uma versão resumida das participações das citadas enzimas no equilíbrio do estado oxidativo celular.

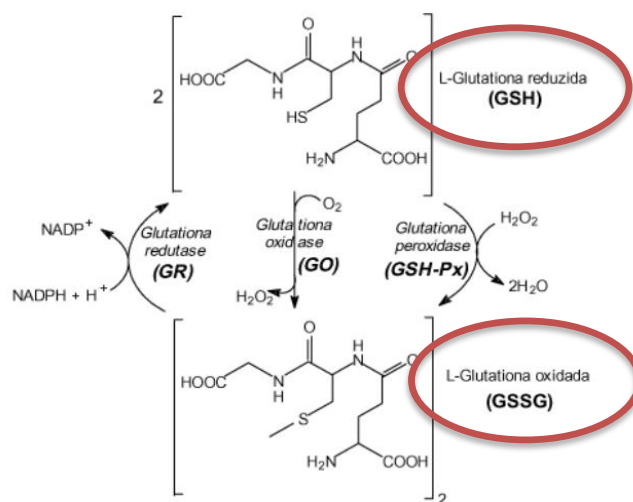


Figura 5. Interconversão entre formas reduzida e oxidada pela ação de enzimas que fazem parte do ciclo catalítico da glutathione (Adaptado de Rover Júnior, 2001)

Como afirmamos anteriormente, a geração de espécies reativas de oxigênio (bem como de outras espécies reativas não derivadas do oxigênio) pode ser classificada como exógena ou endógena. No caso, a exposição à fumaça de cigarro - com consequente aspiração de espécies reativas próprias desta fumaça e de outras componentes que elevam a geração de ROS - é tida como exógena. Por outro lado, a geração endógena de ROS, são exemplificadas pelas situações

fisiopatológicas e as condições metabólicas especiais e, relacionado ao entendimento e objeto da nossa pesquisa, o exercício físico através do mecanismo central da energética e respiração celular, que aumenta a captação de oxigênio e do fornecimento de energia via fosforilação oxidativa e cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, o torna uma das importantes condições de geração de ROS (Kerksick, 2015; Hervouet, 2016).

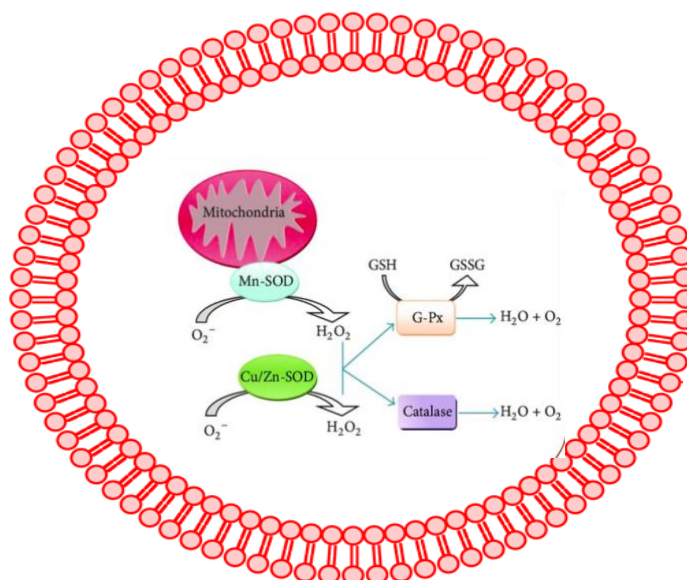


Figura 6 – Representação das ações celulares das enzimas Catalase, Superóxido-Dismutase e Glutationa-Peroxidase para a manutenção do estado oxidativo nas células (figura do autor).

Sabe-se que aproximadamente 95-99% do oxigênio consumido combina-se com hidrogênio formando água, através da cadeia de transporte de elétrons, e cerca de 1-5% vai formar o radical superóxido (Sen, 2001), observado através da ação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase, no complexo 1, e da oxidação de CoQH2 no complexo 3 da cadeia transporte de elétrons. Esse processo resulta na produção de elétrons isolados que reagem com o O2 para produzir superóxido (Finaud, 2006). Como o exercício físico é acompanhado de aumento nos requerimentos energéticos, maior atividade metabólica e consumo de oxigênio, é esperado que o exercício físico possa elevar em até 15 vezes a taxa de consumo de oxigênio e 100 vezes o fluxo de oxigênio para os músculos em uso e estas elevações possibilitem um aumento proporcional na produção de ROS (Sen, 2000)³.

³ Existe uma série de discussões sobre a fonte original da produção de ROS durante o exercício e estas inclui, além do vazamento de elétrons nas mitocôndrias, a participação dos peroxissomos, a autooxidação das catecolaminas, o processo de isquemia e reperfusão, a elevação de cálcio intracelular e ação da xantina oxidase, a oxidação da mioglobina e hemoglobina, o metabolismo dos prostanóides e a ação dos neutrófilos durante inflamações provocadas pelo exercício agudo ou crônico (Sen 2000; Radak 2008)

Por fim, a relação entre o exercício físico e a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a sua inativação pelas enzimas antioxidantes, determina a que ponto ocorrerá e se intensificará o estresse oxidativo (Powers, 2016; Sies, 2017). Se restam poucas dúvidas de que o exercício físico aumenta a produção de ROS, por outro lado temos muitas evidências epidemiológicas sobre a redução da incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo para indivíduos ativos e essa redução pode estar relacionada ao fato de que o exercício físico também aumenta os mecanismos de defesa antioxidantes, ofertando uma proteção adicional a esse estresse (Cooper, 2002; Radak, 2008; Copley, 2017). Sendo o exercício físico um tratamento que altera o estado oxidativo celular e por outro lado, a exposição à fumaça de cigarro uma condição que eleva a produção das ROS, entendemos interessante estudar a associação entre o estresse oxidativo e a prática de exercício físico quando os sujeitos estão expostos à fumaça de cigarro.

2.2. Exercício Físico, Fatores Neurotróficos e Memória

Tem sido aceito pela comunidade científica o efeito benéfico do exercício físico sobre a saúde humana, e em particular, sobre as funções cerebrais (Farooqui, 2014), mas muitas questões ainda continuam em aberto sobre os mecanismos de ação do exercício físico. Parece que esses efeitos do exercício físico sobre funções cerebrais - como aprendizagem e memória - estão envolvidos com o aumento de fatores neurotróficos na região conhecida como formação hipocampal⁴ (Andersen, 2007; Arida, 2009). Assim, torna-se imperioso o interesse sobre as condições que elevam a expressão das neurotrofinas na formação hipocampal, dado ser esta uma estrutura cerebral considerada o centro da memória e aprendizagem (Andersen, 2007; Lisman, 2017; Montagrín, 2018).

A formação hipocampal é uma estrutura heterogênea, interligadas por sub-regiões que tem diferentes funções. Estudos comportamentais, anatômicos e da expressão gênica confirmam a segmentação funcional da formação hipocampal em compartimentos, sendo principalmente constituída por três regiões interligadas com diferentes tipos de células, morfologia e conexões sinápticas: o giro dentado, o complexo subicular e três camadas corticais denominadas *Cornu Ammonis* (CA, subdivididas em CA1, CA2 e CA3). Essa organização trilaminada - composta por células granulares do giro dentado e células piramidais do Cornu Ammonis (CA), somado a outras estruturas - é a formação hipocampal (Figura 7) (Voss, 2017; Fares, 2018; Jeffery, 2018).

Um grupo de proteínas identificadas como neurotrofinas são potentemente expressos na formação hipocampal e reconhecidos como mediadores moleculares das modificações comportamentais em resposta aos distintos estímulos ambientais (Gómez-Palacio-Schjetnan, 2013; Mitre, 2017). Essas proteínas, enquanto ligantes extracelulares afetam e regulam os processos de proliferação, manutenção e diferenciação de células neuronais (Skaper, 2018). Estas proteínas são sintetizadas por neurônios e células gliais, permitindo que estas recebam nutrição adequada para crescer, desenvolver ou se regenerar. A ausência/redução destes fatores, faz com que as células neurais diminuam sua atividade metabólica e as conexões sinápticas com as células adjacentes (Lessmann, 2009; Poyhonen, 2019).

⁴ Para Andersen (2007), o termo hipocampo tem sido usado tanto para uma região anatômica do cérebro (protuberância no assoalho do ventrículo lateral), quanto para uma das estruturas citoarquitetônicas distintas que compõe a região. O termo formação hipocampal é aplicado a um grupo de regiões adjacentes que include o giro dentado, o hipocampo (incluindo as regiões Cornu ammonis CA1, CA2, C3 e até CA4), o complexo subicular (composto pelo subículo, pré-subículo e o parassubículo) e o córtex entorrinal (EC). Segundo o autor, a principal justificativa para incluir as seis regiões nomeadas como formação hipocampal é que elas estão ligadas por uma via unidirecional de três circuitos neuronais: EC → DG (sinapse 1), DG → CA3 (sinapse 2), CA3 → CA1 (sinapse 3).

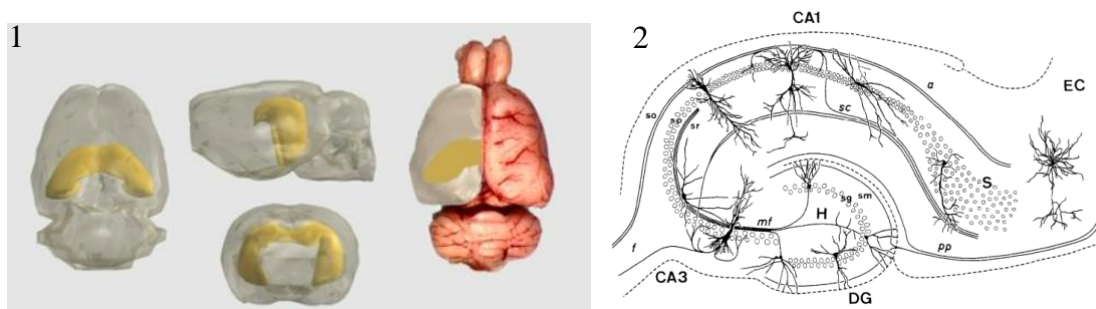


Figura 7. Imagens das estruturas componentes da formação hipocampal de ratos (Adaptado: 1. Harris, 2020; 2. Caeser, 1991).

O BDNF⁵ – brain-derived neurotrophic factor, na língua inglesa - é membro dessa família das neurotrofinas, e também é conhecido por exercer um papel fundamental durante o desenvolvimento saudável e por modular a plasticidade no cérebro maduro (Leal, 2014; Kowiański, 2018; Lima Giacobbo, 2019). O BDNF regula a ramificação e o remodelamento de dendritos e axônios (Yacoubian, 2000; Bosch, 2012; Von Bohlen und Halbach, 2018), a plasticidade sináptica (Alsina, 2001, Edelmann, 2014), a eficácia da transmissão sináptica junto com a síntese e liberação de neurotransmissores e a maturação funcional das sinapses excitatórias e inibitórias (Seil, 2000; Kuczewski, 2010). Além disso, na vida adulta, o BDNF comanda a modulação na expressão de RNAm e proteínas envolvidas com a potenciação de longo prazo⁶ (ou Long-Term Potentiation, LTP, em inglês) e formação da memória (Park, 2013; Kuipers, 2016).

As diversas funções do BDNF são mediadas via duas classes de receptores: o receptor

⁵ O BDNF é uma proteína de 13 kDa que consiste em 119 resíduos de aminoácidos e é produzida pela transcrição do gene BDNF. No cérebro adulto, o BDNF é encontrado e produzido em diferentes tipos de células, principalmente neurônios, mas também em astrócitos (Moretto, 1994). Os níveis mais altos de BDNF são expressos na formação hipocampal, nos neurônios glutamatérgicos. Existe também BDNF circulante, encontrado principalmente armazenado em plaquetas e concentrações significativas de BDNF já foram observadas no coração, fígado, baço, células endoteliais, músculo esquelético e pulmões (Bayas, 2002). O gene possui diferentes regiões promotoras. O BDNF inicialmente encontra-se na forma imatura de pré-proBDNF, que é então clivado no retículo endoplasmático (ER) para produzir proBDNF e posteriormente clivado em sua forma madura. Embora as evidências tenham mostrado que o proBDNF é secretado pelos neurônios centrais e é biologicamente ativo (Yang, 2009), cerca de 90% do BDNF encontrado nos neurônios centrais encontra-se na forma madura (Matsumoto, 2008).

⁶ A formação da memória declarativa no hipocampo começa com o fluxo de informações sensoriais altamente processadas no lobo temporal a partir da associação de áreas corticais como os córtices pré-frontal e parieto-occipital. Inicialmente, a entrada se dá nos córtices parahipocampal e perirrinal e depois o córtex entorrinal. Este último envia informações para o hipocampo – através da via perfurante. Esses axônios formam sinapses com os neurônios do giro dentado (DG), também chamados de neurônios granulares. Em 1966, Terje Lomo observou que uma única estimulação da via perforante causou uma resposta potencializada no DG. Mais tarde, observou-se que a estimulação de alta frequência nessa via causou uma ‘potenciação’ sustentada da transmissão sináptica nas células granulares de DG. Os neurônios granulares do DG através das fibras musgosas, enviam seus axônios para os neurônios piramidais do CA3, que, por sua vez envia parte de suas projeções para o CA1, através da via colateral de Schaffer. As informações do hipocampo retornam para a camada profunda do córtex entorrinal, depois para os córtices parahipocampal e perirrinal e, finalmente, de volta aos córtices associativos. Desta forma, existe um consenso de que a aquisição de memória ocorre através de mudanças na força da sinalização das sinapses. Um aumento na força sináptica em resposta a um estímulo foi registrado pela primeira vez por Bliss e Lomo em 1973, e denominado de LTP - potenciação de longo prazo (Cooper, 2005; Dash, 2007).

de tropomiosina quinase B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB) - membro da família dos receptores tirosina-quinase - e o receptor neurotrófico p75^{NTR} (Chao, 2003; Sasi, 2017). Ambos receptores podem estar localizados no mesmo neurônio, porém desencadeiam efeitos celulares distintos quando ativados: os receptores TrkB ativam vias de sinalização intracelular relacionadas com sobrevivência, proliferação neuronal e plasticidade sináptica, enquanto os receptores p75^{NTR}, que ligam-se mais fortemente a forma não clivada chamada pro-BDNF, ativam vias associadas à morte celular/apoptose (Teng, 2005; Islam, 2009; Hempstead, 2014; De Vincenti, 2019; Zanin, 2019) (Figura 8).

Em relação ao complexo ligante-receptor BDNF/TrkB, logo após a sua formação ocorre a dimerização e fosforilação dos resíduos de tirosina (Tyr515 e Tyr816) no terminal carboxil no domínio intracelular. Isso leva à ativação do RAS pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a estimulação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) pela proteína quinase tipo B (AKT) e geração de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) pela mobilização dos estoques de Ca⁺² e ativação das proteínas quinases reguladas por Ca⁺² e por DAG (Minichiello, 2009; Leal 2017).

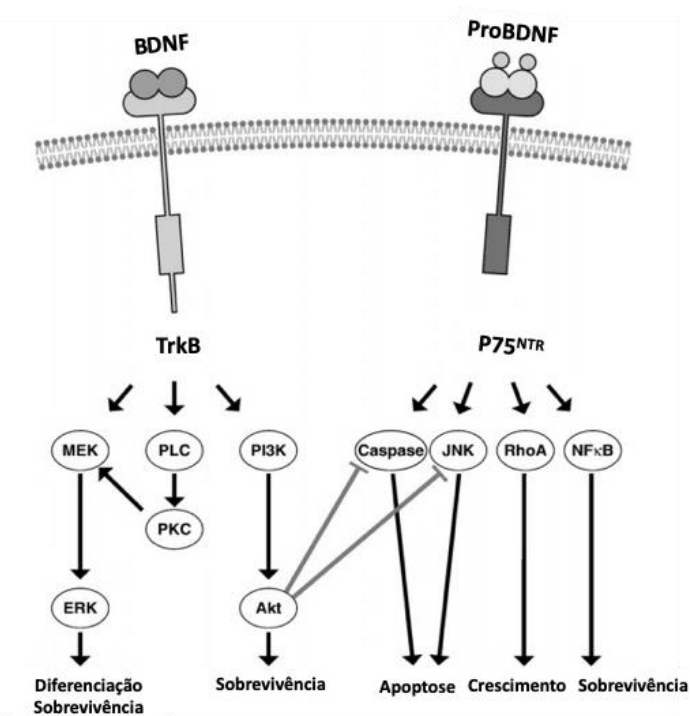


Figura 8. Imagem das vias de sinalização intracelular mediadas pelo BDNF com seus receptores: tropomiosina quinase B (TrkB) e neurotrófico p75^{NTR} (Adaptado: Buckley, 2007).

De acordo com estudos anteriores, tanto em roedores quanto em humanos, o exercício induz inúmeros efeitos benéficos centrais através do aumento na expressão das neurotrofinas, no volume hipocampal e na melhoria na performance cognitiva (Neeper, 1996; Huang, 2006; Hillman, 2008; van Praag, 2009; Berchtold, 2010; Mattson, 2012; Szuhany, 2015; Cassilhas, 2016). Na formação hipocampal, a expressão elevada de BDNF em animais treinados, tem sido observada principalmente em neurônios das sub-regiões CA1, CA3 e giro dentado (Neeper, 1995, Oliff, 1998; Cotman, 2002a; Molteni, 2002; Vaynman, 2003; Farmer, 2004; Vaynman, 2004; O`Callaghan, 2007; Leasure, 2008; Griffin, 2009; Aguiar, 2011; Bechara, 2013; Alkadhi, 2018), sugerindo que o BDNF seja o elemento-chave na mediação dos efeitos a longo prazo do exercício no cérebro (Figura 9).

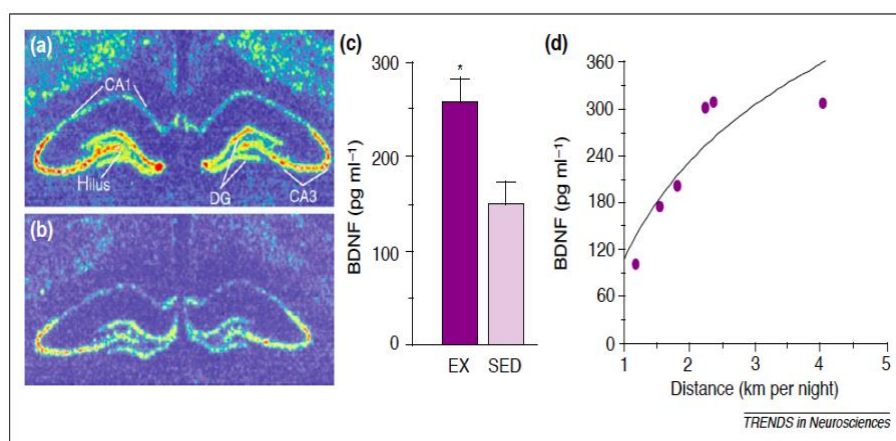


Figura 9. Efeito do exercício físico sobre a expressão hipocampal de BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro. O BDNF mRNA apresentou maiores concentrações no giro dentado (DG), hilus e região CA3, de animais exercitados (a) do que sedentários (b). (c) A quantificação proteica da região hipocampal BDNF foi maior nos animais exercitados. (d) Os valores de BDNF, em animais que realizaram exercícios voluntários, apresentou correlação com a distância corrida. (Cotman, 2002)

O BDNF, além da expressão no hipocampo, é também abundante no córtex cerebral, estriado e amígdala, estruturas relacionadas com aspectos comportamentais (Vaynman, 2003). Assim, participa ativamente da plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (Furini, 2010; Lee, 2013; Rosas-Vidal, 2014; Alberini, 2014; Signor, 2017).

Sobre a memória, uma das mais importantes funções cognitivas do ser humano, esta pode ser entendida como a habilidade que possuímos de armazenar informações e conhecimentos sobre o mundo exterior, sobre nós mesmos, os outros seres, objetos e fatos (baddeley, 2009;

Almaraz-Espinoza, 2020). Existem vários tipos de memória⁷ e a memória de longa duração se refere a retenção de informações por prolongados períodos de tempo. A memória explícita está envolvida no conhecimento de fatos, pessoas e objetos. Ela inclui a memória episódica, referente a experiências cujo contexto espacial e temporal são específicos. O reconhecimento - é a capacidade de lembrar-se e diferenciar uma experiência ou item novo de outro familiar, e é estudada enquanto integrante da memória declarativa e episódica (Figura 10), revelando forte relação com a formação hipocampal (Kelly, 2003; Buckley, 2005; Smith, 2006; Gaskin, 2010; Schmidt, 2011; Bird, 2017; Voss, 2017; Sugar, 2019).

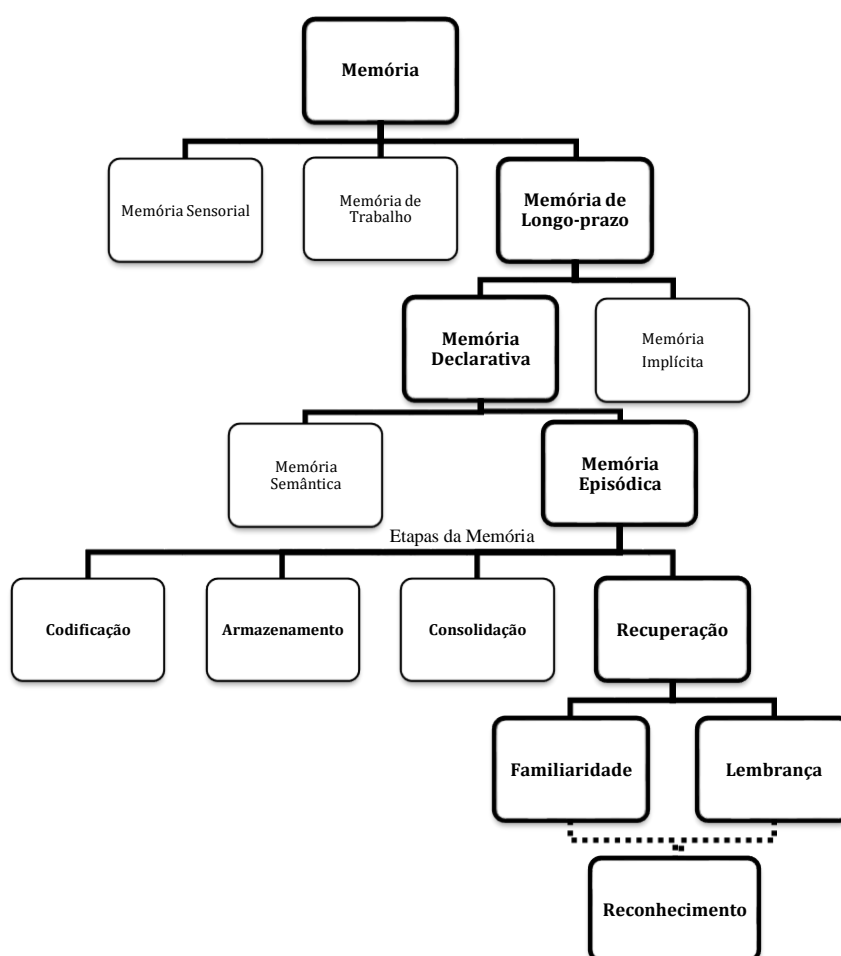


Figura 10. Os diversos tipos de memória e a memória de reconhecimento (Adaptado de Das, 2019).

⁷ A referência de Das (2019) é necessária para dar o entendimento sobre as memórias, ao afirmar que, as memórias que pertencem ao conhecimento do mundo, dos fatos e dos eventos cotidianos e que podem ser trazidas à mente conscientemente, são classificadas como memórias declarativas. Um componente da memória declarativa, a memória episódica, se refere a eventos diários da vida. A memória episódica envolve detalhes dos aspectos espaciais e temporais de um evento, ou seja, quando e onde um evento aconteceu e o que foi esse evento. Um subcomponente crucial do estágio de recuperação da memória episódica é a memória de reconhecimento, que é a capacidade de reconhecer eventos, objetos ou pessoas encontrados anteriormente.

Esta pesquisa além de analisar o efeito do exercício físico sobre o estresse oxidativo, a expressão de neurotrofinas e suas vias de sinalização celular na formação hipocampal em ratos expostos à fumaça de cigarro, também utilizou testes sobre a atividade locomotora e o desempenho da memória como miméticos do desempenho comportamental dos animais. A decisão de incluir estas avaliações têm por base a ampla possibilidade de efeito do exercício e da exposição à fumaça de cigarro impactarem sobre o ambiente redox celular e fatores neurotróficos, estes assumidamente envolvidos com o comportamento motor e a memória hipocampal-dependente.

3. QUESTÕES REFLEXIVAS

As questões reflexivas são aspectos fundamentais para construção do pensamento central, da crítica aos aparatos técnicos e ao raciocínio analítico em relação as respostas da condição experimental. Nesse aspecto, tendo por base a intervenção do exercício físico e a assunção do seu impacto na expressão do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro-BDNF e do receptor Tropomyosin receptor quinase B-TrkB, e por ser esta ligação BDNF-TrkB determinante para a plasticidade hipocampal, sinaptogênese e sobrevivência neural, o que poderíamos observar em animais expostos à fumaça de cigarros em associação ao exercício físico? A resposta a esta questão está inicialmente localizada no centro das descobertas das quantificações de determinadas proteínas, e suas diferenças entre grupos submetidos ao exercício físico e/ou expostos à fumaça de cigarro, no caso, a citada neurotrofina e seu receptor, os marcadores de atividade pré e pós-sinápticos via expressão proteica de Sinapsina e da PSD-95, e também pela expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização neural, como a proteína quinase B - AKT, proteína c-Jun N-terminal quinase- JNK, proteína ativada por mitógenos P38, proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDa- P70S6K, proteína quinase regulada por sinalização extracelular 1 e 2- ERK1/2, fator nuclear kappa beta- NFkB, proteína de ligação responsiva ao AMPc- CREB, proteína sinalizadora ativadora da transcrição nuclear 3- STAT3 e a proteína sinalizadora ativadora da transcrição nuclear 5- STAT5.

Por outro lado, a intervenção do exercício físico que pode tanto elevar o estado oxidativo quanto aumentar as defesas celulares antioxidantes, mas esta intervenção ao ser realizada em animais expostos à fumaça de cigarros, qual seria o real impacto na condição redox? a exposição à fumaça de cigarro elevaria o estresse oxidativo ou a cronicidade do exercício físico preservaria a capacidade de síntese de fatores neurotróficos promovendo um efeito neuroprotetor? de uma forma crítica, é possível buscar a associação dessas mudanças no estado redox à fumaça de cigarro com a responsividade das neurotrofinas ao exercício? e mais, o exercício físico poderia potencializar as defesas antioxidantes permitindo a síntese de fatores neurotróficos ? mais uma vez a quantificação dos níveis das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase Citosólica, Superóxido Dismutase Mitocondrial e da molécula peptídica antioxidante Glutathione, nas suas formas reduzida e oxidada, nos possibilitarão encontrar respostas a estas indagações.

Por fim, não menos importante, possíveis modificações no estado oxidativo celular, bem como nas neurotrofinas e em suas vias de sinalização intracelular na formação hipocampal, afetaria a dinâmica motora entre animais exercitados e expostos à fumaça de cigarro? E com relação ao desempenho da memória hipocampal-dependente, poderemos encontrar algum efeito dessas intervenções sobre a clássica condição que imputa espaço e familiaridade a objetos? Em outras palavras, existem evidências empíricas que suportem o efeito mediador dos fatores neurotróficos sobre a interação exercício-memória? Todas estas questões são claramente relevantes do ponto de vista científico-funcional e direcionam possíveis respostas a partir dos testes comportamentais.

4.OBJETIVOS

-GERAL

Avaliar o efeito do exercício físico sobre a expressão de fatores neurotróficos, seus receptores e vias de sinalização e o estresse oxidativo sobre a formação hipocampal e o desempenho comportamental em ratos expostos à fumaça de cigarro.

-ESPECÍFICOS

Verificar se o exercício físico seria capaz de modificar a atividade locomotora e o desempenho da memória hipocampal-dependente, através de testes comportamentais, em ratos expostos à fumaça de cigarros.

Verificar se o exercício físico seria capaz de modificar a plasticidade hipocampal, através da expressão proteica de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro-BDNF e do receptor Tropomyosin receptor quinase B-TrkB, em ratos expostos à fumaça de cigarros.

Verificar se o exercício físico seria capaz de modificar a plasticidade pré e pós-sináptica na formação hipocampal, através da expressão proteica de Sinapsina e da proteína de densidade pós-sináptica-PSD-95, em ratos expostos à fumaça de cigarros.

Verificar se o exercício físico seria capaz de modificar a expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização da sobrevivência e morte celular, crescimento e diferenciação celular e plasticidade hipocampal e sináptica, sendo elas a proteína quinase B-AKT, proteína c-Jun N-terminal quinase-JNK, proteína ativada por mitógenos P38, proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA- P70S6K, proteína quinase regulada por sinalização extracelular 1 e 2- ERK1/2, fator nuclear kappa beta-NFkB, proteína de ligação responsiva ao AMPc- CREB, proteína sinalizadora ativadora da transcrição nuclear 3- STAT3 e a proteína sinalizadora ativadora da transcrição nuclear 5- STAT5, em ratos expostos à fumaça de cigarros.

Verificar se o exercício físico seria capaz de modificar o estado oxidativo na formação hipocampal de ratos expostos à fumaça de cigarros, através da quantificação dos níveis das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase Citosólica e Superóxido Dismutase Mitocondrial (CuZnSOD e MnSOD) e da molécula peptídica antioxidante Glutathiona (total) e em suas formas reduzida e oxidada (GSH e GSSG).

5.METODOLOGIA

5.1. Animais e Tratamento

No estudo foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus Novergicus*) da linhagem Wistar, sendo todos os animais adultos, com 55 dias de idade, peso próximo de 200 gramas, obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Espírito Santo.

Todo o tratamento biológico foi desenvolvido em sala reservada do Biotério citado, com temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75% respectivamente, e ciclo claro/escuro de 12 horas. Antes do início do período experimental os animais foram adaptados ao ambiente durante 5 dias. Os animais ficaram alojados em gaiolas coletivas com quatro animais e receberam água e ração à vontade. A dieta utilizada foi a ração padrão para roedores marca Nuvilab®.

Trinta e dois animais foram distribuídos randomicamente (numerados e sorteados ao acaso, e alocados quatro ratos por caixa) em 4 grupos experimentais (8 animais cada grupo). Conforme apresentado seguir:

-Grupo sedentário (-CS Sedentário): composto por 8 animais nos quais não receberam nenhum tratamento específico. Receberam água e ração livremente ao longo do dia.

-Grupo exercício (-CS Exercício): composto por 8 animais nos quais receberam água livremente e ração ao longo do dia e realizaram exercício de natação nas piscinas.

-Grupo sedentário exposto à fumaça de cigarro (+CS Sedentário): composto por 8 animais nos quais receberam água e ração livremente e foram expostos ao tratamento crônico com a fumaça de cigarro na câmara experimental.

-Grupo exercício e exposto à fumaça de cigarro (+CS Exercício): composto por 8 animais nos quais receberam livre acesso à água e ração e realizaram exercício de natação nas piscinas e foram expostos ao tratamento crônico com a fumaça de cigarro na câmara experimental.

Em outro experimento, mais 32 animais, foram distribuídos nos grupos experimentais citados (8 animais cada grupo), e utilizados exclusivamente para aplicação dos testes comportamentais, sendo 16 animais (4 por grupo) para Teste de Campo Aberto e 16 animais (4 por grupo) animais para Tarefa de Reconhecimento de Objetos.

5.2. Procedimentos Éticos

O protocolo foi submetido ao Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo e recebeu o número #032/2012.

5.3. Procedimentos Cirúrgicos e Coleta de Tecidos

Previamente à eutanásia, os ratos foram deixados em jejum de 12 horas (ração e água) durante a noite, e em seguida submetidos ao procedimento de decapitação conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, COBEA, 2004. concea.mct.gov.br), que estão em conformidade com as normas internacionais de pesquisas científicas envolvendo animais. A formação hipocampal de cada animal, foi separado e colocado em eppendorf e depositado em nitrogênio líquido. Todas as amostras, ao final dos procedimentos cirúrgicos, foram guardadas em freezer -80oC, para posterior uso.

5.4. Determinação do Consumo de Dieta e Monitoramento do Ganho de Peso

A ingestão alimentar e o peso corporal dos animais foram monitorados semanalmente. O peso final de cada animal foi subtraído do peso do inicial, sendo o resultado considerado a alteração de peso do animal. Foi realizado um monitoramento do ganho e/ou perda de peso a fim de acompanhar as alterações de peso dos animais de cada grupo. O consumo alimentar de todos os grupos foi baseado na média do consumo alimentar dos grupos expostos à fumaça de cigarro (+CS Exercício e +CS Sedentário). Apesar de menores valores do peso corporal dos animais dos grupos expostos à fumaça de cigarro, não ocorreram mudanças significativas no peso final entre os diferentes grupos.

5.5. Protocolo de Exposição à Fumaça de Cigarro

O método utilizado para a exposição crônica à fumaça de cigarro foi o descrito por Simani (1974) adaptado por Wang (1999) e Paiva (2003) e utilizado por Castardeli (2005) e Zornoff (2006), onde os ratos foram colocados na câmara transparente conectada ao aparato de fumar com um volume de aproximadamente 95x80x65 cm (Fotografias 1a e 1b).



Fotografias 1a e 1b: Aparatos de exposição à fumaça de cigarro. 1c: EPI de proteção individual (fotos do autor)

1a

1b

Puffs de fumaça foram retirados do cigarro por vácuo e jogados na câmara. A fumaça foi liberada a uma taxa de cinco cigarros/30 min, com intervalos de descanso de 10 minutos duas vezes por dia, no período da tarde, durante a primeira semana. O número de cigarros foi aumentado a partir da segunda semana, para uma taxa de dez cigarros/30 min, com intervalos de descanso de 10 minutos, duas vezes no período da manhã e duas no período da tarde, até o final do período de estudo para os grupos expostos à fumaça de cigarro (Figura 11). O experimento teve o total de oito semanas. Foi utilizado cigarro comercial popular com a seguinte composição: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono. O sacrifício dos ratos ocorreu no final da oitava semana do experimento. Durante todo o experimento foi utilizado o equipamento de proteção individual, como luvas e máscaras (Fotografia 1c), bem como o acionamento de exaustores no final das sessões.

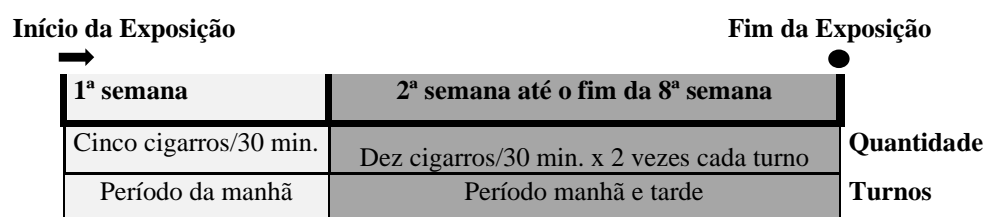


Figura 11. Esquema do período de adaptação da Exposição à Fumaça de Cigarro

5.6. Protocolo de Treinamento (Natação)

A utilização da natação como protocolo de exercício físico para os animais, deu-se pelo fato dos ratos apresentarem habilidade inata para nadar, além desse tipo de exercício não requerer aparelhos e ter impacto significativo na fisiologia animal geral e cerebral (Seo, 2014; Ra, 2002).

O protocolo de treinamento físico de natação foi baseado no modelo de Penpargkul (1970), Kregel (2006), adaptado e usado por Portes (2006) e Bocalini (2010), e incluiu dois períodos - o de adaptação e o do treinamento propriamente dito. O período de adaptação teve dez dias (Figura 12) e o treinamento seguiu até oitava semana. O período de treinamento propriamente dito foi realizado concomitante ao período de exposição à fumaça de cigarro. Esse protocolo é considerado de intensidade moderada (Seo, 2014), e consiste em 1h/dia por 8 semanas de treino.

	Adaptação			Treinamento Propriamente Dito				Fim: 8ª semana
Dias	1 ^o /2 ^o	3 ^o /4 ^o	5 ^o /6 ^o	7 ^o	8 ^o	9 ^o	Do 10 ^o dia até o fim da 8ª semana	
Nível da água	rasa			profunda				profunda
Tempo (min)	10	20	30	30	40	50	60	60

Figura 12. Esquema ilustrativo do período de adaptação e treinamento propriamente dito.

A piscina de treinamento foi construída em vidro com 1,80m de comprimento, 0,70m de altura e 0,60m de largura dividida em seis raias, cada raia tem 0,70m de altura, 0,60 largura e 0,30 de comprimento (Fotografia 2). Em cada raia, foi distribuído um animal e a temperatura da água variava de 30 a 34°C (Portes, 2006). Os animais do grupo expostos à fumaça de cigarro tiveram intervalo mínimo de uma hora entre o protocolo de natação e a aplicação do protocolo de exposição à fumaça de cigarro, para que os ratos voltassem às condições de repouso.



Fotografia 2 - Piscina para a realização do protocolo de treinamento de natação (foto do autor).

5.7. Teste de Campo Aberto e Tarefa de Reconhecimento de Objetos

Para medir o impacto da exposição crônica à fumaça de cigarro e ao exercício físico no desempenho de tarefas, após as últimas sessões de exposição à fumaça de cigarro e treino, os animais foram submetidos a testes comportamentais como o Teste de Campo Aberto – TCA (Hall, 1934) e a Tarefa de Reconhecimento de Objetos – TRO (Ennaceur, 1988).

A escolha dos testes comportamentais citados anteriormente, teve por base a referência de que memória de longa duração pode durar horas, dias e meses, e que a informação gerada pelo protocolo dos testes, como o objeto novo, possa ser uma informação fixada permanentemente pelos mecanismos de potenciação de longa duração, evidenciado por repetitivo e contínuo responsividade dos neurônios do hipocampo (Bunzeck, 2006; Kandel, 2014). Na tarefa típica de reconhecimento de objeto, tem-se um componente espacial com a organização dos objetos na arena. O reconhecimento de objetos (especialmente quando discrimina dois objetos semelhantes e posteriormente um objeto familiar e um objeto novo) está relacionado a processo atribuído às células

granulares do giro dentado (Schmidt, 2011; Hainmuller, 2020) e a região CA1 (Rampon, 2000; Dere, 2007) e a relação entre a formação hipocampal e o córtex perirrinal (Buckley, 2005).

Os testes foram realizados em arena circular de polivinilacrílico branco opaco, medindo 32,5 cm de altura e sua base de madeira tem diâmetro de 97 cm. O chão da arena é dividido em 18 quadrantes, igualmente demarcados por circunferências concêntricas de raios diferentes 8,5cm, 28,5 cm e 48,5 cm, intersectadas por segmentos de retas radiais (Fotografia 3). Os animais foram alocados na sala de baixa luminosidade, onde realizaram as tarefas com uma hora de antecedência para ambientação.

Os testes foram realizados com base na observação direta e anotação das tarefas das fases do TCA: habituação e teste, e nas fases do TRO: habituação, familiarização e teste. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos ratos, todas essas fases foram realizadas sempre nos mesmos horários. Para o TCA, inicialmente os animais foram habituados à arena, pelo tempo de 10 minutos. Passados 5 min, iniciou-se a fase de teste, consistiu, que durou 5 min, na observação e quantificação da locomoção vertical (crossing) de cada animal, bem como o ato de levantar o corpo (rearing). O termo locomoção refere-se ao ato do animal entrar por completo, com as quatro patas, em qualquer quadrante da arena. Já o levantar-se, só foi registrado quando o animal permanecia apoiado em duas patas, independente do auxílio da parede da arena.

Na TRO, os animais passaram pela fase habituação (5 min, por 2 dias consecutivos, Figura 13a) e 24 horas após o último dia dessa fase, foi realizado a fase familiarização, que consistiu de uma nova exposição à arena pelo tempo de 5 minutos consecutivos, em uma única sessão, para que os animais pudessem explorar livremente dois objetos fixados em lados opostos no espaço (Figura 13b). 24 horas após término da fase citada, foi realizada a fase de teste, com duração de três minutos, onde os animais foram expostos na arena circular com dois objetos, sendo um objeto anteriormente usado na fase de treino (familiar ao animal), e um objeto novo para o animal (Figura 13c). Todos os animais retirados da arena, permaneciam na sala de teste por 5 min, mantidos isolados em suas gaiolas, para possível retenção das informações a respeito do espaço e dos objetos, antes de qualquer deslocamento posterior (Izquierdo, 2002; Bevin, 2006)

Os objetos que foram usados - com tamanho similar aos animais - eram todos de material plástico em diferentes formas, texturas e cores: uma bola azul, uma casinha amarela e um objeto (cofre) na cor verde. Eles foram adesivados com fita adesiva inodora para melhor fixação no piso. Todos os objetos e a própria arena circular, em todas as sessões realizadas eram previamente limpas com solução hidroalcolica (5%), para garantir a ausência de pistas olfativas.

Foi utilizado o Índice de discriminação ou de reconhecimento (DI) como mimético de índice de memória, medindo assim a discriminação e exploração entre o objeto novo e o objeto

familiar. O comportamento exploratório foi considerado quando o animal se aproximava e cheirava ou tocava o objeto com o focinho, vibrissas ou patas dianteiras por, no mínimo, 20 segundos (Antunes, 2012). O cálculo é determinado pela fórmula:

$$DI = (T_{nov}) / (T_{nov} + T_{fam})$$

A fórmula acima expressa o tempo utilizado na exploração do objeto novo, dividido pelo tempo gasto total na exploração dos objetos novo e familiar (Ennaceur 1988; Romero-Granados, 2010; Barker, 2019; Constans, 2020). Esse índice varia entre -1 a $+1$. Um DI com escore positivo indica que os animais preferiam o objeto novo e com escore negativo que preferiram o objeto familiar. Um índice com escore zero significa que não teve discriminação entre os objetos, explorando-os igualmente. Os dados foram analisados usando média = 0 para determinar as preferências dos objetos. Anova duas-vias, seguido do teste de Tukey, foram utilizados para determinar as diferenças entre os grupos sobre o tempo total de exploração. Adotou-se o $p < 0.05$ como valor estatístico significativo. Os dados foram analisados usando GraphPad Prism® software.

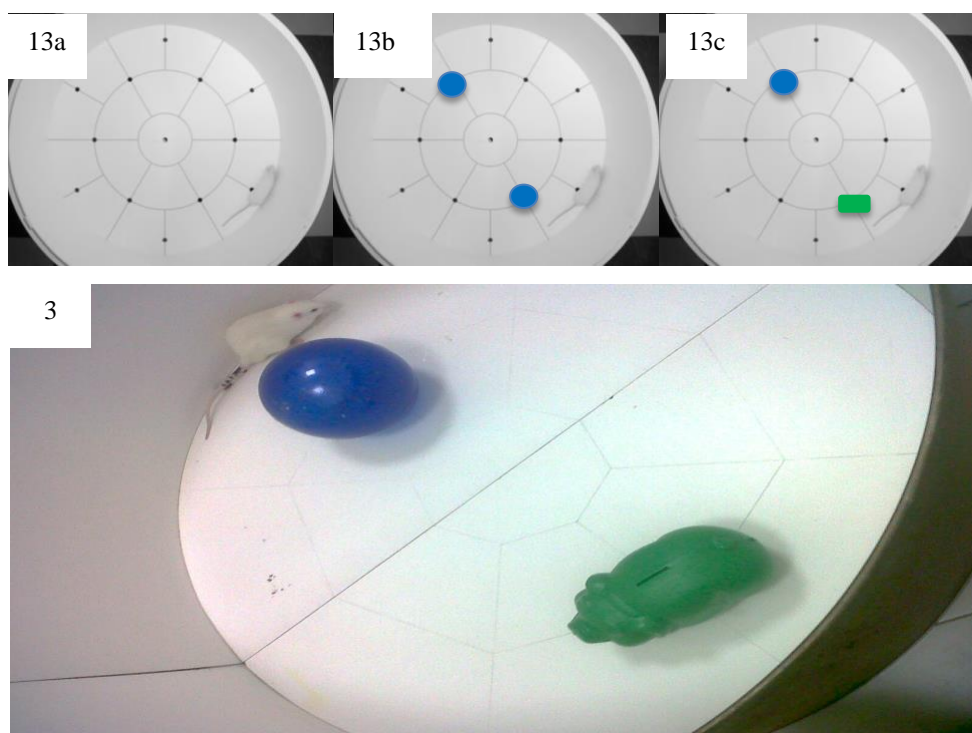


Figura 13 – Esquema ilustrativo das fases do TRO: 13a. Habituação; 13b. Treino. 13c. Teste; Fotografia 3. Experimentação real (foto do Autor).

5.8. Espectrofotometria – CAT e SOD

As amostras da formação hipocampal, foram maceradas em solução salina de tampão de Hanks, e o homogenato foi centrifugado em tampão PO4K. Logo após, os sobrenadantes foram sonicados, centrifugados a 16000 g por 45 min a 4 ° C e realizadas as medidas de atividade CAT e SOD. Os ensaios espectrofotométricos das atividades de CAT e SOD foram realizados de acordo com Beutler (1975) and Ewing (1985), respectivamente. Para a medição da atividade da SOD mitocondrial (MnSOD), a adição de 15 mM de cianeto de potássio (KC N) foi necessária no meio reacional para inibir a atividade da SOD citosólica (CuZnSOD). Os resultados estão expressos como U (unidades)/ mg Proteína.

5.9. Espectrofotometria – CAT e SOD Quantificação de Glutathiona Total, Reduzida e Oxidada

Os ensaios espectrofotométricos das atividades da GSH foram baseados no método proposto por Tietze (1969). Um extrato ácido da formação hipocampal foi obtido usando ácido perclórico e analisado em espectrofotômetro (Hitachi U-2010; Hitachi) em 412 nm e 25°C, usando software UV (Hitachi High Technologies America). Os valores estão apresentados em mmol/g tecido. Para a quantificação da GSSG, foi utilizado o método descrito por Galdieri (2007), sem a adição de agente redutor.

5.10. Dosagem dos níveis de Fatores Neurotróficos e Proteínas Intracelulares

Uma alíquota da formação hipocampal foi homogeneizada em 100µL de tampão de lise (20mM Tris; pH 8,0; 137 mM NaCl; 10% glycerol; cocktail inibitor de protease, P2714, sigma), centrifugado a 10.000g , por 15min, por 4oC, e o sobrenadante foi coletado.

O conteúdo do BDNF foi avaliado utilizando kit de ELISA (BDNF Emax EIA Assay System, Promega), de acordo com a metodologia padronizada (Sales, 2011). Os valores foram registrados em pg/ml. O conteúdo do TrkB, Sinapsina e PSD95 foram avaliados utilizando kit de ELISA (TrkB, Synap, PSD95 Emax EIA Assay System, Promega), de acordo com a metodologia padronizada (Sales, 2011). Os valores foram registrados em pg/ml.

Para investigar as vias de sinalização intracelular, foi usado a plataforma MILLIPLEX (MAP magnetic bead-based multi-analyte panels, Merck Millipore®). e analisada em leitor de placas próprio (Luminex Multiplexing Instrument - EMD Millipore, Luminex Corporation, Austin,

TX, USA). Conforme a metodologia do fabricante, as amostras foram adicionadas às placas específicas para o ensaio e diluídas em tampão fornecido pelo kit e, após a incubação com microesferas magnéticas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura específicos para as proteínas listadas, realizou-se a leitura das amostras no equipamento. Os dados adquiridos foram analisados através do software Milliplex Analyst 5.1. Com essa tecnologia, objetivou-se avaliar a quantificação hipocampal das proteínas intracelulares: Akt, p70S6K, ERK, CREB, p38, JNK, NFkB, STAT3 e STAT5. Foram usados os kits de proteínas de sinalização intracelular: Akt total (Cat# 48-618MAG, Lot# 2532050), ERK total (Cat# 48-619MAG, Lot# 2541778), p70S6K total (Cat# 46-630MAG Lot#46630M-1KA), CREB total (Cat# 46-632MAG, Lot# 46632M-1KA), p38/SAPK2 total (Cat# 46-612MAG, Lot# 46612M-1KA), JNK total (Cat# 48-622AMAG, Lot# 2541778), NFkB total (Cat# 48-612AMAG, Lot# 46629M-1KA), STAT3 total (Cat# 48-622AMAG, Lot# 46629M-1KA) e STAT5 total (Cat# 48-622AMAG, Lot# 46629M-1KA).

4.11. Procedimentos Estatísticos

O Teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para a análise de normalidade dos dados ($W=0.9481$; $p\text{-valor}=0.4543$; $\alpha=0.05$). Os dados foram analisados estatisticamente por meio de Análise de Variância de duas vias. Quando a ANOVA apontou interação foram realizadas comparações pelo Teste de Tukey, para identificar onde residiam as diferenças significativas. Assumiu-se o nível de significância de 5%. Para a análise da correlação, utilizou-se a Correlação de Pearson (r) assumindo-se a força desta classificada em: muito fraca= 0,00-0,19; fraca = 0,20-0,39; moderada = 0,40-0,69; forte = 0,70-0,89; muito forte = 0,90-1,00 com a finalidade de interpretar os coeficientes. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 8.4

6.RESULTADOS

6.1. Peso dos Animais

A variável peso corporal dos animais encontram-se na figura 14. Todos os animais selecionados para esta pesquisa estavam com peso inicial entre 190 e 230 g, alimentados com ração Nuvilab (Nuvital, Curitiba, PR) e água ad libitum. Não houve diferença estatística dos valores iniciais e finais do peso corporal, quando da comparação entre todos os grupos experimentais (Kruskal-Wallis test, $p=0.2410$). Cabe lembrar que foi utilizada distribuição aleatória a partir da seleção que garantisse os estratos de peso (baixo, médio e alto) dos animais para as caixas, quanto a normatização da quantidade de ração ofertada aos grupos, tem por base a média do consumo alimentar diário dos grupos *+CS Sedentário* e *+CS Exercício*.

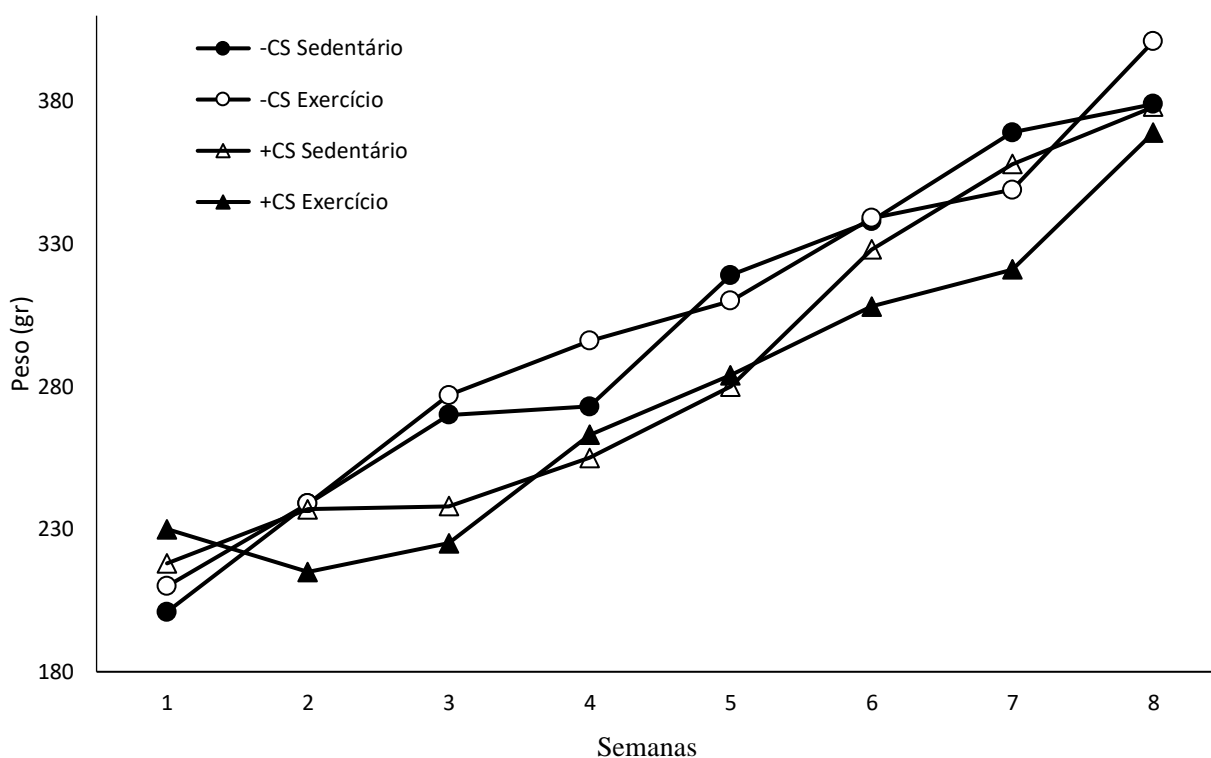


Fig. 14. Evolução do ganho ponderal nos grupos experimentais de ratos adultos. Os valores representam a média dos grupos ($n = 8$). Grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro (*-CS Sedentário*), exercício sem exposição à fumaça de cigarro (*-CS Exercício*), Sedentário expostos à fumaça de cigarro (*+CS Sedentário*) e exercício e expostos à fumaça de cigarro (*+CS Exercício*). (Kruskal-Wallis test).

6.2. Fatores Neurotróficos e Proteínas de Sinalização Intracelular

Foram observadas diferenças significativas nos níveis de BDNF hipocampal entre os grupos, e ANOVA não apontou interação entre os dois fatores ($F(1,16)0.04861$; $p=0.08283$) somente o efeito do fator exercício ($F(1,16)26.12$, $p\text{-valor}=0.0001$). O grupo de animais somente exercitados apresentou valores maiores de BDNF e TrkB na formação hipocampal, quando comparado ao grupo sedentário não expostos à fumaça de cigarro e o grupo sedentário expostos à fumaça de cigarro ($BDNF\ hippo\ -CS\ Exercício\ vs.\ -CS\ Sedentário$: 102.180 ± 13.343 vs. 72.680 ± 11.027 , $p=0.0154$; $-CS\ Exercício\ vs.\ +CS\ Sedentário$: 102.180 ± 13.343 vs. 64.120 ± 10.487 , $p<0.0020$; $TrkB\ -CS\ Exercício\ vs.\ -CS\ Sedentário$: 0.693 ± 0.214 vs. 0.307 ± 0.234 , $p=0.0113$; $-CS\ Exercício\ vs.\ +CS\ Sedentário$: 0.693 ± 0.214 vs. 0.384 ± 0.139 , $p<0.0080$; *Efeito CS* $F(1,20)4.356$, $p\text{-valor}=0.0499$, *Efeito Exercício* $F(1,20)9.461$, $p\text{-valor}=0.0060$). O grupo de animais exercitados e expostos à fumaça de cigarro também apresentou níveis elevados e significativos de BDNF na formação hipocampal quando comparado com o grupo somente expostos à fumaça de cigarro ($+CS\ Exercício\ vs.\ +CS\ Sedentário$: 96.28 ± 17.837 vs. 64.120 ± 10.487 , $p=0.0082$; Fig.15-A e B). Em avaliação adicional - apenas para efeito de comparação - observou-se efeito do fator exercício sobre os níveis de BDNF na região do córtex pré-frontal ($F(1,12)4.944$, $p\text{-valor}=0.0461$) entre os grupos sedentários e exercitados, em animais não expostos à fumaça de cigarro ($BDNF\ PFC\ -CS\ Exercício\ vs.\ -CS\ Sedentário$: 336.667 ± 118.634 vs. 128.333 ± 73.912 , $p=0.0229$; dados não apresentados).

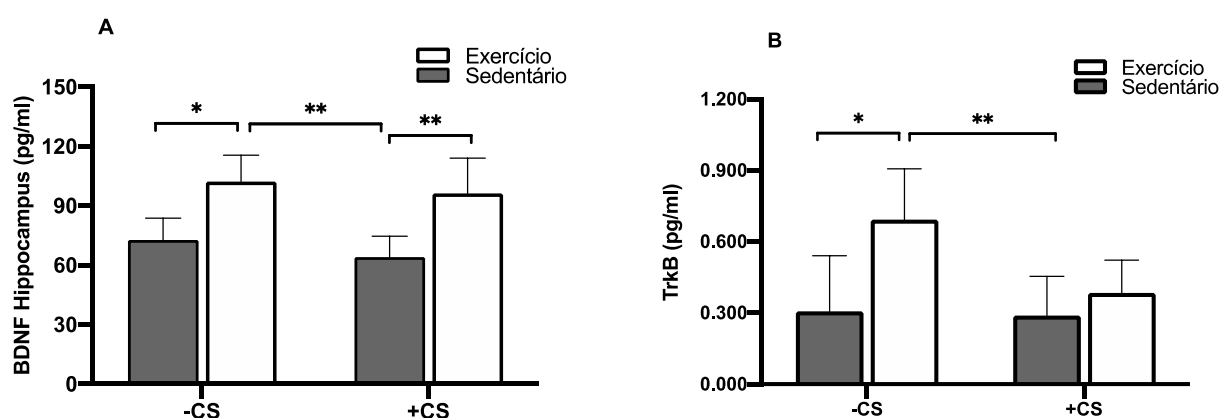


Fig. 15. Efeito do exercício sobre a expressão do Brain-Derived Neuronal Factor (A) hipocampal e (C) cortical e (B) Tropomyosin Receptor Kinase- type B na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os Valores são apresentados em Média \pm DP ($n = 5$). Valor $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, quando comparado os grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro ($-CS\ Sedentário$), Exercício sem exposição à fumaça de cigarro ($-CS\ Exercício$), Sedentário expostos à fumaça de cigarro ($+CS\ Sedentário$) e Exercício e expostos à fumaça de cigarro ($+CS\ Exercício$). (Two-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

Dado o seu papel crítico na regulação de sinapses excitatórias no hipocampo, determinamos os níveis de expressão de sinapsina e PSD-95 como marcadores de plasticidade pré e pós-sináptica. Não encontramos interações na expressão hipocampal de Sinapsina e Postsynaptic Density 95 (*Sinapsina* $F(1,20)1.181$, $p=0.2901$; *PSD-95* $F(1,20)1.347$, $p=0.2595$; Figuras 16A e 16-B).

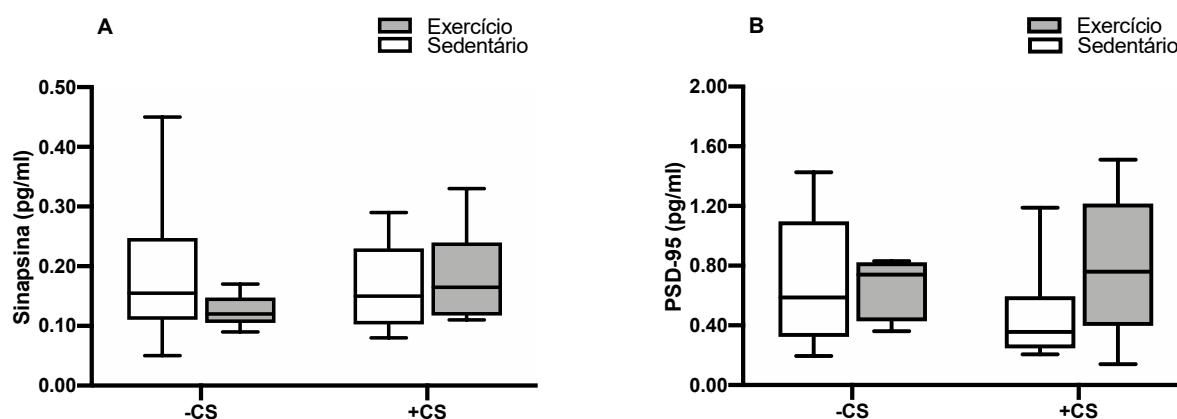


Fig. 16. Efeito do exercício sobre a expressão de (A) Sinapsina e (B) Postsynaptic Density 95 na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os Valores são apresentados em Média \pm DP (n=5). Grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Sedentário), Exercício sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Exercício), Sedentário expostos à fumaça de cigarro (+CS Sedentário) e Exercício e expostos à fumaça de cigarro (+CS Exercício). (Two-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

A expressão de proteínas totais envolvidas na sinalização intracelular (Akt, p70S6K, ERK, CREB, p38, JNK, NFkB, STAT3 e STAT5) foi investigada na formação hipocampal de ratos adultos dos grupos exercício, bem como submetidos a exposição à fumaça de cigarro, e seus respectivos controles. Em relação as proteínas ERK, P70S6K, JNK e NF-KB, nenhuma interação significativa entre os grupos foi observada na intensidade da fluorescência (*ERK* $F(1, 16)0.01748$, $p=0.8965$; *JNK* $F(1, 16)1.259$, $p=0.2784$; *p70S6K* $F(1, 16)0.0004181$, $p=0.9839$ e *NF-KB* $F(1, 16)0.07168$, $p=0.7923$; Figuras 17-A, C, D, E, F, G). Contudo, ocorreu efeito da fumaça de cigarro sobre os valores do elemento responsivo do AMP cíclico ($F(1,16)10.48$, $p\text{-valor}=0.0052$) com valores diferentes entre os grupos exercício e grupo exercício exposto à fumaça de cigarro (*CREB - CS Exercício vs. +CS Exercício*, 91.600 ± 2.584 vs 76.900 ± 1.949 , $p=0.0463$), bem como efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a AKT ($F(1, 16)9.100$, $p=0.0081$) com diferença do grupo exercício em relação aos grupos sedentários exposto à fumaça de cigarro e exercitados exposto à fumaça de cigarro (*AKT -CS Exercício vs. +CS Sedentário*, 134.0 ± 8.916 vs 119.0 ± 16.808 , $p=0.0290$ e *-CS Exercício vs. +CS Exercício*, 134.0 ± 8.916 vs 110.2 ± 9.445 , $p=0.0290$). Observou-se também efeito da fumaça de cigarro sobre a intensidade da fluorescência da p38MAPK

($F(1,16)8.461$, $p=0.0103$) e da $STAT5$ ($F(1, 16)11.72$, $p=0.0035$), com diferenças identificadas entre os grupos exercício, sem e com exposição à fumaça de cigarro ($p38$ -*CS Exercício* vs. +*CS Exercício*: 104.80 ± 3.701 vs. 86.20 ± 7.294 , $p=0.0331$; $STAT5$ -*CS Exercício* vs. +*CS Exercício*: 135.50 ± 12.227 vs. 110.60 ± 12.462 , $p=0.0175$). E mais, foi observada redução significativa na intensidade da fluorescência da $STAT5$ e da $STAT3$, entre o grupo sedentário não expostos à fumaça de cigarro e o grupo exercício exposto à fumaça de cigarro ($STAT5$ -*CS Sedentário* vs. +*CS Exercício*: 133.2 ± 13.3 vs. 110.6 ± 12.4 , $p=0.0326$; $STAT3$ -*CS Sedentário* vs. +*CS Exercício*: 90.7 ± 10.5 vs. 76.5 ± 8.0 , $p=0.0499$; Figura 17-A, B, E, H e I).

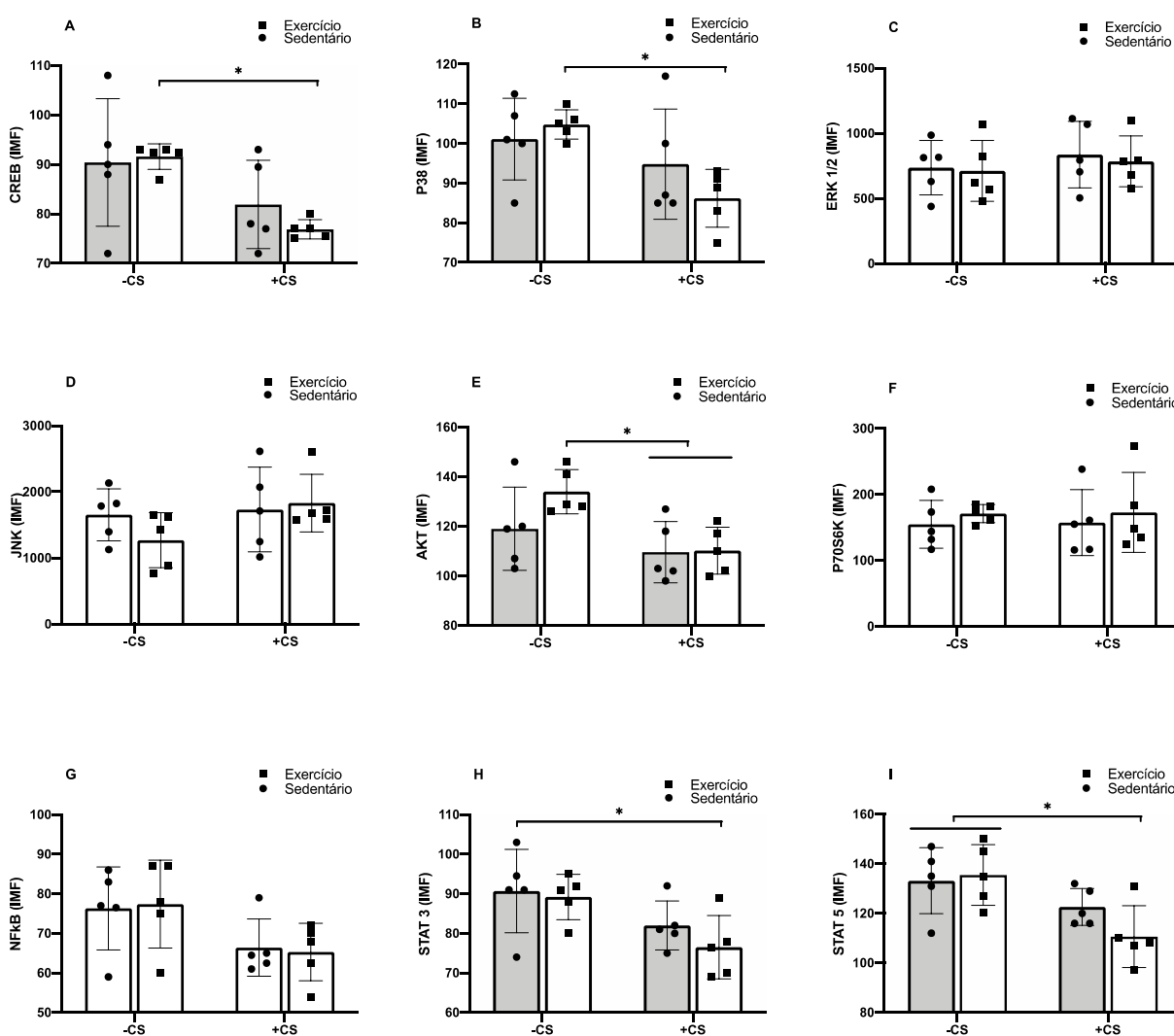


Fig. 17. Efeito do exercício sobre a intensidade da fluorescência de proteínas da via de sinalização intracelular (A) CREB, (B) P38, (C) ERK 1/2, (D) JNK, (E) AKT, (F) P70S6K, (G) NFκB, (H) STAT3 e (I) STAT5 na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os Valores são apresentados em Média \pm DP (n=5), Valor * $p < 0.05$. Grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro (-*CS Sedentário*), Exercício sem exposição à fumaça de cigarro (-*CS Exercício*), Sedentário expostos à fumaça de cigarro (+*CS Sedentário*) e Exercício e expostos à fumaça de cigarro (+*CS Exercício*). (Two-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

6.3. Parâmetros Comportamentais no Teste do Campo Aberto (TCA) e na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO)

Na avaliação da atividade locomotora, através do teste do campo aberto (TCA), observa-se na figura 18-A que os animais do grupo exercício apresentaram maior locomoção horizontal quando comparado ao grupo de animais sedentários expostos à fumaça de cigarro, evidenciando o efeito do exercício físico sobre essa variável de atividade ($F(1,12)9.632$, $p\text{-valor}=0.0091$; *Locomoção Horizontal: -CS Exercício vs. +CS Sedentário: 69.500 ± 8.185 vs. 59.000 ± 8.287 , $p < 0.05$*). Em 18-B e C, apesar do efeito do exercício sobre o “rearing” (*Locomoção Vertical: $F(1,12)4.942$, $p\text{-valor}=0.0462$*) e a tempo total de locomoção (*Tempo total de locomoção $F(1, 12)6.539$, $p\text{-valor}=0.0251$*), não foi impactante o suficiente para gerar diferença entre os grupos.

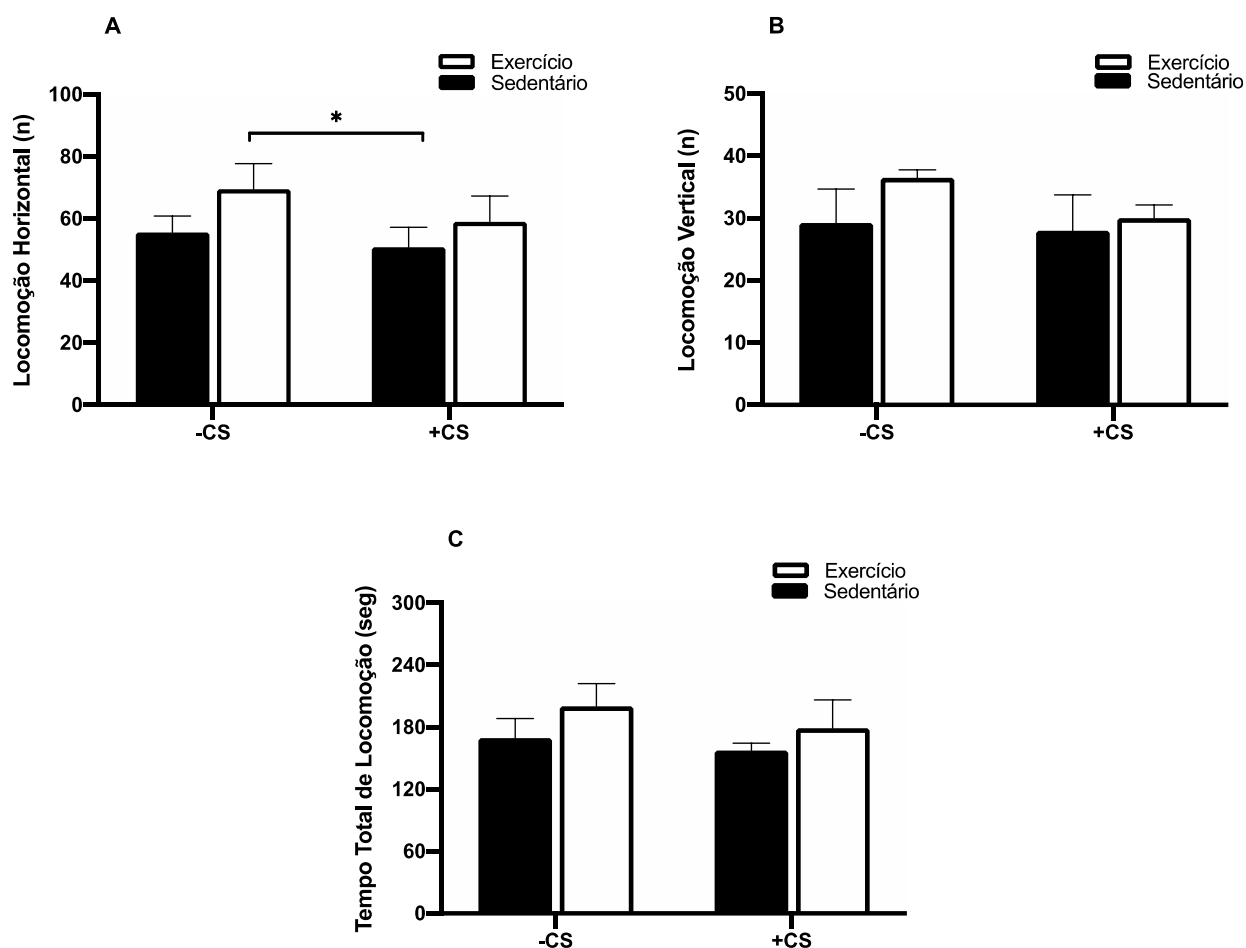


Fig. 18. Efeito do exercício sobre a (A) Locomoção horizontal, (B) Locomoção vertical e o (C) Tempo total de locomoção, de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os valores são apresentados em Média \pm DP ($n = 4$). * $p < 0.05$ quando comparado -CS Exercício x +CS Sedentário (Two-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

Na avaliação da atividade exploratória relacionada a memória de longo prazo hipocampal-dependente, foi aplicado a tarefa de reconhecimento de objetos (TRO). O $DI\%$ afere a capacidade do animal em identificar e explorar os objetos novos em detrimento dos objetos já conhecidos. O teste ANOVA apontou efeito do exercício e da CS, mas sem interação sobre os valores do DI ($F(1,12)40.30$, $p\text{-valor}<0.0001$; $F(1,12)5.470$, $p\text{-valor}=0.0375$; $F(1,12)0.2512$, $p\text{-valor}=0.6253$; respectivamente). Na figura 19-A, os animais do grupo exercício apresentaram maior índice de discriminação quando comparado ao grupo de animais controle sedentários ($DI\% \text{-CS Exercício vs. -CS Sedentário: } 49.25 \pm 1.708 \text{ vs. } 39.00 \pm 4.490$, $p=0.0020$), bem como diferenciaram-se dos sedentários expostos à fumaça de cigarro ($DI\% \text{-CS Exercício vs. +CS Sedentário: } 49.25 \pm 1.780 \text{ vs. } 36.25 \pm 2.754$, $p=0.0003$). Os animais do grupo exercício expostos à fumaça de cigarro apresentaram diferenças significativas ao grupo sedentário com exposição à fumaça de cigarro ($DI\% \text{+CS Exercício vs. +CS Sedentário: } 45.00 \pm 1.826 \text{ vs. } 36.25 \pm 2.754$, $p=0.0065$). Na figura 19-B, temos o tempo total usado na exploração de todos os objetos (novos e familiares). Anova apontou interação das variáveis CS e Exercício ($F(1,12)8.059$, $p\text{-valor}=0.0149$), onde exercício exerceu efeito significativo com diferença em todos os grupos ($F(1,12)6.530$, $p\text{-valor}=0.0251$; $\text{-CS Exercício vs. -CS Sedentário: } 141.875 \pm 14.133 \text{ vs. } 65.000 \pm 17.512$, $p<0.0001$; $\text{-CS Exercício vs. +CS Sedentário: } 141.875 \pm 14.133 \text{ vs. } 71.875 \pm 19.665$, $p=0.0001$; $\text{-CS Exercício vs. +CS Exercício: } 141.875 \pm 14.133 \text{ vs. } 106.000 \pm 3.742$, $p=0.0249$), enquanto o grupo de animais exercitados expostos à fumaça de cigarro teve média significativamente diferente comparado aos grupos sedentários, com ou sem exposição à fumaça de cigarro ($\text{+CS Exercício vs. -CS Sedentário, } 106.000 \pm 3.743 \text{ vs. } 65.000 \pm 17.512$, $p=0.0107$; $\text{+CS Exercício vs. +CS Sedentário: } 106.000 \pm 3.742 \text{ vs. } 71.875 \pm 19.665$, $p=0.0332$).

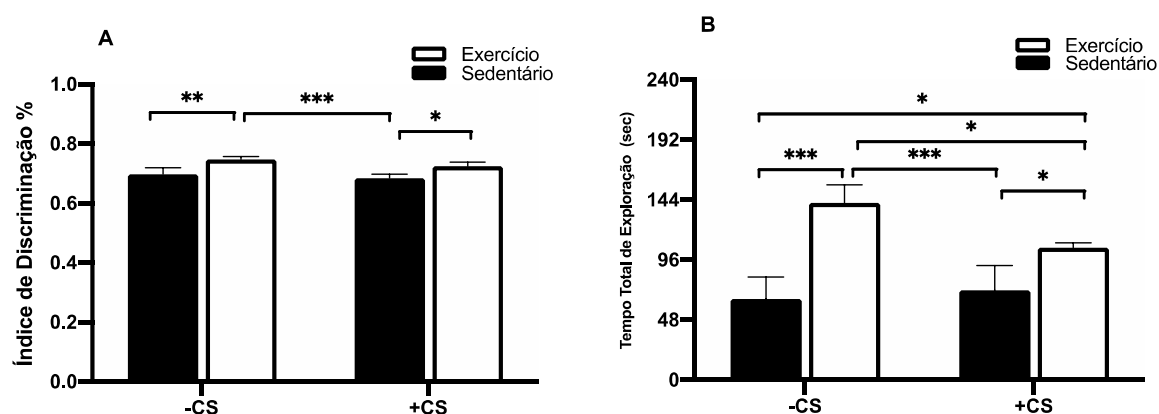


Fig. 19. Efeito do exercício sobre atividade exploratória (A) Índice de discriminação e (B) Tempo de exploração total de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os Valores são apresentados em Média \pm DP ($n = 4$) ou %. Valor * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** e **** $p < 0.001$, quando comparado entre os grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Sedentário), Exercício sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Exercício), Sedentário expostos à fumaça de cigarro (+CS Sedentário) e Exercício e expostos à fumaça de cigarro (+CS Exercício). (Two-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

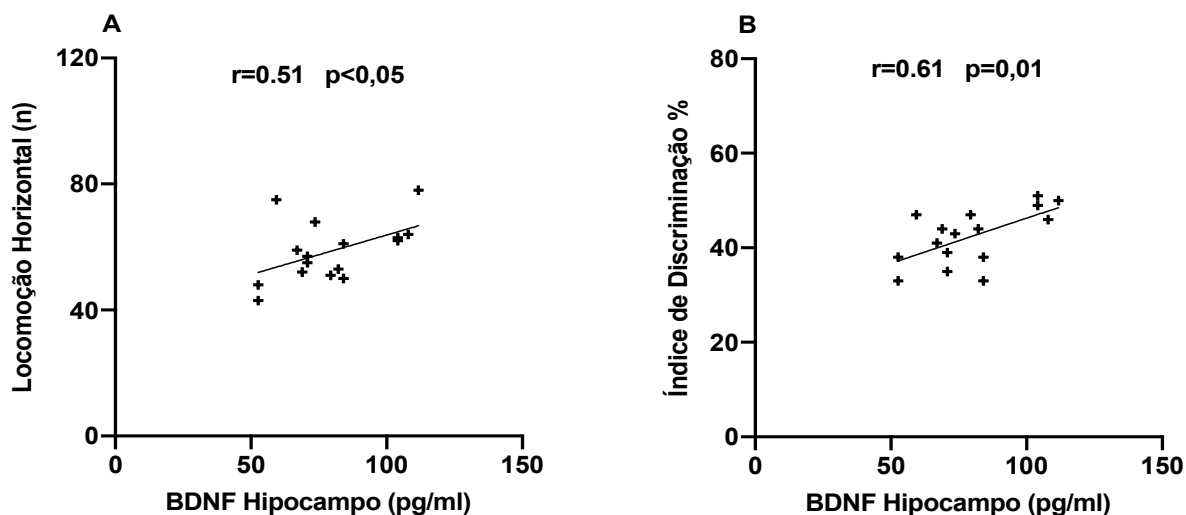


Fig. 20. Correlação das concentrações hipocâmpais de BDNF com a (A) Locomoção Horizontal e (B) Índice de Discriminação. Os Valores são apresentados em Média das variáveis.

Com base nos resultados anteriores, investigamos a possível correlação do BDNF com o desempenho em atividade motora e na memória hipocâmpal-dependente. Como pode ser observado nos gráficos 20-A e 20-B, o aumento dos níveis hipocâmpais de BDNF apresentou significativa correlação com o desempenho comportamental dos animais, medido pelas atividades locomotora/exploratória (*BDNF/Atividade Locomotora horizontal: $r=0.5044$, $p=0.0482$*) e da memória de reconhecimento de objeto (*BDNF/DI %: $r=0.6139$, $p=0.0114$*), auxiliando assim nas relações mais concretas a respeito do papel do BDNF em aspectos cognitivos dos animais para futura análise dos mecanismos através dos quais o exercício pode exercer neuroplasticidade.

6.4. Estresse Oxidativo

Sobre os marcadores do estado redox, a quantificação do tripeptídeo glutationa, em suas formas reduzida e oxidada, foi investigada na formação hipocampal de ratos adultos dos grupos exercício e/ou submetidos a exposição à fumaça de cigarro, e seus respectivos controles. Em relação aos valores totais, reduzido (GSH) e oxidado (GSSG), foram encontradas as mesmas tendências com diferenças significativas entre o grupo submetido ao exercício e exposto à fumaça de cigarro em relação aos demais grupos de animais (Figura 21). A interação entre as variáveis exercício e exposição à fumaça de cigarro foi observada nas quantificações totais ($TOTAL F(1, 20)17.91, p=P=0.0004$), *reduzida* ($GSH F(1, 20)16.63, P=0.0006$) e *oxidada* ($GSSG F(1, 20)13.52, P=0.0015$). Contudo, não foi encontrado interação entre os grupos na razão GSH/GSSG ($F(1, 16)0.2574, P=0.6188$). Os valores das variáveis GSH, GSSG, GSht e a Razão GSH/GSSG encontram-se na Tabela 1.

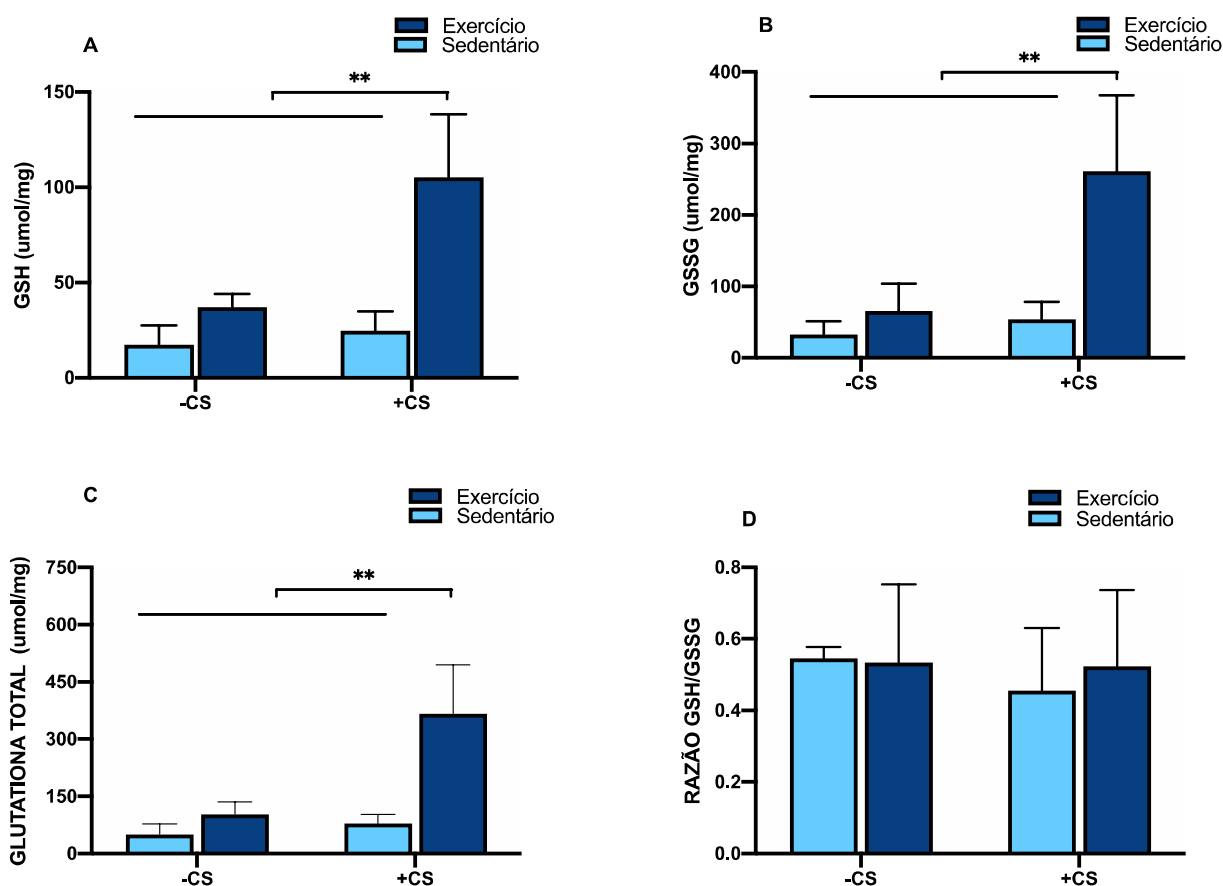


Fig. 21. Efeito do exercício sobre a quantificação do peptídeo glutationa em suas formas (A) reduzida, (B) oxidada, (C) total e (D) relação reduzida/oxidada, na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os Valores são apresentados em Média \pm DP (n=6), Valor **p < 0.01. Grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Sedentário), Exercício sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Exercício), Sedentário expostos à fumaça de cigarro (+CS Sedentário) e Exercício e expostos à fumaça de cigarro (+CS Exercício). (Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons post hoc test).

Tabela 1- Valores de glutatona reduzida, oxidada e razão GSH/GSSG no hipocampo dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais		GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ tecido)	GSSG ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ tecido)	Razão GSH/GSSG
Sedentário	Não exposição à fumaça de cigarro (-CS)	17,3 \pm 9,9	33,2 \pm 17,9	0,546 \pm 0,03
	Exposição à fumaça de cigarro (+CS)	37,2 \pm 6,7	65,9 \pm 38,1	0,534 \pm 0,21
Exercício	Não exposição à fumaça de cigarro (-CS)	24,7 \pm 10,0	54,0 \pm 24,1	0,456 \pm 0,17
	Exposição à fumaça de cigarro (+CS)	105,3 \pm 32,9 ^a	261,5 \pm 105,7 ^a	0,524 \pm 0,21

Todos os dados estão apresentados em Média \pm Desvio-padrão (n=5).

a: GSH e GSSG $p < 0.0001$ em comparação aos demais grupos.

Corroborando respostas similares encontradas na quantificação anterior, em relação a Catalase, a estatística de variância identificou interação do CS e Exercício ($F(1,20)6.443$, $p\text{-valor}=0.0196$). Assim, o grupo +CS Exercício apresentou diferenças significativas em relação a todos os demais grupos, conforme se observa na Figura 22 com *Heat Map* dos valores individualizados. Claramente, os valores da Catalase quantificados na formação hipocampal do grupo com as duas intervenções exercício e fumaça, apresentou níveis mais elevados que os demais valores dos outros grupos de animais (*CAT +CS Exercício vs -CS Sedentário*: 18.085 ± 4.394 vs. 1.453 ± 0.433 , $p < 0.0001$; *+CS Exercício vs +CS Sedentário*: 18.085 ± 4.394 vs. 6.358 ± 6.587 , $p = 0.0003$; *+CS Exercício vs -CS Exercício*: 18.085 ± 4.394 vs. 4.858 ± 1.267 , $p < 0.0001$), corroborando que a exposição crônica à fumaça de cigarro e o exercício físico, de forma conjunta alteraram significativamente os níveis da enzima Catalase no hipocampo do animais.

A enzima Superóxido Dismutase, foi investigada em seu conteúdo total (SOD Total) e em suas formas CuZnSOD e MnSOD, e apresentaram tendência similar descrita para a enzima Catalase e o tripeptídeo Glutaciona, assumindo-se o entendimento da existência de forte estresse oxidativo na região hipocampal dos animais quando foram submetidos ao exercício físico e expostos à fumaça de cigarro (Figura 23). De uma forma geral, a interação entre as variáveis exercício e exposição à fumaça de cigarro impactou fortemente a quantificação total da Superóxido Dismutase (*SOD-Total* $F(1,20)7.805$, $P=0.0112$; *Fig.23-C*). Os grupos de animais submetidos ao exercício, *-CS Exercício e +CS Exercício*, apresentaram diferenças significativas com os demais grupos, sendo que a dupla exposição (exercício e fumaça de cigarro) apresentou os maiores valores totais da Superóxido Dismutase (*SOD-Tot +CS Exercício vs -CS Exercício*: 3.088 ± 0.194 vs. 1.848 ± 0.220 , $p < 0.0001$; *+CS Exercício vs +CS Sedentário*: 3.088 ± 0.194 vs. 1.272 ± 0.649 , $p < 0.0001$; *+CS Exercício vs -CS Sedentário*: 3.088 ± 0.194 vs. 0.857 ± 0.124 , $p < 0.0001$; *-CS Exercício vs -CS Sedentário*: 1.848 ± 0.220 vs. 0.857 ± 0.124 , $p = 0.0007$).

Em relação aos valores da Superóxido Dismutase Manganês-dependente (Fig.23-B), observou-se que as diferenças significativas seguem aquelas diferenças aos valores totais da SOD, onde as maiores quantificações é observada no grupo de animais exercitados e expostos à fumaça de cigarro (*MnSOD +CS Exercício vs -CS Exercício*: 1.780 ± 0.203 vs. 1.228 ± 0.174 , $p=0.0063$; *+CS Exercício vs +CS Sedentário*: 1.780 ± 0.203 vs. 0.757 ± 0.427 , $p<0.0001$; *+CS Exercício vs -CS Sedentário*: 1.780 ± 0.203 vs. 0.480 ± 0.073 , $p <0.0001$; *-CS Exercício vs -CS Sedentário*: 1.228 ± 0.174 vs 0.480 ± 0.073 , $p=0.0003$; *-CS Exercício vs +CS Sedentário*: 1.228 ± 0.174 vs 0.757 ± 0.427 , $p=0.0211$). Diferente da SOD-Total, os resultados da Superóxido Dismutase manganês-dependente não permitiram assumir interação entre as variáveis do estudo (*MnSOD F(1,20)1.751*, $p\text{-valor}=0.2007$), mesmo sendo significativo o efeito do exercício (*F(1,20)72.66*, $p\text{-valor}<0.0001$) e da exposição à fumaça de cigarro (*F(1,20)15.55*, $p\text{-valor}=0.007$).



Fig. 22. Efeito do exercício sobre a quantificação da enzima Catalase na formação hipocampal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os Valores são apresentados em Média (n=6), Valor *** $p < 0.001$. Grupos: Sedentário não exposto à fumaça de cigarro (-CS Sedentário), Exercício não exposto à fumaça de cigarro (-CS Exercício), Sedentário exposto à fumaça de cigarro (CS Sedentário) e Exercício exposto à fumaça de cigarro (CS Exercício). (Two-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

Embora esteja em compartimento diferente da SOD mitocondrial, a CuZnSOD, abundantemente encontrada no meio citosólico, foi possível observar similaridades com as outras enzimas do sistema redox (Fig.23-A), a começar pela forte interação entre as variáveis exercício e exposição à fumaça de cigarro (*CuZnSOD* $F(1,20)21.98$, p -valor=0.0001; todas as interações encontram-se na Tabela 2). A aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey identificou como significativa as diferenças entre o grupo de animais exercitados expostos à fumaça de cigarro em relação os demais grupos de animais (*CuZnSOD* +CS Exercício vs -CS Exercício: 1.308 ± 0.071 vs. 0.623 ± 0.145 , $p=0.0001$; +CS Exercício vs +CS Sedentário: 1.308 ± 0.071 vs. 0.513 ± 0.231 , $p<0.0001$; +CS Exercício vs -CS Sedentário: 1.308 ± 0.071 vs. 0.378 ± 0.058 , $p<0.0001$), bem como entre o grupo de animais exercitados e o grupo sedentário, ambos sem exposição à fumaça de cigarro (*CuZnSOD* -CS Exercício vs -CS Sedentário: 0.623 ± 0.145 vs 0.378 ± 0.058 , $p=0.0363$).

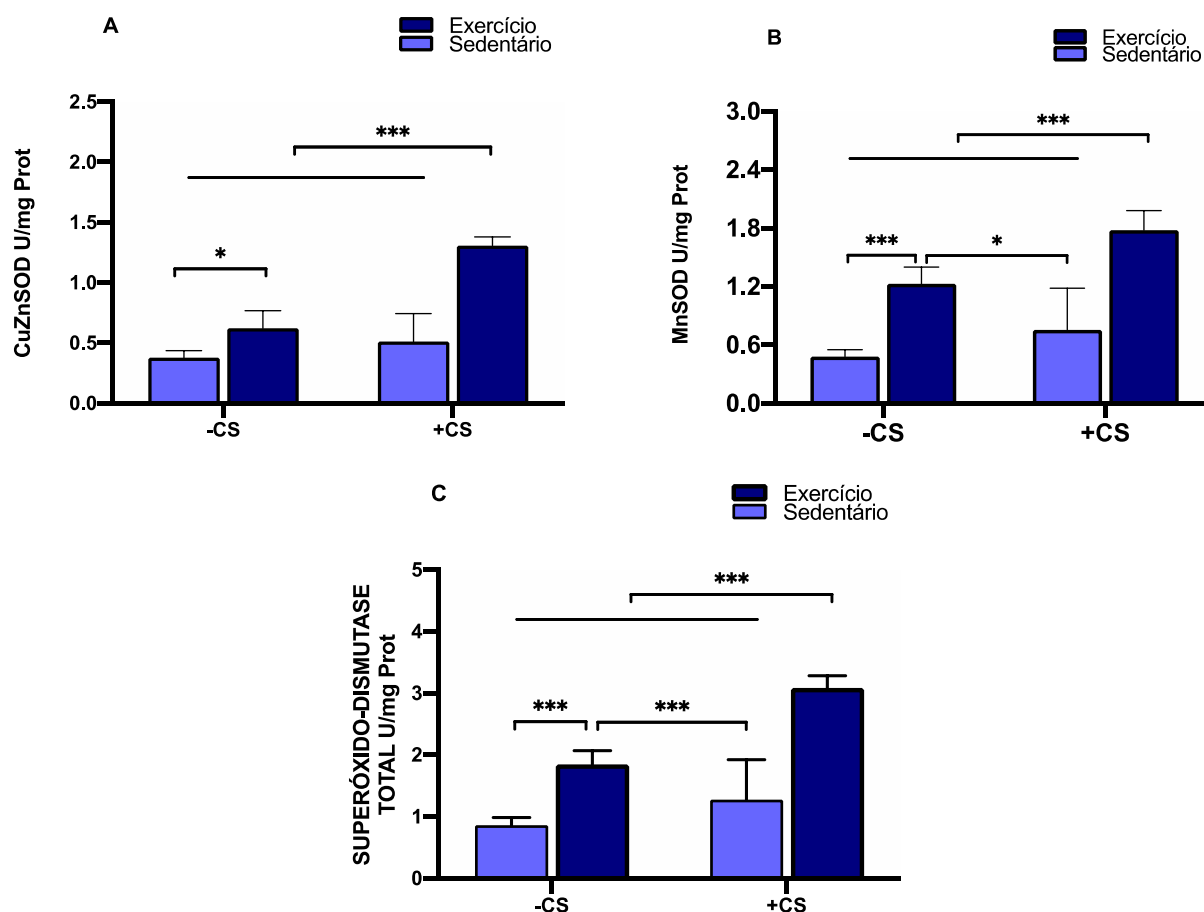


Fig. 23. Efeito do exercício sobre a quantificação da Superóxido dismutase em suas formas (A) CuZnSOD, (B) MnSOD e (C) SOD Total na formação hipocámpal de ratos adultos expostos à fumaça de cigarro. Os Valores são apresentados em Média \pm DP (n=6), Valor * <0.05 , ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Sedentário), Exercício sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Exercício), Sedentário expostos à fumaça de cigarro (+CS Sedentário) e Exercício e expostos à fumaça de cigarro (+CS Exercício). (Two-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

Tabela 2. Medidas de enzimas e peptídeos do sistema de defesa antioxidante e interação da exposição à fumaça de cigarro e do exercício.

Grupos	Glutationa Total	GSH	GSSG	Catalase	Superóxido Dismutase Total	CuZnSOD	MnSOD
-CS Sedentário	50.62 ± 27.86 ^a	17.39 ± 9.99 ^a	33.23 ± 17.94 ^a	1.45 ± 0.43 ^a	0.85 ± 0.12 ^a	0.37 ± 0.05 ^a	0.48 ± 0.07 ^a
-CS Exercício	103.21 ± 32.69 ^a	37.21 ± 6.79 ^a	65.99 ± 38.11 ^a	4.85 ± 1.26 ^{ac}	1.84 ± 0.22 ^{ac}	0.62 ± 0.14 ^{ac}	1.22 ± 0.17 ^{ac}
+CS Sedentário	78.78 ± 23.79 ^b	24.73 ± 10.05 ^b	54.04 ± 24.18 ^b	6.35 ± 6.58 ^a	1.27 ± 0.64 ^a	0.51 ± 0.23 ^a	0.75 ± 0.42 ^a
+CS Exercício	366.91 ± 127.16 ^a	105.39 ± 32.97 ^b	261.54 ± 105.77 ^b	18.08 ± 4.39 ^c	3.08 ± 0.19 ^c	1.30 ± 0.07 ^c	1.78 ± 0.20 ^c
Efeitos							
*Efeito da Exposição à Fumaça de cigarro (CS)	F = 27.50 p < 0.0001	F = 25.63 p < 0.0001	F = 20.73 p = 0.0002	F = 30.59 p < 0.0001	F = 31.41 p < 0.0001	F = 48.86 p < 0.0001	F = 15.88 p = 0.0007
**Efeito do Exercício	F = 37.49 p < 0.0001	F = 45.38 p < 0.0001	F = 25.57 p < 0.0001	F = 21.30 p < 0.0001	F = 90.44 p < 0.0001	F = 78.60 p < 0.0001	F = 72.66 p < 0.0001
***Interação CS x Exercício	F = 17.91 p = 0.004	F = 16.63 p = 0.0006	F = 13.52 p = 0.0015	F = 6.443 p = 0.0196	F = 7.805 p = 0.0112	F = 21.98 p = 0.0001	F = 1.751 p = 0.2007

-Valores expressos como média ± desvios padrão; Grupos: Grupos: Sedentário sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Sedentário), Exercício sem exposição à fumaça de cigarro (-CS Exercício), Sedentário expostos à fumaça de cigarro (+CS Sedentário) e Exercício e expostos à fumaça de cigarro (+CS Exercício). GSH: Glutationa reduzida. GSSG: Glutationa oxidada. CuZnSOD: Superóxido dismutase citosólica. MnSOD: Superóxido dismutase mitocondrial.

*Efeito da Exposição crônica à fumaça do cigarro (CS): Valores de F e p na análise da ANOVA two way.

**Efeito do Exercício: Valores de F e p na análise de ANOVA two way.

***Interação do CS x Exercício: Valores de F e p na análise de ANOVA two way.

-Diferentes letras representam diferenças estatísticas (p < 0,05).

Após verificar várias alterações causadas pelo exercício e fumaça de cigarro nas respostas de fatores neurotróficos expressos na formação hipocampal, nosso objetivo foi entender se esse processo poderia alterar o estresse oxidativo. Na Tabela 2 apresentamos as medidas das enzimas e peptídeos envolvidos no sistema de defesa antioxidante e as interações a partir das intervenções desta pesquisa.

A realização desta pesquisa proporcionou a elaboração de um artigo científico original, com base nos resultados obtidos. O artigo foi submetido à revista internacional *Brain Research Bulletin*, e foi redigido e configurado conforme as normas da revista. Esta revista explora os conhecimentos dos mecanismos moleculares e celulares que estão subjacentes às propriedades neurais associadas ao comportamento, cognição e outras funções cerebrais durante o neurodesenvolvimento e na fase adulta, sendo classificada como A2, na área de Educação Física, de acordo com a classificação de periódicos 2013-2016, disponível na plataforma sucupira da CAPES. Possui um fator de impacto de 3.440.

7. DISCUSSÃO

O Exercício é reconhecido por gerar modificações nas neurotrofinas, adaptações ao estresse oxidativo e normalizar as funções cognitivas (Novkovic, 2015). O hipocampo, região do cérebro relacionada com essas funções cognitivas, como aprendizagem e memória, é altamente sensível ao estímulo ou estresse induzido pelo exercício físico (Prakash, 2015; Biedermann, 2016). Nessa região, o exercício físico é capaz de promover alta responsividade do BDNF (Klintsova, 2004; Rasmussen, 2009; Lapmanee, 2017; Fernandes, 2017), além de respostas em proteínas como Sinapsina e CREB, confirmando o papel das neurotrofinas nos potenciais mecanismos para a promoção da neuroplasticidade e consequentemente melhorias cognitivas (Neeper, 1995; Ollif 1998; Berchtold, 2002; Farmer, 2004; Gomez-Pinilla, 2012).

Nossa pesquisa corroborou achados anteriores ao observarmos que o exercício físico foi capaz de promover a elevação da expressão hipocampal do BDNF e de seu receptor TrkB. Esse é um aspecto importante, confirmando o treinamento de natação utilizado nesta pesquisa, considerado exercício físico de nível moderado, foi suficiente para promover a expressão da neurotrofina e seu receptor. O exercício físico também foi capaz de proteger o impacto negativo da exposição à fumaça de cigarro ao observarmos a elevação da BDNF no grupo com duas variáveis (exercício e fumaça). Fato este reforçado pelas pesquisas prévias onde a exposição crônica à fumaça de cigarro - diferentemente de exposição aguda - pode reduzir os níveis de BDNF (Tuon, 2010; Xiao, 2016), e também de seus fatores de transcrição, tanto no hipocampo quanto em outras regiões cerebrais (Sun, 2007; Tang, 2008; Novak, 2010; Ortega, 2013).

A nicotina, um conhecido agente neurotóxico constituinte da fumaça de cigarro, tem mostrado gerar mudanças nos níveis de BDNF e uma possível explicação encontrada para esta redução está pode estar na diferença da expressão, ativação e dinâmica dos receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) de animais adultos expostos comparado com não expostos à fumaça de cigarro (Faraday, 2001; Doura, 2008). Após a aspiração da fumaça de cigarro, a nicotina atinge o cérebro em poucos segundos e se propaga para regiões como núcleo acumbens, hipocampo e tronco cerebral (Meirelles, 2009) interagindo com os receptores nAChRs presentes nas membranas dos neurônios (Renda, 2012). Os receptores colinérgicos nicotínicos são altamente expressos na formação hipocampal (Dani, 2001; Kawai et al., 2002). Assim, a ativação destes receptores altera a dinâmica de neurotransmissores no hipocampo e pode causar rápida mudança no conjunto das

neurotrofinas e na interação de neurotrofinas com os receptores colinérgicos nicotínicos, explicando parte dos efeitos neuroquímicos da nicotina.

Machalani (2018) relata o possível mecanismo pelo qual o principal constituinte da fumaça de cigarro pode induzir mudanças nos níveis de BDNF e TrkB. Na presença da fumaça de cigarro - e obviamente de nicotina - os nAChRs são ativados através das suas subunidades moleculares específicas. Após a ligação, ocorre um forte influxo de cálcio intracelular que causa a liberação de BDNF. O aumento na liberação de BDNF, e de sua ligação ao TrkB, com elevado níveis intracelulares de Ca^{2+} , afeta as cascatas subsequentes que regulam a sobrevivência celular e a atividade sináptica. De forma compensatória, pode ocorrer a dessensibilização dos nAChRs reduzindo a atividade desta via de sinalização celular e causando ações opostas, diretamente relacionadas com a consequente diminuição na geração de segundos mensageiros do agonista nicotina (Ventura, 2010). A diminuição na expressão da BDNF pode resultar na redução da neuroproteção a insultos subsequentes ou também a morte neuronal. Por outro lado, a exposição aguda à nicotina pode ocasionar elevação na expressão no BDNF, significando uma potencial proteção na tentativa de neutralizar os efeitos de constituintes da fumaça de cigarro. Como resposta adaptativa a essas variações, a expressão de TrkB pode estar elevada ou reduzida, garantindo a homeostase nas funções do BDNF/TrkB (Tongiorgi, 2008), fato por demais importante dado que na sequência outras proteínas envolvidas na sinalização intracelular da neurotrofina poderão ser afetadas.

A cascata intracelular do BDNF/TrkB envolve várias vias de sinalização, como PI3K/Akt, PLC- γ , GTP-ases e MAPK/ERK/CREB (Kowianski, 2018). Na via de transcrição de genes dependente do CREB, desencadeada pelo influxo inicial de cálcio, ativa-se a adenilciclase para converter adenosina difosfato intracelular (ADP) em adenosina monofosfato cíclico. O aumento da concentração de cAMP na célula ativa a proteína quinase A (PKA), que está criticamente envolvida na memória (Abel, 2008). A PKA fosforila o CREB (Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP), e posteriormente ocorre a tradução da proteína. Estudos também sugeriram que a PKA pode ativar a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosforilando as quinases reguladas por sinal extracelular ERK1/2, que ativa o CREB (Impey, 1998). Sabe-se que a nicotina, contida na fumaça de cigarro, é uma agonista dos nAChRs e, quando em exposição aguda pode diretamente ativar tais receptores e as vias neuronais acima mencionados e modular a memória.

Em nosso estudo, o exercício físico foi capaz de elevar os níveis de CREB e AKT, reforçando a ideia dos mecanismos de ação ativados pela sinalização do BDNF/TrkB (Chen, 2009). Vários estudos mostram que o exercício físico induz elevação nos níveis de CREB, onde age como

modulador positivo da neuroplasticidade hipocampal. Estudos sugerem que a nicotina tem impacto direto sobre a cascata de sinalização para mediar a atividade do CREB sendo esse processo controlado por canais iônicos (Carlezon, 2005). Sua fosforilação pode ocorrer por muitas vias de sinalização e induz transcrições gênicas e síntese proteica e, conseqüentemente, participando de modificações estruturais, plasticidade sináptica, sobrevivência celular, LTP e aprendizagem (Eckel-Mahan, 2008). Sob a exposição de nicotina, Kowianski (2018b) demonstrou que a formação hipocampal respondeu com aumento significativo na expressão e ativação do CREB. Contudo, em nosso estudo os valores mais baixos de CREB foram justamente dos grupos expostos à fumaça de cigarro, mesmo quando estes eram submetidos ao exercício físico. Essa mesma dinâmica também foi observada para AKT, p38, STAT3 e STAT5, ou seja, o exercício físico sendo capaz de promover o aumento significativo no nível destas proteínas e a condição exercício físico concomitante a exposição à fumaça, ou somente a exposição à fumaça, não registrando as mudanças que o exercício físico induziu de forma isolada. Henrique (2018) encontrou elevação significativa nos níveis de AKT e p38, dentre outras proteínas, ao analisar as diferenças entre tipos de exercício físico. Esses achados corroboram outro estudo prévio que mostra o impacto do exercício físico sobre as proteínas intracelulares da família MAPK (Cardoso, 2017). Essas quinases hipocampais podem ser ativadas pelo exercício físico, e reduzidas ou não serem afetadas direta ou indiretamente pela nicotina encontrada na fumaça de cigarro - e sendo exposição aguda até ter aumento significativo - acabando por modular a plasticidade hipocampal e paralelamente a aprendizagem e memória hipocampal-dependente (Kutlu, 2016).

A ativação da família MAPK hipocampal não está limitada aos receptores de neurotransmissores. Um dos ativadores mais estudados é o BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro, responsivo ao estímulo do exercício físico. Seguente a ligação BDNF/TrkB, após a ativação das MAPKs pode ter impacto sobre a plasticidade sináptica na área CA1 hipocampal (Sweatt, 2008). Além da sinalização do complexo BDNF/TrkB, as espécies reativas de oxigênio também podem ativar as MAPKs por mecanismos que ainda estão totalmente esclarecidos, mas que atuam como mensageiros celulares na LTP-potenciação de longo prazo hipocampal (Kanterewicz, 1998; Klann, 1999). A potenciação de longo prazo é uma forma robusta e duradoura de plasticidade sináptica e principal candidata enquanto mecanismo celular que contribui para a aprendizagem e memória. Chama a atenção que entre as MAPKs por nós pesquisadas, somente a p38 apresentou níveis elevados quando no exercício físico, inclusive com diferença significativa do grupo que realizou exercício físico, mas com exposição à fumaça de cigarro. Se a via BDNF/TrkB (que pode ser estimulada pelo exercício físico) e o estresse oxidativo (que pode ocorrer pela exposição à fumaça de cigarro), são ativadoras da p38 MAPK, qual justificativa para o fato que o grupo exercício físico

com exposição à fumaça de cigarro não tenha gerado níveis elevados da proteína quinase ? É justamente pela condição excessiva dos ativadores que os níveis passam a ser inibidas. Knapp (2002) vai nos dizer que dependendo da espécie reativa e quais os níveis gerados, os efeitos podem ser benéficos ou deletérios em relação as respostas celulares. Por exemplo, existem evidências que a produção do ânion superóxido é necessário para várias funções e comunicações celulares. Contudo, a produção excessiva do superóxido pode levar à geração de peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila, que interferem nas funções e comunicações celulares. Estas observações sugerem que existe uma continuidade funcional de espécies reativas no qual é dependente da força da oxidação ditada pela concentração de ROS e/ou pelo tipo de espécie oxidativa gerada. Por sua vez, a concentração e/ou tipo dessa ROS ditarão quais as cascatas de sinalização impactadas e se as respostas celulares ocorrerão ou serão bloqueadas.

O exercício é provavelmente o estímulo fisiológico que altera a equilíbrio redox mais amplamente estudado nas pesquisas biológicas sobre estresse oxidativo (Finkler, 2013; Radak, 2014). Sob nossas condições experimentais, observamos que os animais do grupo exercitados expostos à fumaça de cigarro apresentaram aumento significativo dos níveis de todas as quantificações das enzimas testadas, como a Catalase, Superóxido Dismutase Zinco-Cobre-dependente e a Superóxido Dismutase Manganês-dependente, bem como o peptídeo Glutathione, mas sem alterar a proporção entre as formas reduzida e oxidada (Relação GSH/GSSG). E mais, a SOD total, a mitocondrial e a citosólica, também apresentaram níveis significativamente elevados quando submetido somente ao programa de treinamento em natação, apontando o forte papel do exercício físico na ativação dos sistemas antioxidantes, confirmando os achados de outras pesquisas. Radak (2006) demonstrou elevação cerebral significativa na atividade da SOD hipocampal em ratos submetidos a 8 semanas de exercício na esteira (cerca de 130% maior do que o grupo sedentário). Nonato (2016) encontrou resultados de oxidantes e antioxidantes similares em animais submetidos ao treinamento de natação, assim como Souza (2009) encontrou significativa atividade da SOD cortical em ratos após 6 semanas da mesma modalidade de treinamento. Esses resultados podem ser entendidos inicialmente como mecanismo compensatório e adaptativo, dado que o exercício físico induz a produção das espécies reativas, devido ao aumento do consumo de oxigênio e à ativação de reações fisiológicas durante e após a interrupção do exercício físico, promovendo o aumento de atividades enzimáticas e não enzimáticas, bloqueando o excesso de espécies reativas e protegendo o cérebro de danos oxidativos (Ji, 2006; Radak, 2008; Fisher-Wellman, 2009). Nossas condições experimentais, em última instância, oportunizam o entendimento de que o aumento das enzimas e peptídeos antioxidantes, pode ser interpretado tanto um aumento na proteção ao dano oxidativo, quanto uma adaptação específica para lidar com a geração contínua de oxidantes a partir do exercício

físico (perceptível no caso da SOD zinco-cobre-dependente e SOD manganês-dependente), ou pela dupla exposição: exercício físico e fumaça de cigarro (no caso da Catalase e dos tripeptídeos Glutathiona total, reduzida e oxidada). A exposição à fumaça de cigarro de forma isolada, não foi capaz de gerar níveis elevados nos marcadores do estresse oxidativo que utilizamos, possivelmente o método e/ou o protocolo que adotamos na geração e aspiração de fumaça de cigarro pelos animais por si só não foi suficiente para provocar as esperadas respostas.

Sobre correlações específicas do BDNF, foi possível de estabelecer entre a neurotrofina e o desempenho comportamental, no caso, uma medida da atividade motora (locomoção horizontal) e uma medida da memória (índice de discriminação), mas mesmo assim encontramos r moderado, 0.51 e 0.61, respectivamente.

Em relação ao desempenho em atividades motoras, nossos resultados revelaram que o exercício físico, com ou sem exposição à fumaça de cigarro, não foi suficiente para modificar a locomoção total, apesar do exercício físico conferir significativo aumento do número de quadrantes caminhados pelos animais no teste de campo aberto. Por outro lado, a exposição à fumaça de cigarro isolada não foi capaz de gerar efeitos psicoativos, mas bloqueou o efeito do exercício físico sobre o aumento de mobilidade horizontal quando o exercício físico foi concomitante a exposição à fumaça. A ausência de resposta significativa para os grupos que receberam a exposição à fumaça de cigarro pode estar potencialmente relacionada com disfunção da neurotrofina nas regiões cerebrais responsiva à nicotina. Resultados similares foram publicados por Bandiera (2019), que não encontrou diferenças na locomoção total em animais expostos à fumaça de cigarro, e por Tuon (2010), que encontrou resultado similar ao nosso, mas pela medida da imobilidade, com maior tempo (seg) para os grupos de animais expostos à fumaça de cigarro, com ou sem exercício, mas sem diferenças significativas nas medidas de crossing (horizontal) e rearing (vertical) entre os grupos exercício e fumaça de cigarro. Devi (2020) observou deterioração na atividade motora e atribuiu o impacto negativo da exposição crônica à fumaça de cigarro na locomoção a sua correlação com a redução na expressão dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 e colinérgicos nicotínicos, no qual estão relacionados com o desempenho motor do animal. Por outro lado, estudos de Miller (2007), ao expor animais à fumaça de cigarro durante 7 semanas, observou um aumento das atividades locomotoras (horizontal, vertical e total). O autor atribui esse efeito estimulante dos componentes da fumaça de cigarro sobre o sistema dopaminérgico e demonstrou que tanto os níveis de dopamina quanto dos receptores D1 e D2 encontravam-se significativamente elevados, assim como sua ação sobre os receptores pós-sinápticos nAChRs. Por fim, já é bem descrito que o principal componente psicoativo da fumaça de cigarro, a nicotina, interage com os sistemas neurotransmissores colinérgicos, adrenérgicos e dopaminérgicos no SNC (Benowitz, 2008; Koob,

2010), contudo, os mecanismos específicos que estão envolvidos nestas contraditórias expostas não estão totalmente esclarecidos.

Os achados sobre a memória hipocampal-dependente a partir da aplicação de testes específicos em nossos grupos experimentais trouxeram informações interessantes. Nossos dados comprovam que o exercício garantiu potencial benéfico ao animal ao explorar por mais tempo os objetos (novos + usados) comparado aos demais grupos e ainda permitiu diferenciar o novo objeto do objeto familiarizado, em comparação aos expostos à fumaça de cigarro, com ou sem exercício. Por sinal, ao ser submetido ao exercício mesmo estando exposto à fumaça de cigarro, também permitiu explorar e discriminar mais, logo conferiu memória melhor do que os exclusivamente expostos à fumaça de cigarro. Estes últimos demonstraram fraca capacidade de discriminar um objeto previamente explorado de um novo objeto, um sinal da perda de memória. A atividade exploratória dos objetos entre os expostos à fumaça de cigarro é significativamente menor do que dos não expostos, quando se trata de analisar os resultados de exercitados, garantindo assim que o protocolo de exercícios físico adotado foi fundamental para reverter o efeito prejudicial dos componentes da fumaça de cigarro sob a memória de reconhecimento dos objetos.

Em nosso experimento, mesmo tendo o exercício físico gerado melhor desempenho em teste de memória hipocampal-dependente, contraditoriamente as proteínas sinapsina e PSD-95 não apresentaram diferenças entre os grupos. Podemos entender que, como mostrado, o exercício gerou alterações nos níveis da neurotrofina BDNF e seu receptor TrkB e essa sinalização é importante para a performance cognitiva, seja a aquisição ou manutenção (Novkovic, 2015) mas sua importância é efetiva em respostas específicas, não da mesma forma para a plasticidade sináptica e para memória hipocampal-dependente (Aarse, 2016). Inúmeros estudos prévios identificaram de que o exercício físico influenciou significativamente o desempenho avaliado através da tarefa de reconhecimento de objetos. Nossos dados corroboram os achados de Antunes (2012) no qual o TRO mostrou que 8 semanas de exposição à fumaça de cigarro foi o suficiente para gerar fraca capacidade de discriminar um objeto previamente explorado de um novo objeto, um sinal de perda de memória. Heldt (2007) mostrou que a eliminação de BDNF dentro do hipocampo reduziu a quantidade de tempo gasto com o novo objeto em comparação com o objeto habituado, e que os níveis de BDNF hipocampal correlacionam-se com o desempenho no TRO.

8. CONCLUSÃO

A avaliação de parâmetros neurotróficos, oxidativos e comportamentais nesta pesquisa possibilitou concluir que o protocolo moderado do exercício físico garante maior neuroproteção ao elevar os níveis de BDNF hipocampal, garante maior equilíbrio no estado redox por não gerar o estresse oxidativo; aumenta a concentração de fatores de transcrição em resposta a efeito inflamatório e melhora a memória episódica de longa duração envolvida no reconhecimento de objetos, bem como a atividade locomotora. O exercício físico quando associado a exposição à fumaça de cigarro reduzem a neuroproteção e aumentam as concentrações de espécies reativas e do sistema antioxidante na formação hipocampal, além de não ofertar melhorias na locomoção nem na memória.

Portanto, a associação entre exercício físico e cigarro potencializa deletérios mecanismos neurais na formação hipocampal de ratos, representando maior risco para a integridade celular e fisiológica. Estudos adicionais avaliando outros parâmetros relacionados as alterações de neurotransmissores, neuroinflamação, apoptose e sobrevivência celular, volume hipocampal e novos marcadores comportamentais de aprendizagem e memória, entre outros, são necessários para auxiliar na compreensão dos efeitos do uso combinado de exercício físico e cigarro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarse J, Herlitze S, Manahan-Vaughan D. The requirement of BDNF for hippocampal synaptic plasticity is experience-dependent. *Hippocampus*. 2016 Jun; 26(6): 739-51.

Abel T, Nguyen PV. Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Prog Brain Res*. 2008; 169:97-115.

Aguiar AS, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos ARS, Tasca CI, Latini A, Prediger RDS. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2011. 132: 560-567.

Alberini CM, Kandel ER. The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Dec 4;7(1): 021741.

Alkadhi KA. Exercise as a Positive Modulator of Brain Function. *Mol Neurobiol*. 2018 Apr;55(4):3112-3130.

Alkam, T, Nabeshima, T. Molecular mechanisms for nicotine intoxication. *Neurochemistry International*. 2019:125;117-12.

Almaraz-Espinoza A, Grider MH. Physiology, Long Term Memory. 2020 Jul 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan.

Alsina B, Vu T, Cohen-Cory S. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci*. 2001 Nov;4(11):1093-101.

Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci*. 2017 Jun;18(6):335-346.

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, 2007.

Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process*. 2012;13(2):93–110.

Arida RM, Scorza FA, Scorza CA, Cavalheiro EA. Is physical activity beneficial for recovery in temporal lobe epilepsy? Evidences from animal studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009 Mar;33(3):422-31.

Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2010, 34, J258-J265.

- Baddeley AD, Eysenck MW, Anderson MC, Memory. Hove, UK. Psychology Press Lt, 2009.
- Bandiera S, Caletti G, Giustina CLD, Hansen AW, Deniz BF, Confortim HD, Pulcinelli RR, Nin MS, Silva LOP, Gomez R. Changes in behavioral and neuronal parameters by alcohol, cigarette, or their combined use in rats. *Behav Pharmacol.* 2019 Sep;30(6):490-499.
- Barker GRI, Evuarherhe O, Warburton EC. Remembering the order of serially presented objects: A matter of time? Version 2. *Brain Neurosci Adv.* 2019 Oct 23; 3:2.
- Barnett R, Moon G, Pearce J, Thompson L, Twigg L. Smoking geographies- space, place and tobacco. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, UK, 2017.
- Bayas A, Hummel V, Kallmann BA, Karch C, Toyka KV, Rieckmann P. Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine.* 2002 Jul 21;19(2):55-8.
- Bechara RG, Kelly ÁM. Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behavioural Brain Research,* 2013. 245: 96-100.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology.* 2014 Jan;76 Pt C:677-83.
- Benowitz NL, Henningfield JE. Establishing a nicotine threshold for addiction. The implications for tobacco regulation. *N Engl J Med.* 1994 Jul 14;331(2):123-5.
- Benowitz NL Neurobiology of nicotine addiction: implications for smoking cessation treatment. *Am J Med.* 2008, 121:3–10
- Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience* 2010: 167, 588–597.
- Berchtold NC, Kesslak JP, Cotman CW. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. *J Neurosci Res.* 2002 Jun 1;68(5):511-21.
- Beutler E. Disorders in glutathione metabolism. *Life Sci.* 1975 16:1499–1505.
- Biedermann SV, Fuss J, Steinle J, Auer MK, Dormann C, Falfán-Melgoza C, Ende G, Gass P, Weber-Fahr W. The hippocampus and exercise: histological correlates of MR-detected volume changes. *Brain Struct Funct.* 2016 Apr;221(3):1353-63.
- Bird CM. The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex.* 2017 Aug; 93:155-165.
- Bocalini DS, Carvalho EVA, de Sousa AFM, Levy RF, Tucci PJF. (2010). Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *European Journal of Applied Physiology,* 109(5), 909–914.

Bosch M, Hayashi Y. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol.* 2012 Jun; 22(3):383-8.

Bothwell M: Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research.* 2016; 5.

Boveris A, Repetto MG. Mitochondria are the main cellular source of O₂⁻, H₂O₂ and oxidative stress. Gelpi RJ, Boveris A, Poderoso JJ. *Biochemistry of oxidative stress. Physiopathology and clinical aspects. Advances in Biochemistry in Health and Disease 16.* Springer International Publishing Switzerland, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. *Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.* Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

Buchman AS, Yu L, Boyle PA, Schneider JA, De Jager PL, Bennett DA. Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults. *Neurology,* 2016 Feb 23;86(8):735-41.

Buckley MJ. The role of the perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory, and perception. *Q J Exp Psychol B.* 2005 Jul-Oct;58(3-4):246-68.

Buckley PF, Mahadik S, Pillai A, Terry AJr. Neurotrophins and schizophrenia. *Schizophr Res.* 2007 Aug;94(1-3):1-11.

Bunzeck N, Duzel E. Category-specific organization of prefrontal response-facilitation during priming. *Neuropsychologia.* 2006 44: 1765-1776.

Caeser M, Aertsen A. Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *The Journal of Comparative Neurology,* 1991 307(1), 87–106.

Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends in neurosciences.* 2005;28(8):436–445.

Camiletti-Moirón D, Aparicio VA, Aranda P, Radak Z. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 2013; 23, 202–212.

Cardoso FDS, França EF, Victorino AB, de Almeida AA, Fernandes J, Cabral FR, Venancia DP, Arida RM, Gomes da Silva S. Aerobic exercise reduces hippocampal ERK and p38 activation and improves memory of middle-aged rats. *Hippocampus,* 2017; 27 (8), 899–905.

Cassilhas RC, Tufik, S, de Mello MT. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016 73(5), 975–983.

Castardeli E, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo OS. Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats. *Arq. Bras Cardiol*. 2005; 84(4): 320-4.

Cay M, Naziroglu M, Köylü H. Selenium and vitamin E modulates cigarette smoke exposure-induced oxidative stress in blood of rats. *Biol Trace Elem Res*. 2009; 131, 62-70.

Chalimoniuk M, Jagsz S, Sadowska-Krepa SJ, Chrapusta SJ, Klapcinska B, Langfort J, Diversity of endurance training effects on antioxidant damage in different brain regions of adolescent male rats. *J. Physiol. Pharmacol*. 2015. 4, 539–547.

Chang RC-C, Ho Y-S, Wong S, Gentleman SM, Ng H-K. Neuropathology of cigarette smoking. *Acta Neuropathologica*, 2013 127(1), 53–69.

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Apr;4(4):299-309.

Chen C, Loo G. Cigarette smoke extract inhibits oxidative modification of lowdensity lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1995 Jan 20;112(2):177-85.

Chen MJ, Russo-Neustadt AA. Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. *Hippocampus*. 2009 Oct;19(10):962-72.

Cirulli F, Berry A, Chiarotti F, Alleva E. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus*. 2004;14(7):802-7.

Cobley JN, Close GL, Bailey DM, Davison GW. Exercise redox biochemistry: Conceptual, methodological and technical recommendations. *Redox Biol*. 2017 Aug 12:540-548.

CONCEA. Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. MCTI, Brasília, 2015. <http://www.sindan.org.br/sd/img/outros/concea.pdf>

CONCEA. Resolução normativa n. 13. MCTI, Brasília, 2013. https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-13-de-20.09.2013-D.O.U.-de-26.09.2012-Secao-I-Pag.-5.pdf

Constans A, Pin-Barre C, Molinari F, Temprado JJ, Brioché T, Pellegrino C, Laurin J. High-intensity interval training is superior to moderate intensity training on aerobic capacity in rats: Impact on hippocampal plasticity markers. *Behav Brain Res.* 2020 Oct 23; 398: 112977.

Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2002 Apr;30(2):280-5.

Cooper SJ, Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005 28:851 -874.

Cordova A, Gimenez M, Escanero JF. Effect of swimming to exhaustion, at low temperatures, on serum Zn, Cu, Mg and Ca in rats. *Physiology & Behavior.* 1990, 48(5), 595–598.

Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002 Jun;25(6):295-301.

Cotman CW, Engesser-Cesar C. Exercise enhances and protects brain function. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2002a 75–79.

Czegeny Z, Blazso M, Varhegyi G, Jakab E, Liu C, Nappi L. Formation of selected toxicants from tobacco under different pyrolysis conditions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2009, 85 (1-2): p. 47-53.

da Costa Daniele TM, de Bruin PFC, de Matos RS, de Bruin GS, Maia Chaves C Junior, de Bruin VMS. Exercise effects on brain and behavior in healthy mice, Alzheimer's disease and Parkinson's disease model-A systematic review and meta-analysis. *Behav Brain Res.* 2020 Apr 6; 383:112488.

Dani JA. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry.* 2001 Feb 1;49(3):166-74.

Dash P, Moore AN. Neurochemistry and molecular neurobiology of memory. Lajtha A, Blaustein JD. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology.* 3a ed. New York: Springer, 2007.

De Souto Barreto P, Demougeot L, Vellas B, Rolland Y. Exercise training for preventing dementia, mild cognitive impairment, and clinically meaningful cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *J Gerontol A. Biol Sci Med Sci.* 2017.

De Vincenti AP, Ríos AS, Paratcha G, Ledda F. Mechanisms That Modulate and Diversify BDNF Functions: Implications for Hippocampal Synaptic Plasticity. *Front Cell Neurosci.* 2019 Apr 9; 13:135.

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2005 Nov;84(3):214-21.

Devi K, Moharana B. Cigarette smoke extract triggers neoplastic change in lungs and impairs locomotor activity through wnt3a- β -catenin signaling in aged COPD rodent model. *Exp Lung Res.* 2020 Oct;46(8):283-296.

Ding Q, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience.* 2011 Sep 29; 192:773-80.

Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandevia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salamone JD, Van Hoomissen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ. Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring).* 2006 Mar;14(3):345-56.

Doura MB, Gold AB, Keller AB, Perry DC. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res.* 2008 Jun 18; 1215: 40-52.

Drougard A, Fournel A, Valet P, Knauf C. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front. Neurosci.* 2015, 9, 56.

Dube MF, Green CR. Methods of collection of smoke for analytical purposes; *Recent Adv. Tob. Sci.* 8, 1982, 42–102.

Eckel-Mahan KL. Circadian Oscillations within the Hippocampus Support Memory Formation and Persistence. *Front Mol Neurosci.* 2012 Apr 18; 5:46.

Edelmann, E., Leßmann, V., Brigadski, T. Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 2014 (76) 610–627.

Elsayed NM; Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutrition Research.* 2001 21: 551-567.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. *BehavBrain Res.* 1988: 31:4

Erickson, K.I., Miller, D.L., Roecklein, K.A. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. *Neuroscientist*, 2012 (18) 82-97.

Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem* 232, 243–248, 1995.

Faraday MM, Elliott BM, Grunberg NE. Adult vs. adolescent rats differ in biobehavioral responses to chronic nicotine administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 Dec;70(4):475-89.

Fares J, Bou Diab Z, Nabha S, Fares Y. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *Int J Neurosci.* 2019 Jun;129(6):598-611.

Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience.* 2004;124(1):71-9.

Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience.* 2004;124(1):71-9.

Farooqui AA, Farooqui T. *Diet and Exercise in Cognitive Function and Neurological Diseases.* New Jersey: Wiley-Blackwell, 2014.

Faux SP, Tai T, Thorne D, Xu Y, Breheny D, Gaca M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers.* 2009 Jul;14 Suppl 1:90-6.

Fernandes J, Arida RM, Gomez-Pinilla F. Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Sep; 80:443-456.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006; 36 (4): 327-58.

Finkler M, Lichtenberg D, Pinchuk I. The relationship between oxidative stress and exercise. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2014 Feb; 25(1): 1-11.

Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*, 2009, 8, 1-1.

Flynn JM, Melov S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, 62, 4–12.

Frankenburg, WG. Chemical changes in the harvested tobacco leaf, in *Advances in Enzymology*, Vol. VI, Interscience, New York, 1946, p. 344.

Freeman DJ, Packard CJ. Smoking and plasma lipoprotein metabolism. *Clin Sci (Lond).* 1995 Oct;89(4):333-42.

Furini CR, Rossato JI, Bitencourt LL, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus* 2010 May 21; 435:112-123.

Galdieri LC, Arrieta SR, Silva CM, Pedra CA, D'Almeida V. Homocysteine concentrations and molecular analysis in patients with congenital heart defects. *Arch Med Res*. 2007, 38:212–218.

Gaskin S, Tardif M, Cole E, Piterkin P, Kayello L, Mumby DG. Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behav Proc* 2010 83:61–71.

Gochman E, Reznick AZ, Avizohar O; Bem-Amotz A; Levy Y. Exhaustive exercise modifies oxidative stress in smoking subjects. *American Journal Medicine Science*. 2007 333: 346-353.

Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. Neurotrophins and Synaptic Plasticity. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 2013: 117–136.

Gomez-Pinilla F, Hillman C. The influence of exercise on cognitive abilities. *Compr Physiol*. 2013 Jan;3(1):403-28.

Goodwin VA, Richards SH, Taylor RS, Taylor AH, Campbell JL. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2008 Apr 15;23(5):631-40.

Griffin EW, Bechara RG, Birch AM, Kelly AM. Exercises enhances hippocampal-dependent learning in the rat: Evidence for a BDNF-related mechanism. *Hippocampus*, 2009, 19: 973-980.

Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*. 1934 18: 385–403.

Halliwell B, Gutteridge, JMC. *Free radicals in biology and medicine*. New York, Oxford University Press, 2007.

Harris KM. Sinapseweb. <https://synapseweb.clm.utexas.edu/hippocampus-rat>. Acesso em 01/janeiro/2020.

Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry*. 2007 Jul; 12(7): 656-70.

Hempstead BL. Deciphering proneurotrophin actions. *Handb Exp Pharmacol*. 2014; 220:17-32.

Henrique JS, França EF, Cardoso FDS, Serra FT, de Almeida AA, Fernandes J, Arida RM, Gomes da Silva S. Cortical and hippocampal expression of inflammatory and intracellular signaling proteins in aged rats submitted to aerobic and resistance physical training. *Exp Gerontol*. 2018 Sep;110: 284-290.

Hervouet E, Zhang J, Boyer-Guittaut M. Ros and epigenetics. Ahmad SI (ed.) Oxygen species in biology and human health. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton-FL, 2016.

Hillman CH, Erickson K, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):58-65.

Hu M, Zou W, Wang CY, Chen X, Tan HY, Zeng HY, Zhang P, Gu HF, Tang XQ. Hydrogen Sulfide Protects against Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Oxidative Stress in Hippocampus by Upregulation of BDNF-TrkB Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 2153745.

Huang AH, Jen CJ, Chen HF, Yu L, Kuo YM, Chen HI. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural Transm (Vienna)*. 2006 Jul;113(7):803-11.

Islam O, Loo TX, Heese K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT3 signaling pathways. *Curr Neurovasc Res*, 2009 6(1):42-53.

Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*. 1998 Oct;21(4):869-83.

Izquierdo I. *Memória*. 2a ed. Porto alegre: Artmed, 2011.

Jeffery KJ. The Hippocampus: From Memory, to Map, to Memory Map. *Trends Neurosci*. 2018 Feb;41(2):64-66. doi: 10.1016/j.tins.2017.12.004.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1067:425-435.

Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999 Jan;11(1):1-14.

Kandola K, Bowman A, Birch-Machin MA. Oxidative stress--a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int J Cosmet Sci*. 2015 Dec;37 Suppl 2:1-8..

Kashihara K, Maruyama T, Murota M, Nakahara Y. Positive effects of acute and moderate physical exercise on cognitive function. *J Physiol Anthropol*. 2009 Jun;28(4):155-64.

Kawai H, Berg DK. Nicotinic acetylcholine receptors containing alpha 7 subunits on rat cortical neurons do not undergo long-lasting inactivation even when up-regulated by chronic nicotine exposure. *J Neurochem*. 2001 Sep;78(6):1367-78.

Kehrer, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000, 149(1): 43–50.

Kelly A, Laroche S, Davis S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci*. 2003, 23:5354–5360.

Kerksick CM, Zuhl M. Mechanisms of oxidative damage and their impact on contracting muscle. Lamprecht M (ed.). *Antioxidants in sport nutrition*. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2015.

Kibet JK, Khachatryan L, Dellinger B. Molecular products from the pyrolysis and oxidative pyrolysis of tyrosine, *Chemosphere*, 2013, 91, 1026–1034.

Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; 1802(4), 396–405.

Klann E, Thiels E. Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1999 Apr; 23(3): 359–76.

Klntsova AY, Dickson E, Yoshida R, Greenough WT. Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. *Brain Res*. 2004 Nov 26;1028(1):92–104.

Knapp LT, Klann E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J Neurosci Res*. 2002 Oct 1; 70(1):1–7.

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35:217–238.

Koning D, Berg A. Exercise and oxidative stress: Is there a need for additional antioxidants. *Osterreichisches J. Fur Sportmedizin*, 2002: 6–15.

Kowianski P, Lietzau G, Steliga A, Czuba E, Ludkiewicz B, Waśkow M, Spodnik JH, Moryś J. Nicotine-induced CREB and DeltaFosB activity is modified by caffeine in the brain reward system of the rat. *J Chem Neuroanat*. 2018 Mar;88:1–12.

Kowianski P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Apr;38(3):579–593. (b)

Kregel KC. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. American Physiological Society. 2006. Available from: <http://www.the-aps.org/pa/action/exercise/book.pdf> (accessed 11 July 2020).

Kuczewski, N, Porcher, C, Gaiarsa, J-L. Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity. *European Journal of Neuroscience*, 2010 32(8), 1239–1244.

Kuipers SD, Trentani A, Tiron A, Mao X, Kuhl D, Bramham CR. BDNF-induced LTP is associated with rapid Arc/Arg3.1-dependent enhancement in adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep.*, 2016. Feb 18; 6: 2122.

Kutlu MG, Gould TJ. Nicotinic modulation of hippocampal cell signaling and associated effects on learning and memory. *Physiol Behav.* 2016 Mar 1; 155:162-71.

Lapmanee S, Charoenphandhu J, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats. *PLoS One.* 2017 Nov 3;12(11):e0187671.

Leal G, Bramham CR, Duarte CB. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitam Horm.* 2017; 104:153-195.

Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014, 76, 639–656.

Leasure JL, Jones M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*, 2008. 156: 456-465.

Lee JL, Hynds RE. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus.* 2013 Mar;23(3):233-44.

Lessmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res.* 2009 Sep;65(1):11-22.

Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Molecular Neurobiology*, 2019 May 56(5): 3295-3312.

Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD. Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat Neurosci.* 2017 Oct 26;20(11):1434-1447.

- Liu W, Xue X, Xia J, Liu J, Qi Z. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins. *J Affect Disord*. 2018 Feb; 227:126-135.
- Ma B, Stepanov I, Hecht SS. Recent Studies on DNA Adducts Resulting from Human Exposure to Tobacco Smoke. *Toxics*. 2019 Mar 19;7(1). pii: E16.
- Machaalani R, Chen H. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Its Tyrosine Kinase Receptor B (TrkB) and Nicotine. *NeuroToxicology*. 2018, 65, 186–195.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci*. 2008 Feb;11(2):131-3.
- Mattson MP. Evolutionary aspects of human exercise—born to run purposefully. *Ageing research reviews* 2012: 11, 347–352.
- Meirelles RHS. Tabagismo e DPOC - dependência e doença – fato consumado. *Pulmão RJ* 2009: 1(1), 13-19.
- Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Dec 10(12):850-60.
- Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Front Cell Neurosci*. 2019 Aug 7; 13:363.
- Mitre M, Mariga A, Chao MV. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Jan 1;131(1):13-23.
- Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem*. 2003 Apr;384(4):567-74.
- Molteni R, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci*. 2002 Sep;16(6):1107-16.
- Montagrin A, Saiote C, Schiller D. The social hippocampus. *Hippocampus*. 2018 Sep;28(9):672-679.

Moretto G, Xu RY, Walker DG, Kim SU. Co-expression of mRNA for neurotrophic factors in human neurons and glial cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994 Jan;53(1):78-85.

Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*. 1995 Jan 12;373(6510):109.

Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res*. 1996 Jul 8;726(1-2):49-56.

Nonato LF, Rocha-Vieira E, Tossige-Gomes R, Soares AA, Soares BA, Freitas DA, Oliveira MX, Mendonça VA, Lacerda AC, Massensini AR, Leite HR. Swimming training attenuates oxidative damage and increases enzymatic but not -enzymatic antioxidant defenses in the rat brain. *Braz J Med Biol Res*. 2016 Sep 29;49(10): e5310.

Novak G, Seeman P, Le Foll B. Exposure to nicotine produces an increase in dopamine D2(High) receptors: a possible mechanism for dopamine hypersensitivity. *Int J Neurosci*. 2010 Nov;120(11):691-7.

Novkovic T, Mittmann T, Manahan-Vaughan D. BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. *Hippocampus*. 2015 Jan; 25(1):1-15.

O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial and -spatial learning. *Behavioural Brain Research*. 2007 176: 362-366.

Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Oct 30;61(1-2):147-53.

Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Oct 30;61(1-2):147-53.

Ortega LA, Tracy BA, Gould TJ, Parikh V. Effects of chronic low- and high-dose nicotine on cognitive flexibility in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 2013 Feb 1; 238: 134-45.

Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol* 2003; 81:221-4.

Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Jan; 14(1): 7-2

Peacock A, Leung J, Larney S, Colledge S, Hickman M, Rehm J, Giovino GA, West R, Hall W, Griffiths P, Ali R, Gowing L, Marsden J, Ferrari AJ, Grebely J, Farrell M, Degenhardt L. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction*. 2018 May 10.

Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*, 2004, 7(2): p. 97-110.

Penpargkul S, Scheuer J. The effect of physical training upon the mechanical and metabolic performance of the rat heart. *J Clin Invest*. 1970 Oct;49(10):1859-68.

Portes LA, Tucci PJ. Swim training attenuates myocardial remodeling and the pulmonary congestion in wistar rats with secondary heart failure to myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2006 Jul;87(1):54-9.

Powers SK, Hogan MC. Exercise and oxidative stress. *J Physiol*. 2016 Sep 15;594(18):5079-80.

Poyhonen SES, Domanskyi A, Airavaara M. Effects of Neurotrophic Factors in Glial Cells in the Central Nervous System: Expression and Properties in Neurodegeneration and Injury. *Frontiers in Physiology*, 10, 2019.

Prakash RS, Voss MW, Erickson KI, Kramer AF. Physical activity and cognitive vitality. *Annu Rev Psychol*. 2015 Jan 3; 66:769-97.

Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol*. 2013 Sep 9; 23(17): R764-73.

Pryor WA, Hales BJ, Premovic PI, Church DF. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science*. 1983 Apr 22;220(4595):425-7.

Ra SM, Kim H, Jang MH, Shin MC, Lee TH, Lim BV, Kim CJ, Kim EH, Kim KM, Kim SS. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Neurosci Lett*. 2002 Nov 22;333(2):123-6.

Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int* 2006; 49: 387–392,

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):153-9.

Radak Z, Ihasz F, Koltai E, Goto S, Taylor AW, Boldogh I. The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. *Free Radic Res*. 2014 Jan;48(1):84-92.

- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci*. 2000 Mar;3(3):238-44.
- Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*. 2009 Oct;94(10):1062-9.
- Renda A, Nashmi R. Spectral confocal imaging of fluorescently tagged nicotinic receptors in knock-in mice with chronic nicotine administration. *J Vis Exp*. 2012 Feb 10;(60):3516.
- Roberts DL. Natural tobacco flavor; *Recent Adv. Tob. Sci*. 1988, 14. 49–81.
- Rodgman A, Perfetti TA. The chemical components of tobacco and tobacco smoke. Second edition. CRC press Taylor and Francis Group. Boca raton, FL, 2013.
- Romero-Granados R, Fontán-Lozano A, Delgado-García JM, Carrión AM. From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus*. 2010 May;20(5):584-95.
- Rosas-Vidal LE, Do-Monte FH, Sotres-Bayon F, Quirk GJ. Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology*. 2014 Aug 39(9): 2161-9.
- Rover Júnior L, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím. Nova* 2001, 24:1 Jan./Feb.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AMK. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 9:49, 2007.
- Sales AJ, Biojone C, Terceti MS, Guimarães FS, Gomes MV, Joca SR. Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. *Br J Pharmacol*. 2011 Nov;164(6):1711-21.
- Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch*. 2017 Jun;469(5-6):593-610.
- Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: The dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res*. 2011, 226:56-65.
- Seil FJ, Drake-Baumann R. Neurotrophins and activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *Prog Brain Res*. 2000; 128:219-29.

Sen CK, Packer L, Hänninen, O. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Amsterdam, Elsevier Science, 2000.

Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2001, 33(3), 368-370.

Seo DY, Lee SR, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Han J. Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflugers Arch*. 2014 Sep;466(9):1673-87.

Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20; 86:715-748.

Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jul;21(7):363-383.

Signor C, Girardi BA, Lorena Wendel A, Frühauf PKS, Pillat MM, Ulrich H, Mello CF, Rubin MA. Spermidine improves the persistence of reconsolidated fear memory and neural differentiation in vitro: Involvement of BDNF. *Neurobiol Learn Mem*. 2017 Apr;140: 82-91

Simani AS, Inoue S, Hogg JC. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. *Lab Invest*. 1974 Jul;31(1):75-81.

Skaper SD. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2018; 1727:1-17.

Smilin Bell G, Choib S, Krishnan J, Ruckmani K. Cigarette smoke and related risk factors in neurological disorders: An update. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jan; 85:79-86.

Smith AD, Zigmond MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp Neurol*. 2003 Nov;184(1):31-9.

Smith DM, Mizumori SJ. Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus*. 2006;16(9):716-29.

Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 2009; 50: 811–823.

Stampfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):377-84.

Sugar J, Moser MB. Episodic memory: Neuronal codes for what, where, and when. *Hippocampus*. 2019 Dec;29(12):1190-1205.

Sun D, Huang W, Hwang YY, Zhang Y, Zhang Q, Li MD. Regulation by Nicotine of Gpr51 and Ntrk2 Expression in Various Rat Brain Regions. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 32(1), 110–116.

Szuhany KL, Bugatti M, Otto MW. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J. Psychiatr. Res.* 2015; 60 56–64.

Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry*, 2008, 76(1), 1–10.

Tang SW, Chu E, Hui T, Helmeste D, Law C. Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. *Neurosci Lett.* 2008 Jan 24;431(1):62-5.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005; 25(22):5455-63

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969; 27, 502–522.

Tongiorgi E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci Res.* 2008 Aug;61(4):335-46.

Triviño-Paredes J, Patten AR, Gil-Mohapel J, Christie BR. The effects of hormones and physical exercise on hippocampal structural plasticity. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2016; 41, 23–43.

Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Fries GR, Silva LA, Kapczinski F, Quevedo J, Pinho RA. Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice. *Neurosci Lett.* 2010 May 7;475(1):16-9.

Valentine G, Sofuoglu, M. Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. *Curr Neuropharmacol.* 2018 May; 16(4): 403–414.

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

van Praag H. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 2009, 32; 283–290.

Vaynman S, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. *J Neurosci Res.* 2004 May 1;76(3):356-62.

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.* 2003; 122(3):647-57.

Von Bohlen und Halbach O, von Bohlen und Halbach V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell Tissue Res.* 2018 Sep; 373(3):729-741.

Voss JL, Bridge DJ, Cohen NJ, Walker JA. A Closer Look at the Hippocampus and Memory. *Trends Cogn Sci*. 2017; Aug;21(8):577-588.

Wang X-D, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russel RM. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given β -carotene supplements and exposure to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 60-6.

Weindruch R. Interventions based on the possibility that oxidative stress contributes to sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995 Nov;50 Spec 157-61.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.

WHO. Tobacco. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>. Jul, 2019. Acesso em 03/05/2020.

Willis D, Popovech M, Gany F, Zelikoff J. Toxicology of smokeless tobacco: implications for immune, reproductive, and cardiovascular systems. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2012;15(5):317-31.

Wu CL, Chen SD, Yin JH, Hwang CS, Yang DI. Nuclear factor- κ B-dependent sestrin2 induction mediates the antioxidant effects of BDNF against mitochondrial inhibition in rat cortical neurons. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(6):4126–4142.

Yacoubian TA, Lo DC. Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci*. 2000 Apr;3(4):342-9.

Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci*. 2009 Feb;12(2):113-5.

Zanin JP, Montroull LE, Volosin M, Friedman WJ. The p75 neurotrophin receptor facilitates TrkB signaling and function in rat hippocampal neurons. *Front Cell Neurosci*. 2019 Oct 29; 13:485.

Zemann A. Smoke Chemistry. Bernhard D. Cigarette smoke toxicity: linking individual chemicals to human diseases. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, Germany, 2011.

Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, PAIVA SA. Cigarette smoke exposure intensifies the ventricular remodeling process following myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 86: 276-282.