Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2016

Alterações morfológicas e comportamentais em gerbilos
isquêmicos induzidas pela exposição à nicotina e treino de marcha
forçada contínua em esteira.

Takae Tamy Kitabatake

Dissertação de Mestrado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REABILITAÇÃO E DESEMPENHO
FUNCIONAL

Takae Tamy Kitabatake

Alterações morfológicas e comportamentais em gerbilos isquêmicos induzidas pela
exposição à nicotina e treino de marcha forçada contínua em esteira.

Ribeirão Preto

2016

Takae Tamy Kitabatake

Alterações morfológicas e comportamentais em gerbilos isquêmicos induzidas pela exposição à nicotina e treino de marcha forçada contínua em esteira.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, junto ao Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, para obtenção do título de mestre em Reabilitação e Desempenho Funcional.

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na biblioteca da unidade que aloja o programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”.

Área de Concentração: Fisioterapia

Orientador: João Eduardo de Araújo

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a Reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Kitabatake, Takae Tamy

Alterações morfológicas e comportamentais em gerbilos isquêmicos induzidas pela exposição à nicotina e treino de marcha forçada contínua em esteira.

90 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação.

Orientador: Araujo, João Eduardo de.

1. Isquemia cerebral. 2. Gerbil. 3. Nicotina. 4. Exercício físico.

Nome: Kitabatake, Takae Tamy

Título: Alterações morfológicas e comportamentais em gerbilos isquêmicos induzidas pela exposição à nicotina e treino de marcha forçada contínua em esteira.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento: _____
Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Inês e Amadeu, que sempre me apoiaram em todas as escolhas que fiz em minha vida e estiveram ao meu lado em todos os momentos, me fornecendo todo suporte e amor que só se pode esperar daqueles que nos amam.

Dedico também aos meus amigos e especialmente ao meu namorado, Luigi, que esteve ao meu lado em todos os momentos ao longo desta importante etapa.

Muito obrigada.

Com amor.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. João Eduardo de Araujo por toda confiança, apoio e por acreditar em meu trabalho e me oferecer esta grande oportunidade.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra que cedeu seu laboratório para a avaliação histológica deste trabalho, e também ao seu técnico de laboratório Daoud Hibrahim Elias Filho, que me ajudou nesta etapa.

Aos funcionários do prédio da Fisioterapia, Samuel, Marília e Rubens. Sem a ajuda de todos eles este trabalho não seria possível.

A todos os meus colegas de laboratório que e ajudaram ao longo desta jornada, Raquel, Thairyne, Tamyris e ao Guilherme, que me ensinou durante minha Iniciação Científica, os procedimentos que pude pôr em prática neste trabalho.

A todos os meus familiares que de alguma maneira, mesmo que indireta, colaboraram com a conclusão deste trabalho.

À FAPESP, que financiou este projeto e que desta maneira me proporcionou maiores recursos para realização deste trabalho. Processo 2015/07730-0.

E aos animais que participaram deste projeto. Meu sincero respeito.

Resumo

Resumo

Kitabatake, T.T. **Alterações morfológicas e comportamentais em gerbilos isquêmicos induzidas pela exposição à nicotina e treino de marcha forçada contínua em esteira**. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Este trabalho visa avançar o conhecimento sobre a interferência da nicotina no protocolo de treino forçado em gerbilos isquêmicos. Utilizamos 110 Gerbilos, distribuídos em 11 grupos. Grupo controle com animais ingênuos (C), falso operado (S) e isquêmicos (I). Grupos nicotina (CN, SN, SNE, IN e INE) e salina (CS, SS, IS) com ou sem treinamento. Os animais receberam uma injeção de 2mg/kg de nicotina ou salina durante 9 dias. Utilizamos uma esteira motorizada (treino contínuo, 5 dias, 5m/min por 15 minutos), um monitor de atividades e o Rota Rod. Os resultados foram analisados por uma ANOVA e pós teste de Holm-Sidak, $p < 0,05$. Observamos aumento de apresentação de todos comportamentos no monitor de atividades, o CN maior do que os C, S, SS, SNE e INE, o SN maior do que o SNE, o I maior do que os C, S, SS, SNE, IS, INE e ainda, o IN maior do que os C, S, SS, SNE, IS e INE (cruzamento, $F_{10,93} = 2,97$), (distância, $F_{10,93} = 2,79$), (velocidade, $F_{10,93} = 2,79$) e (atividade, $F_{10,93} = 2,81$). No Rota Rod o CN apresentou maior tempo de permanência com relação aos outros grupos exceto SNE, já o SNE, em relação aos CS, S, SN, I, IN e o I menor tempo de permanência do que o C e INE ($F_{10,93} = 3,35$). Nos grupos I e IS observamos menor densidade de neurônios no hipocampo ($F_{6,42} = 31,02$), córtex motor M1 ($F_{6,42} = 4,01$) e estriado ($F_{6,42} = 23,33$). A nicotina não interferiu com a melhora do comportamento dos animais isquêmicos.

Palavras chave: isquemia, gerbil, nicotina, exercício físico.

Abstract

Kitabatake, T.T. **Morphological and behavioral changes in ischemic gerbils induced by nicotine exposure and to continuous treadmill training.** 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

This work aims to advance the knowledge about the interference of nicotine in the forced training protocol in ischemic gerbils. We use 110 gerbils, distributed in 11 groups. Control (C), false operated (S) and ischemic (I). Nicotine groups (CN, SN, SNE, IN, INE) and sham (CS, SS, SI) with or without training. The animals received an injection of 2mg/kg of nicotine or saline for 9 days. We use a treadmill (continuous training 5 days, 5m / min for 15 minutes), an activity monitor and the Rota Rod (RR). The results were analyzed by an ANOVA and *post Holm-Sidak* test, $p < 0.05$. We observed increased in all behaviors in the activity monitor, increase of CN than C, S, SS and NSS INE, SN increase compared to NES, the I increase than C, S, SS, ENS, S, NSI and also the IN showed an increase compared to C, S, SS, SNE, SI and NSI (crossing, $F_{10,93} = 2,97$), (distance, $F_{10,93} = 2,79$), (speed, $F_{10,93} = 2,79$) and (activity, $F_{10,93} = 2,81$). In RR, CN showed an increase of time spent with the other groups except SNE, and an increase in the SNE, compared to the CS, S, SN, I, IN and I showed an decrease of time compared to C and INE ($F_{10,93} = 3,35$). In groups I and IS we observed an decrease of neurons density in the hippocampus ($F_{6,42} = 31,02$), motor cortex M1 ($F_{6,42} = 4,01$) and striatum ($F_{6,42} = 23,33$). Nicotine did not interfere with the improvement of motor behavior in ischemic animals.

Key words: ischemia, gerbil, nicotine, physical exercise.

Lista de Abreviaturas

AVE - Acidente vascular encefálico.....	20
SNC - Sistema nervoso central.....	21
LTP - Potencialização à longo prazo.....	23
NGF - Fator de crescimento neural.....	24
nAChRs - Receptores neuronais nicotínicos de acetilcolina.....	27
MAO - Monoamina oxidase.....	27
OMS - Organização Mundial de Saúde.....	29
C - Grupo Controle.....	35
CS - Grupo Controle Salina.....	35
CN - Grupo Controle Nicotina.....	35
S - Grupo Sham.....	35
SS - Grupo Sham Salina.....	35
SN - Grupo Sham Nicotina.....	35
SNE - Grupo Sham Nicotina Estimulado.....	35
I - Grupo Isquemia.....	35
IS - Grupo Isquemia Salina.....	36
IN - Grupo Isquemia Nicotina.....	36
INE - Grupo Isquemia Nicotina Estimulado.....	36
RR - Rota Rod.....	40

RPM - Rotações por minuto.....40

H&E - Hematoxilina e Eosina.....41

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do nAChR (A) cinco subunidades se juntam para formar uma subunidade funcional. (B) receptores homoméricos consistem em subunidades únicas que geralmente, têm uma baixa afinidade para o agonista. Até o presente, apenas o $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$ (não mostrado) subunidades podem formar homômeros funcionais. (C) A maior parte dos nAChRs de afinidade elevada são heteroméricos e consistem de uma combinação de subunidades α e β . Múltiplas subunidades α podem se juntar com múltiplas subunidades β do nAChR (ilustrada aqui por $\alpha 4\alpha 6\beta 3\beta 2$). Locais de ligação de ACh são representados como triângulos vermelhos (modificada de Hendrickson et al., 2013)28

Figura 2: Animal na tábua cirúrgica já com as artérias carótidas ocluídas por fio de sutura durante o procedimento cirúrgico de isquemia.....37

Figura 3: Esteira monitorizada para roedores com 6 baias individuais.....38

Figura 4: Monitor de atividades. Local onde é feita a análise comportamental do animal para os comportamentos de cruzamento, atividade, distância e velocidade.....40

Figura 5: Rota Rod. Local onde o equilíbrio dos animais foi testado..... 41

Figura 6: Índice de aproveitamento dos animais submetidos a cirurgia isquêmica em porcentagem. Em azul 86% dos animais operados apresentaram sinais de isquemia; em vermelho 5%, dos animais não apresentaram sinais de isquemia e, em verde 9% representa o número de óbitos.....44

Figura 7: Número de cruzamentos no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que SNE; $\neq$ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e $\neq$ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.....45

Figura 8: Comparação do comportamento de distância entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que o SNE; $\neq$ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e $\neq$ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.....46

Figura 9: Comparação do comportamento de velocidade entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que o SNE; $\neq$ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e $\neq$ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.....48

Figura 10: Comparação do comportamento de atividade entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que o SNE; $\neq$ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e $\neq$ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.....49

Figura 11: Comparação do tempo de permanência no RR entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam o tempo de permanência em segundos e as barras representam

+ o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que todos os grupos, exceto o SNE; £ SNE maior que CS, S, SN, I, IN; ≠ I menor que C e o INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de *Holm Sidack*. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.....50

Figura 12: Comparação da densidade de neurônios na área CA1 do hipocampo. As colunas representam a média das densidades em cada grupo e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. ≠ diminuição I em relação ao C, CS, CN, IN e INE; + diminuição IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE; ¥ diminuição IN em relação ao C, CS, CN e INE. sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de *Holm Sidack*. O número de animais em todos os grupos é igual a 7 (n=7) 52

Figura 13: Fotomicrografia de cortes coronais da área CA1 do hipocampo de gerbilos. (A) grupo controle - C, (B) grupo isquemia - I, (C) grupo isquemia nicotina - IN, (D) grupo isquemia nicotina estimulado - INE. A barra representa 50µm. As setas em preto apontam para células piramidais e as setas em branco apontam para regiões de rarefação.....53

Figura 14: Comparação do número de neurônios do córtex motor M1. As colunas representam a média das densidades em cada grupo e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. ≠ diminuição do I em relação ao C, CS, CN, IN e INE, + diminuição do IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de *Holm Sidack*. O número de animais em todos os grupos é igual a 7 (n=7).....54

Figura 15: Fotomicrografia de cortes coronais da área do córtex motor M1 de gerbilos. (A) grupo controle - C, (B) grupo isquemia - I, (C) grupo isquemia nicotina - IN, (D) grupo isquemia nicotina estimulado - INE. A barra representa 50µm. As setas em preto apontam para células piramidais e as setas em branco apontam para regiões de rarefação.....55

Figura 16: Comparação do número de neurônios do estriado. As colunas representam a média das densidades em cada grupo e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. ≠ diminuição do I em relação ao C, CS, CN, IN e INE, + diminuição do IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de *Holm Sidack*. O número de animais em todos os grupos é igual a 7 (n=7)56

Figura 17: Fotomicrografia de cortes coronais da área do estriado de gerbilos. (A) grupo controle - C, (B) grupo isquemia - I, (C) grupo isquemia nicotina - IN, (D) grupo isquemia nicotina estimulado - INE. A barra representa 50µm. As setas em preto apontam para células piramidais e as setas em branco apontam para regiões de rarefação.....57

1.0 Introdução	19
1.1 Acidente Vascular Encefálico	20
1.2 Morte celular por isquemia	21
1.3 Modelos Animais e plasticidade encefálica.....	22
1.4 Isquemia encefálica e atividade física.....	23
1.5 A nicotina e o comportamento motor	27
2.0 Objetivos	32
Objetivo geral:	33
Objetivo específico:	33
3.0 Materiais e métodos	34
3.1 Animais	35
3.3 Aplicação Nicotina:	36
3.4 Cirurgia experimental	37
3.5 Estimulação Motora	38
3.6 Aparelhos Para Análise Comportamental.....	39
3.7 . Monitor de Atividade.....	39
3.8 Rota Rod	40
3.9 Avaliação Histológica da Área de Isquemia	41
3.10 Análise Dos Resultados	42
4.0 Resultados	43
4.1 Resultados comportamentais	45
4.2 Resultados Histológicos	51
4.2.1 Hipocampo	52
4.2.2 Córtex motor – M1	54
4.2.3 Estriado	56
5.0 Discussão	58
6.0 Conclusões	66
Referências Bibliográficas	68

1.1 Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma doença neurológica importante que pode desencadear sequelas temporárias ou permanentes (SPOLAORE et.al., 2005; MICHAELSKI et al., 2015). Entre os acometidos, somente 65% dos sobreviventes apresentam um retorno funcional no primeiro ano pós-lesão (WOLFE, et al., 2000). O AVE é a terceira causa de morte na população mundial, resultando em cerca de 6.000.000 de mortes anualmente (WOODRUFF et al., 2011).

O AVE pode ser dividido em dois grupos distintos, o isquêmico e o hemorrágico, sendo que o AVE isquêmico é responsável por 87% e o hemorrágico, por 13% dos casos diagnosticados (ROSAMOND et al, 2007, YAN et al., 2014, YU et al., 2014). Desta maneira, podemos observar que o AVE isquêmico é o de maior prevalência e importância em relação à quantidade de novos casos anuais. Entre as causas do AVE isquêmico, os tromboembolismos são responsáveis por aproximadamente 75% de todos os casos na população, constituindo a causa mais frequente de obstrução do fluxo sanguíneo ao cérebro (DESILLES et al., 2015; KOLOMINSKY-RABAS PL et al., 2001).

Os fatores de risco para o AVE estão associados à ocorrência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, sendo que, fatores cardiovasculares não tratados são os maiores responsáveis por sua ocorrência (GUS et al., 2002). Em ordem decrescente de fatores de risco temos a hipertensão, sedentarismo, diabetes mellitus tipo II, tabagismo e hipercolesterolemia (RODRIGUES et al., 2013).

Após um AVE, o tecido cerebral sofre com a privação de oxigênio e glicose, seguido pela liberação de glutamato, acúmulo de cálcio intracelular e indução de processos inflamatórios (LIPTON et al., 1999). Subsequentemente, ocorre infarto tecidual e perda neuronal por processos necróticos e apoptóticos (DE ARAUJO et al., 2008, CAO et al., 2004). Essa sequência de eventos chama-se cascata isquêmica e leva a lesões nos tecidos cerebrais, ditas irreversíveis (FLURI et al., 2015). O desafio na recuperação do AVE é entender de que maneira pode-se modificar as redes neuronais para promover melhores estratégias que compensem a lesão tecidual (MURPHY AND COBBET 2009). Estudos com modelos isquêmicos, plasticidade encefálica e exercícios combinados são relativamente novos, dando origem a áreas de investigação bastante recentes (HARA et al., 2015).

1.2 Morte celular por isquemia

O tecido cerebral é extremamente sensível à isquemia, assim, até mesmo pequenos períodos isquêmicos são capazes de gerar morte celular e consequente prejuízo às funções cerebrais (MATTSON et al., 2001; WOODRUFF et al., 2011). Após a isquemia, a excitotoxicidade conduz a inflamação e estresse oxidativo no tecido encefálico, resultando em disfunção da barreira hematoencefálica, alterações microvasculares, morte celular e consequentemente danos cerebrais (LAKHAN et al., 2009). Durante o processo de isquemia, também ocorre aumento da liberação de glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), levando inúmeros neurônios à morte devido à hiperestimulação (DE ARAUJO et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2012; KITABATAKE et al., 2015; NISHIZAWA et al., 2001).

Em modelos animais ou estudos clínicos, a isquemia global induzida pela privação de fluxo sanguíneo, oriundo da obstrução do fluxo sanguíneo das carótidas, causa neurodegeneração em regiões específicas e vulneráveis, como o observado no estriado, córtex cerebral, tálamo (PEREIRA et al., 2010), sendo a região mais vulnerável a CA1 do hipocampo (YAN et al., 2014).

A região CA1 no hipocampo tem um importante papel no aprendizado e no processamento de memória (RILJACK et al., 2010). A morte neuronal nesta região é chamada de “atrasada” em comparação a outras regiões, (ECKERT; ABRAHAM, 2013; YAN, et al., 2012) já que o processo de morte se acentua no 4º dia pós evento isquêmico (DE ARAUJO et al., 2012). Em outras áreas como a área motora M1 do córtex motor, que está envolvida com processos referentes ao aprendizado motor (NUDO, 2003; PAGNUSSAT et al., 2012), a morte celular pós isquemia apresenta uma perda neuronal adicional após o 4º dia do evento isquêmico (DE ARAUJO et al., 2012). De maneira distinta, no estriado, a morte neuronal acontece em poucas horas após o evento isquêmico, chegando a aproximadamente 20% de neurônios sobreviventes em 4 horas (WINTER et al., 2005). Trabalhos realizados em nosso laboratório com modelos isquêmicos em gerbilos da mongólia, mostram que o córtex motor e o estriado são as estruturas mais afetadas seis dias após a isquemia global (DE ARAUJO et al., 2008, DE ARAUJO et al., 2012).

Um fator importante a ser considerado em trabalhos que analisam dados morfológicos é a idade do animal no momento do evento isquêmico. Estudos recentes mostram que a morte neuronal na área CA1 do hipocampo após 5 minutos de isquemia é mais atrasada e menor em gerbilos jovens, quando comparados com animais já adultos (YAN et al., 2011; YAN et al., 2012).

1.3 Modelos Animais e plasticidade encefálica

O emprego de modelos animais permite o estudo e a investigação da fisiopatologia da isquemia encefálica, especialmente os modelos de isquemia focal (GERRIETS et al., 2003), assim como a experimentação com novos modelos terapêuticos, contribuindo para o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento (DITTMAR et al., 2003), tornando-se indispensáveis para o estudo dos mecanismos e das possibilidades terapêuticas pós AVE (PAGNUSSAT et al., 2012). Existem limitações em todo e qualquer estudo com sujeitos humanos, incluindo os estudos que abordam AVE. Desta maneira, modelos animais de isquemia são muito úteis para descrever a remodelação e a reorganização dos neurônios, seja em nível micro ou macromolecular (WAHL; SCHWAB, 2014).

Nos modelos experimentais temos dois tipos principais de isquemia encefálica: a isquemia global e a focal. Nos modelos de isquemia global, dois ou quatro vasos cervicais são temporariamente ocluídos e a circulação restaurada após determinado tempo. Nesses modelos, os mais utilizados são a oclusão da artéria cerebral média, oclusão das carótidas, modelos de craniectomia e trombóticos, aplicação de endotelina 1 em sítios específicos (FLURI et al., 2015) e também modelos em cérebros imaturos como, por exemplo, a oclusão do cordão umbilical (MALLARD et al., 2015). Para tal propósito, mamíferos roedores são espécies comumente utilizadas por sua semelhança anatomofisiológica com a espécie humana e por apresentar certa homogeneidade interespecie (MUNIZ et al., 2004). A técnica mais simples, do ponto de vista operacional, é a oclusão das carótidas em gerbilos. Para isso, no modelo clássico, a oclusão das carótidas se dá bilateralmente por 5 minutos, seguida de reperusão (DE ARAUJO et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 2012).

Gerbilos são amplamente usados nos modelos de isquemia (CANISTRO et al., 2010; LEE et al., 2010). Estes animais possuem uma fragilidade na circulação do

sangue pelo encéfalo, já que há uma falta de comunicação arterial posterior, que conecta o sistema vertebrobasilar e as artérias carótidas (KITABATAKE et al., 2015). Essa característica foi primeiramente mostrada por Levine e Sohn em 1969 e desde então esses animais vêm sendo utilizados pois, a cirurgia para a produção da isquemia se torna mais simples do ponto de vista instrumental e operacional. A isquemia encefálica transitória pelo período de 5 ou 10 minutos produz lesão e morte das células neuronais, sendo esse tempo suficiente para desencadear um estresse nos neurônios encefálicos que evolui com o passar do tempo, produzindo necrose, apoptose, despolarização e excitotoxicidade nas áreas afetadas (DE ARAUJO et al., 2012; KITABATAKE et al., 2015; SIM et al., 2004). Já está bem mostrado que a oclusão, por esse pequeno período de tempo gera lesão na região CA1 do hipocampo, no núcleo caudado e neocórtex (BACIGALUPPI et al., 2010; DE ARAUJO et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2012; KITABATAKE et al., 2015). Considerando o papel importante destas estruturas no controle de diferentes tipos de comportamento e da motricidade, espera-se que a isquemia encefálica produza alterações funcionais que podem ser avaliadas em modelos comportamentais e alterações morfológicas detectáveis em análises histológicas (AUSTIN et al., 2014; DE ARAUJO et al., 2012).

Neste sentido, novos trabalhos estão avaliando os efeitos da isquemia, propondo diferentes abordagens para recuperação comportamental e locomotora, com análises cada vez mais profundas do efeito da neuroplasticidade na recuperação dos modelos propostos. Trabalhos recentes que envolvem isquemia e atividade física revelam uma melhora da neuroplasticidade dos animais testados, no entanto é observada uma dependência do modelo de atividade física proposto e a plasticidade cerebral observada (YANG et al., 2003; ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

1.4 Isquemia encefálica e atividade física

A Atividade física tem se mostrado eficaz na manutenção da saúde global e também de estruturas encefálicas, com efeitos benéficos para a memória, processos de potencialização à longo prazo (LTP) e aprendizagem (CECHETTI et al., 2012; RILJACK et al., 2010). O exercício físico regular melhora o condicionamento cardiovascular, força e função motora, bem como reduz a probabilidade de manutenção dos fatores de risco cardiovasculares que contribuem com o risco de AVE (LEUNG et al., 2012; YUNG et al., 2009). Além disso, melhora a resposta aos eventos

isquêmicos encefálicos, reduz a área do infarto após o AVE, e assim, minimiza a frequência e severidade dos sintomas nos sobreviventes (MIDDLETON et al., 2013). Existem evidências que o exercício físico pode afetar a neuroquímica hipocampal, a atividade neuronal, a proliferação e sobrevivência de células granulares e a sobrevivência neuronal após a isquemia (ARIDA et al., 2004).

Estudos clínicos mostram que os indivíduos que realizam exercícios físicos regulares apresentam 25% menos chance de apresentar um episódio de AVE (REIMERS et al., 2009) em relação aos indivíduos sedentários. Desta maneira, a atividade física não somente pode reduzir a incidência do AVE, como também os danos neurais associados à sua ocorrência e a severidade das incapacidades (KRARUP et al., 2007; STROUND et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Entretanto, os mecanismos pelos quais o exercício protege o encéfalo contra a neurodegeneração após a isquemia, não foram propriamente estabelecidos e possivelmente podem ser multifatoriais. Além disso, a quantidade de apresentação da atividade física que potencialmente pode reduzir o risco do AVE ainda não está clara (MIDDLETON et al., 2013). Porém, existem estudos relacionando a atividade física com um melhor aprendizado motor durante o desenvolvimento e uma maior proliferação de células gliais e endoteliais, bem como um aumento na neogênese e conectividade neuronal, em regiões encefálicas críticas para a aprendizagem e a memória (BARDO et al., 2015; ECKERT; ABRAHAM, 2013; VIOLA et al., 2009). Os modelos animais estabeleceram que exercícios em esteira aumentam a atividade cardiovascular e a produção de fatores neurotróficos, como o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a neurotrofina 3 (ITOH et al., 2011). Ainda, em relação aos tipos de treinamento, o exercício aeróbico também foi relacionado a mecanismos de neuroproteção, prevenindo a atrofia encefálica relacionada ao envelhecimento em populações saudáveis e com doenças neurodegenerativas (AUSTIN et al., 2014). Entre os treinamentos aeróbicos, a corrida em esteira aumenta o nível do BDNF, que é importante para a sobrevivência celular e outras formas de plasticidade, estimulando a angiogênese e neurogênese (THOMAS et al., 2012).

Na literatura, existem ainda evidências dos benefícios da atividade física para a prevenção e também para o tratamento de várias outras doenças, como por exemplo alzheimer, obesidade, psiquiátricas, ansiedade, depressão entre outras (BARDO et al., 2015; HATCHARD et al., 2014; NELSON et al., 2015).

Modelos animais de isquemia vêm sendo utilizados para ajudar com o entendimento da influência da atividade física pós-isquemia encefálica, proporcionando um melhor controle nos experimentos e nas variáveis envolvidas com os mecanismos plásticos (CECHETTI et al., 2012; LEE et al., 2005; QUIRIE et al., 2012). A prescrição ideal do exercício para esse fim, como por exemplo sua duração, frequência e intensidade, é de difícil tradução para os modelos clínicos. Em modelos animais, exercícios forçados em esteira ou livres em rodas de atividade, variam de 5m/min a 22m/min, sua intensidade varia de 30 a 50% da capacidade máxima dos animais, sendo esses valores considerados como eficazes na redução do volume da lesão, diminuição da inflamação e na promoção da neurogênese (AUSTIN et al., 2014). Na literatura, também já é evidente que exercícios iniciados precocemente, ou seja, com 12h (DE ARAUJO et al., 2012) a 48h após o evento isquêmico, com intensidade moderada de 10m/min, com uma frequência entre 5 à 7 dias na semana e duração aproximada de 30 minutos de atividade, já são suficientes para reduzir o volume da lesão (LEE et al., 2005; ZHANG et al., 2012, ZHANG et al., 2013). Os exercícios iniciados precocemente após 12 h do evento isquêmico produzem prejuízos morfológicos e comportamentais (DE ARAUJO et al., 2008). Já os exercícios iniciados 24 horas após o AVE, protegem o tecido perilesional contra danos oxidativos e inflamação (DE ARAUJO et al., 2008, DE ARAUJO et al., 2012, KITABATAKE et al., 2015).

Por mais que os benefícios do exercício físico estejam bem relatados após uma lesão encefálica (WILL et al., 2004), os mecanismos ativados ou inibidos para a preservação da função cerebral não estão claros, podendo se correlacionar desde a ativação de vias celulares e/ou moleculares que contribuem para a neuroproteção (CECHETTI et al., 2012; SERVAIS et al., 2003).

Em nosso laboratório, os últimos trabalhos foram direcionados exatamente para um melhor entendimento dos parâmetros início, frequência, intensidade e duração (DE ARAUJO et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2012, KITABATAKE et al., 2015, KITABATAKE et al., 2016). Nesse sentido, mostramos os efeitos da estimulação motora forçada em esteira por 15 minutos, utilizando velocidade de 10m/min e diferentes tempos de início de estimulação 12, 24, 48 e 72 horas após o evento isquêmico. A partir desse trabalho, mostramos que o treinamento iniciado 12 horas após o evento isquêmico produz danos neuronais adicionais à lesão experimental e

interferem com o desempenho comportamental (DE ARAUJO et al., 2008). Em outro estudo, mostramos que a oclusão unilateral da carótida por 10 minutos, com e sem reperusão e, bilateral com e sem reperusão por 5 minutos, produzem deficiências no comportamento motor e no comportamento exploratório (DE ARAUJO et al., 2012). Após estabelecer o tempo de início da estimulação e o melhor método de isquemia a ser utilizado, procuramos investigar os efeitos da frequência de treinamento em esteira em dias contínuos e intervalados, com a mesma intensidade de 10m/minuto e mesma duração de 15 minutos. Dessa maneira, mostramos que uma maior frequência de atividade física foi mais benéfica para reestabelecimento dos padrões comportamentais após 5 dias de estimulação (KITABATAKE et al., 2015).

Uma vez que os trabalhos anteriores avaliaram o desempenho motor e a preservação dos neurônios no sítio isquêmico sob uma perspectiva aguda (5 dias após a lesão), um novo estudo, com os mesmos parâmetros em esteira, entretanto avaliando o desempenho e os neurônios após 10 dias (crônico), revelou que a baixa frequência de estimulação também produz resultados satisfatórios mantendo o comportamento e os neurônios (SILVEIRA et al., 2016).

Já que a baixa frequência pode produzir resultados satisfatórios, após o aumento dos dias de estimulação e uma avaliação de resultados mais tardia, no trabalho mais recente modificamos a duração e a intensidade nos modelos de estimulação contínua e intervalado. No protocolo contínuo, aumentamos a intensidade para 15 m/min e diminuímos a duração para 10 minutos e também diminuímos a intensidade para 5m/min e aumentamos a duração para 15 minutos. Para o protocolo intervalado usamos a intensidade já conhecida de 10m/min, aumentamos a duração para 30 minutos e também, aumentamos a intensidade de 15m/min a duração diminuída de 15 minutos. Neste trabalho, ficou claro que os resultados do treinamento contínuos e intervalado são dependentes dos parâmetros intensidade e duração (KITABATAKE et al., 2016).

Quando se propõe trabalhos com animais experimentais, a pretensão é que no futuro esses resultados possam ser transferidos para a prática clínica. Entretanto, até esse ponto nossos procedimentos experimentais com isquemia não se aproximam de maneira adequada a sujeitos que sofreram um processo de AVE. Nossos animais são totalmente saudáveis, sem os fatores desencadeadores dessa doença, como por

exemplo, tabagismo, obesidade, hipertensão, entre outros já citados acima. Sendo assim, como nossa pretensão é transpor as informações obtidas com animais de experimentação para sujeitos humanos, é importante que os modelos ofereçam aspectos complicadores presentes na prática clínica.

1.5 A nicotina e o comportamento motor

A nicotina foi inicialmente isolada da folha de tabaco (*Nicotiana tabacum*), por Posselt e Reiman em 1828 e somente em 1843 foram iniciados os primeiros estudos farmacológicos com o alcaloide. Esse alcaloide é líquido e natural encontrado na fase particulada do cigarro, apresenta uma base volátil e incolor que, quando exposta ao ar, adquire a cor marrom e o odor do tabaco. Facilmente passa através do aparelho digestivo, do trato respiratório, pele e membranas mucosas sendo rapidamente distribuído para o corpo (EJAZ et al., 2005). Ao entrar na circulação arterial, atinge o cérebro em um intervalo de 10 a 19 segundos (HENNINGFIED et al., 1993) alterando assim, o número de receptores neuronais nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) ativados e/ou função em circuitos importantes do cérebro (LESTER et al., 2009).

Em relação aos mecanismos de ação, a nicotina inibe a monoamina oxidase (MAO) e, conseqüentemente, aumenta os níveis de dopamina principalmente no núcleo accumbens, contribuindo assim para o aumento dos efeitos reforçadores positivos da nicotina (FOWLER et al., 1996). Outro mecanismo de ação, não menos importante, se relaciona à sua função farmacológica, ligando-se aos nAChR. Esses receptores são exemplos típicos de canais iônicos regulados por ligantes, sendo as classes musculares, ganglionares e do SNC as três principais classes de ligantes (HENDRICKSON et al., 2013). No cérebro o $\alpha 4\beta 2^*$ subtipo é o mais encontrado, o que representa 90% dos locais de afinidade para a ligação da nicotina (ASHARE et al., 2014; DINELEY et al., 2015). Desta maneira, ela exerce numerosos efeitos no SNC, como a modulação de funções neurovegetativas, influenciando no aprendizado, memória e nas funções cognitivas (RILJACK et al., 2010).

Ao alcançar o SNC, pode influenciar fortemente seu microambiente, como por exemplo, regiões do hipocampo e córtex, causando sobrecarga funcional e induzindo o surgimento do estresse oxidativo (NEWMANN et al., 2002). A nicotina é considerada a principal substância do tabaco relacionada à dependência, devido à sua capacidade de ativar fortemente os nAChRs (SHIN et al., 2012; SHU et al., 2015). Esses

receptores são encontrados no SNC e medeiam as transmissões sinápticas rápidas no sistema colinérgico (TALY et al., 2009). São receptores ionotrópicos, compostos por 5 subunidades e seus maiores subtipos no SNC são homoméricos $\alpha 7$ e $\beta 2$, contendo receptores heteroméricos (Figura 1) (HENDRICKSON et al., 2013; HIJIOKA et al., 2011).

Figura 1- Estrutura do nAChR. (A) cinco subunidades se juntam para formar uma subunidade funcional. (B) receptores homoméricos consistem em subunidades únicas que geralmente, têm uma baixa afinidade para o agonista. Até o presente, apenas a $\alpha 7$, $\alpha 9$, e $\alpha 10$ (não mostrado) subunidades podem formar homômeros funcionais. (C) A maior parte dos nAChRs de afinidade elevada são heteroméricos e consistem de uma combinação de subunidades α e β . Múltiplas subunidades α podem se juntar com múltiplas subunidades β do nAChR (ilustrada aqui por $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$). Locais de ligação de ACh são representados como triângulos vermelhos (modificada de Hendrickson et al., 2013).

O hábito de fumar aumenta a morbidade, mortalidade e os gastos com saúde, por influenciar o surgimento de doenças como o câncer, as cerebrovasculares, cardiorrespiratórias, enfisema, hipertensão entre outras. Em função do alto consumo do tabaco, mais de 6 milhões de mortes por ano podem ser atribuídas ao seu uso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Diminuir o uso excessivo é o ponto

principal dos objetivos preventivos para as mortes citadas nas estatísticas mundiais (GUBNER et al., 2015), uma vez que interfere na capacidade física e no desempenho do fumante durante o exercício. Já foi mostrado que quando esse grupo populacional passa a ser ativo fisicamente, ocorre redução de doenças e mortes relacionadas ao tabagismo (RODRIGUES et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em um estudo feito com a população brasileira em 2011, a prevalência de fumantes é do sexo masculino, sendo que 21% dos homens alegaram que consomem cigarros eventualmente e 18% que consomem diariamente. Nas mulheres, os dados revelam que 13% consomem eventualmente e 11% consomem diariamente. Ao observar esses dados, podemos concluir que grande parte de população tem chances de ser acometida, por exemplo, por um AVE, devido ao alto consumo de tabaco.

Em modelos animais, no que diz respeito a neuroadaptação da nicotina, duas aplicações em um intervalo de seis dias já foram capazes de gerar efeitos neuroadaptativos, sugerindo uma predisposição ao risco de dependência à nicotina (BERNARDI et al., 2014). A sua aplicação apresenta efeitos significativos e complexos no aparelho locomotor (JANDOVÁ et al., 2013). Sua interação com as estruturas do SNC pode agir tanto como reforçador positivo ou negativo, sendo seu efeito determinado pela dose e pela forma de administração (ASHARE et al., 2013; BENOWITZ et al., 2006). Desta maneira, deve ser levada em consideração a dose utilizada em cada animal, seu peso, sexo e idade. Doses baixas de nicotina produzem um efeito ansiolítico (0,1 mg/kg), já doses altas produzem um efeito ansiogênico (1mg/kg) (FILE et al., 2001).

A dose de nicotina utilizada em animais experimentais, para uma adequada correlação com o sujeito fumante, deve ser correlacionada com as concentrações plasmáticas desses indivíduos e com a quantidade de cigarro consumida diariamente. Assim, os níveis plasmáticos da nicotina em fumantes passivos ou não fumantes é cerca de 10 ng/ml de nicotina no plasma, já fumantes moderados apresentam níveis de nicotina entre 10 a 100 ng/ml, enquanto que os fumantes crônicos apresentam mais do que 100 ng/mL (BENOWITZ et al., 2006). Com base nessa classificação, a dose de 2mg/kg atinge concentrações no plasma correspondente aos fumantes moderados, podendo ainda variar de acordo com essa classificação de 0,5 a 5mg/kg, dito fumante

passivo ou crônico, respectivamente (BRADFORD et al., 2011). Em nosso laboratório, o efeito da alta dose de 2mg/kg já foi testado em ratos Wistar pelo modelo de injeção subcutânea crônica durante 28 dias. Os animais apresentaram níveis elevados e significativos de hiperatividade, atingindo um patamar máximo já na primeira semana, se mantendo inalterada durante as outras avaliações (NEVES et al., 2016).

Na literatura, animais tratados com nicotina são, em sua maioria, utilizados em trabalhos relacionados à sensibilização da droga (FALCO et al., 2015; JACKSON et al., 2015; NESIL et al., 2015; PICCIOTTO et al., 2014) e associados aos seus efeitos condicionados. Dessa maneira, modelos animais comportamentais estão sendo cada vez mais explorados, utilizando de recursos para avaliação comportamental, como o campo aberto, o monitor de atividades (GOUTIER et al., 2015), o labirinto em cruz elevado (IJOMONE et al., 2015), as câmaras de condicionamento (GREBEINSTEIN et al., 2013), entre outros. Em relação ao comportamento motor e a exposição à nicotina, um protocolo de exercício físico com nado forçado (GONZALEZ et al., 2006) mostrou que o exercício aquático moderado por 4 semanas melhora o tecido muscular danificado pela exposição direta à nicotina ou fumo passivo em animais submetidos ao treinamento motor e expostos a estresse por choque (KURU et al., 2014). Protocolos em rodas de corrida (BARDO et al., 2015) observaram diminuição da resistência dos animais ao teste (SANCHEZ et al., 2014) e protocolos em esteira mostraram que os efeitos observados em animais sedentários, como o aumento da frequência arterial e o aumento da demanda de oxigênio ao miocárdio, são minimizados nos grupos com intervenção motora em esteira (CHANG, et al., 2011, MATSUDA et al., 2011, SHIMADA et al., 2013, ZHANG et al., 2012, ZHENG et al., 2011).

Em relação aos trabalhos que envolvem modelos animais de isquemia focal e exposição à nicotina, foi revelado um aumento do edema e do volume do infarto (BRADFORD et al., 2011; PAULSON et al., 2010) e piora do comportamento neuromotor 24 horas após a administração da droga, seguida da oclusão da artéria cerebral média (SHAH et al., 2015). Na direção contrária, outros estudos sugerem que a administração crônica de nicotina aumenta a recuperação motora após AVE focal e estimula o crescimento dendrítico em regiões corticais (GONZALEZ et al., 2006). É conhecido também que sua administração regula o NGF e o BDNF (JACKSON et al., 2015; KENNY et al., 2000). O problema atual é a definição precisa da dose para que

esse efeito ocorra sem problemas secundários, ainda que os dados sugiram que mudanças comportamentais ocorram devido ao aumento desses fatores de crescimento após a lesão (BROWN; COLB, 2001). O que parece claro é que, dependendo dos regimes de apresentação e da dose, a nicotina pode exercer efeitos antagônicos (HIJIOKA et al., 2011). Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho com animais isquêmicos expostos a nicotina e submetidos ao treino de marcha forçado em esteira. Desta maneira, a utilização da nicotina neste trabalho visa estudar seus efeitos reforçadores positivos e/ou negativos no comportamento motor e volume de lesão, pós isquemia encefálica em gerbilos.

Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Por se tratar de um protocolo eficaz para a preservação do comportamento e dos sítios de lesão, pretendemos analisar sob a luz dos trabalhos anteriores o impacto da nicotina sobre o treino em esteira pós-isquemia.

2.2 Objetivo específico:

Analisar o desempenho comportamental no monitor de atividades e no rota rod, e as áreas do córtex motor M1, CA1 do hipocampo e estriado, de gerbilos isquêmicos expostos a nicotina e submetidos ao treino de marcha forçada contínua em esteira, sobre o protocolo de 5 dias consecutivos, com 15 minutos de duração e intensidade de 5m/min.

Materiais e métodos

3.1 Animais

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais nº 077/2014, estando de acordo com os princípios éticos em experimentação animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados 110 roedores da espécie *Meriones unguiculatus* (Gerbilo da Mongólia), pesando entre 50 e 80g, sendo distribuídos em 11 grupos. Os animais foram alojados no biotério do Prédio de Fisioterapia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), com controle de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro escuro de 12/12 horas, em gaiolas de polipropileno, forradas com serragem, tendo livre acesso à água e comida durante todo o período do experimento.

Os gerbilos com aproximadamente 70 dias de vida são considerados adultos e adequados à experimentação, já que gerbilos jovens apresentam resposta morfológica distinta, influenciando a velocidade da morte neuronal após a lesão isquêmica (YAN et al., 2015).

3.2 Grupos

Grupo Controle (C): Animais ingênuos avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=9.

Grupo Controle Salina (CS): Animais ingênuos injetados com salina e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=10.

Grupo Controle Nicotina (CN): Animais ingênuos injetados com nicotina e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=10.

Grupo Sham (S): Animais falso operados, avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=9.

Grupo Sham Salina (SS): Animais falso operados, injetados com salina e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=9.

Grupo Sham Nicotina (SN): Animais falso operados, injetados com nicotina e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=9.

Grupo Sham Nicotina Estimulado (SNE): Animais falso operados e injetados com nicotina, treinados em esteira e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=10.

Grupo Isquemia (I): Animais isquêmicos avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=9.

Grupo Isquemia Salina (IS): Animais isquêmicos, injetados com salina e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=10.

Grupo Isquemia Nicotina (IN): Animais isquêmicos, injetados com nicotina e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=9.

Grupo Isquemia Nicotina Estimulado (INE): Animais submetidos à cirurgia experimental e injetados com nicotina, treinados em esteira e avaliados no Monitor de Atividade e Rota Rod, n=10.

3.3 Aplicação Nicotina:

A nicotina [Nicotina Sulfato L-1 Metil-2 (3-Piridil) - Pirrolidina Sulfato; grau II; PM 422-6], adquirida da Sigma® (Sigma®, Brasil) foi aplicada durante os nove dias consecutivos do experimento, sendo eles: três dias antecedentes a cirurgia experimental, no dia da cirurgia e pelos cinco dias seguintes referentes ao treino forçado em esteira. Cada animal dos grupos nicotina recebeu via intraperitoneal, uma injeção de 2mg/kg de (-)-nicotina (Sigma), dissolvida em salina, com volume recalculado de 1mg de nicotina para 2 ml de salina. Os animais do grupo Salina receberam o mesmo volume de salina. Todas as aplicações ocorreram no período da manhã e os outros procedimentos ocorreram 30 minutos após a aplicação da nicotina para não haver nenhuma ação imediata da droga durante a cirurgia e/ou estimulação motora em esteira, pois dados sugerem que a nicotina afeta o equilíbrio, coordenação e planejamento motor dos animais em até 30 minutos após sua administração (WELCH et al., 2013).

3.4 Cirurgia experimental

Cada animal foi anestesiado por via intramuscular com Zoletil (5 mg/kg) e levado a uma tábua cirúrgica. Após o estabelecimento da anestesia, foi feito um corte dos pelos na região do ventral do pescoço e aplicado iodo. Foi então, realizada a tricotomia, seguida de uma incisão ventral no pescoço. Os tecidos subcutâneo e muscular foram afastados, e a artéria carótida comum foi exposta bilateralmente e ocluída por cinco minutos através de um fio de sutura (Figura 2). Durante esse período, a região foi irrigada com cloreto de sódio estéril para prevenir a desidratação tecidual. Uma checagem visual foi realizada para assegurar que o fluxo sanguíneo foi interrompido. Passados cinco minutos, a artéria foi liberada, provocando a reperusão da região irrigada. Em seguida foi feita a sutura na região ventral do pescoço com fio de nylon 3-0 (Shalon®).

Após a cirurgia, cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 120.000 U.I de penicilina G benzatina (Fontoura-Wyeth-Brasil) para evitar infecção e foram mantidos em aquecimento até o completo retorno anestésico. A manutenção da temperatura do animal foi monitorada, uma vez que a hipotermia atua como mecanismo neuroprotetor e pode assim interferir nos resultados (MARTÍNEZ et al., 2012).

Figura 2 - Animal na tábua cirúrgica já com as artérias carótidas ocluídas por fio de sutura durante o procedimento cirúrgico de isquemia.

3.5 Estimulação Motora

Para a estimulação motora foi utilizada uma esteira motorizada para roedores ("Insight", Ltda. Ribeirão Preto/SP - Brasil), com seis baias individuais, medindo 40 centímetros de extensão por 10 centímetros de largura (Figura 3). Caso o animal não acompanhasse a marcha da esteira, esta possui em sua região traseira um dispositivo de estimulação elétrica que incentiva o animal a retomar a marcha estabelecida. Foi utilizado o protocolo de estimulação motora contínuo por 5 dias, com intensidade de 5 m/min e duração de 15 minutos. Utilizamos esse protocolo pois mostrou ser efetivo (KITABATAKE et al., 2016).

Figura 3 - Esteira monitorizada para roedores com 6 baias individuais.

3.6 Aparelhos Para Análise Comportamental

A avaliação comportamental teve início 24 horas após a última estimulação motora na esteira, no período da manhã.

3.7 . Monitor de Atividade

Foi utilizado um monitor de atividade de acrílico e alumínio anodizado, com dimensão externa de 50x50cm e 48 cm de altura (“Insight”, Ltda - Ribeirão Preto/SP-Brasil) dotado de seis barras de sensores de infravermelho. Cada barra possui 16 sensores infravermelhos que detectam o movimento do animal. Através de um software específico (“Insight”, Ltda - Ribeirão Preto/SP-Brasil) os comportamentos foram detectados e analisados automaticamente.

Vinte e quatro horas antes da cirurgia experimental, todos os animais foram levados ao monitor de atividades e colocados um a um por um período de cinco minutos para a habituação ao local (KITABATAKE et al., 2015). Nos grupos estimulados SNE e INE a habituação ocorria antes da marcha forçada em esteira. Após a habituação, os animais retornavam para suas caixas e somente após uma hora eram levados à esteira para a estimulação motora forçada. No sexto dia após a cirurgia, os animais foram recolocados no monitor e seu comportamento registrado por 15 minutos. As seguintes respostas comportamentais foram registradas: **cruzamento** (toda vez que o animal cruzou as delimitações de 3x3cm do assoalho do monitor os sensores de infravermelho foram disparados); **atividade** (resposta em segundos de atividade de cada animal durante o período de permanência no monitor); **distância** (distância registrada em centímetros percorrida pelo animal durante o período de permanência no monitor); **velocidade** (velocidade registrada em centímetros/segundo pelo animal, durante o período de permanência no monitor) (Figura 4).

Figura 4 - Monitor de atividades. Local onde é feita a análise comportamental do animal para os comportamentos de cruzamento, atividade, distância e velocidade.

3.8 Rota Rod

Três dias antecedentes e consecutivos à cirurgia experimental, todos os animais foram levados ao Rota Rod (RR) e colocados um a um por um período de 3 repetições para a habituação ao local (OH et al., 2015; SINHA et al., 2002; ZHU et al., 2015).

No sexto dia após a cirurgia experimental, cada animal foi posicionado no RR, que consiste em uma superfície cilíndrica para o animal se equilibrar. Este cilindro move-se em torno de seu eixo com uma aceleração progressiva de 5,5 rotações por minuto (RPM) (Figura 5). Os animais foram colocados um a um até que se habituassem ao cilindro em movimento, permanecendo por pelo menos três segundos com as quatro patas no cilindro. O tempo de permanência foi registrado em 3 repetições. Quando o animal apresentou queda da superfície de teste, o sistema interrompeu a cronometragem totalizando o tempo de permanência do animal (em segundos) nos cilindros em movimentação. Os dados obtidos equivalem à média dos três tempos registrados de permanência no cilindro em movimento.

Figura 5 -: Rota Rod. Local onde o equilíbrio dos animais foi testado.

3.9 Avaliação Histológica da Área de Isquemia

Após a realização dos experimentos, no dia seguinte ao da coleta de comportamento dos animais, cada animal recebeu uma dose anestésica excessiva de Zoletil (10mg/kg). Em seguida, uma incisão no tórax foi realizada, com a exposição do mediastino. A aorta descendente torácica foi clampada e, em seguida, com o coração já exposto, foi realizada uma incisão no átrio direito. O ventrículo esquerdo foi puncionado através de um equipo sanguíneo e conectado a uma seringa de 60ml. Os encéfalos foram perfundidos com salina (PBS) e fixados com paraformoldeído a 4% em fosfato (PB, pH 7,4). Os animais foram decapitados, seus encéfalos removidos e imersos em solução crioprotetora de sacarose a 30%, onde foram mantidos por 24h. Após esse período, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado com gelo seco e mantidos resfriados em um freezer -80 e posteriormente foram cortados em um criostato (Leica CM 1850 UV, V1.2–10/2006). Os cortes foram feitos em secções coronais de 40 μ m de espessura e preparados em lâminas de microscopia gelatinizadas. Depois de prontos, foi realizada a técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E) para a análise morfométrica do hipocampo (CA1), estriado e área motora M1. Para a análise, as lâminas coradas foram colocadas em um microscópio eletrônico

(AxioImager Z1 Zeiss, Alemanha) e avaliadas sempre com coordenadas estereotáticas estabelecidas para a mesma estrutura. Para a área motora M1 foi usado o Bregma 3,20mm, para o estriado foi usado o Bregma 1,20mm e para o hipocampo foi usado o Bregma -3,60mm (Paxinos e Watson, 1998). Em seguida, os locais selecionados foram digitalizados em forma de imagem com aumento de 40x. A análise morfométrica foi realizada com o software AxioVision versão 4.7.2 (Carl Zeiss Vision Imaging System, EUA), através da contagem do número de núcleos de neurônios. A contagem do número de neurônios foi realizada três vezes por três pesquisadores diferentes, cegos aos procedimentos citados anteriormente. Após a contagem, foi realizada a média do número de núcleos de neurônios analisados pelos pesquisadores, e este foi o número final utilizado para a realização da análise estatística. Para a análise histológica foi adotado o número de 7 animais em cada grupo experimental.

3.10 Análise Dos Resultados

Os dados do monitor de atividade, do teste de RR e da análise morfológica foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA) e sempre que foram detectadas diferenças entre os grupos ($p < 0,05$), estas foram evidenciadas pelo teste *post hoc de Holm-Sidak*. Para os testes estatísticos foi utilizado o programa SigmaPlot®13.

Resultados

110 animais foram selecionados para o presente trabalho e 104 foram utilizados. Após a cirurgia dos 40 animais operados, 2 não apresentaram os sinais clínicos da isquemia observados nos testes comportamentais e foram descartados e no geral, 4 foram a óbito.

Figura 6 - Índice de aproveitamento dos animais submetidos a cirurgia isquêmica em porcentagem. Em azul 94,54% aproveitamento dos animais no geral; em laranja 5% correspondendo ao número de óbitos e em cinza, 3,63% representando o número de animais que não apresentaram os sinais de isquemia.

4.1. Resultados comportamentais

Para o número de cruzamentos, o CN disparou um número maior de sensores do que os C, S, SS, SNE e INE. O SN disparou mais sensores do que o SNE, assim como o I disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS, INE e ainda, o IN disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS e INE ($F_{10, 93} = 2,97$; $p < 0,05$) (Figura 07).

Figura 7 - Número de cruzamentos no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que SNE; ≠ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e ¥ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.

O mesmo padrão de ativação comportamental foi encontrado para a distância onde o CN disparou um número maior de sensores do que os C, S, SS, SNE e INE. O SN disparou mais sensores do que o SNE, assim como o I disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS, INE e ainda o IN disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS e INE ($F_{10, 93} = 2,79$; $p < 0,05$) (Figura 08). Também para velocidade onde o CN disparou um número maior de sensores do que os C, S, SS, SNE e INE. O SN disparou mais sensores do que o SNE, assim como, o I disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS, INE e ainda, o IN disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS e INE ($F_{10, 93} = 2,79$; $p < 0,05$) (Figura 09). O mesmo foi mostrado para o tempo de atividade, onde CN disparou um número maior de sensores do que os C, S, SS, SNE e INE. O I disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS, INE e ainda, o IN disparou mais sensores do que os C, S, SS, SNE, IS e INE ($F_{10, 93} = 2,81$; $p < 0,05$) (Figura 10). Os comportamentos observados no monitor de atividade revelaram um significativo padrão de ativação comportamental para os grupos nicotina ou isquêmicos não treinados. Por outro lado, os grupos treinados na esteira, sejam isquêmicos ou injetados com nicotina, mostraram uma redução significativa dessa ativação comportamental, revelando assim o efeito terapêutico do exercício em esteira para a hiperativação comportamental produzida pela nicotina e pela isquemia.

Figura 8 - Comparação do comportamento de distância entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que o SNE; ≠ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e ¥ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de *Holm Sidack*. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.

Figura 9 - Comparação do comportamento de velocidade entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que o SNE; ≠ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e ¥ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de *Holm Sidack*. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.

Figura 10 - Comparação do comportamento de atividade entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam as médias de sensores disparados e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que C, S, SS, SNE e INE; # SN maior que o SNE; ≠ I maior que C, S, SS, SNE, IS, INE e ¥ IN maior que C, S, SS, SNE, IS e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais nos C, S, SS, SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.

O desempenho dos animais no teste de RR revelou que o tempo de permanência do CN é significativamente maior que o tempo de todos os outros grupos, exceto em relação ao SNE. Já o SNE apresentou tempo significativamente maior de permanência em relação aos CS, S, SN, I, IN. Além disso, o I ainda apresentou menor tempo de permanência do que os C e o INE ($F_{10, 93} = 3,35$; $p < 0,05$) (Figura 11). Esses dados revelam mais uma vez um melhor desempenho no teste para os grupos nicotina e exercício, revelando o potencial terapêutico do exercício e nesse caso também da nicotina.

Figura 11 - Comparação do tempo de permanência no RR entre os grupos experimentais no monitor de atividade. As colunas representam o tempo de permanência em segundos e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, S: sham, SS: sham salina, SN: sham nicotina, SNE: sham nicotina estimulado, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. * CN maior que todos os grupos, exceto o SNE; £ SNE maior que CS, S, SN, I, IN; ≠ I menor que C e o INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais nos C,S,SS,SN, I e IN é igual a 9 animais e nos grupos CS, CN, SNE, IS e INE é igual a 10 animais.

4.2 Resultados Histológicos

Para análise da histologia, foram consideradas as áreas CA1 do hipocampo, córtex motor (M1) e estriado de todos os animais dos grupos apresentados. Para esta análise foram considerados os grupos controles (C, CS e CN) e também os grupos isquêmicos (I, IS, IN e INE), uma vez que nos trabalhos anteriores os animais dos grupos sham não apresentam diferenças significativas comparados com os controles (Kltabatake et al., 2016). Para isso, foram utilizados 7 animais em cada grupo. Para a análise morfológica foi feita a contagem de neurônios através do software Axion Vision versão 4.7.2 (Carl Zeiss Vision Imaging System, EUA).

4.2.1 Hipocampo

A comparação entre os grupos revelou uma diminuição significativa da densidade de neurônios do I em relação ao C, CS, CN, IN e INE. Nesta mesma direção, o grupo IS apresentou uma diminuição significativa em relação ao C, CS, CN, IN e INE, e por fim o IN apresentou uma diminuição significativa de densidade de neurônios quando comparado com C, CS, CN e INE ($F_{6,42} = 31,02$; $p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 - Comparação da densidade de neurônios na área CA1 do hipocampo. As colunas representam a média das densidades em cada grupo e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. ≠ diminuição I em relação ao C, CS, CN, IN e INE; + diminuição IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE; ¥ diminuição IN em relação ao C, CS, CN e INE. sendo $p < 0,05$ eANOVA seguida pelo *post-hoc* de *Holm Sidack*. O número de animais em todos os grupos é igual a 7 ($n=7$).

Figura 13 - Fotomicrografia de cortes coronais da área CA1 do hipocampo de gerbilos. (A) grupo controle - C, (B) grupo isquemia - I, (C) grupo isquemia nicotina - IN, (D) grupo isquemia nicotina estimulado - INE. A barra representa 50µm. As setas em preto apontam para células piramidais e as setas em branco apontam para regiões de rarefação. Todas as imagens foram escolhidas de maneira aleatorizada por sorteio.

4.2.2 Córtex motor – M1

A comparação entre os grupos revelou uma diminuição do número de neurônios do I em relação ao C, CS, CN, IN e INE, e também uma diminuição do número de neurônios do IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE ($F_{6,42} = 4,01$; $p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 14 - Comparação do número de neurônios do córtex motor M1. As colunas representam a média das densidades em cada grupo e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. # diminuição do I em relação ao C, CS, CN, IN e INE, + diminuição do IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais em todos os grupos é igual a 7 ($n=7$).

Figura 15 - Fotomicrografia de cortes coronais da área do córtex motor M1 de gerbilos. (A) grupo controle - C, (B) grupo isquemia - I, (C) grupo isquemia nicotina - IN, (D) grupo isquemia nicotina estimulado - INE. A barra representa 50µm. As setas em preto apontam para neurônios piramidais e as setas em branco apontam para regiões de rarefação. Todas as imagens foram escolhidas de maneira aleatorizada por sorteio.

4.2.3 . Estriado

A comparação entre os grupos revelou uma diminuição do número de neurônios do grupo I em relação ao C, CS, CN, IN e INE; também foi observado uma diminuição do número de neurônios do grupo IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE ($F_{6,42} = 23,33$; $p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 16 - Comparação do número de neurônios do estriado. As colunas representam a média das densidades em cada grupo e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). C: controle, CS: controle salina, CN: controle nicotina, I: isquemia, IS: isquemia salina, IN: isquemia nicotina, INE: isquemia nicotina estimulado. # diminuição do I em relação ao C, CS, CN, IN e INE, + diminuição do IS em relação ao C, CS, CN, IN e INE, sendo $p < 0,05$ e ANOVA seguida pelo *post-hoc* de Holm Sidack. O número de animais em todos os grupos é igual a 7 ($n=7$).

Figura 17 - Fotomicrografia de cortes coronais da área do estriado de gerbilos. (A) grupo controle - C, (B) grupo isquemia - I, (C) grupo isquemia nicotina - IN, (D) grupo isquemia nicotina estimulado - INE. A barra representa 50µm. As setas em preto apontam para neurônios neo estriatais e as setas em branco apontam para regiões de rarefação. Todas as imagens foram escolhidas de maneira aleatorizada por sorteio.

O presente trabalho mostra o valor terapêutico da atividade física em esteira, para os animais que sofreram uma isquemia encefálica global e foram submetidos à aplicação de nicotina. Em nosso laboratório, esse trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que vem estabelecendo a cada novo trabalho, além dos efeitos terapêuticos do treino forçado em esteira, o valor de se controlar os parâmetros como a frequência, a intensidade e a duração do exercício (DE ARAUJO et al., 2008; KITABATAKE et al., 2015; KITABATAKE et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016,).

A recuperação após AVE é um processo complexo que provavelmente ocorre com a combinação entre restauração, substituição e compensação de funções, do posto de vista motor. Por esta razão, é difícil traduzir estudos de reabilitação em animais para ensaios clínicos (WAHL; SCHWAB, 2014). Portanto cada vez mais trabalhos experimentais são realizados tentando mostrar as possíveis estratégias, para que, no futuro, seja encontrado um parâmetro ideal que possa ser passado a estudos clínicos (MACKAY-LYONS et al., 2013).

Para que os resultados possam ser traduzidos para a prática clínica, no presente trabalho procuramos associar a nicotina ao modelo de isquemia encefálica, uma vez que a nicotina está presente n tabaco e é um fator de risco para o AVE (HAWKINS, et al., 2002; MANDA et al., 2010). Acreditamos que assim aproximamos nosso modelo da realidade clínica, já que, nos dias atuais, a porcentagem de idosos que apresentaram essa doença e eram tabagistas chega a 20,9% (ZAITUNE et al., 2012).

Para tornar os animais semelhantes a sujeitos tabagistas, utilizamos a injeção intraperitoneal de nicotina. Kuru e colaboradores (2014) mostraram que um protocolo de fumo passivo, com dois cigarros diários, é semelhante a aplicação de 0,1mg/kg/dia de nicotina. Sob o aspecto de um fumante crônico, para simular a quantidade de nicotina presente na circulação sanguínea, é necessária uma dose de 4,5mg/Kg/dia de nicotina (SHAH et al., 2015). Em nosso trabalho, definimos a dose de 2mg/kg/dia pois é a dose mais próxima ao que um fumante moderado apresenta em sua circulação sanguínea e que permite a sobrevivência em gerbilos. Nesse sentido, o teste piloto que realizamos em nosso laboratório com a dose de 4,5mg/Kg/dia de nicotina, se mostrou inviável pelo grande número de óbitos apresentados. Sendo assim, a dose que utilizamos corresponde ao consumo de 40 cigarros diários, com

base em protocolos já estabelecidos (KURU et al., 2014). Em relação a viabilidade e aplicabilidade do nosso modelo experimental, ele se mostrou extremamente viável uma vez que, de toda a amostra, apenas 6 animais não puderam ser utilizados, seja por problemas cirúrgicos ou falha nos sinais clínicos de isquemia.

Diferentes autores vêm tentando elucidar os benefícios do exercício físico após a indução de AVE em animais experimentais (LEE et al., 2008; MA et al., 2013; QUIRIE et al., 2012; SAKAKIMA et al., 2012; SHIMADA et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Essa é uma linha bastante promissora, porque é bem conhecido que o exercício promove melhora da função cerebrovascular, aumenta a tolerância à isquemia e assim pode reduzir o surgimento de eventos isquêmicos, pois quando esses acontecem, deixam as sequelas do AVE menos intensas (MIDDLETON et al., 2013). Entre os diferentes tipos de exercício, os exercícios em esteira induzem uma maior neuroproteção, quando comparados com outros tipos de exercícios, durante ao mesmo tempo de estimulação (KINNI et al., 2011). Existem diferentes protocolos para o treino forçado em esteira, com duração variando de 20 a 30 minutos, de 5 a 7 dias por semana (AUSTIN et al., 2014). Com relação à intensidade, exercícios com início 24 horas após o evento isquêmico (DE ARAUJO et al., 2012), com intensidade baixa de 30-40% da capacidade máxima do animal ou <10m/min, tendem a ser mais eficazes do que exercícios vigorosos (CHANG et al., 2011; YANG et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

Em nosso trabalho, adotamos o protocolo que se mostrou mais eficiente para a reabilitação aguda após isquemia encefálica global, entre os protocolos que testamos nos últimos estudos (DE ARAUJO et al., 2008; KITABATAKE et al., 2015). O protocolo contínuo que se mostrou mais eficaz foi o de duração de 15 minutos e intensidade de 5m/min (KITABATAKE et al., 2016).

Com a dose de nicotina utilizada, o modelo experimental de isquemia e o protocolo de treinamento em esteira, a nicotina não representou um obstáculo para a melhora do comportamento dos animais isquêmicos, apresentando também uma maior manutenção de neurônios no estriado, córtex motor M1 e região CA1 do hipocampo, como já havíamos mostrado em trabalhos anteriores sem a presença da nicotina (DE ARAUJO, et al., 2008, KITABATAKE et al., 2015).

Entretanto, diferentemente dos trabalhos anteriores, temos agora uma droga, a qual foi injetada intraperitonealmente. Podemos observar que os animais injetados com nicotina apresentaram uma hiperatividade no monitor de atividade. Esse fato se relaciona ao efeito estimulante da nicotina (KUTLU et al., 2015; NESIL et al., 2015). Porém, imediatamente após a sua aplicação, os animais sofrem supressão da atividade locomotora, apresentando um período de imobilidade, seguido por um aumento da atividade comportamental motora (JADOVÁ et al., 2013). O aumento deste comportamento nos grupos nicotina pode ser atribuído aos receptores nicotínicos que influenciam significativamente esta atividade (BERNARDI; SPANAGEL, 2014; DANIELS et al., 2015; SHU et al., 2015). Essa hiperatividade pode ser exemplificada, por exemplo, em relação ao aumento da distância percorrida pelos animais injetados com nicotina. Quanto a esse comportamento, um trabalho mostrou que após a aplicação da nicotina, os animais percorrem maiores distâncias do que os animais controle (BERNARDI; SPANAGEL, 2014). Diferentemente do trabalho de Bernardi e Spangel, não realizamos a análise comportamental imediata do animal, porém, após 9 dias de aplicação crônica, essa variável comportamental permanece semelhante à resposta visualizada pela injeção aguda.

Por outro lado, Wecker e colaboradores (2013), realizaram avaliação do comportamento de animais com ataxia, tratados com baixa dose de nicotina (2 μ moles/kg/dia), e expostos ao campo aberto, com seu comportamento avaliado também no RR. Nesse estudo não foram encontradas diferenças dos grupos tratados em relação ao grupo controle no campo aberto, porém seu equilíbrio foi maior no teste de RR. Outro modelo de avaliação comportamental, o labirinto em cruz elevado, foi utilizado para definir o perfil de efeito de doses individuais de nicotina, e nesse sentido, as doses consideradas ansiogênicas estavam entre 0,1 a 0,5mg/kg/dia (LEITE et al., 2013; RAOUFI et al. 2012). Não encontramos trabalhos com o monitor de atividades, bem como a interação de exercícios em esteira na atividade comportamental de animais isquêmicos exposto a nicotina. Sendo assim, nosso trabalho é original e sua contribuição traz mais impacto para a área de reabilitação neurológica.

Ainda em relação a hiperatividade comportamental que está presente nos animais isquêmicos não treinados, também observada nos trabalhos anteriores, pode estar relacionada a lesão presente no hipocampo desses animais, o que acaba diminuindo a habituação ao modelo e a essa hiperatividade (DE ARAUJO et al., 2008,

DE ARAUJO et al., 2012, BERTOLINO et al., 2013, KITABATAKE et al., 2015). Entretanto, essa hiperatividade não aumenta quando os animais isquêmicos são expostos à nicotina.

Um dado curioso que podemos observar em nossos grupos injetados com nicotina e submetidos ao treino em esteira é a diminuição da hiperatividade observada no monitor de atividade. Animais controle, falsos operados e até mesmo isquêmicos se tornam hiperativos, como vemos em animais do CN, entretanto o treino em esteira reduz essa hiperatividade. Trabalhos com sujeitos humanos, que utilizam a atividade física para combater o hábito de fumar, mostram que ocorre diminuição da busca pelo tabaco após um período de treinamento físico (TAYLOR, et al., 2007; USSHER ET AL., 2012). Outro trabalho mostrou que após pelo menos 30 minutos da atividade física, os pacientes não sentiam vontade de fumar (HAASOVA et al., 2013 e ROBERTS et al., 2012).

Já está bem relatado que a atividade física aumenta a liberação de endorfinas e outros opiáceos endógenos, os quais podem dessa maneira interagir nos sistemas de recompensa e ansiedade por estresse e assim modificar a expressão do comportamento tanto de memória, como de aprendizado motor (BALI et al., 2015; YANG et al., 2003). Apesar dessas evidências, o parâmetro ideal de atividade física, para produzir os melhores efeitos em sujeitos tabagistas ainda não está bem estabelecido (ROBERTS et al., 2012). Como utilizamos o monitor de atividade, não podemos afirmar que a hiperatividade observada nos nossos animais se correlaciona com a ansiedade, porque esse não é o melhor modelo para esse tipo de estudo (LEITE-ALMEIDA, PINTO-RIBEIRO, ALMEIDA, 2006; FAILLACE et al., 2015), sendo o labirinto em cruz elevado o melhor modelo para este tipo de avaliação (SOUSA et al., 2006).

O teste de RR pode nos ajudar a entender os comportamentos hiperativos obtidos no monitor de atividade. Enquanto o monitor de atividade é um modelo que permite uma livre exploração do campo aberto, o RR exige uma resposta motora forçada e ainda um bom equilíbrio induzido pela iminência de queda do aparelho (SALAZAR-COLOCHO et al., 2008). Mais uma vez o que chama atenção nesse teste é o grupo controle injetado com nicotina, o grupo sham injetado com nicotina e treinado em esteira e o grupo isquemia injetado com nicotina e treinado em esteira.

Esses três grupos apresentam um excelente desempenho no teste em relação aos seus grupos correlatos (controles, sham's e isquêmicos) e, no caso do controle nicotina, em relação a todos os outros grupos. Acreditamos que esse melhor desempenho possa ir além do efeito estimulante tanto da droga, quanto do aumento do desempenho pelo exercício (WECKER et al., 2013). Todos os animais passam por um treinamento prévio antes de qualquer tipo de procedimento experimental, sendo assim, o aprendizado parece ser fundamental para um bom desempenho nesse aparato. No presente trabalho, como veremos a seguir, e também nos anteriores, mostramos que o exercício em esteira pode prevenir a morte de neurônios no hipocampo, área responsável pela memória, e também de outras áreas responsáveis pelo comportamento motor (DE ARAUJO et al., 2008, KITABATAKE et al., 2015, KITABATAKE et al., 2016).

Quando se trabalha com isquemia cerebral, são necessárias avaliações morfológicas para o entendimento de possíveis efeitos neuroprotetores, mostrando o porquê da modificação comportamental (CECHETTI et al 2007; DE ARAUJO et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2012; KITABATAKE et al., 2015; SCOPEL et al, 2006). Utilizamos a técnica H&E para coloração dos sítios de lesão e contagem do número de neurônios. Nossos dados morfológicos, corroborando com outros estudos do nosso laboratório (DE ARAUJO et al., 2008, DE ARAUJO et al., 2012, KITABATAKE et al., 2015), revelam o córtex motor, o hipocampo e o estriado são as estruturas mais afetadas pela isquemia ao fim do experimento. Exercícios físicos podem melhorar as sequelas neurológicas e cognitivas por prevenir a perda neuronal após lesão encefálica, exercendo desta forma um efeito neuroprotetor (KITABATAKE et al., 2015; YANG et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Intervenções precoces (1-3 dias) ou 24 horas após o evento isquêmico, no caso deste trabalho, são associadas ao aumento de morte celular, porém promovem uma melhora no comportamento motor em longo prazo (FARRELL et al., 2001; LEE et al., 2005; YANG et al., 2003). Através dos nossos resultados comportamentais e morfológicos e de outros estudos, observamos que o exercício físico em esteira pode atuar de maneira neuroprotetora, melhorar a proliferação de células neuronais e a neurogênese no hipocampo e no córtex de ratos isquêmicos (BRIONES et al., 2004; DE ARAUJO et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2012; BERTOLINO et al., 2013; ITOH et al., 2011; KITABATAKE et al., 2015; LEE et al., 2003; SONG et al., 2012; ZHANG et al., 2013), inibir a morte neuronal apoptótica no

hipocampo e promover melhora do aprendizado motor (KITABATAKE et al., 2015; SIM et al., 2005, ECKERT et al., 2013). Estudos com roedores mostram que animais submetidos à atividade física tem melhora cognitiva e performance como resultado demonstrando um aumento significativo em atividades de enzimas antioxidantes, o que aumenta a resistência oxidativa ao estresse e reduz os danos celulares, quando os animais são estimulados em esteira (CECHETTI et al., 2012). Consistente com esta última possibilidade, exercícios de corrida aumentam o BDNF (LAKHAN et al., 2009; PETERSON et al., 2014).

O melhor desempenho dos nossos animais isquêmicos exercitados pode ser justificado pelos mecanismos já conhecidos e apontados acima. Especialmente o desempenho no RR, pela manutenção do aprendizado prévio, já que os efeitos do exercício sobre o estresse oxidativo no hipocampo, após a isquemia, aumento da produção de fator de crescimento do nervo (NGF) e assim inibição de morte apoptótica após isquemia (HENIGAN et al., 2007, PAGNUSSAT et al., 2012).

Entretanto, mais instigante ainda é o melhor desempenho no RR, produzido simplesmente pela nicotina. Estudos recentes evidenciam a importância do nAChRs nos mecanismos de plasticidade sináptica para formação de memória a longo prazo e sua manutenção (TIAN et al., 2015), assim como hipótese, os animais injetados com nicotina puderam apresentar um melhor aprendizado nas sessões de treino no RR. Não podemos também deixar de considerar que nossos animais isquêmicos e exercitados também receberam injeções intraperitoneais de nicotina. Assim, com o aumento da nicotina no organismo, há aumento destes receptores atuando em áreas do SNC, como o hipocampo, e sua estimulação gera proteção de neurônios ligados a neurodegeneração. Os nAChRs também são expressados em micróglia e macrófagos, e sua estimulação suprime a ativação anti-inflamatória (LEE et al., 2009) e atua de maneira neuroprotetora nessas células (HIJOTA et al., 2011). Desta maneira, em alguns estudos, a nicotina vem sendo utilizada como protetora dos neurônios dopaminérgicos via ação anti-inflamatória (PARK et al., 2007).

Nossa hipótese inicial de que a nicotina poderia interferir negativamente com o desempenho motor dos animais não se confirmou. Pelo contrário, foi observado que a dose utilizada possivelmente facilitou a atividade no hipocampo dos animais. Outros estudos mostram que a ativação de nAChRs via nicotina pode aumentar ou

diretamente induzir a LTP do hipocampo, que seria uma forma de plasticidade sináptica relacionada à formação de memória a longo prazo (KUTLU et al., 2015) além de também melhorar o fluxo sanguíneo (HIJOTA et al., 2011).

Outras evidências ainda sugerem que a nicotina pode ter propriedades antioxidantes no SNC, por via intracelular ativando os receptores nicotínicos ou extracelular atuando como um radical (NEWMAN et al., 2002). Um estudo sugere que pode ocorrer alterações nos níveis de sensibilidade dos receptores nicotínicos de acetilcolina no cérebro dos animais, podendo ser os responsáveis por esses efeitos da nicotina sobre a atividade locomotora, constituindo um campo de pesquisa que requer trabalhos adicionais (LEITE et al., 2013). Foi evidenciado em outro estudo realizado, que a nicotina pode melhorar o comportamento motor através de mecanismos compensatórios que envolvem o recrutamento e alterações da atividade dos circuitos motores na marcha e equilíbrio em ratos normais e tratados (DOYON; BENALI, 2005). Porém, o mecanismo com o qual ela é capaz de prevenir os danos do SNC não é claro. Desta maneira, podemos concluir que a nicotina age como agente positivo e negativo, enquanto o efeito é limitado pela dose e pela forma de administração, dependendo também do sexo, tipo de aplicação, estresse do animal e outros fatores (FALCO et al., 2015; PEHRSON et al., 2008; PRUS et al., 2008; ROSECRANS et al., 1995). Assim, podemos mostrar pela primeira vez que, a nicotina na dose utilizada não prejudica o desempenho motor dos animais submetidos a um protocolo específico em esteira, bem como ainda pode potencializar o desempenho de estruturas envolvidas com o aprendizado e a memória.

Uma limitação deste estudo foi a falta de uma análise imuno-histoquímica que permita avaliar a morte neuronal por apoptose, uma vez que a técnica de H&E avalia apenas a característica do núcleo no hipocampo, estriado e córtex cerebral área da M1. Porém, esta técnica atendeu aos objetivos do presente trabalho em mostrar as condições patológicas em animais isquêmicos com aplicação de nicotina.

Conclusões

O protocolo de estimulação usado em esteira foi adequado para reverter efeitos da isquemia e também da aplicação da nicotina nas variáveis comportamentais

A realização da atividade física em animais submetidos à exposição a nicotina foi benéfica para restabelecimento do comportamento motor e preservação neuronal.

A nicotina não interfere nos benefícios do treino forçado em esteira observado nos trabalhos anteriores.

Referências Bibliográficas

ARIDA, R.M.; SCORZA, C.A.; DA SILVA, A.V.; SCORZA, F.A.; CAVALHEIRO, E.A. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neuroscience Letters**, v. 364, p. 135-138, 2004.

ASHARE, R.L.; FALCONE, M.; LERMAN, C. Cognitive function during nicotine withdrawal: Implications for nicotine dependence treatment. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 581-591, 2013.

AUSTIN, M.W.; PLOUGHMAN, M.; GLYNN, L.; CORBETT, D. Aerobic exercise effects on neuroprotection and brain repair following stroke: a systematic review and perspective. **Neuroscience Research**, v. 87, p. 8-15, 2014.

BACIGALUPPI, M.; COMI, G.; HERMANN, M. D. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. **The Open Neurology Journal**, v. 4, p. 34-38, 2010.

BALI, A.; RANDHAWA, P.K.; JAGGI, A.S. Stress and opioids: Role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.51, p. 138-150, 2015.

BARDO, M.T.; COMPTON, W.M. Does physical activity protect against drug abuse vulnerability? **Drug and Alcohol Dependence**, v.153, p. 3–13, 2015.

BENOWITZ, N.L.; JACOB, P.; HERRERA, B. Nicotine intake and dose response when smoking reduced-nicotine content cigarettes. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** Clin Pharmacol Ther, v. 80, p. 703-714, 2006.

BERNARDI, R.E.; SPANAGEL, R. Basal activity level in mice predicts the initial and sensitized locomotor response to nicotine only in high responders. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 143-150, 2014.

BERTOLINO, G.; DE ARAUJO, F.L.B.; SOUZA, H.C.D.; COIMBRA, N.C.; DE ARAUJO, J.E. Neuropathology and behavioral impairments after bilateral global ischemia and exposure to static magnetic field: evidence in the motor cortex, the hippocampal CA1 region and the neostriatum. **International Journal of Radiation Biology**, v. 89, p. 595-601, 2013.

BRADFORD, S.T.; STAMATOVIC, S.M.; DONDETI, R.S.; KEEP, R.F.; ANDJELKOVIC, A.V. Nicotine aggravates the brain postischemic inflammatory response. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology** Am J Physiol Heart Circ Physiol, v. 300, pP. 1518-1529, 2011.

BRIONES, T.L.; SUH, E.; JOZSA, L.; HATTAR, H.; CHAI, J.; WADOWSKA, M. Behaviorally induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 997, p. 137-146, 2004.

BROWN, R.W., KOLB, B. Nicotine sensitization increases dendritic length and spine density in the nucleus accumbens and cingulate cortex. **Brain Research**, v. 899, p. 94-100, 2001.

CANISTRO, D.; AFFATATO, A.A.; SOLETI, A.; MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; SCULCO, F.; SACCO, I.; VISALLI, V.; BONAMASSA, B.; MARTANO, M.; IANNONE, M.; SAPONE, A.; PAOLINI, M. The novel radical scavenger IAC is effective in preventing and protecting against post-ischemic brain damage in Mongolian gerbils. **Journal of Neurologic Science**, v. 290, p. 90-95, 2010.

CAO, D.H.; XU, J.F.; XUE, R.H.; ZHENG, W.F.; LIU, Z.L. Protective effect of chronic ethyl docosahexaenoate administration on brain injury in ischemic gerbils, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 651-659, 2004.

CECHETTI, F.; WORMA, V.P.; ELSNER, R.V.; BERTOLDI, K.; SANCHES, E.; BEN, J.; SIQUEIRA, R.I.; NETTO, A.C. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, p. 90-96, 2012.

CECHETTI, F.; RHOD, A.; SIMÃO, F.; SANTIN, K.; SALBEGO, C.; NETTO, C.A.; SIQUEIRA, I.R. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research**, v. 1157, p. 121-125, 2007.

CHANG, H.C.; YANG, Y.R.; WANG, P.S.; KUO, C.H.; WANG, R.Y. Insulin-like growth factor I signaling for brain recovery and exercise ability in brain ischemic rats. **Medicine Science and Sports Exercercise**, v. 43, p. 2274-2280, 2011.

DANIELS, C.W.; WATTERSON, E.; GARCIA, R.; MAZUR, G.J.; BRACKNEY, R.J.; SANABRIA, F. Revisiting the effect of nicotine on interval timing. **Behavioural Brain Research**, v. 283, p. 238-250, 2015.

DE ARAUJO, F.L.B.; BERTOLINO, G.; FUNAYAMA, C.A.R.; COIMBRA, N.C.; DE ARAUJO, J.E. Influence of treadmill training on motor performance and organization of exploratory behavior in Meriones Unguiculatus with unilateral ischemic stroke: Histological correlates in hippocampal CA1 region and the neostriatum. **Neuroscience Letters**, v. 431, p. 179-183, 2008.

DE ARAUJO, F.L.B.; BERTOLINO, G.; GONÇALVES, R.B.; MARINI, L.C.; COIMBRA, N.C.; DE ARAUJO, J.E. Neuropathology and behavioral impairments after three types of global ischemia surgery in Meriones unguiculatus: evidence in motor cortex, hippocampal CA1 region and the neostriatum. **Journal of Neurologic Science**, v. 312, p. 73-8, 2012.

DESILLES, J.P.; LOYAU, S.; SYVANNARATH, V.; VALCARCEL, J.G.; CANTIER, M.; LOUEDEC, L.; LAPERGUE, B.; AMARENCO, P.; AJZENBERG, N.; PERRUS, M.J.; MICHEL, J.B.; NOE, B.H.T.; MAZIGHI, M. Alteplase Reduces Downstream Microvascular Thrombosis and Improves the Benefit of Large Artery Recanalization in Stroke. **Stroke**, v. 46(11), p. 3241-3248, 2015.

DINELEY, K.T.; PANDYA, A.A.; YAKEL, J.L. Nicotine Ach receptors as therapeutic targets in CNS disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n.2, 2015.

DITTMAR, M.D.; SPRUSS, T.; SCHUIERER, G.; HORN, M. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke**, v. 34, p. 2252-2257, 2003.

DOYON, J.; BENALI, H. Reorganization and plasticity in the adult brain during learning of motor skills. **Current Opinion in Neurobiology** , v. 15, p. 161-7, 2005.

ECKERT, M.J.; ABRAHAM, W.C. Effects of environmental enrichment exposure on synaptic transmission and plasticity in the hippocampus. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 15, p. 165-87, 2013.

EJAZ, S.; LIM, C.W. Toxicological overview of cigarette smoking on angiogenesis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 335-44, 2005.

FAILLACE, M.P.; ZWILLER, J.; BERNABEU, R.O. effects of combined nicotine and fluoxetine treatment on adult hippocampal neurogenesis and conditioned place preference **Neuroscience**, v. 300, p. 104-115, 2015.

FALCO, A.M.; BEVINS, R.A. Individual differences in the behavioral effects of nicotine: A review of the preclinical animal literature. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 138, p. 80-90, 2015.

FARRELL, M.; HOWES, S.; BEBBINGTON, P.; BRUGHA, T.; JENKINS, R.; LEWIS, G.; MARSDEN, J.; TAYLOR, C.; MELTZER, H. Nicotine, alcohol and drug dependence and psychiatric comorbidity. Results of a national household survey. **British Journal of Psychiatry**, v. 179, p. 432–437, 2001.

FILE S.E.; CHEETA S.; AKANEZI C. Diazepam and nicotine increase social interaction in gerbils: a test for anxiolytic action. **Brain Research**, v. 888: 311–313, 2001.

FLURI, F.; SCHUHMANN, M.K.; KLEINSCHNITZ, C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. **Journal of Drug Design, Development and Therapy**, Drug Des Devel Ther, v. 9, p. 3445-3454, 2015.

FOWLER, J.S.; VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; PAPPAS, N.M.; LOGAN, L.; MACGREGOR, R.; ALEXOFF, D.; SHEA, C.; SCHLYER, D.; WOLF, A.P.; WARNER, D.; ZEZEKOV, O.; CILENTO, R. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. . **Nature**, v. 379, p. 733-736, 1996.

GERRIETS, T.; LI, F.; SILVA, M.D.; MENG, X.; BREVARD, M.; SOTACK, C.H.; FISCHER, M. The macrosphere model: evaluation of new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 122(2), p. 201-211, 2003.

GONZALEZ, C.L.R.; GHARBAWIE, O.A.; KOLB, B. Chronic low-dose administration of nicotine facilitates recovery and synaptic change after focal ischemia in rats. **Neuropharmacology**, v. 50, p. 777-787, 2006.

GOUTIER, W.; O'CONNOR, J.J.; LOWRY, J.P.; MCCREARY, A.C. The effect of nicotine induced behavioral sensitization on dopamine D1 receptor pharmacology: An in vivo and ex vivo study in the rat. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 933-943, 2015.

GREBENSTEIN, P.; BURROUGHS, D.; ZHANG, Y.; LESAGE, M.G. Sex differences in nicotine self-administration in rats during progressive unit dose reduction: Implications for nicotine regulation policy. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 114-115, p. 70-81, 2013.

GUBNER, N.R., TAMARA J. PHILLIPS, T. J. Effects of nicotine on ethanol-induced locomotor sensitization: A model of neuroadaptation. **Behavioural Brain Research**, v. 288, p. 26-32, 2015.

GUS I.; FUSCHAMAN A.; MEDINA C. Prevalência dos Fatores de Risco da Doença Arterial Coronariana no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 78(5), p. 478-83, 2002.

HAASOVA, M.; WARREN, F.C.; USSHER, M.; JANSE VAN RENSBURG K.; FAULKNER, G.; CROPLEY, M.; BYRON-DANIEL, J.; EVERSON-HOCK, E.S.; OH, TAYLOR, A.H. The acute effects of physical activity on cigarette cravings: systematic review and meta-analysis with individual participant data. **Addiction**, v. 108, p. 26-37, 2013.

HARA, Y. Brain plasticity and rehabilitation in stroke patients. **Journal of Nippon Medical School**, J Nippon Med Sch, v. 82, p. 4-13, 2015.

HATCHARD, T.; TING, J.J.; MESSIER, C. Translating the impact of exercise on cognition: methodological issues in animal research. **Behavioral Brain Research**, v. 273, p. 177-188, 2014.

HENDRICKSON, L.M.; GUILDFORD, M.J.; TAPPER, A.R. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. **Frontiers in Psychiatry**, v. 30, p. 4-29, 2013.

HENNIGAN, A.; O'CALLAGHAN, R.M.; KELLY, A.M. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 424-427, 2007.

HENNINGFIELD, J.E.; STAPLETON, J.M.; BENOWITZ, N.L.; GRAYSON, R.F.; LONDON, E.D. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 33, p. 23-29, 1993.

HIJIOKA, M.; MATSUSHITA, H.; HISATSUNE, A.; ISOHAMA, Y.; KATSUKI, H. Therapeutic effect of nicotine in a mouse model of intracerebral hemorrhage. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 388, p. 741-749, 2011.

IJOMONE, O.M.; OLAIBI, O.K.; MBA, C.; BIOSE, I.J.; TETE, S.A.; NWOHA, P.U.

Chronic nicotine administration does not alter cognitive or mood associated behavioural parameters. **Pathophysiology**, v. 22, p. 57-63, 2015.

ITOH, T.; IMANO, M.; NISHIDA, S.; TSUBAKI, M.; HASIMOTO, S.; ITO, A.; SATOU, T. Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves brain encefálico function following rat traumatic brain injury. **Journal Neural Transmission**, v. 118, p.: 1263-1272, 2011.

JACKSON, K.J.; MULDOON, P.P.; DE BIASI, M.; DAMAJ, M.I. New mechanisms and perspectives in nicotine withdrawal. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 223-234, 2015.

JANDOVÁ, K.; MARESOVÁ, D.; POKORNÝ, J. Fast and Delayed Locomotor Response to Acute High-Dose Nicotine Administration in Adult Male Rats. **Physiological Research**, v. 62, p. (Suppl. 1): S 81-S88, 2013.

KENNY, P.J.; FILE, S.E.; RATTRAY, M. Acute nicotine decreases, and chronic nicotine increases the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus. **Molecular Brain Research**, v.85, p. 234-238, 2000.

KINNI, H.; GUO, M.; DING, J.Y.; KONAKONDLA, S.; DORNBOS III, D.; TRAN, R.; GUTHIKONDA, M.; DING, Y. Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. **Brain Research**, v. 1388, p. 48-55, 2011.

KITABATAKE, T.T.; MARINI, L.C.; GONÇALVES, R.C.; BERTOLINO, G.; DE SOUZA, H.C.D.; DE ARAUJO, J.E. Behavioral effects and neural changes induced by continuous and not continuous treadmill training, post bilateral cerebral ischemia in gerbils. **Behavioural Brain Research**, v. 291, p. 20-25, 2015.

KITABATAKE, T.T.; MARINI, P.; BERTOLINO, G.; DE ARAUJO, J.E. Distinct intensity and duration interfere with motor performance in ischemic gerbils post continuous and not continuous treadmill training. **Artigo em fase de publicação**, 2016.

KOLOMINSKY-RABAS, P.L.; WEBER, M.; GEFELLER, O.; NEUNDOERFER, B.; HEUSCHMANN, P.U. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. **Stroke**, v. 32, p. 2735-2740, 2001.

KRARUP, L.H.; GLUUD, C.; TRUELSEN, T.; PEDERSEN, A.; LINDAHL, M.; HANSEN, L.; MICHELSEN, S.; ANDERSEN, G.; ZENG, X.; KÖRV, J.; OSKEDRA, A.; BOYSEN, G. The Ex Stroke Pilot Trial: rationale, design, and baseline data of a randomized multicenter trial comparing physical training versus usual care after an ischemic stroke. **Contemporary Clinical Trials**, v. 29, p. 410-417, 2007.

KURU, P.; BILGIN, S.; MENTESE, S.T.; TAZEGUL, G.; OZGUR, S.; CILINGIR, O.T.; AKAKIN, D.; YARAT, A.; KASIMAY, O. Ameliorative effect of chronic moderate exercise in smoke exposed or nicotine applied rats from acute stress. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 17, p. 559-565, 2014.

KUTLU, M.G.; GOULD, T.J. Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders **Biochemical Pharmacology**, v. 97, p. 498-511, 2015.

LAKHAN, S.E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, p. 7-97, 2009.

LEE, H.H.; SHIN, M.S.; KIM, Y.S.; YANG, H.Y.; CHANG, H.K.; LEE, T.H.; KIM, C.J.; CHO, S.; HONG, S.P. Early treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 19, p. 339-346, 2005.

LEE, M.H.; KIM, H.; KIM, S.S.; LEE, T.H.; LIM, B.V.; CHANG, H.K.; JANG, M.H.; SHIN, M.C.; KIM, C.J. Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in

apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils. **Life Sciences**, v. 73, p. 2455-2465, 2003.

LEE, S.H.; KIM, Y.H.; KIM, Y.J.; YOON, B.W. Enforced physical training promotes neurogenesis in the subgranular zone after focal cerebral ischemia. **Journal of Neurological Science**, v. 269, p. 54-61, 2008.

LEE, S.U.; KIM, D.Y.; PARK, S.H.; CHOI, D.H.; PARK, H.W.; HAN, T.R. Mild to moderate early exercise promotes recovery from cerebral ischemia in rats. **Canadian Journal of Neurological Science**, v. 36, p. 443-449, 2009.

LEE, C.H.; YOO, K.Y.; CHOI, J.H.; PARK, O.K.; HWANG, I.K.; KIM, S.K.; KANG, I.J.; KIM, Y.M.; WON, M.H. Neuronal damage is much delayed and microgliosis is more severe in the aged hippocampus induced by transient cerebral ischemia compared to the adult hippocampus. **Journal of Neurology Science**, v. 294, p. 1-6, 2010.

LEITE, F.B.; PREDIGER, R.D.; SILVA, M.V.; SOUSA, J.B.; CARNEIRO, F.P.; GASBARRI, A.; TOMAZ, C.; QUEIROZ, A.J.; MARTINS, N.T.; FERREIRA, V.M. Role of nicotine on cognitive and behavioral deficits in sepsis-surviving rats. **Brain Research**, v., 1507, p. 74-82, 2013.

LEITE-ALMEIDA, H.; CERQUEIRA, J.J.; WEI, H.; RIBEIRO-COSTA, N.; ANJOS-MARTINS, H.; SOUSA, N.; PERTOVAARA, A.; ALMEIDA, A. Differential effects of left/right neuropathy on rats' anxiety and cognitive behavior. **Pain**, v. 153, p. 2218-2225, 2012.

LESTER, H.A.; XIAO, C.; SRINIVASAN, R.; SON, C.D.; MIWA, J.; PANTOJA, R.; BANGHART, M.R.; DOUGHERTY, D.A.; GOATE, A.M.; WANG, J.C. Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry. Implications for drug discovery. **AAPS Journal**, v. 11, p. 167-77, 2009.

LEUNG, P.Y.; HURST, S.; BERNY-LANG, M.A.; VERBOUT, N.G.; GAILANI, D.; TUCKER, E.I.; WANG, R.K.; MCCARTY, O.J.; GRUBER, A. Inhibition of Factor XII-Mediated Activation of Factor XI Provides Protection Against Experimental Acute Ischemic Stroke in Mice. **Translational Stroke Research**, v. 3, p. 381-389, 2012.

LEVINE, S.; SOHN, D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils; relation to incomplete circle of Willis. **Archives of Pathology Arch Pathol**, v. 87, p. 315-317, 1969.
LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews** Physiol Ver, v. 79, p. 1431-56, 1999.

MA, Y.; QIANG, L.; HE, M. Exercise therapy augments the ischemia-induced proangiogenic state and results in sustained improvement after stroke. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 8570–8584, 2013.

MACKAY-LYONS, M.; MCDONALD, A.; MATHESON, J.; ESKES, G.; KLUS, M. A. Dual effects of body-weight supported treadmill training on cardiovascular fitness and walking ability early after stroke: a randomized controlled trial. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, 27(7), 644- 653, 2013.

MALLARD, C.; VEXLER, Z.S. Modeling Ischemia in the Immature Brain: How Translational Are Animal Models? **Stroke**, v. 46, p. 3006-3011, 2015.

MANDA, V.K.; MITTAPALLI, R.K.; BOHN, K.A.; ADKINS, C.E.; LOCKMAN, P.R. Nicotine and cotinine increases the brain penetration of saquinavir in rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, p. 1495-1507, 2010.

MARTÍNEZ, N.S.; MACHADO, J.M.; SAAD, H.P.; ANTICH, R.M.C.; ACOSTA, J.A.B.; SALGUEIRO, S.R.; ILLERA, G.G.; ALBA, J.S.; HERRERA, D.G.B. Global brain ischemia in Mongolian gerbils: Assessing the level of anastomosis in the cerebral circle of Willis. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 72, p. 377-384, 2012.

MATSUDA, F.; SAKAKIMA, H.; YOSHIDA, Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. **Acta Physiologica**, v. 201, p. 275–287, 2011.

MATTSON, M.P.; DUAN, W.; PEDERSEN, W.A.; CULMSEE, C. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. **Apoptosis**, v. 6, p. 69-81, 2001.

MICHALSKI, D.; HÄRTIG, W.; KRUEGER, M.; HOBOHM, C.; KÄS, J.A.; FUHS, T. A novel approach for mechanical tissue characterization indicates decreased elastic strength in brain areas affected by experimental thromboembolic stroke. **Neuroreport**, v. 26, p. 583-587, 2015.

MIDDLETON, L.E.; CORBETT, D.; BROOKS, D.; SAGE, M.D.; MACINTOSH, B.J.; MCILROY, W.E.; BLACK, S.E. Physical activity in the prevention of ischemic stroke and improvement of outcomes: a narrative review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, p. 133-137, 2012.

MUNIZ, L.R.F.; FARIA, M.H.G.; VASCONCELOS, P.R.L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19(5), p. 529-534, 2004.

MURPHY, T.H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 861-872, 2009.

NELSON, L., TABET, N. Slowing the progression of Alzheimer's disease; what works? **Ageing Research Reviews**, v. 23, p. 193-209, 2015.

NESIL, T.; KANIT, L.; UGUR, M.; POGUN, S. Nicotine withdrawal in selectively bred high and low nicotine preferring rat lines. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 131, p. 91–97, 2015.

NEVES, L.M.S.; GUIRRO, E.C.O.; KITABATAKE, T.T.; DE ARAUJO, J.E. Motor Hyperactivity observed in adult Wistar rats after prolonged exposure to nicotine assessed by activity tracking. **Artigo em fase de publicação**, 2016.

NEWMAN, M.B.; ARENDASH, G.W.; SHYTLER, R.D.; BICKFORD, P.C.; TIGHE, T.; SANBERG, P.R. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. **Life Science**, v. 71, p. 2807-2820, 2002.

NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. **Life Science**, v. 69, p. 369-381, 2001.

NUDO, R.P. Adaptive plasticity in motor cortex: implications for rehabilitation after brain injury. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 41, p.7–10, 2003.

OH, H.A.; KIM, D.E.; CHOI, H.J.; KIM, N.J.; KIM, D.H. Anti-fatigue Effects of 20(S)-Protopanaxadiol and 20(S)-Protopanaxatriol in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 1415-1419, 2015.

PAGNUSSAT, A.S.; SIMAO, F.; ANASTACIO, J.R.; MESTRINER, R.G.; MICHAELSEN, S.M.; CASTRO, C.C.; SALBEGO, C.; NETTO, C.A. Effects of skilled and unskilled training on functional recovery and brain plasticity after focal ischemia in adult rats. **Brain Research**, v. 1486, p. 53-61, 2012.

PARK, H.J.; LEE, P.H.; AHN, Y.W.; CHOI, Y.J.; LEE, G.; LEE, D.Y.; CHUNG, E.S.; JIN, B.K. Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 79-89, 2007.

PAULSON, J.R.; YANG, T.; SELVARAJ, P.K.; MDZINARISHVILI, A.; VAN DER SCHYF, C.J.; KLEIN, J.; BICKEL, U.; ABBRUSCATO, T.J. Nicotine Exacerbates Brain Edema during In Vitro and In Vivo Focal Ischemic Conditions. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, p. 371-379, 2010.

PEHRSON, A.L.; PHILIBIN, S.D.; GROSS, D.; ROBINSON, S.E.; VANN, R.E.; ROSECRANS, J.A.; JAMES, J.R. The effects of acute and repeated nicotine doses on spontaneous activity in male and female Sprague Dawley rats: analysis of brain area epibatidine binding and cotinine levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 424-431, 2008.

PEREIRA, E.A.; WANG, S.; PATERSON, D.J.; STEIN, J.F.; AZIZ, T.Z.; GREEN, A.L. Sustained reduction of hypertension by deep brain stimulation. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, p. 124-127, 2010.

PETERSON, A.B.; ABEL, J.M.; LYNCH, W.J. Dose-dependent effects of wheel running on cocaine-seeking and pré-frontal córtex Bdnf exon IV expression in rats. **Psychopharmacology**, v. 231, p.1305-1314, 2014.

PICCIOTTO, M.R.; MINEUR, Y.S. Molecules and circuits involved in nicotine addiction: The many faces of smoking. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 545-553, 2014.

POSSELT, W., REIMANN, L. Chhemische Untersuchung des Tabaks and Darstellug des eigenthumlichen wirksamen Principis dieser fanze. **Geiger's Mag Parmac**, v. 24, p. 138-162, 1828.

PRUS, A.J.; VANN, R.E.; ROSECRANS, J.A.; JAMES, J.R.; PEHRSON, A.L.; O'CONNELL, M.M.; PHILIBIN, S.D.; ROBINSON, S.E. Acute nicotine reduces and repeated nicotine increases spontaneous activity in male and female Lewis rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, p. 150-154, 2008.

QUIRIE, A.; HERVIEU, M.; GARNIER, P.; DEMOUGEOT, C.; MOSSIAT, C.; BERTRAND, N.; MARTIN, A.; MARIE, C.; PRIGENT-TESSIER, A. Comparative effect

of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. **PLoS ONE** 7, 44218, 2012.

RAOUFI, N.; PIRI, M.; MOSHFEGH, A.; SHAHIN, M-S. Nicotine improves ethanol-induced impairment of memory: possible involvement of nitric oxide in the dorsal hippocampus of mice. **Neuroscience**, v. 219, p. 82-91, 2012.

REIMERS, C.D.; KNAPP, G.; REIMERS, A.K. Exercise as stroke prophylaxis. *Deutsches Ärzteblatt International* Dtsch Arztebl Int., v. 106, p. 715-721, 2009.

RILJACK, V.; MARESOVA, D.; POKORNÝ, J. Nicotine effects on rat seizures susceptibility and hippocampal neuronal degeneration. **Neuroendocrinology Letters**, v. 31, p. 792-795, 2010.

ROBERTS, V.; MADDISON, R.; SIMPSON, C.; BULLEN, C.; PRAPAVESSIS, H. The acute effects of exercise on cigarette cravings, withdrawal symptoms, affect and smoking behavior: systematic review update and meta-analysis. **Psychopharmacology**, v. 222, p. 1-15, 2012.

RODRIGUES, E.S.R.; CASTRO, K.A.B.; REZENDE, A.A.B.; HERRERA, A.D. C.C.; PEREIRA, A.M.P.; TANAKADA, J.A.P. Fatores de risco cardiovascular em pacientes com acidente vascular cerebral. **Revista Amazônia**, v. 1(2), p.: 21-28, 2013.

ROSAMOND, W.; FLEGAL, K.; FRIDAY, G.; FURIE, K.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HO, M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KITTNER, S.; LLOYD-JONES, D.; MCDERMOTT, M.; MEIGS, J.; MOY, C.; NICHOL, G.; O'DONNELL, C.J.; ROGER, V.; RUMSFELD, J.; SORLIE, P.; STEINBERGER, J.; THOM, T.; WASSERTHIEL-SMOLLER, S.; HONG, Y. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 115, p. 69-171, 2007.

ROSECRANS, J.A. The psychopharmacological basis of nicotine's differential effects on behavior: individual subject variability in the rat. **Behavior Genetics**, v. 25, p. 187-196, 1995.

SAKAKIMA, H.; KHAN, M.; DHAMMU, T.S.; SHUNMUGAVEL, A.; YOSHIDA, Y.; SINGH, I.; SINGH, A.K. Stimulation offunctional recovery via the mechanisms of neurorepair by S-nitrosoglutathione and motor exercise in a rat model of transient cerebral ischemia and reperfusion. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 30, p. 383–396, 2012.

SALAZAR-COLOCHO, P.; LANCIEGO, J.L.; DEL-RIO, J.; FRENCHILLA, D. Ischemia induces cell proliferation and neurogenesis in the gerbil hippocampus in response to neural death. **Neuroscience Research**, v. 61, p. 27-37, 2008.

SANCHEZ, V.; MOORE, C.F.; BRUNZELL, D.H.; LYNCH, W.J. Sex differences in the effect of wheel running on subsequent nicotine seeking in a rat adolescent-onset self-administration model. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 1753-1762, 2014.

SCOPEL, D.; FOCESATTO, C.; CIMAROSTI, H.; RABBO, M.; BELLÓ-KLEIN, A.; SALBEGO, C. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampus slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research Bulletin**, v. 71, p. 155-159, 2006.

SERVAIS, S.; COUTURIER, K.; KOUBI, H.; ROUANET, J.L.; DESPLANCHES, D.; SORNAY-MAYET, M.H.; SEMPORE, B.; LAVOIE, J.M.; FAVIER, R. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 24-32, 2003.

SHAH, K.K.; BOREDDY, P.R.; ABBRUSCATO, T.J. Nicotine pre-exposure reduces stroke-induced glucose transporter-1 activity at the blood–brain barrier in mice. **Fluids Barriers CNS**, v. 29, p.12-22, 2015.

SHIMADA, H.; HAMAKAWA, M.; ISHIDA, A.; TAMAKOSHI, K.; NAKASHIMA, H.; ISHIDA, K. Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Behavior Brain Research**, v. 243, p. 21-27, 2013.

SHIN, S.S.; BRAY, E.R.; DIXON, C.E. Effects of Nicotine Administration on Striatal Dopamine Signaling after Traumatic Brain Injury in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, p. 843–850, 2012.

SHU, H.; Zheng, G.; Wang, X.; Sun, Y.; Liu, Y.; Weaver, J.M.; Shen, X.; Liu, W.; Jin, X. Activation of matrix metalloproteinase in dorsal hippocampus drives improvement in spatial working memory after intra-VTA nicotine infusion in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, p. 257-367, 2015.

SILVEIRA, A.P.C.; KITABATAKE, T.T.; PATALEO, V.M.; ZANGROSSI, H. Continuous and not continuous treadmill training enhances the performance in the passive avoidance test in ischemic gerbils. **Artigo em fase de publicação**, 2016.

SIM, Y.J., KIM, H., KIM, J.Y., YOON, S.J., KIM, S.S., CHANG, H.K., LEE, T.H., LEE, H.H., SHIN, M.C., SHIN, M.S., KIM, S.J. Long-term treadmill exercise overcomes ischemia-induced apoptotic neuronal cell death in gerbils. **Physiology & Behavior**, v. 84, p. 733-738, 2005.

SIM, Y.J.; KIM, S.S.; KIM, J.Y.; SHIN, M.S.; KIM, C.J. Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils. **Neuroscience Letters**, v. 36:372(3), p.: 256-261, 2004.

SINHA, K., CHAUDHARY, G., GRUPTA, Y.K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Sciences**, v. 71, p. 655-665, 2002.

SONG, M.K.; SEON, H.J.; KIM, I.G.; HAN, J.Y.; CHOI, I.S.; LEE, S.G. The effect of combined therapy of exercise and nootropic agent on cognitive function in focal cerebral infarction rat model. **Archive of Annals of Rehabilitation Medicine**, v. 36, p. 303–310, 2012.

SOUZA, T.A.; ROMANO-SILVA, M.A.; MIRANDA, D.M.; MALLOY-DINIZ, L.F.; BENDA, R.N.; UGRINOWITSCH, H.; LAGE, G.M. The primary motor cortex is associated with learning the absolute, but not relative, timing dimension of a task: A tDCS study. **Physiology & Behavior**, v. 160, p. 18-25, 2016.

SPOLAORE, P.; BROCCO, S.; FEDEJI, U.; VISENTIN, C.; SCHIEVANO, E.; AVOSSA, F.; MILAN, G.; VANUZZO, D.; PILOTTO, L.; PESSINA, A. C.; BONITA, R. Measuring accuracy of discharge diagnoses for a region-wide surveillance of hospitalized strokes. **Stroke**, v 36(5), p.: 1031-1034, 2005.

STROUD, N.; MAZWI, T.M.; CASE, L.D.; BROWN Jr, R.D.; BROTT, T.G.; WORRALL, B.B.; MESCHIA, J.F. Prestroke physical activity and early functional status after stroke. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 80, p. 1019-1022, 2009.

SYMONS, J.D.; STEBBINS, C.L. Hemodynamic and regional blood flow responses to nicotine at rest and during exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise** Med Sci Sports Exerc, v.28, p. 457-67, 1996.

TALY, A.; CORRINGER, P.J.; GUEDIN, D.; LESTAGE, P.; CHANGEUX, J.P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery** Nat Rev Drug Discov, v. 8, p. 733-750, 2009.

TAYLOR, A. H.; USSHER, M. H.; FAULKNER, G. The acute effects of exercise on cigarette cravings, withdrawal symptoms, affect and smoking behaviour: a systematic review. **Addiction**, v. 102, p. 534-543, 2007.

THOMAS, A.G.; DENNIS, A.; BANDETTINI, P.A.; JOHANSEN-BERG, H. The effects of aerobic activity on brain structure. **Frontiers in Psychology**, v. 3, article 86, 2012.

TIAN, S.; PAN, S.; YOU, Y. Nicotine enhances the reconsolidation of novel object recognition memory in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 129, p. 14-18, 2015.

USSHER, M. H.; TAYLOR, A.; FAULKNER, G. Exercise interventions for smoking cessation. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 8;(4):CD002295, 2012.

VIOLA, G.G.; RODRIGUES, L.; AMÉRICO, J.C.; HANSEL, G.; VARGAS, R.S.; BIASIBETTI, R.; SWAROWSKY, A.; GONÇALVES, C.A.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M.; SOUZA, D.O.; AMARAL, O.B. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. **Brain Research**, v. 1274, p. 47-54, 2009.

WAHL, A.S.; SCHWAB, M.E. Finding an optimal rehabilitation paradigm after stroke: enhancing fiber growth and training of the brain at the right moment. **Frontiers**, v. 7:9, p. 1-13, 2014.

WECKER, L.; ENGBERG, M.E.; PHILPOT, R.M.; LAMBERT, C.S.; KANG, C.W.; ANTILLA, J.C.; BICKFORD, P.C.; HUDSON, C.E.; ZESIEWICZ, T.A.; ROWELL, P.P. Neuronal Nicotinic Receptor Agonists Improve Gait and Balance in Olivocerebellar Ataxia. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 75-86, 2013.

WELCH, K.D.; PFISTER, J.A.; LIMA, F.G.; GREEN, B.T.; GARDNER, D.R. Effect of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists and antagonists on motor function in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, p. 66-374, 2013.

WILL B.; GALANI R.; KELCHE C.; ROSENZWEIG M.R. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002). **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 167-181, 2004.

WINTER, B.; JUCKEL, G.; VIKTOROV, I.; KATCHANOV, J.; GIETZ, A.; SOHR, R. Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1166-1175, 2005.

WOLFE, C.D.; TILLING, K.; RUDD, A.G. The effectiveness of community-based rehabilitation for stroke patients who remain at home: a pilot randomized trial. **Clinical Rehabilitation**, v. 14, p. 563-569, 2000.

WOODRUFF, T.M.; THUNDYIL, J.; TANG, S.C.; SOBEY, C.G.; TAYLOR, S.M.; ARUMUGAM, T. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, p. 11, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Mental Health and Substance Abuse, Global Status Report on Alcohol 2011, **World Health Organization Department of Mental Health and Substance Abuse**, Geneva, Switzerland, 2011.

YAN, B.C., PARK, J.H., KIM, S.K., CHOI, J.H., LEE, C.H., YOO, K.Y., KWON, Y.G., KIM, Y.M., KIM, J.D., WON, M.H. Comparison of trophic factors changes in the hippocampal CA1 region between the young and adult gerbil induced by transient cerebral ischemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Cell Mol Neurobiol, v. 32, p. 1231-1242, 2012.

YAN, B.C.; OHK, T.G.; AHN, H.; PARK, J.H.; CHEN, B.H.; LEE, J.C.; LEE, C.H.; SHIN, M.C.; HWANG, I.K.; MOON, S.M.; CHO, J.H.; WON, M.H. Differences in neuronal damage and gliosis in the hippocampus between young and adult gerbils induced by long duration of transiente cerebral ischemia. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 337, p. 129-136, 2014.

YAN, B.C.; PARK, J.H.; LEE, C.H.; YOO, K.Y.; CHOI, J.H.; LEE, Y.J.; CHO, J.H.; BAEK, Y.Y.; KIM, Y.M.; WON, M.H. Increases of antioxidants are related to more delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region of the young gerbil induced by transient cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 1425, p.142-54, 2011.

YAN, G.; XUAN, Y.; DAI, Z.; ZHANG, G.; XU, H.; MIKULIS, D.; WU, R. Evolution of blood-brain barrier damage associated with changes in brain metabolites following acute ischemia. **Neuroreport**, v. 26, p. 945-951, 2015.

YANG, Y.R.; CHANG, H.C.; WANG, P.S.; WANG, R.Y. Motor performance improved by exercises in cerebral ischemic rats. **Journal of Motor Behavior**, v. 44, p. 97-103, 2012.

YANG, Y.R.; WANG, R.Y.; WANG, P.S. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 91-94, 2003.

YU, K.; WU, Y.; ZHANG, O.; XIE, H.; LIU, G.; GUO, Z.; LI, F.; JIA, J.; KUANG, S.; HU, R. Enriched environment induces angiogenesis and improves neural function outcomes in rat stroke model. **Journal of the Neurological Science**, v. s 347, p. 275–280, 2014.

YUNG, L.M.; LAHER, I.; YAO, X.; CHEN, Z.Y.; HUANG, Y.; LEUNG, F.P. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). **Sports Medicine**, v. 39, p. 45-63, 2009.

ZAITUNE, M. P. A; BARROS, M. B. A; LIMA, M. G; CÉSAR, C. L. G.; CARANDINA, L; GOLDBAUM, M; ALVES, M. C. G. P. Fatores associados ao tabagismo em idosos: Inquérito de Saúde no Estado de São Paulo (ISA-SP) **Cadernos Saúde Pública**, v. 28, n.3, Rio de Janeiro, 2012.

ZHANG, F.; GUO, A.; LIU, C.; COMB, M.; HU, B. Phosphorylation and assembly of glutamate receptors after brain ischemia. **Stroke**, v. 44, p. 170-176, 2013.

ZHANG, F.; GUO, R.M.; YANG, M.; WEN, X.H.; SHEN, J. A stable focal cerebral ischemia injury model in adult mice: assessment using 7T MR imaging. **American Journal of Neuroradiology**, v. 33, p. 935-939, 2012.

ZHANG, F.; JIA, J.; WU, Y.; HU, Y.; WANG, Y. The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2658-2669, 2010.

ZHENG, Q.; ZHU, D.; BAI, Y.; WU, Y.; JIA, J.; HU, Y. Exercise improves recovery after ischemic brain injury by inducing the expression of angiopoietin-1 and Tie-2 in rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 224, p. 221–228, 2011.

ZHU, J.; LIU, Q.; JIANG, Y.; WU, L.; XU, G.; LIU, X. Enhanced Angiogenesis Promoted By Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell Transplantation In Stroked Mouse Is Notch1 Signaling Associated. **Neuroscience**, v. 290, p. 288-299, 2015.