



Universidade Federal do Pampa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

HELEN LIDIANE SCHIMIDT

**DÉFICITS DE MEMÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO NA ISQUEMIA E
REPERFUSÃO CEREBRAL: PAPEL NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO
FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ VERDE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiana, RS, Brasil.

2014

HELEN LIDIANE SCHIMIDT

**DÉFICITS DE MEMÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO NA ISQUEMIA E
REPERFUSÃO CEREBRAL: PAPEL NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO
FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Bioquímica.

Área de concentração: Química e Bioquímica
de Produtos Biologicamente Ativos

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Pivetta Carpes

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Pâmela Billig Mello Carpes

Uruguaiana, RS, Brasil

HELEN LIDIANE SCHIMIDT

**DÉFICITS DE MEMÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO NA ISQUEMIA E
REPERFUSÃO CEREBRAL: PAPEL NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO
FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em 20 de junho de 2014.

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Felipe Pivetta Carpes - UNIPAMPA
Presidente/Orientador**

Prof. Dr. Fernando Benetti – UFRGS

Prof^ª. Dr^ª. Mauren Souza – UNIPAMPA

DEDICO

A Deus, que com certeza é o principal mediador dessa conquista. Aos meus pais Dalton e Maslova e meu irmão Deilon pelo amor, incentivo e apoio em todas minhas decisões e a família GNAP pelo coleguismo e amizade acima de tudo.

AGRADECIMENTO

Os dois anos de mestrado foram, sem dúvida, os dois anos mais intensos que vivi até aqui. E muitas pessoas fizeram parte dessa intensidade contribuindo para o resultado final, que é este trabalho e minha defesa de mestrado. Agora então é chegada a hora de expressar minha gratidão.

Em primeiro a Deus que guiou meu caminho, me deu proteção e coragem para superar os desafios e sabedoria para resolver os problemas e fazer as escolhas certas.

Logo, minha eterna gratidão à minha família, especialmente meu pai e minha mãe, que são exemplos de honestidade, caráter e construção em família. Com certeza o desejo de dar orgulho a eles foi uma das minhas motivações para continuar. Assim como, meu irmão Deilon, que é meu eterno amigo e guardião. E ainda, ao meu noivo Tiago o qual sou grata pelo apoio, encorajamento e paciência nos momentos de difíceis.

Do mesmo modo, devo agradecer, e também dividir a responsabilidade deste trabalho, com meu orientador Professor Dr. Felipe Pivetta Carpes que sempre me orientou de uma forma incentivadora me mostrando caminhos e me dando oportunidades. Sou, e serei eternamente grata por ele ter transformado o meu futuro e me sinto extremamente orgulhosa de tê-lo como orientador pelo grande profissional que é.

A professora Dra. Pamela Billig Mello Carpes, que cedeu o laboratório para a coleta de dados e que esteve presente em todas as etapas desse trabalho, meu muito obrigada.

A professora Dra. Francielli Weber Cibin e seu grupo de pesquisa pela ajuda nas análises bioquímicas; é uma honra tê-la como colaboradora neste trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis) que me recebeu no laboratório, em especial aos alunos Aline, Alexandre e Caroline pelo trabalho desempenhado e pela amizade

e companheirismo de domingo a domingo. Com certeza vocês fazem parte desse trabalho e viraram parte da minha vida.

E claro, ao meu grupo de pesquisa, o Grupo de Pesquisa em Neuromecânica (GNAP) do qual eu tenho maior orgulho, obrigada pela força e incentivo sempre.

Por fim, meu agradecimento às instituições. A Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) da qual eu tive o prazer de fazer parte desde sua criação, e me orgulho por isso. A universidade me faz acreditar que a educação é o caminho para um país melhor. Aos professores e coordenação do PPG Bioquímica, pelos ensinamentos, paciência e pelo apoio, principalmente na hora que eu quis me ausentar para fazer um intercâmbio.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio grande do Sul) pelo auxílio financeiro, na forma de bolsa de estudos e financiamento para pesquisa, respectivamente.

Ao Governo Canadense, que por meio do *Emerging Leaders in the Americas Program* (ELAP) financiou meu período de intercâmbio na *University of Alberta, Edmonton* no Canadá.

Ao *Human Neurophysiology Laboratory*, na figura do Professor David Collins e Professor Matheus Wiest, por me receberem e me ensinarem muita coisa em tão pouco tempo.

“Tenha coragem. Vá em frente. Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

DÉFICITS DE MEMÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL: PAPEL NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ VERDE

O acidente vascular cerebral isquêmico é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Entre os prejuízos observados nos sobreviventes, estão os déficits cognitivos para aprendizagem e memória. Acredita-se que essas deficiências são resultantes de danos secundários provocado pelo processo de isquemia-reperfusão, incluindo o estresse oxidativo. Estratégias para neuroproteção são investigadas para minimizar tais déficits após um evento isquêmico, especialmente aquelas capazes de modular o estresse oxidativo, seja melhorando a atividade antioxidante, ou diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Nesse estudo, nós investigamos o potencial neuroprotetor do exercício físico e do chá verde em um modelo animal de isquemia-reperfusão. Para isso, 80 ratos Wistar machos foram divididos em 8 grupos de acordo com a presença das intervenções para neuroproteção (8 semanas de exercício físico e/ou suplementação de chá verde) e para isquemia (oclusão, ou não, bilateral das carótidas comuns por 30 minutos). O exercício físico baseou-se em corrida, realizada em esteira, durante 30 minutos por dia, 5 vezes na semana. Para a suplementação com chá verde, a infusão foi colocada no lugar da água de beber, sendo trocada diariamente. Ao final das 8 semanas de intervenções foi realizado a cirurgia e 24h depois a memória foi avaliada em uma tarefa não aversiva e um teste de memória aversiva. Passados os testes comportamentais, o hipocampo e córtex pré-frontal

foram removidos para análise bioquímica de marcadores de estresse oxidativo. Os resultados mostraram que a isquemia-reperfusão prejudica a aprendizagem e a memória, além de aumentar espécies reativas de oxigênio no hipocampo e no córtex pré-frontal. Oito semanas de exercício físico e/ou suplementação com chá verde antes do evento de isquemia-reperfusão foram capazes de promover neuroproteção; ambos os tratamentos, por separado ou em conjunto, reduziram os déficits cognitivos e foram capazes de manter o nível funcional das enzimas antioxidantes.

Palavras-chaves: neuroproteção, antioxidantes; acidente vascular cerebral, reconhecimento de objetos, esQUIVA inibitória.

ABSTRACT

MEMORY DEFICITS AND OXIDATIVE STRESS IN CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION: NEUROPROTECTIVE ROLE OF PHYSICAL EXERCISE AND GREEN TEA SUPPLEMENTATION

Ischemic stroke is a major cause of morbidity and mortality all over the world. Among impairments observed in survivors is a significant cognitive learning and memory deficit. It is believed that these deficits are due to oxidative stress caused by ischemia-reperfusion. Neuroprotective strategies are investigated to minimize such deficits after an ischemic event, especially those strategies that modulate oxidative stress by improving the antioxidant activity or decreasing the production of reactive oxygen species. Here we investigated the neuroprotective potential of physical exercise and green tea in an animal model of ischemia-reperfusion. Eighty male Wistar rats were divided into 8 groups and subjected to 8 weeks of exercise and / or supplementation with green tea before submission to a surgery and transient cerebral ischemia or a sham operation. The physical exercise was treadmill running performed 5 times per week during 30 minutes and the green tea was put in place of drinking water and daily changed. Ischemia-reperfusion was performed by occlusion of the bilateral common carotid arteries during 30 min. Later, memory was evaluated in aversive and in a non-aversive tasks. Hippocampus and prefrontal cortex were removed for biochemical analyses of possible oxidative stress effects. Ischemia-reperfusion impaired learning and memory and reactive oxygen species were increased in the hippocampus and prefrontal cortex. Eight weeks of physical exercise and/or green tea supplementation before the ischemia-reperfusion event showed a neuroprotective effect; both treatments by separate

or together reduced the cognitive deficits and were able to maintain the functional level of antioxidant enzymes and glutathione.

Keywords: neuroprotective, antioxidant; stroke, inhibitory avoidance, object recognition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Esquema ilustrativo da arquitetura vascular cerebral no sentido transversal do rato (base cerebral).....	24
Figura 1.2 - Ilustração dos mecanismos de lesão cerebral na isquemia reperfusão com ênfase no estresse oxidativo	26
Figura 1.3 - Ilustração do cérebro de rato com destaque para as estruturas envolvidas na memória.....	29
Figura 1.4 - Teste de reconhecimento de objetos.....	29
Figura 1.5 - Teste da esQUIVA inibitória.....	30
Figura 1.6 - Instrumentos para testes comportamentais.....	32
Figura 1.7 - Esteira motorizada para ratos.	32
Figure 2.1 - Experimental design.	41
Figure 2.2 - Ischemia-reperfusion impairs memory in the object recognition task.	51
Figure 2.3 - Ischemia-reperfusion impairs aversive memory	52
Figure 2.4 - Effect of ischemia-reperfusion, physical exercise and green tea supplementation on antioxidant markers in the prefrontal cortex (right column) and the hippocampus (left column)	57
Figure 2.5 - Effects of ischemia-reperfusion, physical exercise, and green tea on biochemical markers in the prefrontal cortex (right) and hippocampus (left).....	59

LISTA DE TABELAS

Table 2.1 - Result of behavioral control tasks. Green tea supplementation and physical exercise along eighth weeks and ischemia-reperfusion surgery had no effect in the total time of exploration in OR task, locomotor and exploratory activities, anxiety and pain thresholds.⁵⁴

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

AVC – Acidente Vascular Cerebral

DCFH-DA - 2'7'diclorofluoresceína diacetato

DEF - Derivativo fluorescente oxidado

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECG - Epicatechin gallate

EGC - Epicatechin

EGCG - Epigallocatequina 3-galato

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GLT-1 - Glutamate Transporter-1

GPx - Glutathione peroxidase *ou* Glutathione peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSH - Glutathione *ou* Glutathione

GSSG - Glutathione disulfide

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

HClO₄ - Perchloric Acid

HO - Radical hidroxila

IA - Inhibitory Avoidance Task

MDA - Malondialdehyde

Na⁺/K⁺ - bomba sódio-potássio

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NADPH - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase

NOS - Óxido Nítrico Sintetase

O₂ - Oxigênio

O₂ – Ânion Superóxido

OF - Open field

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR - Object Recognition Task

PM - Plus maze;

ROS - Reactive oxygen species levels

SNC- Sistema Nervoso Central

TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances

TF - Tail Flick

VO₂max - Maximal oxygen consumption

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	18
CAPÍTULO I.....	20
1.1 INTRODUÇÃO	20
1.1.1 Natureza do Problema	20
1.1.2 Fundamentação Teórica	22
1.1.2.1 Acidente Vascular Cerebral (AVC)	22
1.1.2.2 Modelo Animal	23
1.1.2.3 Fisiopatologia da isquemia-reperusão	24
1.1.2.4 Estresse oxidativo.....	26
1.1.2.5 Memória	27
1.1.2.6 Testes Comportamentais e de Memória	29
1.1.2.6 Neuroproteção e neuroprotetores	30
1.1.2.7 Delimitação do tema	33
1.2.1 Objetivo Geral	35
1.2.2 Objetivos específicos	35
CAPITULO II	36
MEMORY DEFICITS AND OXIDATIVE STRESS IN CEREBRAL ISCHEMIA- REPERFUSION: NEUROPROTECTIVE ROLE OF PHYSICAL EXERCISE AND GREEN TEA SUPPLEMENTATION	36
ABSTRACT	37
HIGHLIGHTS.....	38
2.1 Introduction	39
2.2 Material and methods	40
2.2.1 Animals and experimental design	40
2.2.2 Exercise Protocol	42
2.2.3 Green tea supplementation	43
2.2.4 Ischemia-reperfusion surgery	43
2.2.5 Behavioral testing.....	44

2.2.5.1. Object recognition memory test	44
2.2.5.2. Inhibitory avoidance memory test.....	45
2.2.5.3 Control behavioral tasks.....	45
2.2.6 Biochemical testing	46
2.2.6.1 Tissue preparation	46
2.2.6.2 Glutathione (GSH)	46
2.2.6.3 Glutathione Peroxidase	47
2.2.6.4 Catalase	47
2.2.6.5 Reactive Oxygen Species (ROS)	47
2.2.6.6. Detection of TBARS level	48
2.2.7 Statistical Analysis	48
2.3 RESULTS	49
2.3.1 Animal weight and fluid intake.....	49
2.3.2 Indirect oxygen uptake (VO ₂)	49
2.3.3 Behavioral results.....	50
2.3.3.1 Object recognition memory test	50
2.3.3.2 Inhibitory avoidance memory test.....	51
2.3.3.3 Control behavioral tasks.....	52
2.3.4 Biochemical results: antioxidant markers	53
2.3.4.1 Glutathione (GSH)	53
2.3.4.2 Glutathione Peroxidase (GPx).....	55
2.3.4.3 Catalase	55
2.3.5 Biochemical results: oxidative stress markers	56
2.3.5.1 Reactive oxygen species (ROS)	56
2.3.5.2 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).....	58
2.4 DISCUSSION	60
CAPITULO III.....	63
3.1 DISCUSSÃO.....	63
3.2 CONCLUSÕES.....	68
3.3 APLICAÇÕES PRÁTICAS E PERSPECTIVAS FUTURAS	69
REFERÊNCIAS	70

APRESENTAÇÃO

Neste estudo avaliamos o papel do exercício físico e do chá verde como estratégias de neuroproteção em ratos Wistar submetidos à cirurgia de isquemia-reperfusão cerebral transitória. Para alcançar os objetivos traçados, realizamos intervenções envolvendo a suplementação com chá verde e exercício físico (corrida em esteira), durante 8 semanas antes de provocar uma lesão isquêmica por meio da oclusão bilateral temporária das carótidas comuns. Para as avaliações comportamentais e bioquímicas, utilizamos tarefas de memória e comportamento em ratos e avaliamos marcadores pró-oxidantes e antioxidantes em estruturas cerebrais associadas com aprendizado e a memória.

Esse estudo foi motivado pelo o aumento na incidência de acidente vascular cerebral (AVC) no Brasil e no mundo. Em uma grande parte, os pacientes que sobrevivem a um AVC ficam com sequelas motoras e cognitivas que alteram sua qualidade de vida, o que gera grande impacto econômico e social. Dessa forma, existe a necessidade de estudos que tenham como objetivo descobrir terapias capazes de proteger o tecido cerebral de pessoas que estão no grupo de risco de ter um AVC, tentando assim diminuir o impacto das sequelas e melhorando a qualidade de vida após um evento isquêmico.

Os resultados que compõem essa dissertação são parte do projeto de pesquisa com título “*Efeitos neuroprotetores do chá verde e do exercício físico na isquemia-reperfusão: Avaliação da memória e do estresse oxidativo em tecidos neurais*”, registrado junto à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Pampa com protocolo de registro nº 10.013.13 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa, com parecer de aprovação nº 013/2012.

Esse trabalho está estruturado em três capítulos. No Capítulo I, apresentamos a natureza do problema, fundamentação teórica, delimitação do tema e objetivos. O Capítulo II contempla os materiais e métodos empregados, resultados encontrados, discussão considerando a literatura pertinente e a conclusão. Estes itens estão estruturados na forma de um artigo original, o qual foi submetido para publicação na revista *Neurobiology of Learning and Memory*, que, no momento, possui classificação Qualis A2 na área de avaliação das ciências biológicas II. Por fim, o capítulo III compreende uma discussão mais ampla dos resultados, e uma conclusão seguida de perspectivas de aplicação dos resultados, bem como direções futuras para pesquisa no tema.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Natureza do Problema

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013) mostram que o acidente vascular cerebral (AVC) foi, entre o ano de 2000 e 2011, a segunda principal causa de morte no mundo, o que significa que o AVC é responsável por 12,9% do total de mortes. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, o AVC chega a ser a principal causa de morte, e sua incidência aumentou de 84.130 pessoas por ano em 2000, para 99.726 em 2010. Além disso, o AVC é também responsável por um grande número de morbidades que possuem grandes impactos sociais e econômicos¹. Sabe-se que 20% dos sobreviventes necessitam de cuidados institucionais de longo prazo, e 15% a 30% serão incapazes de voltar ao trabalho e realizar as suas tarefas de vida diária². Estima-se, que se medidas preventivas não sejam tomadas, o número de mortes no mundo deverá aumentar para 6,5 milhões em 2015 e 7,8 milhões em 2030. O AVC é considerado uma doença de origem multifatorial, sendo os principais fatores de risco a hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, sedentarismo, obesidade, dislipidemia³; ⁴; ⁵ e idade avançada⁶. Por conseguinte, segundo dados da OMS publicados em 2008 e 2009, o número de pessoas que apresentam esses fatores de risco tem crescido significativamente, assim como o aumento da expectativa de vida.

Com aumento da incidência do AVC, ligado ao avanço da medicina para o diagnóstico precoce, há uma expansão na taxa de sobrevivência pós-AVC e, conseqüentemente, uma intensificação no número de pessoas com sequelas provenientes do evento isquêmico. Estas sequelas podem ser motoras, sensoriais, perceptivas e cognitivas⁷.

Dentre elas, os déficits cognitivos e de memória têm sido recorrentes^{8; 9} além de serem classificados como progressivos após o AVC⁹. A memória é uma habilidade essencial no dia a dia, e por isso os déficits de memória caracterizam um dos principais fatores da queda da qualidade de vida¹⁰. Dentre os principais mecanismos envolvidos nos déficits de memória, no caso do AVC, está o estresse oxidativo provocado pela diminuição da perfusão sanguínea, seguida de uma reperfusão após o evento isquêmico¹¹. Há poucas opções de tratamento para o AVC, e por isso a prevenção é fundamental para aqueles que estão nos grupos de risco de sofrer um AVC¹.

Terapias com agentes neuroprotetores têm sido amplamente estudadas como estratégias para evitar a morte neuronal em virtude de um AVC⁹. Dentre as terapias mais empregadas estão aquelas que buscam melhorar a capacidade antioxidante e diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no tecido cerebral¹². Assim, o exercício físico aeróbico, como a caminhada e a corrida, bem como a ingestão de chá verde^{13;14}. A suplementação com chá verde e seu potencial antioxidante tem sido foco de estudos que investigam a combinação do chá verde e exercício físico tendo como base a investigação do potencial do chá verde para recuperação ou minimização de danos musculares provocados pelo exercício¹⁵, ou ainda, na prevenção de doenças metabólicas e obesidade¹⁶. A literatura apresenta escassas evidências sobre a combinação de estratégias antioxidantes, como a suplementação com chá verde e exercício, sobre características de neuroproteção.

Sendo o exercício e a suplementação com chá verde estratégias comportamentais acessíveis, investigar se a associação de exercício e ingestão de chá, que já se mostrou eficiente para a proteção da função neuromuscular, têm efeitos positivos para a função cerebral pode prover importantes informações sobre formas de prevenção do tecido neural e da sua função no caso de sobrevivência a um AVC.

1.1.2 Fundamentação Teórica

1.1.2.1 Acidente Vascular Cerebral (AVC)

O AVC acontece quando o fluxo sanguíneo para o cérebro é interrompido¹⁷. Essa interrupção pode resultar do rompimento em um vaso sanguíneo, o que classifica o AVC como hemorrágico, ou por uma obstrução do vaso sanguíneo, caracterizando um AVC isquêmico². Cerca de 85% a 90% dos casos de AVC têm origem isquêmica¹⁸. A isquemia é definida como uma redução no fluxo de sangue que é capaz de produzir alterações na função celular normal¹⁷. O diagnóstico do AVC é feito com base nos sinais clínicos, tais como déficits motores aparentes e também por diagnóstico por imagem, como tomografia computadorizada do crânio (TC)¹⁹. O tratamento deve ser iniciado o quanto antes, ainda na fase aguda, e se limita ao uso de medicamentos tais como antitrombóticos, antiplaquetários e anticoagulantes²⁰.

O tecido cerebral é extremamente sensível à isquemia, de forma que mesmo breves períodos sem aporte sanguíneo adequado podem iniciar uma sequência de eventos complexos e que, em última instância, podem culminar em morte celular²¹. Isto ocorre porque o encéfalo apresenta alta demanda metabólica e ausência de reservas energéticas substanciais. Além disso, diferentes regiões do cérebro têm diferentes limiares para o dano celular isquêmico²². A substância branca é mais resistente do que a massa cinzenta, assim como certas populações de neurônios são seletivamente mais vulneráveis a isquemia; no hipocampo, por exemplo, neurônios piramidais são altamente suscetíveis à isquemia, enquanto que neurônios granulares dentados são mais resistentes¹⁷. A substância cinzenta por sua vez está envolvida em processos de memória, sendo que o volume da área cinzenta está associado com a performance cognitiva²³.

A isquemia pode ser classificada quanto à duração e localização da obstrução sanguínea. Quanto à duração, ela pode ser permanente ou transitória. Na transitória há uma restituição do fluxo sanguíneo logo após a retirada do agente obstrutivo, o que não acontece na isquemia permanente. Quanto à localização, ela pode ser global, focal ou multifocal. Na global todo o encéfalo é privado do aporte sanguíneo, enquanto na focal e multifocal uma, duas ou mais áreas são afetadas²².

1.1.2.2 Modelo Animal

Para compreender os mecanismos do AVC, modelos de isquemia-reperusão em animais, tais como roedores, têm sido amplamente utilizados²⁴. Isso porque estes modelos nos permitem investigar efeitos sistêmicos de tratamentos alternativos o que não é possível em estudos *in vitro*, o que proporciona maior segurança para procedimentos futuros com sujeitos humanos. Um dos modelos animais mais comuns envolve a oclusão temporária bilateral das carótidas comuns, o que caracteriza um evento isquêmico global transitório. Esse modelo de isquemia pode diminuir em 90% o fluxo sanguíneo cerebral²⁵, e além da isquemia, o modelo permite investigar os efeitos deletérios do retorno do fluxo sanguíneo no leito vascular, fenômeno denominado de reperusão²².

A função das carótidas comuns em ratos é semelhante ao que observamos em humanos. Elas são responsáveis por levar sangue oxigenado para os hemisférios cerebrais²⁶.

As artérias carótidas comuns dão origem, entre outras, às artérias carótidas internas²⁷, que também se bifurcam e dão origem a artérias cerebral média e cerebral anterior, sendo essas responsáveis pela irrigação de estruturas como córtex e hipocampo²⁸. Além disso, as artérias carótidas comuns, juntamente com as artérias vertebrais, fazem parte do polígono de Willis (Figura 1.1). A interrupção do fluxo sanguíneo através da oclusão bilateral das carótidas

comuns leva à morte de células neuronais por meio de múltiplos e complexos mecanismos¹⁷.

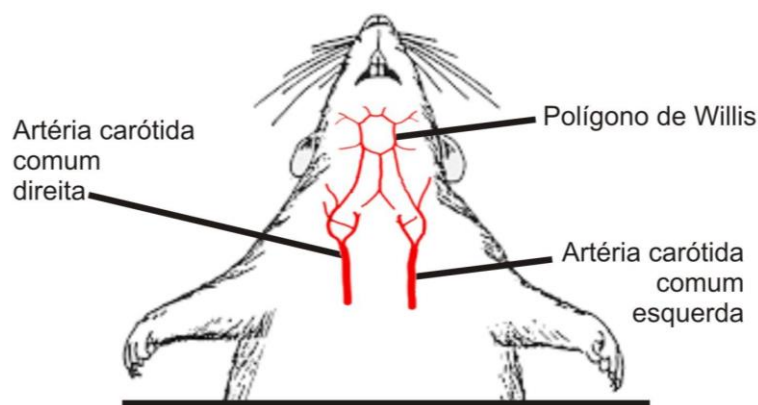


Figura 1.1. Esquema ilustrativo da arquitetura vascular cerebral no sentido transversal do rato (base cerebral). Destacamos as artérias carótidas comuns como origem para outras artérias que fazem a irrigação do tecido cerebral, assim como para o principal circuito arterial responsável do cérebro, o Polígono de Willis²⁸.

1.1.2.3 Fisiopatologia da isquemia-reperfusão

As lesões no tecido cerebral devido ao AVC isquêmico acontecem em duas fases, na fase isquêmica e na fase de reperfusão³⁰, envolvendo vários mecanismos como: mecanismos de inflamação, resultado da ruptura da barreira hematoencefálica³¹, excitotoxicidade, pelo aumento na liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato no espaço extracelular³², e estresse oxidativo, pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e diminuição dos antioxidantes^{24; 33}.

Na fase isquêmica, dentro de minutos após a oclusão, ocorre uma diminuição dos componentes energéticos da célula, como oxigênio (O_2), glicose, adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) induzindo à célula uma condição anaeróbica. Como consequência, há um aumento da acidose e lactato, evoluindo para falência da bomba sódio-potássio (Na^+/K^+)²¹. A quebra da bomba Na^+/K^+ leva a um aumento do radical superóxido (O_2^-) e outros radicais, como o peróxido de oxigênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) via

metabolismo da xantina. Ao mesmo tempo, há um aumento do cálcio, e os neurônios glutaminérgicos liberam glutamato, iniciando um processo de excitotoxicidade e inflamação levando à morte neuronal^{30; 34}.

A fase de reperfusão leva a uma lesão adicional, conhecida como lesão por reperfusão³⁴. A lesão por reperfusão tem um papel importante em mecanismos de morte celular³⁵ uma vez que nessa fase há uma reoxigenação abrupta do tecido, o que aumenta acentuadamente o metabolismo aeróbico celular. Apenas por esse aumento repentino do metabolismo aeróbico, já há crescimento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em um sistema onde as defesas antioxidantes já estão insuficientes, tanto por questões fisiológicas do tecido cerebral, como por consequência da lesão na fase isquêmica. Essas alterações levam ao desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes, levando a um estado de estresse oxidativo danoso a célula, a ponto de ocorrer apoptose celular³⁴(Figura 1.2).

Dessa forma, o aumento do cálcio intracelular na fase isquêmica parece ser o principal causador de morte celular na fase de reperfusão²¹, uma vez que na primeira fase ele aumenta a concentração de hipoxantina. Na presença de oxigênio disponível na segunda fase, a hipoxantina é metabolizada, e dessa via metabólica são produzidos radicais livres em excesso³⁰.

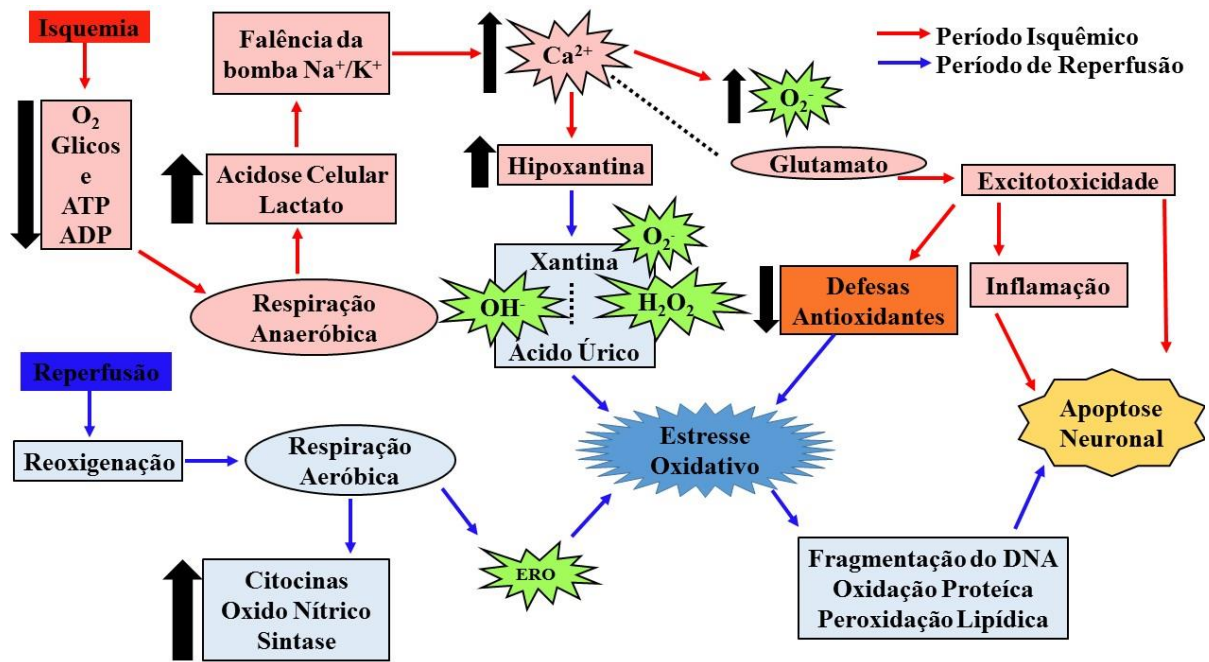


Figura 1.2. Ilustração dos mecanismos de lesão cerebral na isquemia reperfusão com ênfase no estresse oxidativo. As linhas vermelhas representam os eventos que acontecem durante a fase isquêmica, e as linhas azuis os eventos que acontecem durante a fase de reperfusão.

1.1.2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido pelo desequilíbrio entre a formação e a remoção de agentes oxidantes, sendo decorrente da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou diminuição de antioxidantes endógenos^{36;37}. As ERO são compostos químicos resultantes do metabolismo energético dependente de oxigênio. Esses compostos podem reagir com proteínas e lipídios, afetando a estrutura molecular e promovendo desintegração da membrana plasmática e organelas celulares, levando ao desequilíbrio iônico e morte celular²². O estresse oxidativo está envolvido em várias doenças, tais como câncer, diabetes, arteriosclerose, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas entre outras³⁸. A literatura sugere que o estresse oxidativo é o principal mecanismo responsável pelas

disfunções resultantes da isquemia-reperfusão (Figura 1.2)^{5;8;34;35}. Em contrapartida, existem antioxidantes, que são substâncias de origem endógenas ou exógenas que inibem a oxidação e, portanto, a produção de radicais livres³⁹. Entre os antioxidantes de origem endógenas, a glutathiona reduzida (GSH) é o principal antioxidante presente nos seres vivos, auxiliando na metabolização de radicais como H_2O_2 ⁴⁰. A glutathiona peroxidase (GPx) é uma variação da GSH, e está envolvida na proteção de lipídios das membranas celulares, que por sua vez são altamente susceptíveis aos danos por radicais livres⁴¹. A catalase, é conhecida como uma enzima oxirredutase e também apresenta um importante papel antioxidante, principalmente ajudando na metabolização de peróxidos e atuado como quelante do Ferro (Fe)⁴⁰.

O tecido cerebral é altamente suscetível a danos causados pelo estresse oxidativo⁸. Isto porque o tecido cerebral contém altas concentrações de lipídios, baixos níveis de antioxidantes e ainda alto consumo de oxigênio e altos níveis de ferro, que atuam como pró-oxidantes sob condições patológicas³⁴. A geração excessiva de ERO acontece tanto na fase isquêmica, quando há um acúmulo de cálcio promovendo uma ação pró-oxidante³⁴, quanto na fase de reperfusão, onde o aumento na produção de ERO se acentua, principalmente por que há uma liberação de citosinas e óxido nítrico sintetase (NOS)³⁰. Dessa forma, os danos oxidativos podem causar morte neuronal e danificar o tecido do cérebro por meio da oxidação de moléculas intracelulares, tais como lipídios, proteínas e DNA³³.

1.1.2.5 Memória

Dentre as consequências da isquemia-reperfusão global transitória e do estresse oxidativo, estão os déficits de memória^{29;42}. Memória é definida como a capacidade de reter uma informação para que, quando necessário, se possa mais tarde evocar a informação

aprendida anteriormente⁴³. A memória é uma habilidade de extrema importância para a realização de tarefas diárias. O processo de formação da memória engloba um conjunto de estruturas anatômicas e funcionais do sistema nervoso central (SNC) que funcionam independentemente, mas de forma cooperativa⁴⁴.

O hipocampo (Figura 1.3) é considerada a estrutura cerebral mais importante envolvida no processo de formação e armazenamento da memória, dessa forma a capacidade de reter informações depende da integralidade do hipocampo⁴⁵. Adicionalmente, entre as estruturas cerebrais, o hipocampo é uma das mais susceptíveis aos danos de isquemia e reperfusão, por que os neurônios constituintes dessa estrutura são sensíveis a toxicidade por glutamato⁴⁶.

O córtex pré-frontal (Figura 1.3) também está envolvido na memória mais especificamente na recuperação da informação memorizada e armazenada no hipocampo e na memória contextual ou espaço temporal, de forma que danos no córtex pré-frontal levam a déficits nesse sentido, assim como déficits na memória de longo prazo que utilizam o armazenamento de acontecimentos pessoais para se situar no espaço⁴⁷. Contudo, a conectividade do córtex pré-frontal com o hipocampo é determinante para a tradução da experiência passada em comportamento adaptativo atual⁴⁸.

1.1.2.6 Testes Comportamentais e de Memória

Para avaliação de déficits de memória em pesquisas com ratos, as tarefas de reconhecimento de objetos (figura 1.4) e a esQUIVA inibitória (figura 1.5) têm sido amplamente utilizadas^{45;49;50;51;52}. O teste de reconhecimento de objetos avalia/estima/verifica a habilidade do roedor em distinguir um objeto familiar de um objeto

novo, e esse tipo de memória está diretamente ligado com a atividade do hipocampo^{45;53}. A tarefa de esquila inibitória envolve aprendizado por condicionamento, para o qual se sabe que regiões como a parte dorsal do hipocampo e o córtex pré-frontal participam ativamente⁵¹.

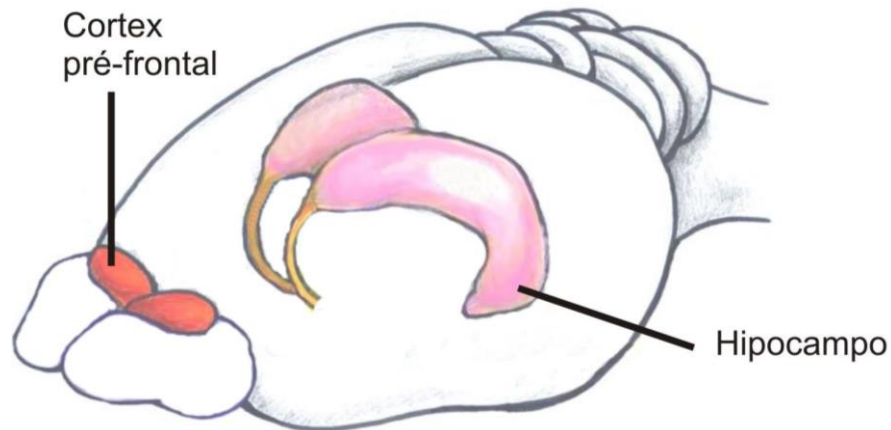


Figura 1.3. Ilustração do cérebro de rato com destaque para as estruturas envolvidas na memória. Em vermelho está destacada a localização do córtex pré-frontal, e em rosa o hipocampo. Imagem adaptada de Sokolowski e Corbin, (2012).



Figura 1.4. Teste de reconhecimento de objetos. DIA 1: corresponde ao dia do treino; DIA 2: corresponde ao dia do teste, onde o objeto antigo (conhecido) é trocado um por um objeto novo.

Além disso, outros testes comportamentais têm sido bastante empregados para a investigação de sequelas neurológicas, tais como o teste de campo aberto, que avalia a atividade locomotora e exploratória⁵³ (figura 1.6B), o teste de labirinto em cruz elevado, que avalia o comportamento impulsivo e a ansiedade⁵⁴ (figura 1.6A), e o teste de *tail-flick*, que avalia a sensibilidade térmica⁵⁵ (figura 1.6C).

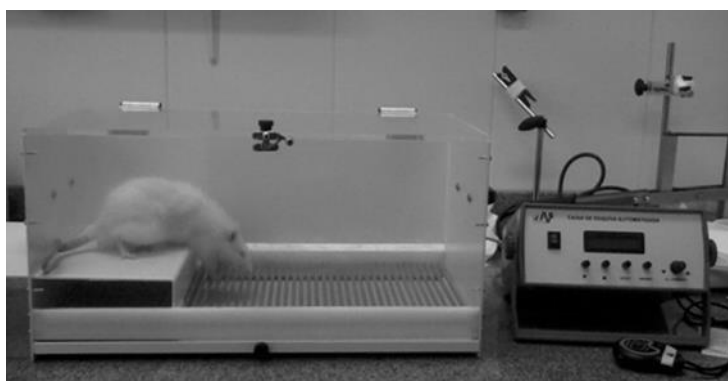


Figura 1.5 - Teste da esquiwa inibitória.

1.1.2.6 Neuroproteção e neuroprotetores

Com o aumento da incidência de AVC, as pesquisas têm procurado investigar muito mais mecanismos protetores do que estratégias para reabilitação. Agentes neuroprotetores visam preservar o tecido isquêmico, limitar o tamanho do infarto, e minimizar a lesão de reperfusão pós-isquêmica ou inflamação⁵⁶. Dentre as medidas neuroprotetoras, a atividade física é considerada como uma das mais importantes e acessíveis formas de prevenir e proteger as funções cerebrais⁵⁷. O exercício físico regular é capaz de induzir esta tolerância isquêmica cerebral¹⁴. Egan *et al.* (2014)⁵⁸, realizaram uma revisão de literatura sobre o papel do exercício no volume de infarto cerebral em pacientes

com AVC. Os autores observaram que a maioria dos estudos encontraram melhores resultados do exercício realizado antes de um AVC, do que depois. Além de reduzir o risco de AVC³, o exercício físico está associado à diminuição da gravidade dos danos, e a uma melhor recuperação funcional após um AVC⁵⁸.

A neuroproteção pelo exercício está relacionada com o fato de estimular a neurogênese e melhorar os níveis de antioxidantes no cérebro, corroborando a um controle mais efetivo da produção de radicais livres^{59; 60}. Além disso, o exercício é capaz de reduzir a resposta inflamatória, promover a função capilar, inibir a supra expressão de glutamato e combater a apoptose neural causada pela isquemia¹⁴. Dentre as modalidades de exercício investigadas, o exercício físico em esteira é um dos métodos mais comuns para a investigação dos benefícios do exercício em modelos experimentais de roedores^{46; 61; 62} (Figura 1.7).

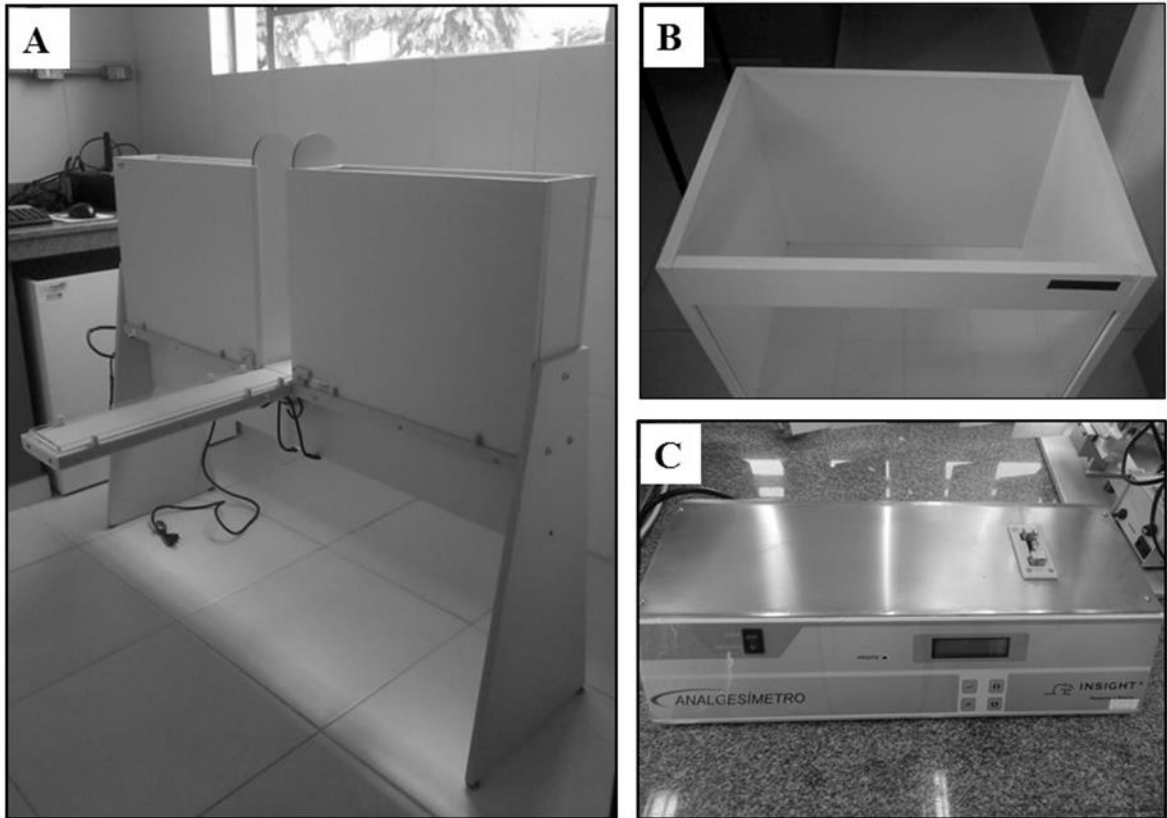


Figura 1.6. Instrumentos para testes comportamentais. A – teste de labirinto em cruz elevado; B – Teste de campo aberto; C – Teste *tail-flick*.



Figura1.7. Esteira motorizada para ratos.

Além do exercício físico, alimentos funcionais têm atraído o foco de pesquisas sobre neuroproteção. O chá verde é uma das bebidas mais populares do mundo⁶³. Evidências crescentes sugerem que o chá verde pode ajudar a reduzir os danos neuronais em algumas doenças neurodegenerativas¹³. Esse benefício se dá porque o chá verde é rico em polifenóis, como a epigallocatequina galato (EGCG)⁶⁴. A EGCG tem provado ser um antioxidante natural e eliminador de radicais livres⁸. Além disso, dados obtidos em experimentos com animais demonstraram que a EGCG melhora a lesão de isquemia cerebral induzida por reperfusão, com a diminuição do volume de infarto e do dano neuronal, o que foi atribuído a seu potente efeito antioxidante¹³. Wu, Hsieh *et al.*⁸(2012), demonstraram que administração oral de 10 mg/kg de chá verde uma vez por dia, durante sete dias, foi capaz de diminuir os déficits de memória causados por isquemia-reperfusão, e atribuíram esse benefício a capacidade do chá verde em diminuir o estresse oxidativo, aumentando as defesas antioxidantes no tecido cerebral.

1.1.2.7 Delimitação do tema

Embora estudos recentes tenham demonstrado benefícios do exercício físico e ingestão de chá verde para o funcionamento do tecido nervoso^{58; 65; 66}, poucos estudos levaram em consideração os benefícios na proteção, e não no tratamento, de doenças neurodegenerativas. Além disso, nenhum estudo revisado investigou os benefícios das duas modalidades quando usadas ao mesmo tempo, e ainda, pouco se sabe sobre quais mecanismos de proteção podem ser influenciados por estas terapias em situações de isquemia-reperfusão.

Sabe-se que o AVC é a principal causa de morbidades no mundo³⁴, e que dentre seus efeitos está o déficit de memória⁹. A memória é uma habilidade fundamental para que possamos realizar tarefas diárias simples, como decorar o caminho da casa até o mercado, por exemplo. Dentre os mecanismos envolvidos na perda de memória em casos de AVC, está o aumento de espécies reativas de oxigênio e a diminuição da capacidade antioxidante. Estes efeitos resultam da isquemia seguida de uma reperfusão, o que leva o tecido cerebral a um estado de estresse oxidativo e, por consequência, ocorrência de morte neuronal de células importantes para o aprendizado e memória, como células do hipocampo e córtex pré-frontal.

O uso de animais como modelos experimentais de AVC se torna indispensável para estudar agentes neuroprotetores para a doença, já que essa doença é de início súbito e não premeditado. Além disso, os experimentos com animais nos permitem estudar o mecanismo e a ação local da neuroproteção como em estruturas específicas do cérebro.

Sendo assim, neste estudo investigamos o potencial neuroprotetor de intervenções baseadas no exercício físico e ingestão de chá verde, em combinação ou não, sobre aprendizado e memória após isquemia-reperfusão, buscando fundamentar os resultados comportamentais com base na avaliação do estado oxidativo relacionado com a reperfusão, em um modelo experimental com roedores.

Nossa hipótese inicial foi que o exercício físico e o chá verde seriam neuroprotetores em situações de isquemia e reperfusão, auxiliando na consolidação da tarefa aprendida. Quando usados juntos, os benefícios das duas terapias se somariam. Além disso, essa neuroproteção estaria associada à capacidade antioxidante das terapias.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar quais os efeitos do exercício físico crônico e da ingestão do chá verde, combinados ou não, quando administrados antes da isquemia-reperfusão cerebral sobre a memória e o estresse oxidativo neural em ratos Wistar machos.

1.2.2 Objetivos específicos

Verificar os efeitos da isquemia-reperfusão, do chá verde e do exercício físico sobre a memória de reconhecimento de objetos e memória aversiva em ratos Wistar machos.

Verificar os efeitos da isquemia-reperfusão, do chá verde e do exercício físico sobre parâmetros oxidativos e antioxidativos em ratos Wistar machos.

CAPITULO II

Artigo Submetido

Neurobiology of Learning and Memory

MEMORY DEFICITS AND OXIDATIVE STRESS IN CEREBRAL ISCHEMIA- REPERFUSION: NEUROPROTECTIVE ROLE OF PHYSICAL EXERCISE AND GREEN TEA SUPPLEMENTATION

Abbreviated title: Green tea and exercise in ischemia-reperfusion

Helen L Schimidt¹, Aline Vieira², Caroline Altermann², Alexandre Martins², Priscila Sosa²,
Francielli W Santos³, Pâmela B Mello-Carpes², Ivan Izquierdo⁴, Felipe P Carpes^{1*}

¹Applied Neuromechanics Group, Laboratory of Neuromechanics, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

²Physiology Research Group, Stress, Memory and Behavior Lab, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

³Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

⁴Center of Memory, Brain Institute, and National Institute of Translational Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author

BR 472 km 592 - Po box 118 - ZIP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil Phone: +55 55 3413
4321; Fax: +55 55 3414 1484; e-mail: carpes@unipampa.edu.br

ABSTRACT

Ischemic stroke is a major cause of morbidity and mortality all over the world. Among impairments observed in survivors there is a significant cognitive learning and memory deficit. Neuroprotective strategies are being investigated to minimize such deficits after an ischemia event. Here we investigated the neuroprotective potential of physical exercise and green tea in an animal model of ischemia-reperfusion. Eighty male rats were divided in 8 groups and submitted to either transient brain ischemia-reperfusion or a sham surgery after 8 weeks of physical exercise and/or green tea supplementation. Ischemia-reperfusion was performed by bilateral occlusion of the common carotid arteries during 30 min. Later, their memory was evaluated in an aversive and in a non-aversive task, and hippocampus and prefrontal cortex were removed for biochemical analyses of possible oxidative stress effects. Ischemia-reperfusion impaired learning and memory. Reactive oxygen species were increased in the hippocampus and prefrontal cortex. Eight weeks of physical exercise and/or green tea supplementation before the ischemia-reperfusion event showed a neuroprotective effect; both treatments in separate or together reduced the cognitive deficits and were able to maintain the functional levels of antioxidant enzymes and glutathione.

Keywords: ischemia-reperfusion; memory; oxidative stress; antioxidants; physical exercise; green tea; brain.

HIGHLIGHTS

- Ischemia-reperfusion impairs learning and memory.
- Physical exercise has a neuroprotective effect in ischemia-reperfusion.
- Green tea has a neuroprotective effect in ischemia-reperfusion.
- ROS are increased in the hippocampus and prefrontal cortex in ischemia-reperfusion.
- Exercise and green tea maintain antioxidant enzymes and glutathione levels.

2.1 INTRODUCTION

Ischemic stroke results from obstruction of a blood vessel supplying the brain, and is considered a major cause of morbidity and mortality⁶⁷. Ischemia events are known to cause learning and memory deficits⁶⁸.

The reperfusion after ischemia damages neuronal cells and tissues generating reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)¹¹ contributing to the oxidative stress, which has been implicated in a variety of acute and chronic neurologic conditions^{69;70}. Indeed, one of the brain regions most sensitive to ischemia-reperfusion injury, the hippocampus, plays a key role in learning and memory⁷¹.

Regular physical exercise improves hippocampus function^{72; 73}, which helps to prevent sequels and assists in recovery⁷⁴. Pre-ischemia treadmill training up-regulated GLUT-1 expression, decreases the extracellular glutamate concentration, reduces the cerebral infarction volume, and improves the neurobehavioral performance of rats⁷⁵. Additionally, ⁶⁸reported positive effects of exercise performed post-hypoperfusion or either in pre- and post-hypoperfusion⁶⁸. In general, the benefits of physical exercise on ischemia-reperfusion are related to prevention of oxidative stress^{68; 76}.

In addition to exercise, the consumption of natural compounds, such as omega fatty acids or plant polyphenols benefits brain function⁶³. The green tea (*Camellia Sinensis*) has been suggested as a potential source of antioxidants^{8;77} available through diet^{8;78}. Green tea contains catechines (30-40% of its dry weight), which found in the green tea have potential antioxidant activity⁷⁹. The epigallocatechin gallate (EGCG) is a major component of green tea and has been shown to be a neuroprotective agent in animal models of focal and global brain ischemia⁷⁷.

The particular effects of physical exercise and green tea on memory deficits are documented in the literature^{63:74:80}, but the association between these two interventions has not been studied. If associating physical exercise and green tea promotes neuroprotection and minimization of deficits after ischemia at a larger extent of isolated interventions, such association could be a potential neuroprotective strategy. Therefore, we investigate if physical exercise and green tea supplementation either associated or by separate have a neuroprotective effect when administered before ischemia-reperfusion.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Animals and experimental design

Male Wistar rats were bought from Central Vivarium of Federal University of Santa Maria (RS/Brazil) and housed three per cage under controlled light and environmental conditions (12h light/12h dark cycle at $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $50\pm 10\%$ humidity) with food and water or green tea *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1996) and Local Institution Animal Care and Use Committee (IRB #0132012).

The weight of each rat and the liquid consumption for each cage house were measured daily. At the age of 2 months, they were randomly assigned to one of 4 experimental groups: (a) control: rats not submitted to intervention; (b) exercise: rats submitted to physical training for 8 weeks; (c) green tea supplementation: rats supplemented with green tea during 8 weeks; and (d) exercise with green tea supplementation: rats submitted to physical training and supplemented with green tea simultaneously during 8 weeks (Figure 2.1).

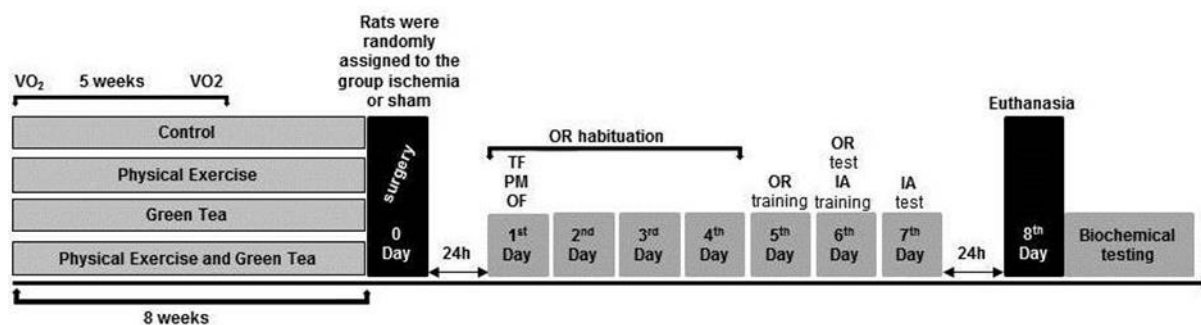


Figure 2.1. Experimental design. OR - Object recognition memory test; TF - Tail Flick; OF - Open field; PM - Plus maze; IA - Inhibitory avoidance memory test. Before the ischemia-reperfusion surgery, rats in the 4 initial proposed groups were randomly divided into 8 different groups, according sham or ischemia-reperfusion surgery. Each group had undergone different interventions during 8 weeks. Behavioral testing started 24h after sham or ischemia-reperfusion surgery. Biochemical testing was the last step of the study.

After 8 weeks the groups were reorganized. Sham or ischemia-reperfusion surgeries were performed and groups were subdivided, as follow:

- group 1 - sham: rats submitted to the sham surgery without the occlusion of carotid arteries;
- group 2 - sham and exercise: rats submitted to physical exercise before sham surgery;
- group 3 - sham and green tea supplementation: rats supplemented with green tea before sham surgery;
- group 4 - sham and exercise with green tea supplementation: rats submitted to physical training and supplemented with green tea simultaneously before sham surgery;
- group 5 - ischemia-reperfusion: rats submitted to the surgery with temporary bilateral occlusion of carotid arteries (ischemia-reperfusion);
- group 6 - ischemia-reperfusion and exercise: rats submitted to physical training before ischemia-reperfusion surgery;

- group 7 - ischemia-reperfusion and green tea supplementation: rats supplemented with green tea before ischemia-reperfusion surgery;
- group 8 - ischemia-reperfusion and exercise with green tea supplementation: rats submitted to physical training and supplemented with green tea simultaneously before ischemia-reperfusion surgery.

After intervention, all rats were submitted to behavioral tests. When behavioral tests were finished, rats were euthanized for posterior brain tissue preparation. Biochemical analyses performed in the brain tissues permitted to quantify the concentration of glutathione (GSH)⁸¹, catalase⁸², reactive oxygen species levels (ROS)⁸³ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)⁸⁴, and also the activity of glutathione peroxidase (GPx)⁸⁵. NADPH, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and GSH reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Other reagents used in this study were of analytical grades and obtained from standard commercial suppliers.

2.2.2 Exercise Protocol

Physical exercise was performed during 8 weeks in a motorized treadmill built for rodents (Insight Ltda, SP/Brazil). Running exercise was performed at intensity of 60-70% maximal oxygen uptake (VO₂) (treadmill belt velocity between 9 m/min and 13 m/min), in sessions lasting 30 min, 5 times a week, always in the same period of day, in light time period⁸⁶. In the week before the start of intervention, rats performed a daily treadmill running for ten minutes to habituate before performing the first VO₂ test. An indirect VO₂ running test was performed to determine the individual intensity of exercise (starting with

low velocity and increasing it in 5 m/min every 3 min until the rat was unable to keep running). Time to fatigue (min) and the work volume (m/min) were considered as an indirect measure of VO₂ maximum^{68;87}. In the middle of exercise intervention (week 4), an additional indirect VO₂ running test was conducted to adjust the exercise intensity for each rat.

2.2.3 Green tea supplementation

Rats received green tea mixed with drinking water (13.33 g/L), as described elsewhere⁸⁸. Green tea was prepared daily in the early morning and administered at ambient temperature. The liquid volume intake for each day was monitored. Green tea samples, Madrugada Co., used in this study were purchased from standard markets and analyzed by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu modified method⁸⁹, which ensured the total polyphenols content (concentration 819.5 µg GAE/mL), and by high-performance liquid chromatography, which ensured presences of epicatechin (EGC) (concentration of 83.35 µg/mL), EGCG (299.56 µg/mL) and epicatechin gallate (ECG) (86.05 µg/mL).

2.2.4 Ischemia-reperfusion surgery

After 8 weeks of interventions, the rats were subjected to the ischemia-reperfusion or sham surgery. The surgery was performed always in the morning, under ketamine and xylazine anesthesia, 75 mg/kg and 10 mg/kg i.p., respectively. The rats were placed on a heating pad and shaved in the neck where a median incision was performed. The muscles' planes and trachea were deviated and common carotid arteries were freed from its adventitial sheath and vagus nerve, which was carefully separated and maintained for

occlusion⁷¹. The temporary occlusion of the carotid arteries was performed using a vascular clip removed after 30 minutes. Restoration of blood flow in the carotid arteries was confirmed by careful observation by an experienced researcher; neck skin incision was then closed and sutured. During the surgical procedure, heating pad temperature was maintained at 37°C to 38°C until the rat wake up. Afterwards, the rat was transferred back to the cage house. Sham-operated rats underwent identical surgical procedures except for the no application of the vascular clip.

2.2.5 Behavioral testing

2.2.5.1. Object recognition memory test

Training and test in the object recognition task (OR) were performed in an open-field arena (50 x 50 x 50 cm) built with polyvinyl chloride plastic, plywood and transparent acrylic^{90;91}. Rats were first habituated to the apparatus during 20 min of free exploration in 4 consecutive days. For training, two different objects (A and B) were placed in the apparatus and rats were allowed to freely explore them during 5 min. The objects were made of metal, glass, or glazed ceramic. Exploration was defined as sniffing or touching the objects with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects were not considered exploratory behaviors. A video camera was positioned over the OR arena, and the behavior was recorded using a video tracking system for offline analyses. After 24h, in the test phase, one of the objects was randomly exchanged for a novel one (C), and the rats were reintroduced into the apparatus to freely explore the objects (familiar and new one) during 5 min. To avoid confounds by lingering olfactory stimuli and preferences, the objects and the arena were cleaned with 70% ethanol after each animal was tested.

2.2.5.2. Inhibitory avoidance memory test

Rats were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance task (IA) using a 50 x 25 x 25 cm plexiglass box with a 5 cm-high, 8 cm-wide, and 25 cm-long platform on the left end of a series of bronze bars which made up the floor of the box. For training, rats were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, a 2 s 0.5 mA scrambled foot shock was delivered. Memory retention was evaluated in a no reinforced test session carried out 24h after training by quantifying the step-down latency^{92; 93; 94}.

2.2.5.3 Control behavioral tasks

To analyze exploratory and locomotor activities and ensure that any procedure impaired such behaviors, each rat was placed on the left quadrant of a 50 x 50 x 39 cm open field arena made with wooden painted white, and with a frontal glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures for locomotor and exploratory activity, respectively, were measured over 5 min⁹⁵.

To evaluate anxiety state, rats were exposed to an elevated plus maze. The time spent and the total number of entries into the open arms was recorded over a 5 min session⁹⁶.

To ensure the IA testing efficacy, nociception was measured using the tail flick test⁹⁷, with pain induced by infrared light acting on the tail of the rat 5 cm away from the tip

of the tail. Reaction time (tail-flick latency) was measured by the interval between placing the tail on the infrared light source and the voluntary withdrawal of the tail.

Data from these tests were compared between the groups to verify any impairment that could influence the behavioral results.

2.2.6 Biochemical testing

2.2.6.1 Tissue preparation

For the preparation of brain tissues, the rats were euthanized 24 h after the behavioral experiments were finished. The brain was removed and bilateral hippocampus and prefrontal cortex were quickly dissected out and homogenized in 50 mM Tris HCl, pH 7.4, (1/10, w/v). Afterwards, samples were centrifuged at 2400x g for 20 min, and supernatants (S1) were used for assay.

2.2.6.2 Glutathione (GSH)

GSH levels were fluorometrically determined⁸¹. An aliquot of homogenized was mixed (1:1) with perchloric acid (HClO₄) and centrifuged at 3000 x g for 10 min. After centrifugation, the protein pellet was discarded and free-SH groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of supernatant was incubated with orto-phthalaldehyde, and fluorescence was measured at excitation of 350 nm and emission of 420 nm. Results were expressed as nmol·g⁻¹ of tissue.

2.2.6.3 Glutathione Peroxidase

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured spectrophotometrically⁸⁵ in a system containing GSH/NADPH/GR by dismutation of H₂O₂ at 340 nm. S1 was added in GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H₂O₂. In this assay, the enzyme activity is indirectly measured by means of NADPH decay. H₂O₂ is decomposed generating GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase presents in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed by the consumption of NADPH in nmol/min/mg of protein.

2.2.6.4 Catalase

Catalase activity was determined spectrophotometrically⁸² involving the monitoring of the consumption of H₂O₂ in the presence of the sample (20μL) at 240 nm. Enzyme activity was expressed in units (1U 1μmol H₂O₂/min decomposed at pH 7 and 25°C).

2.2.6.5 Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive oxygen species (ROS) content was assessed by a spectrofluorimetric method using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe⁸³. The sample (S1)

was incubated in darkness with 5 μ L DCFH-DA (1mM). The oxidation of DCFH-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) is measured for the detection of intracellular ROS. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF), measured by DCF fluorescence intensity, was recorded at 520 nm (480 nm excitation), 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium. Results were expressed as AU (arbitrary units).

2.2.6.6. Detection of TBARS level

Lipoperoxidation was evaluated by the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) test⁸⁴. One aliquot of S1 was incubated with a 0.8% thiobarbituric acid solution, acetic acid buffer (pH 3.2) and sodium dodecyl sulfate solution (8%) at 95°C for 2h, and the color reaction was measured at 532 nm. Results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per mg protein.

2.2.7 Statistical Analysis

Data were checked for normality of distribution using Shapiro-Wilk. Daily intake of water and rats' weight were compared between the experiment days using Anova oneway. Mean weight was compared between the start and at the end of interventions using t-test. Oxygen uptake values in the beginning and end of interventions were compared using t-test. Object exploration time in OR task was converted to percent of total exploration time and therefore a two-way analysis of variance considering groups and interventions was conducted. Exploration time for the familiar and novel object were further compared in each group using paired t test. For IA results, differences in the step down latencies between

training and test were calculated. These differences were compared between the groups using Kruskal-Wallis test. Mann-Whitney test was used for specific comparisons between the groups (sham control vs ischemia control; ischemia control vs ischemia intervention groups). Wilcoxon test was used for specific intra-groups comparisons (training vs test). In OF, PM and TF tests the data were analyzed using ANOVA with Duncan post hoc if necessary. Biochemical results were compared using ANOVA for a mixed linear model (2 groups – sham and ischemia x 4 interventions – control, exercise, green tea, exercise and green tea) using a Bonferroni correction for multiple comparison. Where significant main effects or interaction were observed, t-test or ANOVA with Duncan post hoc were conducted to compare groups and interventions, respectively. The differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

2.3 RESULTS

2.3.1 Animal weight and fluid intake

Individual weight gain of rats from all groups in daily measurements was similar between the groups and between the start and end of the interventions. The mean of water or green tea daily intake were similar between the groups (47.01 ± 3.14 ml for groups drinking green tea mixed with water, and 45.99 ± 1.35 ml for groups drinking water).

2.3.2 Indirect oxygen uptake (VO_2)

VO₂ measured for each rat was higher in the second VO₂ test than the beginning of the physical training (data not shown).

2.3.3 BEHAVIORAL RESULTS

2.3.3.1 Object recognition memory test

Long term recognition memory was evaluated using the OR paradigm. Rats were trained in the OR task when all of them, regardless of the group, explored two new objects (A and B) for about 50% of total exploration time each one (mean of all groups for object A=44.1±13.8 %; and for object B=55.9±13.8%). An effect of the object tested was observed in the testing session, performed 24h after training [$F_{(1,5)}=76.48$, $P<0.01$]. Further analysis indicated that the percent of time exploring the novel object (C) was higher than the time exploring the familiar object (A) in sham groups ($P<0.05$; Figure 2, sham groups). In this case rats explored longer the new object.

Rats from ischemia-reperfusion (group 5) spent similar exploration time for each one of the objects (Figure 2, ischemia-reperfusion 5). An effect of the object tested was observed in the testing session, performed 24h after training [$F_{(1,5)}=8.67$, $P<0.05$].

Further analysis indicated that rats from ischemia-reperfusion and physical exercise (group 6), and ischemia-reperfusion and green tea supplementation (group 7) spent significantly more time exploring the new object (C) compared to the familiar one (A) ($P<0.01$; Figure 2, ischemia-reperfusion 6 and 7). However, the rats from group 8, in which the exercise and the green tea supplementation were conducted simultaneously before the ischemia-reperfusion, spent similar exploration time for each one of the objects (Figure 2, ischemia-reperfusion 8).

The total exploration time (s) in each training and testing session was similar for all groups (Table 1 – Exploration time in OR).

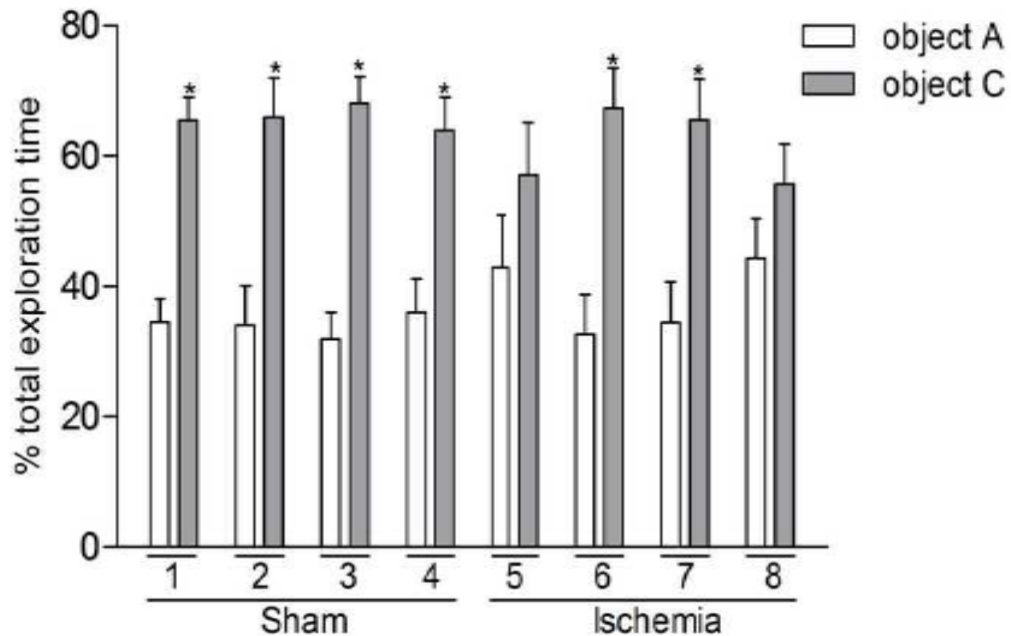


Figure 2.2. Ischemia-reperfusion impairs memory in the object recognition task. Physical exercise and green tea showed a neuroprotective effect when administrated isolated. Long term memory was tested in the object recognition task. 24h after training animals were exposed to a familiar object (A) and a new one (C) during 5 minutes. Data of testing (mean \pm standard-deviation) are presented as a percentage of the total exploration time, in seconds, in the experimental groups: 1: sham; 2: sham and exercise; 3: sham and green tea supplementation; 4: sham and exercise with green tea supplementation; 5: ischemia-reperfusion; 6: ischemia-reperfusion and exercise; 7: ischemia-reperfusion and green tea supplementation; 8: ischemia-reperfusion and exercise with green tea supplementation. * $P < 0.05$; t test comparing exploration time for objects A and C; $n = 8-10$ per group.

2.3.3.2 Inhibitory avoidance memory test

In the evaluation of aversive long term memory consolidation using IA task, rats from all groups presented similar step down latency in the training session (mean of all groups: 2.9 ± 0.8 s). In the test session, all groups significantly increased their step down

latencies, as observed in intra-groups comparisons between training and testing latencies ($P < 0.05$ for groups 5 and 8, and $P < 0.01$ for groups 1-4, 6 and 7 in Wilcoxon test – data not shown). However, the training-test step-down latencies differences were significant shorter in the group submitted to ischemia-reperfusion than in sham groups ($P < 0.01$, Figure 3). Rats submitted to physical exercise or green tea supplementation previously to ischemia-reperfusion presented higher latencies differences than ischemia group ($P < 0.01$, Figure 3).

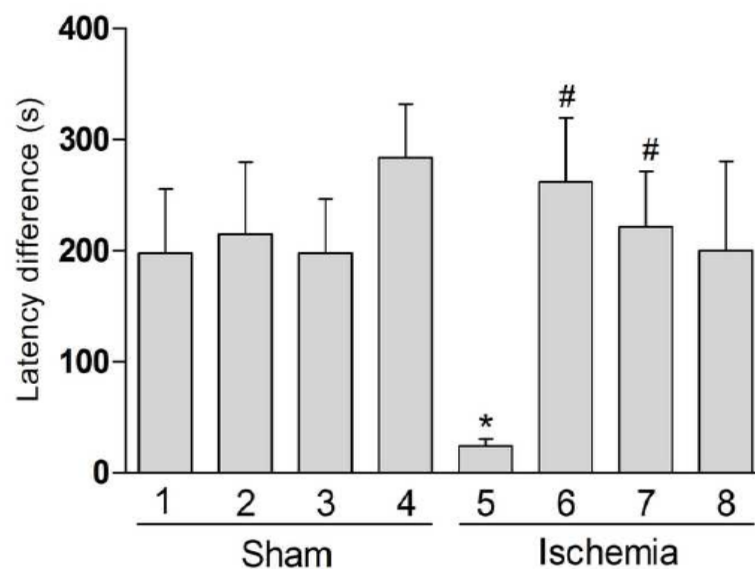


Figure 2.3. Ischemia-reperfusion impairs aversive memory. Physical exercise and green tea have a neuroprotective effect when administrated isolated. Step down latency data are presented in seconds considering mean and standard-deviation data. Experimental groups: 1: sham; 2: sham and exercise; 3: sham and green tea supplementation; 4: sham and exercise with green tea supplementation; 5: ischemia-reperfusion; 6: ischemia-reperfusion and exercise; 7: ischemia-reperfusion and green tea supplementation; 8: ischemia-reperfusion and exercise with green tea supplementation. * $P < 0.01$ in Mann-Whitney test (5 – ischemia – differed from all sham); # $P < 0.01$ in Mann-Whitney test (different of ischemia 5); $n = 8-10$ per group.

2.3.3.3 Control behavioral tasks

Rats were exposed to an open-field arena, elevated plus maze and tail flick test after the surgery to verify exploratory and locomotor activity, anxiety, and pain threshold, respectively. No differences in the number of crossing and rearings in the open field task

were observed after interventions (Table 2.1 – Open Field). The total number of entries and the time spent in the open arms (Table 2.1 – Plus Maze), as well as latencies in the tail flick test, were not altered in the different groups (Table 2.1 – Tail Flick). 3.6 Biochemical results: antioxidant markers.

2.3.4 Biochemical results: antioxidant markers

2.3.4.1 Glutathione (GSH)

A main effect for group [$F_{(1,5)}=17.675$; $P=0.008$] was observed. GSH concentration in the prefrontal cortex of ischemia-reperfusion group was lower than found in the sham group ($P<0.01$ Figure 2.4A, ischemia-reperfusion 5). Ischemia-reperfusion groups submitted to physical exercise and green tea supplementation, either in combination or not, avoided this reduction (figure 2.4A, $P<0.01$, ischemia-reperfusion 6, 7 and 8). Among ischemia-reperfusion groups, exercise and the green tea isolated promoted increase of GSH levels when compared with paired sham animals ($P<0.05$; Figure 2.4A).

In hippocampus, a main effect for intervention [$F_{(3,15)}=22.830$; $P<0,001$] and an interaction group-intervention [$F_{(3,15)}=24.678$; $P=0.013$] were observed. GSH concentration in the hippocampus was reduced in the ischemia-reperfusion group compared to the sham group ($P<0.05$; Figure 2.4B, ischemia-reperfusion 5). Supplementation with green tea did not maintain GSH concentrations in the hippocampus of rats submitted to ischemia-reperfusion when compared to the sham green tea (Figure 2.4B, ischemia-reperfusion 7). On the other hand, exercise, either isolated or associated to the green tea supplementation maintained GSH concentrations in the hippocampus (Figure 2.4B, ischemia-reperfusion 6 and 8). Among sham groups, physical exercise combined with green tea supplementation increased GSH concentration in the hippocampus ($P<0.01$; Figure 2.4B, sham 4).

Table 2.1. Result of behavioral control tasks. Green tea supplementation and physical exercise along 8 weeks and ischemia-reperfusion surgery had no effect in the total time of exploration in OR task, locomotor and exploratory activities, anxiety and pain thresholds. Data are expressed as mean \pm standard-deviation of the total time of exploration for object recognition task (OR), number of crossings and rearings (Open Field), total number of entries and the time spent in the open arms (Plus Maze), and time latency (Tail Flick). There were no differences between the groups ($P>0.05$, one-way ANOVA). Experimental groups: 1: sham; 2: sham and exercise; 3: sham and green tea supplementation; 4: sham and exercise with green tea supplementation; 5: ischemia-reperfusion; 6: ischemia-reperfusion and exercise; 7: ischemia-reperfusion and green tea supplementation; 8: ischemia-reperfusion and exercise with green tea supplementation (n=8-10 per group).

Behavioral tasks		Sham				Ischemia-reperfusion			
		1	2	3	4	5	6	7	8
Exploration time in OR	Total exploration time in training (s)	40.4 ± 19.1	30.9 ± 13.4	31.5 ± 13.0	36.3 ± 17.4	18.2 ± 12.6	33.7 ± 29.0	34.5 ± 21.4	27.6 (13.1)
	Total exploration time in test (s)	39.3 ± 25.2	28.7 ± 20.6	38.2 ± 21.1	26.5 ± 18.4	23.2 ± 15.7	35.2 ± 23.5	25.6 ± 16.3	28.3 (15.1)
Open field	Crossings (n°)	34.2 ± 22.7	35.8 ± 12.2	18.1 ± 5.8	22.1 ± 10.9	20.8 ± 16.5	25.3 ± 9.2	18.0 ± 12.7	21.0 (14.2)
	Rearing (n°)	16.3 ± 10.8	14.9 ± 9.0	10.9 ± 5.2	11.8 ± 6.8	9.3 ± 7.9	11.0 ± 3.2	7.7 ± 5.8	8.2 (7.9)
Plus maze	Total entries (n°)	12.8 ± 11.2	12.6 ± 14.2	11.9 ± 12.7	8.2 ± 7.0	11.1 ± 18.5	13.4 ± 14.2	8.7 ± 13.0	11.4 (16.6)
	Time in open arms (s)	9.2 ± 11.0	19.9 ± 25.2	9.3 ± 11.9	16.0 ± 30.4	10.6 ± 27.8	13.7 ± 19.8	9.7 ± 14.8	12.2 (18.6)
Tail flick	Times (s)	5.8 ± 1.8	5.1 ± 1.5	5.5 ± 1.4	4.6 ± 1.1	5.4 ± 1.7	5.2 ± 1.6	5.6 ± 1.9	5.9 (1.8)

2.3.4.2 Glutathione Peroxidase (GPx)

In the prefrontal cortex, an interaction group-intervention was observed [$F(3,15)=3.789$; $P=0.033$]. GPx activity in the prefrontal cortex increased in the ischemia-reperfusion group compared to the sham animals ($P<0.05$, Figure 2.4C, ischemia-reperfusion 5). Physical exercise combined with green tea supplementation increased prefrontal cortex GPx activity in the ischemia-reperfusion animals compared to the sham physical exercise and green tea ($P<0.01$, Figure 2.4C, ischemia-reperfusion 8). In the sham animals, green tea supplementation increased GPx activity ($P<0.01$, Figure 2.4C, sham 3).

A main effect for intervention was observed in the hippocampus [$F(3,15)=5.553$; $P=0.009$]. Activity of GPx in hippocampus of ischemia-reperfusion groups was similar to the sham (Figure 2.4D). Comparisons between ischemia-reperfusion groups showed a lower activity of GPx in the hippocampus in the group ischemia-reperfusion and green tea supplementation.

2.3.4.3 Catalase

In the prefrontal cortex, a main effect for group [$F(1,5)=15.685$; $P=0.011$]. Catalase activity in the prefrontal cortex was reduced in the ischemia-reperfusion group ($P<0.05$; Figure 2.4E, ischemia-reperfusion 5), and in the ischemia-reperfusion group submitted to physical exercise and supplemented with green tea ($P<0.05$; Figure 2.4E, ischemia-reperfusion 8) when compared to their respective sham group. When the catalase activity was compared between ischemia-reperfusion groups, rats in the group supplemented with green tea presented higher catalase activity in the prefrontal cortex compared to the ischemia-reperfusion group ($P<0.05$; Figure 2.4E, ischemia-reperfusion 7).

In the hippocampus, a main effect for group [$F(1,5)=8.322$; $P=0.034$] and a main effect for intervention [$F(3,15)=3.542$; $P=0.041$] were observed. Rats from ischemia-reperfusion group presented lower activity of catalase in the hippocampus compared to the sham animals ($P<0.01$, Figure 2.4F, ischemia-reperfusion 5). Among the sham groups, physical exercise ($P<0.01$; Figure 2.4F, sham and exercise 2), green tea ($P<0.05$; Figure 2.4F, sham and green tea 3) and physical exercise associated with green tea supplementation reduced the catalase activity in the hippocampus ($P<0.05$; Figure 2.4F, sham and exercise with green tea supplementation 4).

2.3.5 Biochemical results: oxidative stress markers

2.3.5.1 Reactive oxygen species (ROS)

A main effect for group was observed in the hippocampus [$F(1,5)=8.043$; $P=0.036$]. ROS levels in the prefrontal cortex were higher in the ischemia-reperfusion group than sham ($P<0.05$; Figure 2.5A, ischemia 5). In the ischemia-reperfusion groups, exercise increased ROS in comparison to the sham submitted to exercise ($P<0.01$; Figure 2.5A, ischemia-reperfusion 6).

An interaction group-intervention was observed in hippocampus [$F(3,15)=3.819$; $P=0.032$]. Hippocampus presented higher ROS levels in the ischemia-reperfusion compared to the sham ($P<0.05$; Figure 2.5B, ischemia-reperfusion 5). Sham rats supplemented with green tea presented higher hippocampus ROS levels than sham controls ($P<0.01$; Figure 2.5B, sham 3). Rats of the ischemia-reperfusion group submitted to physical exercise and green tea supplementation presented higher ROS levels in the hippocampus compared to the sham ($P<0.05$; Figure 2.5B, ischemia-reperfusion 8), ischemia-reperfusion control ($P<0.05$; Figure

2.5B, ischemia reperfusion 8), and ischemia-reperfusion submitted to physical exercise ($P < 0.01$; Figure 2.5B, ischemia reperfusion 8).

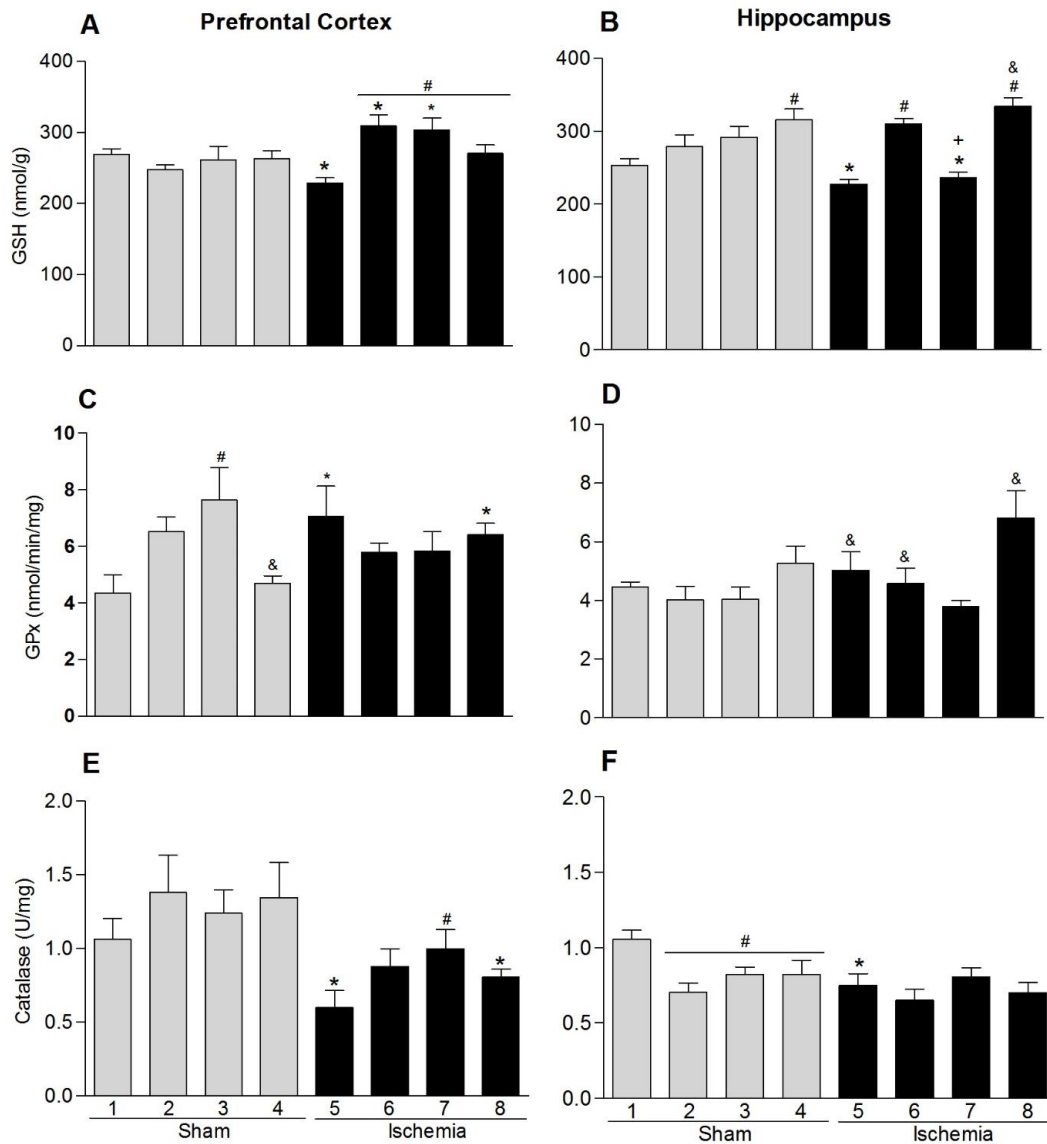


Figure 2.4. Effect of ischemia-reperfusion, physical exercise and green tea supplementation on antioxidant markers in the prefrontal cortex (right column) and the hippocampus (left column). The signs indicate differences between/within groups: * comparison between groups (t test; ischemia-reperfusion group vs its respectively sham); #, & or + evidence comparisons within groups (ANOVA and Duncan post hoc within sham or ischemia-reperfusion groups): where # means different of control; & means different of green tea supplementation, and + indicates different of exercise with green tea supplementation. Experimental groups: 1: sham; 2: sham and exercise; 3: sham and green tea supplementation; 4: sham and exercise with green tea supplementation; 5: ischemia-reperfusion; 6: ischemia-reperfusion and exercise; 7: ischemia-reperfusion and green tea supplementation; 8: ischemia-reperfusion and exercise with green tea supplementation.

2.3.5.2 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

A main effect for intervention [$F(3,15)=4.756$; $P=0.016$] and an interaction group-intervention [$F(3,15)=3.564$; $P=0.040$] were observed. The concentration of TBARS in the prefrontal cortex of ischemia-reperfusion group supplemented with green tea was higher than the control ischemia-reperfusion ($P<0.05$; Figure 2.5C, ischemia-reperfusion 7). In the sham groups, green tea supplementation, either isolated or combined with exercise, reduced TBARS concentration ($P<0.01$; Figure 2.5C, sham 3). Additionally, physical exercise, either isolated or associated with green tea, prevented the increase of TBARS concentration in ischemia-reperfusion rats (Figure 2.5C, ischemia-reperfusion 6 ($P<0.05$) and 8 ($P<0.01$)).

In the hippocampus, a main effect for intervention [$F(3,15)=4.756$; $P=0.016$] and an interaction group-intervention [$F(3,15)=3.564$; $P=0.040$] were observed. Ischemia-reperfusion rats had increased TBARS concentration compared to the sham ($P<0.05$; Figure 2.5D, ischemia-reperfusion 5). Among the ischemia-reperfusion groups, physical exercise, either per se or associated to green tea supplementation, prevented increase of TBARS levels in the hippocampus when compared to the ischemia-reperfusion control ($P<0.05$; Figure 2.5D, ischemia-reperfusion 6 and 8). Within groups comparisons revealed that TBARS levels in hippocampus were increased in the sham group supplemented with green tea compared to the sham control ($P<0.05$; Figure 2.5D, sham 3). However, sham rats submitted to physical exercise combined with green tea supplementation presented lower TBARS levels than sham supplemented with green tea ($P<0.01$; Figure 2.5D, sham 4), and sham submitted to physical exercise ($P<0.05$; Figure 2.5D, sham 4).

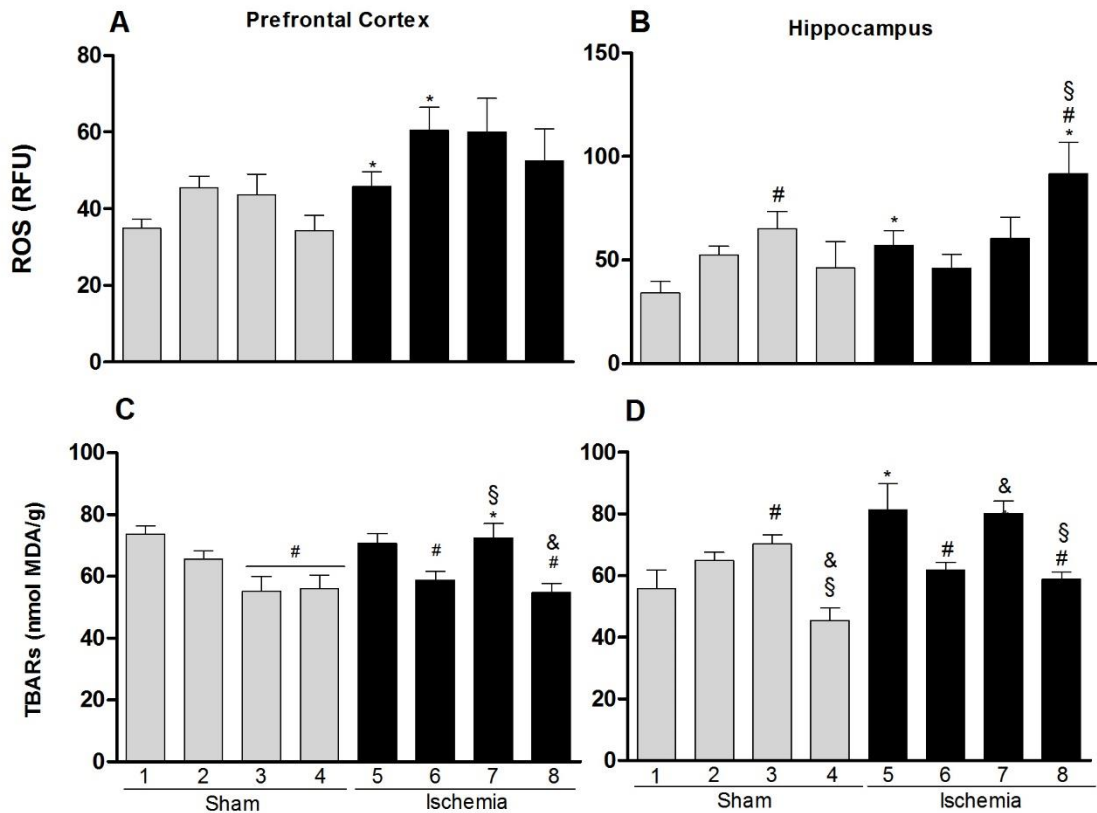


Figure 2.5. Effects of ischemia-reperfusion, physical exercise, and green tea on biochemical markers in the prefrontal cortex (right) and hippocampus (left). The signs indicate differences between/within groups: * between groups comparison (t test; ischemia-reperfusion group vs its respectively sham); #, & or + evidence within groups comparisons (ANOVA and Duncan post hoc within sham or ischemia-reperfusion groups): where # means different of control; & means different of green tea supplementation, and + indicates different of exercise with green tea supplementation. Experimental groups: 1: sham; 2: sham and exercise; 3: sham and green tea supplementation; 4: sham and exercise with green tea supplementation; 5: ischemia-reperfusion; 6: ischemia-reperfusion and exercise; 7: ischemia-reperfusion and green tea supplementation; 8: ischemia-reperfusion and exercise with green tea supplementation.

2.4 DISCUSSION

Here we investigated the neuroprotective potential of long term physical exercise and green tea supplementation, either in association or by separate, to prevent or reduce learning and memory deficits resulting from ischemia-reperfusion in a rat model. Our model showed to be valid as it resulted in cognitive deficits without impairment in locomotor and exploratory activities, as well as anxiety and pain thresholds.

Our results support the interpretation that the cognitive deficits were caused by ischemia-reperfusion surgery. Oxidative damages were observed in prefrontal cortex and hippocampus brain regions. A main finding was that combining of physical exercise and green tea in general did not elicit better results than when interventions were conducted separately.

Learning and memory deficits after ischemia-reperfusion may result from increased oxidative stress (ROS and TBARS) and decreased antioxidant status (GSH and GPx) in the hippocampus and prefrontal cortex⁷¹. Hippocampus is one of the brain areas more sensitive to ischemia-reperfusion⁹⁸. The oxidative damages observed in hippocampus, evidenced by increased TBARS and ROS, can contribute to the impairment of learning function⁴⁹ and the aversive learning⁹⁹.

We observed that physical exercise or green tea supplementation avoided memory deficits in the OR and IA task performed after ischemia-reperfusion. Additionally, physical exercise had positive effects on hippocampus and prefrontal antioxidant status by avoiding decreases of GSH, and on hippocampal pro-oxidants markers by avoiding increases in TBARS. Although with more discrete effects, our results suggest that green tea promotes GSH increases in prefrontal cortex and avoids catalase decreases in the same brain region.

Such observations help to explain the effects of physical exercise and green tea on learning and memory. The neuroprotective effects of exercise on behavioral functions after a transient cerebral ischemia are consistent with previous researches^{62; 100; 101}.

Ischemia-reperfusion also decreased concentration of catalase in the hippocampus and prefrontal cortex. In addition, ischemia-reperfusion increased the concentration of ROS in the hippocampus and prefrontal cortex, while TBARS increased in the hippocampus. Although these results were expected due the injury by ischemia reperfusion, they cannot be compared with any previous result, since our work seems to be the first to consider a long time after reperfusion.

Physical exercise improved the performance in long term recognition and aversive memory tasks in the ischemia-reperfusion rats. The physical exercise has been shown to potentiate hippocampal neurogenesis and cognitive functions^{68; 73; 80; 102; 103}. It results from different mechanisms, including the capability of modulating oxidative stress⁷⁶.

Despite of physical exercise, long term green tea supplementation also was related with improved learning and memory among ischemia-reperfusion groups, despite of association or not with exercise. It most likely resulted from the antioxidant activity of green tea catechines present in green tea⁷⁷. Our initial hypothesis was that when these antioxidant strategies are combined, their positive effects could be potentiated⁶³. However, interventions in association not prevent against the damages caused by ischemia-reperfusion; in these animals, behavioral performance was similar to those animals underwent the occlusion and received no prior intervention.

In addition, physical exercise associated with green tea supplementation significantly increased levels of ROS in the hippocampus after ischemia-reperfusion. While the concomitant regular physical exercise and intake of green tea has been a valid strategy to improve neuromuscular recovery after exercise^{15; 104; 105}, it may has negative impact in the

case of an ischemia-reperfusion event. The combined interventions increased ROS levels in hippocampus, which can be related to the fact that in this group/structure GSH and GPx were also higher than in the others, leading to an oxidative imbalance. It is interesting to observe that increase in ROS was associated with worst memory performance in this group.

In summary, our results suggest that mnemonic deficits associated to cerebral ischemic-reperfusion can be prevented by physical exercise and green tea when used isolated, but not when both interventions were associated. In addition, association of physical exercise and green tea increased ROS in the hippocampus. In general, regular physical exercise promoted better neuroprotection to an ischemic event.

CAPITULO III

3.1 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o papel neuroprotetor do exercício físico e do chá verde para o desempenho cognitivo depois de um evento de isquemia-reperfusão. Nossos resultados mostraram que a oclusão bilateral das carótidas comuns por 30 minutos gerou danos no hipocampo e no córtex pré-frontal, resultando em aumento da expressão de ERO e TBARs, bem como a diminuição de GSH e Catalase. No entanto, a GPx se mostrou aumentada nos grupos de isquemia reperfusão. Segundo a literatura, este resultado para GPx é aceitável, pois caracteriza um mecanismo de defesa específico do tecido contra o aumento da H₂O₂ induzida pela isquemia-reperfusão¹⁰⁶.

Singh e Chopra (2013) mostraram que a oclusão bilateral das carótidas durante 15 minutos reduziu os níveis de GSH e Catalase, quando medidos 12 dias depois da reperfusão. Viswanatha *et al.* (2013) também reportaram diminuição de GSH e Catalase em um modelo de oclusão bilateral com 1h, com 24 horas de reperfusão. Dessa forma, podemos sugerir que os níveis de antioxidantes vão estar diminuídos após a isquemia-reperfusão, independentemente do tempo de oclusão e de reperfusão.

Nossos achados indicam que a isquemia-reperfusão foi responsável pelo um aumento no estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento de produções de ERO e diminuição nas defesas antioxidantes, principalmente nas amostras retiradas do hipocampo. Esse mecanismo é um dos responsáveis pela morte neuronal^{12; 107} e danos cognitivos subsequentes à isquemia-reperfusão⁹⁹. Isso ocorre porque o aumento da produção de radicais livres tem efeitos deletérios sobre as funções fisiológicas importantes para a sobrevivência das células. Esse aumento sobrecarrega a capacidade de desintoxicação pelo sistema antioxidante¹⁰⁸. Além

disso, a maior expressão de ERO e de TBARs e a diminuição de antioxidantes no hipocampo se deve a suscetibilidade desta região aos danos de isquemia e oxidação⁹⁸. A importância que o hipocampo pode ter na consolidação e armazenamento da memória²⁹ justifica nossos resultados no teste de reconhecimento de objetos⁴⁵, onde os ratos que receberam a oclusão e nenhuma intervenção não foram capazes de diferenciar o objeto novo do objeto já conhecido.

Além dos danos da isquemia-reperfusão sobre parâmetros bioquímicos, nós mostramos que o exercício físico foi capaz de proteger o hipocampo e o córtex pré-frontal contra o estresse oxidativo. No hipocampo, o exercício auxiliou na manutenção e contribuiu para um aumento nos níveis de enzimas antioxidantes. O exercício físico também diminuiu a produção de radicais livres. Já no córtex pré-frontal, embora as enzimas antioxidantes tenham se mantido com o exercício físico, a produção de ERO aumentou. No entanto, a expressão de TBARs apresentou-se diminuída em ratos submetidos à isquemia-reperfusão. Esses achados sugerem que os efeitos do exercício físico podem ser específicos para regiões do cérebro analisadas nesse estudo.

Nossos resultados demonstraram que os ratos submetidos à oclusão bilateral depois que receberam um pré-tratamento com exercício físico tiveram suas funções mnemônicas preservadas, assim como mantiveram a capacidade de aprender. Esse benefício pode ser justificado pelo aumento das enzimas antioxidantes¹⁰⁹, e por outros mecanismos descritos na literatura, tais como a diminuição dos danos oxidativo, aumento da biogênese, aumento da atividade complexa da cadeia de transporte de elétrons, e diminuição de marcadores de apoptose¹¹⁰.

Marques-Aleixo., Oliveira. *et al.*⁵⁹ (2012) fizeram uma revisão bibliográfica a respeito do exercício físico e neuroproteção e encontraram diversos sistemas que explicariam o seu papel neuroprotetor. No entanto, os mecanismos que os estudos experimentais mais destacam são:

- O exercício físico promove mudanças no conteúdo e atividade de enzimas oxidativas no músculo esquelético, o que limita o uso de glicose pelo cérebro tendo efeitos indiretos sobre o seu metabolismo, dessa forma, essa limitação induzida cronicamente funciona como um treinamento ao cérebro para situações em que há ausência de glicose, como em uma condição de isquemia;

- A atividade física regular aumenta a proliferação de células endoteliais do cérebro e, portanto, influencia a vasculatura cerebral, melhorando a capacidade metabólica através do aumento de nutrientes e suprimento de oxigênio.

Assim, os autores⁵¹ concluíram que, embora os estudos descrevam diferentes mecanismos para neuroproteção induzida pelo exercício físico, é indiscutível que o exercício contribui para aumentar o número de células e melhorar sua função em condições em que a perda de células neuronais, como o envelhecimento e doenças neurodegenerativas, estejam ocorrendo. Diante disso, podemos observar que, independente do mecanismo descrito, todos os consideram itens oxidantes, o que reforça nossos achados, que o exercício físico atua na neuroproteção também por meio da regulação do estresse oxidativo presente em condições como a de isquemia.

Assim como o exercício físico, o chá verde também mostrou um importante papel neuroprotetor, uma vez que os ratos que tiveram a oclusão depois que receberam a suplementação com chá verde mostraram um bom desempenho nos testes comportamentais para avaliação de memória e aprendizado. Entende-se que as catequinas do chá verde podem provocar diversos efeitos biológicos, atuando em mecanismos relacionadas a distúrbios vasculares, estresse oxidativo e neuroinflamação, e todos esses processos estão envolvidos na isquemia reperfusão¹¹¹. Assim, embora esteja certificado o papel neuroprotetor do chá verde, os mecanismos de neuroproteção em situações de isquemia-reperfusão ainda são contraditórios.

Biasibetti, Tramontina *et al.*¹¹²(2013) administraram via sonda gástrica em ratos, a principal catequina do chá verde, epigallocatequina galato. Foram doses de 10 mg/kg diárias durante 4 semanas. Análises bioquímicas revelaram aumento nas ERO em ratos saudáveis. Porém assim como no nosso trabalho, esse aumento não interferiu nos resultados das tarefas comportamentais. Adicionalmente, Panickar, Polansky *et al.*¹¹³ (2009) realizaram um estudo bastante pontual sobre o papel neuroprotetor do chá verde em um modelo de isquemia *in vitro* induzida pela deprivação de oxigênio e glicose. Para isso, administraram as principais catequinas isoladas e também o extrato purificado do chá verde. Como resultados, eles encontraram que o extrato purificado foi mais eficiente do que as catequinas isoladas para controlar o edema celular. No entanto, essa neuroproteção não estaria associada com a diminuição de radicais livres, já que o extrato do chá purificado aumentou as concentrações de óxido nítrico. Em contrapartida, estudos mostram que esse achado pode ser explicado pelo fato de que o óxido nítrico é essencial para o processo de cicatrização, além de induzir o crescimento de novos vasos sanguíneos através da indução do fator de crescimento endotelial vascular, atuando assim como neuroprotetor via angiogênese¹¹¹. Porém, não podemos justificar nossos resultados por meio deste mecanismo, já que não mensuramos a concentração de óxido nítrico.

Sabe-se que as catequinas do chá verde atuam nas duas vias de proteção ao estresse oxidativo, tanto inibindo enzimas cuja atividade pode promover estresse oxidativo, como também aumentando a atividade das enzimas antioxidantes¹¹⁴. Porém, não há informação precisa de quais são essas enzimas. O conhecimento exato dessas enzimas seria importante para que elas possam servir como marcadores em estudos envolvendo suplementação com chá verde.

A nossa hipótese inicial era que a combinação do exercício físico, conhecido como uma forma de melhorar as defesas antioxidantes endógenas³⁶, com a ingestão de chá verde,

um suplemento rico em antioxidante exógeno¹¹⁵, poderia potencializar as defesas antioxidantes como um todo, e isso traria um benefício neuroprotetor maior do que se exercício e chá fossem assumidos independentemente. No entanto, os ratos que receberam as duas intervenções apresentaram aumento de ERO no hipocampo. Porém, não podemos deixar de considerar que para a mesma estrutura a GSH também aumentou, o que é um resultado interessante, uma vez que esta enzima é a principal antioxidante do tecido cerebral³⁷. Também, os resultados dos testes comportamentais mostraram que a combinação das duas estratégias pode não ser mais efetiva do que elas em isolado, pois nossos resultados sugeriram que as duas intervenções juntas não foram capazes de proteger contra déficits de memória, enquanto que intervenções isoladas tiveram efeitos positivos.

O protocolo de isquemia-reperfusão utilizado aqui já foi bastante descrito, embora os tempos de reperfusão variem muito²⁵. E como vimos buscando na literatura, o período de reperfusão parece estar tanto quanto, ou até mais, envolvido no processo de morte neuronal do que o período de isquemia³⁴.

Nós optamos por utilizar protocolos, tanto de suplementação de chá verde quanto de exercício físico, que simulassem a prática de humanos. Assim, optamos pela suplementação com chá verde junto com a água de beber, e embora tenhamos feito uma medida média do consumo diário de chá verde entre os ratos, não foi possível determinarmos o volume exato de ingestão de líquido por rato e, por conseguinte, a concentração das catequinas do chá verde. Isso pode ter contribuído para alguns resultados não esperados, já que o papel neuroprotetor do chá verde está associado com o volume de ingestão¹¹¹. Em relação ao exercício físico, devemos mencionar que os estudos mostram que seus efeitos no cérebro são divergentes nos protocolos de exercício usados com modelos animais⁶⁸⁶⁸, o que é uma limitação para estudos que investigam os mecanismos de neuroproteção do exercício físico.

3.2 CONCLUSÕES

Diante do nosso embasamento teórico e resultados encontrados, podemos concluir que a isquemia bilateral de carótidas comuns por 30 minutos, seguida de reperfusão, é capaz de causar déficits de aprendizado e memória de longo prazo, sendo este um modelo válido para estudos sobre alterações cognitivas no AVC em modelo animal de ratos Wistar machos. Esses déficits podem ser explicados pelo aumento de ERO em estruturas envolvidas nos processos cognitivos como hipocampo e córtex pré-frontal.

Além disso, podemos afirmar que tanto a suplementação com chá verde quanto o exercício físico por um período de 8 semanas, são capazes de proteger contra os danos cognitivos da isquemia-reperfusão em modelo animal mantendo os níveis funcionais de marcadores antioxidantes. No entanto, as duas intervenções utilizadas juntas, em geral, não provocaram resultados melhores do que cada intervenção realizada separadamente.

3.3 APLICAÇÕES PRÁTICAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A suplementação com antioxidantes tem ganho popularidade como estratégia de prevenção de doenças, pois sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido no mecanismo de várias doenças. Adicionalmente, as pessoas buscam cada vez mais se exercitar para melhorar a qualidade de vida e para prevenir doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e metabólicas, que são consideradas fatores de risco para o AVC. A partir da revisão de literatura, e juntamente com os nossos resultados, as duas modalidades antioxidantes trazem benefício à saúde além de, serem alternativas bastante populares e de fácil acesso para a população em geral.

Pensando nisso, são perspectivas de estudos futuros o teste de outros protocolos que simulem os danos causados por um AVC em ratos, utilizando diferentes tempos de oclusão e também a oclusão de outras artérias, afim de constatar déficits cognitivos e motores mais próximos da realidade humana o que contribuiria para o desenvolvimento de investigações com potenciais neuroprotetores, e ainda poderiam elucidar melhor os mecanismos tanto de lesão quanto de proteção com base em estratégias antioxidantes.

Considerando mecanismos de neuroproteção, temos como expectativas investigar o impacto de variações nos protocolos de exercício físico, como por exemplo, exercício anaeróbico, ou até mesmo protocolos aeróbicos com as variações nas frações entra volume, intensidade e duração do exercício. Por fim, consideramos fundamental investigar outros marcadores bioquímicos que possam esclarecer melhor os mecanismos antioxidantes e pró oxidantes, assim como marcadores de inflamação e neurotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ¹ CHOU, C. Y. et al. Interchangeable Skin Grafting to Camouflage Self-inflicted Wound Scars on the Dorsal and Volar Forearm: A Case Report. **Ostomy Wound Manage**, v. 60, n. 4, p. 50-2, Apr 2014. ISSN 1943-2720 (Electronic) 0889-5899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24706403> >.
- ² CHEN, S. M. et al. HSP90 inhibitor AUY922 abrogates up-regulation of RTKs by mTOR inhibitor AZD8055 and potentiates its antiproliferative activity in human breast cancer. **Int J Cancer**, Apr 7 2014. ISSN 1097-0215 (Electronic) 0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24706460> >.
- ³ ZHENG, G. et al. Primary prevention for risk factors of ischemic stroke with Baduanjin exercise intervention in the community elder population: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 15, n. 1, p. 113, Apr 9 2014. ISSN 1745-6215 (Electronic) 1745-6215 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712684> >.
- ⁴ BOS, M. J. et al. Modifiable etiological factors and the burden of stroke from the Rotterdam study: a population-based cohort study. **PLoS Med**, v. 11, n. 4, p. e1001634, Apr 2014. ISSN 1549-1676 (Electronic) 1549-1277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24781247> >.
- ⁵ SIERRA, C.; COCA, A.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular mechanisms in the pathogenesis of stroke. **Curr Hypertens Rep**, v. 13, n. 3, p. 200-7, Jun 2011. ISSN 1534-3111 (Electronic) 1522-6417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331606> >.
- ⁶ STRONG, K.; MATHERS, C.; BONITA, R. Preventing stroke: saving lives around the world. **Lancet Neurol**, v. 6, n. 2, p. 182-7, Feb 2007. ISSN 1474-4422 (Print) 1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239805> >.
- ⁷ MERCIER, L. et al. Impact of motor, cognitive, and perceptual disorders on ability to perform activities of daily living after stroke. **Stroke**, v. 32, n. 11, p. 2602-8, Nov 2001. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11692024> >.

- ⁸ WU, K. J. et al. Green Tea Extract Ameliorates Learning and Memory Deficits in Ischemic Rats via Its Active Component Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate by Modulation of Oxidative Stress and Neuroinflammation. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 163106, 2012. ISSN 1741-4288 (Electronic)
1741-427X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919410> >.
- ⁹ SACHDEV, P. S. et al. Progression of cognitive impairment in stroke/TIA patients over 3 years. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, Mar 21 2014. ISSN 1468-330X (Electronic)
0022-3050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659793> >.
- ¹⁰ PINTO, J. M.; NERI, A. L. Factors associated with low life life satisfaction in community-dwelling elderly: FIBRA Study. **Cad Saude Publica**, v. 29, n. 12, p. 2447-58, Dec 2013. ISSN 1678-4464 (Electronic)
0102-311X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356691> >.
- ¹¹ SARKAKI, A. et al. Improvement in Memory and Brain Long-term Potentiation Deficits Due to Permanent Hypoperfusion/Ischemia by Grape Seed Extract in Rats. **Iran J Basic Med Sci**, v. 16, n. 9, p. 1004-10, Sep 2013. ISSN 2008-3866 (Print)
2008-3866 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171080> >.
- ¹² MIFSUD, G. et al. Oligodendrocyte Pathophysiology and Treatment Strategies in Cerebral Ischemia. **CNS Neurosci Ther**, Apr 7 2014. ISSN 1755-5949 (Electronic)
1755-5930 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703424> >.
- ¹³ LIU, X. et al. Green tea polyphenols alleviate early BBB damage during experimental focal cerebral ischemia through regulating tight junctions and PKCalpha signaling. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, n. 1, p. 187, Jul 21 2013. ISSN 1472-6882 (Electronic)
1472-6882 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870286> >.
- ¹⁴ ZHANG, F.; WU, Y.; JIA, J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. **Neuroscience**, v. 177, p. 170-6, Mar 17 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241780> >.
- ¹⁵ HARAMIZU, S. et al. Catechins suppress muscle inflammation and hasten performance recovery after exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 9, p. 1694-702, Sep 2013. ISSN 1530-0315 (Electronic)
0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470311> >.

- ¹⁶ MURASE, T. et al. Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, 2008.
- ¹⁷ WOODRUFF, T. M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Mol Neurodegener**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011. ISSN 1750-1326 (Electronic)
1750-1326 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266064> >.
- ¹⁸ CHEN, S. et al. Reduction of unnecessary right ventricular pacing by managed ventricular pacing and search AV+ algorithms in pacemaker patients: 12-month follow-up results of a randomized study. **Europace**, Apr 4 2014. ISSN 1532-2092 (Electronic)
1099-5129 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24706091> >.
- ¹⁹ RJ, G.; CN, R.; SRC, F. Tratamento da Fase Aguda do Acidente Vascular Cerebra. **Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2001. Disponível em: < http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/010.pdf >.
- ²⁰ PERSSON, M. et al. Microwave-based stroke diagnosis making global pre-hospital thrombolytic treatment possible. **IEEE Trans Biomed Eng**, Jun 12 2014. ISSN 1558-2531 (Electronic)
0018-9294 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951677> >.
- ²¹ KANEKAR, S. G.; ZACHARIA, T.; ROLLER, R. Imaging of Stroke: Part 2, Pathophysiology at the Molecular and Cellular Levels and Corresponding Imaging Changes. **American Journal of Roentgenology** v. 198, p. 63-74, 2012.
- ²² PAGNUSSAT, A. S. Caracterização da morte celular em neurônios da região CA1 do hipocampo de ratos submetidos à isquemia global transitória e reperfusão. **Repositório Digital da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2005 2005. Disponível em: < <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/5561> >.
- ²³ MULLER, V. I. et al. Interindividual differences in cognitive flexibility: influence of gray matter volume, functional connectivity and trait impulsivity. **Brain Struct Funct**, May 31 2014. ISSN 1863-2661 (Electronic)
1863-2653 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878823> >.
- ²⁴ MAJID, A. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future. **ISRN Neurol**, v. 2014, p. 515716, 2014. ISSN 2090-5505 (Print)

2090-5505 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579051> >.

25 SPEETZEN, L. J.; ENDRES, M.; KUNZ, A. Bilateral Common Carotid Artery Occlusion as an Adequate Preconditioning Stimulus to Induce Early Ischemic Tolerance to Focal Cerebral Ischemia. n. 75, p. e4387, 2013/05/09/ 2013. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <http://www.jove.com/video/4387> >.

26 ESTEVES, A. et al. Anatomical arrangement and distribution of the cerebral arterial circle in rats. **Journal of Morphological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 132-139, 2013.

27 ENGEL, O. et al. Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. **Journal of Visualized Experiments**, v. 47, 2011. Disponível em: < <http://www.jove.com/details.php?id=2423> >.

28 HEA, Z. et al. Definition of the anterior choroidal artery territory in rats using intraluminal occluding technique. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 128, n. 1, 2000.

29 CHEN, S. et al. Asiaticoside attenuates memory impairment induced by transient cerebral ischemia-reperfusion in mice through anti-inflammatory mechanism. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 122C, p. 7-15, Mar 12 2014. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631487> >.

30 MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. D.; ARAÚJO, E. G. D. FISIOPATOLOGIA DO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL E POTENCIAL NEUROPROTEÇÃO DO PEQUI (CARYOCAR BRASILIENSE). **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 8, n. 15, p. 1976, 2012.

31 GARCIA CARRASCO, D.; ABOITIZ CANTALAPIEDRA, J. Effectiveness of motor imagery or mental practice in functional recovery after stroke: a systematic review. **Neurologia**, Apr 16 2013. ISSN 1578-1968 (Electronic)

0213-4853 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601759> >.

32 SUN, M. K.; ALKON, D. L. The "memory kinases": roles of PKC isoforms in signal processing and memory formation. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 122, p. 31-59, 2014. ISSN 1878-0814 (Electronic)

1877-1173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24484697> >.

- 33 OZTANIR, M. N. et al. Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. **Neurol Sci**, Mar 28 2014. ISSN 1590-3478 (Electronic)
1590-1874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676696> >.
- 34 ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **Int J Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461-70, Dec 2009. ISSN 1747-4949 (Electronic)
1747-4930 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19930058> >.
- 35 GULATI, P.; SINGH, N. Neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice: a possible relationship between protein kinase C and nitric oxide pathways. **J Surg Res**, Feb 19 2014. ISSN 1095-8673 (Electronic)
0022-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655662> >.
- 36 YU, B. P.; CHUNG, H. Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. **Mech Ageing Dev**, v. 127, n. 5, p. 436-43, May 2006. ISSN 0047-6374 (Print)
0047-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497363> >.
- 37 ZLATKOVIC, J. et al. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. **Mol Cell Biochem**, Mar 27 2014. ISSN 1573-4919 (Electronic)
0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671494> >.
- 38 TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 803-19, Apr 2013. ISSN 1872-9754 (Electronic)
0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291248> >.
- 39 TEWARI, A. et al. Antioxidants: The new frontier for translational research in cerebroprotection. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**, v. 30, n. 2, p. 160-171, Apr 2014. ISSN 0970-9185 (Print)
0970-9185 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24803750> >.
- 40 PENG, C. et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 831841, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804252> >.
- 41 CRACK, P. J. et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to

ischemia/reperfusion injury. **J Neurochem**, v. 78, n. 6, p. 1389-99, Sep 2001. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11579147> >.

42 NEWBURGER, J. W. et al. Transplant-Free Survival and Interventions at 3 Years in the Single Ventricle Reconstruction Trial. **Circulation**, Apr 4 2014. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705119> >.

43 IZQUIERDO, L. A. et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 3, p. 269-87, Jun 2002. ISSN 0272-4340 (Print)

0272-4340 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469870> >.

44 IZQUIERDO, I. **Memória**. 2^a. 2011.

45 LARKIN, M. C. et al. Hippocampal output area CA1 broadcasts a generalized novelty signal during an object-place recognition task. **Hippocampus**, Mar 4 2014. ISSN 1098-1063 (Electronic)

1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596296> >.

46 CECHETTI, F. et al. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. **Brain Res**, v. 1188, p. 182-8, Jan 10 2008. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021756> >.

47 TIRAPU-USTÁRROZ, J.; MUÑOZ-CÉSPEDES, J. M. Memoria y funciones ejecutivas. **Revista de Neurologia**, v. 41, n. 8, p. 475-484, 2005.

48 WANG, J. X.; COHEN, N. J.; VOSS, J. L. Covert rapid action-memory simulation (CRAMS): A hypothesis of hippocampal-prefrontal interactions for adaptive behavior. **Neurobiol Learn Mem**, Apr 19 2014. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752152> >.

49 DA SILVEIRA, C. K. et al. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 103, p. 64-71, Jul 2013. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583502> >.

- 50 BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C. Object-in-Place Associative Recognition Memory Depends on Glutamate Receptor Neurotransmission Within Two Defined Hippocampal-Cortical Circuits: A Critical Role for AMPA and NMDA Receptors in the Hippocampus, Perirhinal, and Prefrontal Cortices. **Cereb Cortex**, Sep 12 2013. ISSN 1460-2199 (Electronic)
1047-3211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035904> >.
- 51 YANG, F. C.; LIANG, K. C. Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: Difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning. **Neurobiol Learn Mem**, Jul 25 2013. ISSN 1095-9564 (Electronic)
1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891992> >.
- 52 ROSA, J. et al. Fear extinction can be made state-dependent on peripheral epinephrine: Role of norepinephrine in the nucleus tractus solitarius. **Neurobiol Learn Mem**, Oct 23 2013. ISSN 1095-9564 (Electronic)
1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24161888> >.
- 53 MARTINEZ-DIAZ, J. A. et al. Effects on locomotion and memory in 2 models of cerebral hypoperfusion in male Wistar rats. **Neurologia**, Apr 3 2014. ISSN 1578-1968 (Electronic)
0213-4853 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704245> >.
- 54 HIRAIDE, S. et al. Behavioural effects of monoamine reuptake inhibitors on symptomatic domains in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 105, p. 89-97, Apr 2013. ISSN 1873-5177 (Electronic)
0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23380523> >.
- 55 SAINI, A. K.; KUMAR, H. S. A.; SHARMA, S. S. Preventive and curative effect of edaravone on nerve functions and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. **Eur J Pharmacol**, v. 568, n. 1-3, p. 164-72, Jul 30 2007. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521626> >.
- 56 SUTHERLAND, B. A. et al. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. **Int J Stroke**, v. 7, n. 5, p. 407-18, Jul 2012. ISSN 1747-4949 (Electronic)
1747-4930 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394615> >.

- ⁵⁷ PIETRELLI, A. et al. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. **Neuroscience**, v. 202, p. 252-66, Jan 27 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22183054> >.
- ⁵⁸ EGAN, K. J. et al. Exercise Reduces Infarct Volume and Facilitates Neurobehavioral Recovery: Results From a Systematic Review and Meta-analysis of Exercise in Experimental Models of Focal Ischemia. **Neurorehabil Neural Repair**, Feb 18 2014. ISSN 1552-6844 (Electronic)
1545-9683 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553105> >.
- ⁵⁹ MARQUES-ALEIXO., I. et al. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: Evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 99, p. 149-162, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.08.002> >.
- ⁶⁰ GERECKE, K. M. et al. Exercise protects against chronic restraint stress-induced oxidative stress in the cortex and hippocampus. **Brain Res**, v. 1509, p. 66-78, May 6 2013. ISSN 1872-6240 (Electronic)
0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499928> >.
- ⁶¹ KIM, B. K. et al. Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta-induced Alzheimer disease rats. **J Exerc Rehabil**, v. 10, n. 1, p. 2-8, Feb 2014. ISSN 2288-176X (Print)
2288-176X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678498> >.
- ⁶² TAHAMTAN, M. et al. Exercise Preconditioning Improves Behavioral Functions following Transient Cerebral Ischemia Induced by 4-Vessel Occlusion (4-VO) in Rats. **Arch Iran Med**, v. 16, n. 12, p. 697-704, Dec 2013. ISSN 1735-3947 (Electronic)
1029-2977 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24329142> >.
- ⁶³ VAN PRAAG, H. Exercise and the brain: something to chew on. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 283-90, May 2009. ISSN 0166-2236 (Print)
0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349082> >.
- ⁶⁴ XU, Y. Q. et al. Hydrolysis of green tea residue protein using proteolytic enzyme derived from *Aspergillus oryzae*. **J Food Sci Technol**, v. 50, n. 1, p. 171-5, Feb 2013. ISSN 0022-1155 (Print)
0022-1155 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425904> >.

- ⁶⁵ UNNO, K. et al. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). **Exp Gerontol**, v. 39, n. 7, p. 1027-34, Jul 2004. ISSN 0531-5565 (Print) 0531-5565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15236762> >.
- ⁶⁶ MENARD, C.; BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Neuroprotective effects of resveratrol and epigallocatechin gallate polyphenols are mediated by the activation of protein kinase C gamma. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 281, 2013. ISSN 1662-5102 (Electronic) 1662-5102 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421757> >.
- ⁶⁷ TIAN, S. et al. Early exercise training improves ischemic outcome in rats by cerebral hemodynamics. **Brain Res**, v. 1533, p. 114-21, Oct 2 2013. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948104> >.
- ⁶⁸ CECHETTI, F. et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 97, n. 1, p. 90-6, Jan 2012. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001013> >.
- ⁶⁹ DAL-PIZZOL, F. et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neurosci Lett**, v. 291, n. 3, p. 179-82, Sep 22 2000. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984636> >.
- ⁷⁰ DAL-PIZZOL, F. et al. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 130, n. 1, p. 109-14, Sep 23 2001. ISSN 0165-3806 (Print) 0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557099> >.
- ⁷¹ COLLINO, M. et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. **Eur J Pharmacol**, v. 530, n. 1-2, p. 70-80, Jan 13 2006. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386242> >.
- ⁷² VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromolecular Med**, v. 10, n. 2, p. 128-40, 2008. ISSN 1535-1084 (Print) 1535-1084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286389> >.

- ⁷³ VIVAR, C.; POTTER, M. C.; VAN PRAAG, H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 15, p. 189-210, 2013. ISSN 1866-3370 (Print)
1866-3370 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847651> >.
- ⁷⁴ VOSS, M. W. et al. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. **Trends Cogn Sci**, v. 17, n. 10, p. 525-44, Oct 2013. ISSN 1879-307X (Electronic)
1364-6613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24029446> >.
- ⁷⁵ YANG, X. et al. Pre-Ischemic Treadmill Training for Prevention of Ischemic Brain Injury via Regulation of Glutamate and Its Transporter GLT-1. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 8, p. 9447-59, 2012. ISSN 1422-0067 (Electronic)
1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949807> >.
- ⁷⁶ HAMAKAWA, M. et al. Repeated short-term daily exercise ameliorates oxidative cerebral damage and the resultant motor dysfunction after transient ischemia in rats. **J Clin Biochem Nutr**, v. 53, n. 1, p. 8-14, Jul 2013. ISSN 0912-0009 (Print)
0912-0009 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874064> >.
- ⁷⁷ PARK, J. W. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces neuronal cell damage and up-regulation of MMP-9 activity in hippocampal CA1 and CA2 areas following transient global cerebral ischemia. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 2, p. 567-75, Feb 2009. ISSN 1097-4547 (Electronic)
0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752302> >.
- ⁷⁸ XU, Y. et al. Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 8, p. 741-8, Aug 2010. ISSN 1873-4847 (Electronic)
0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19615878> >.
- ⁷⁹ BERUBE-PARENT, S. et al. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **Br J Nutr**, v. 94, n. 3, p. 432-6, Sep 2005. ISSN 0007-1145 (Print)
0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176615> >.
- ⁸⁰ MARLATT, M. W. et al. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. **Dev Neurobiol**, v. 72, n. 6, p. 943-52, Jun 2012. ISSN 1932-846X (Electronic)

1932-8451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252978> >.

81 HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-26, Jul 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/962076> >.

82 AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.

83 LOETCHUTINAT, C. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 323-331, 2005.

84 OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810> >.

85 WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-33, 1981. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7329310> >.

86 MALEK, M. H. et al. Similar skeletal muscle angiogenic and mitochondrial signalling following 8 weeks of endurance exercise in mice: discontinuous versus continuous training. **Exp Physiol**, v. 98, n. 3, p. 807-18, Mar 2013. ISSN 1469-445X (Electronic)

0958-0670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180811> >.

87 BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 45, n. 6, p. 1009-15, Dec 1978. ISSN 0161-7567 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/730582> >.

88 MUSTATA, G. T. et al. Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycooxidation and cross-linking. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 517-26, Feb 2005. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677510> >.

- ⁸⁹ CHANDRA, S.; DE MEJIA GONZALEZ, E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 11, p. 3583-9, Jun 2 2004. ISSN 0021-8561 (Print)

0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161234> >.

- ⁹⁰ ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3228475> >.

- ⁹¹ MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The nucleus of the solitary tract --> nucleus paragigantocellularis --> locus coeruleus --> CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 100, p. 56-63, Feb 2013. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246466> >.

- ⁹² BARROS, D. M. et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behav Brain Res**, v. 124, n. 1, p. 1-7, Sep 28 2001. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423160> >.

- ⁹³ FIORENZA, N. G. et al. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behav Brain Res**, v. 232, n. 1, p. 210-6, Jun 15 2012. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525015> >.

- ⁹⁴ MELLO, P. B. et al. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 3, p. 364-9, Oct 2009. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398029> >.

- ⁹⁵ BONINI, J. S. et al. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Horm Behav**, v. 50, n. 2, p. 308-13, Aug 2006. ISSN 0018-506X (Print)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697382> >.

- ⁹⁶ PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print)
0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480> >.
- ⁹⁷ TJOLSEN, A. et al. An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail-skin temperature. **J Neurosci Methods**, v. 26, n. 3, p. 259-65, Jan 1989. ISSN 0165-0270 (Print)
0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2918750> >.
- ⁹⁸ ZAMANI, M. et al. Neuroprotective effect of olive oil in the hippocampus CA1 neurons following ischemia: Reperfusion in mice. **J Neurosci Rural Pract**, v. 4, n. 2, p. 164-70, Apr 2013. ISSN 0976-3147 (Print)
0976-3155 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23914093> >.
- ⁹⁹ LIMA, A. M. et al. Differential effects of paradoxical sleep deprivation on memory and oxidative stress. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Jan 15 2014. ISSN 1432-1912 (Electronic)
0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424716> >.
- ¹⁰⁰ SHIH, P. C.; YANG, Y. R.; WANG, R. Y. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78163, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24205142> >.
- ¹⁰¹ LI, J. et al. Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise preconditioning in rats. **Neurol Res**, v. 26, n. 4, p. 404-8, Jun 2004. ISSN 0161-6412 (Print)
0161-6412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198867> >.
- ¹⁰² CASTILLA-ORTEGA, E. et al. Voluntary exercise followed by chronic stress strikingly increases mature adult-born hippocampal neurons and prevents stress-induced deficits in 'what-when-where' memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 109C, p. 62-73, Dec 11 2013. ISSN 1095-9564 (Electronic)
1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333647> >.
- ¹⁰³ KOBILO, T. et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. **Learn Mem**, v. 18, n. 9, p. 605-9, 2011. ISSN 1549-5485 (Electronic)
1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878528> >.

- ¹⁰⁴ HARAMIZU, S. et al. Catechins attenuate eccentric exercise-induced inflammation and loss of force production in muscle in senescence-accelerated mice. **J Appl Physiol**, v. 111, n. 6, p. 1654-63, Dec 2011. ISSN 1522-1601 (Electronic)
0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903878> >.
- ¹⁰⁵ JOWKO, E. et al. Effect of a single dose of green tea polyphenols on the blood markers of exercise-induced oxidative stress in soccer players. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 22, n. 6, p. 486-96, Dec 2012. ISSN 1543-2742 (Electronic)
1526-484X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212321> >.
- ¹⁰⁶ AKSU, I. et al. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. **Neurosci Lett**, v. 452, n. 3, p. 281-5, Mar 20 2009. ISSN 1872-7972 (Electronic)
0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18817845> >.
- ¹⁰⁷ SINGH, D. P.; CHOPRA, K. Verapamil augments the neuroprotectant action of berberine in rat model of transient global cerebral ischemia. **Eur J Pharmacol**, v. 720, n. 1-3, p. 98-106, Nov 15 2013. ISSN 1879-0712 (Electronic)
0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177287> >.
- ¹⁰⁸ RAUS BALIND, S. et al. Extremely low frequency magnetic field (50 Hz, 0.5 mT) reduces oxidative stress in the brain of gerbils submitted to global cerebral ischemia. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88921, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586442> >.
- ¹⁰⁹ GAO, C. et al. Myocardial mitochondrial oxidative stress and dysfunction in intense exercise: regulatory effects of quercetin. **Eur J Appl Physiol**, v. 114, n. 4, p. 695-705, Apr 2014. ISSN 1439-6327 (Electronic)
1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24368555> >.
- ¹¹⁰ KIM, D. Y.; JUNG, S. Y.; SEO, B. D. Effect of exercise intervention on changes in free Fatty Acid levels and metabolic risk factors in stroke patients. **J Phys Ther Sci**, v. 26, n. 2, p. 275-9, Feb 2014. ISSN 0915-5287 (Print)
0915-5287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648648> >.
- ¹¹¹ SUTHERLAND, B. A.; RAHMAN, R. M.; APPLETON, I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. **J Nutr Biochem**, v. 17, n. 5, p. 291-306, May 2006. ISSN 0955-2863 (Print)
0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443357> >.

- ¹¹² BIASIBETTI, R. et al. Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. **Behav Brain Res**, v. 236, n. 1, p. 186-93, Jan 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)
0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964138> >.
- ¹¹³ PANICKAR, K. S.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A. Green tea polyphenols attenuate glial swelling and mitochondrial dysfunction following oxygen-glucose deprivation in cultures. **Nutr Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 105-13, Jun 2009. ISSN 1476-8305 (Electronic)
1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356313> >.
- ¹¹⁴ WEINREB, O. et al. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J Nutr Biochem**, v. 15, n. 9, p. 506-16, Sep 2004. ISSN 0955-2863 (Print)
0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350981> >.
- ¹¹⁵ OUNJAIJEAN, S. et al. Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats. **Med Chem**, v. 4, n. 4, p. 365-70, Jul 2008. ISSN 1573-4064 (Print)
1573-4064 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18673149> >.